คู่มือการปฏิบัติงาน

เรื่อง การสกัดสารพันธุกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพเบื้องต้น

จัดทำโดย

กันตา แสงวิจิตร

นักวิจัย

สังกัดคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา

คำนำ

คู่มือปฏิบัติงานการสกัดสารพันธุกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพเบื้องต้นฉบับนี้จัดทำขึ้นเพื่อใช้เป็นคู่มือในการปฏิบัติงานและใช้ในการสนับสนุนการเรียนการสอนรวมถึงงานวิจัย ของนักวิจัย นักวิทยาศาสตร์ นิสิต และบุคลากรที่เกี่ยวข้องทั้งภายในและภายนอกองค์กร และใช้เป็นแนวทางปฏิบัติให้เป็นแนวทางเดียวกันในการดำเนินงานวิจัยในห้องปฏิบัติการ เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุด

ผู้เขียนหวังว่าคู่มือปฏิบัติการฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการปฏิบัติงานและการเรียนการสอนโดยเฉพาะการสนับสนุนการเรียนในสาขาที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ วิชาเทคโนโลยีชีวภาพเบื้องต้นและการศึกษาอิสระ ที่นิสิตและผู้สนใจจำเป็นต้องมีความเข้าใจตั้งแต่องค์ความรู้พื้นฐานของสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต รวมถึงขั้นตอนพื้นฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ตลอดจนการใช้เทคนิคที่เกี่ยวข้องและการนำองค์ความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการวิจัย การเรียนรวมถึงการต่อยอดนำไปใช้เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ หรือนำไปใช้พัฒนางานที่เกี่ยวข้องได้ ผู้เขียนหวังว่าคู่มือฉบับนี้จะสามารถเป็นแนวทางในการปฏิบัติงานเกี่ยวกับด้านพันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ และสามารถนำไปใช้ประโยชน์สำหรับงานวิจัยอื่น ๆ ได้

กันตา แสงวิจิตร
นักวิจัย

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	ก
สารบัญ	ข
สารบัญตาราง	ง
สารบัญภาพ	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.4 ขอบเขต	3
1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ	3
บทที่ 2 บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบ	5
2.1 โครงสร้างองค์กร	5
2.2 ลักษณะงานที่ปฏิบัติและภาระหน้าที่ของนักวิจัย	8
2.3 บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบของตำแหน่ง	9
2.4 ลักษณะงานที่ปฏิบัติ	10
บทที่ 3 หลักเกณฑ์ วิธีการปฏิบัติงาน และเงื่อนไข	13
3.1 หลักเกณฑ์การปฏิบัติงาน	13
3.2 วิธีการปฏิบัติงาน	14
3.3 ข้อควรระวังและสิ่งที่ควรคำนึงถึงในการปฏิบัติงาน	15
3.4 แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	16
บทที่ 4 เทคนิคในการปฏิบัติงาน	49
4.1 แผนปฏิบัติงาน	49
4.2 ขั้นตอนการปฏิบัติงาน	50

4.3 การติดตามผลปฏิบัติงานและสรุปผลการทดลอง 67

4.4 จรรยาบรรณ/คุณธรรม/จริยธรรมในการปฏิบัติงาน 70

บทที่ 5 ปัญหา อุปสรรค และข้อเสนอแนะ 73

5.1 ปัญหา อุปสรรคในการปฏิบัติงาน 73

5.2 ข้อเสนอแนะ 75

บรรณานุกรม 76

ประวัติผู้เขียน 79

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 3.4.1	แสดงความเข้มข้นของ agarose gel ที่ใช้ในการแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอในช่วงต่าง ๆ	27
ตารางที่ 3.4.2	แสดงคุณสมบัติและองค์ประกอบที่ต้องใช้ในการทำงานของเอนไซม์ Endonucleases ทั้ง 3 ชนิด	29
ตารางที่ 3.4.3	ตัวอย่างและบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะบางชนิดที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการ	30
ตารางที่ 3.4.4	แสดงยีนติดตามคัดเลือก (selectable marker) ที่นิยมใช้ในการโคลนยีน	32
ตารางที่ 3.4.5	ตัวอย่างพลาสมิดที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการและคุณสมบัติบางประการของพลาสมิด	33
ตารางที่ 4.1.1	แผนการดำเนินเตรียมการทดลองเกี่ยวกับการสกัดสารพันธุกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพเบื้องต้น	50
ตารางที่ 4.2.1	อธิบายขั้นตอนการปฏิบัติงานการสกัดสารพันธุกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพเบื้องต้นเพื่อใช้ในงานวิจัย	52
ตารางที่ 4.2.2	ส่วนผสมของสารละลายเพื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชด้วยเทคนิค HAT-RAPD	59
ตารางที่ 4.2.3	ขั้นตอนการทำ PCR ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม	60
ตารางที่ 4.3.1	บันทึกผลการทดลองการสกัดดีเอ็นเอพืช แบคทีเรียและพลาสมิดดีเอ็นเอ	67
ตารางที่ 5.1.1	แสดงปัญหาและอุปสรรคและแนวทางแก้ไขและพัฒนางาน	73

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 2.1.1	โครงสร้างองค์กร คณะวิทยาศาสตร์	6
ภาพที่ 2.1.2	โครงสร้างการบริหาร คณะวิทยาศาสตร์	7
ภาพที่ 2.1.3	โครงสร้างการแบ่งส่วนงาน งานแผนงาน	7
ภาพที่ 2.1.4	โครงสร้างบริหารงานแผนงานของคณะวิทยาศาสตร์	8
ภาพที่ 3.4.1	แสดงองค์ประกอบและขั้นตอนการทำปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction)	21
ภาพที่ 3.4.2	แสดงเครื่อง Thermal cycler รุ่นT100 จากบริษัท BIO-RAD	24
ภาพที่ 3.4.3	แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสกุล *Zanthoxylum* spp. 15 ตัวอย่างได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยกระบวนการ PCR	25
ภาพที่ 3.4.4	แสดงกล่องบรรจุบัฟเฟอร์ที่มีขั้วฟ้า (gel chamber)	26
ภาพที่ 3.4.5	แสดงรูปเครื่องกำเนิดไฟฟ้าที่ต่อกับกล่องบรรจุบัฟเฟอร์ ที่มีขั้วฟ้า (gel chamber)	26
ภาพที่ 3.4.6	แสดงการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอโดยแถบดีเอ็นตัวอย่าง คือ DNA Ladder (DM003-R500, Bio-Helix) ในอะกาโรสเจล ความเข้มข้นร้อยละ 2 ที่ถูกย้อมด้วยสี Novel Juice	28
ภาพที่ 3.4.7	แสดงลักษณะของพลาสมิดที่เป็นโมเลกุลของดีเอ็นเอวงกลม ขนาดเล็กที่อยู่ในเซลล์แบคทีเรีย	31
ภาพที่ 3.4.8	แสดงแผนที่พันธุกรรมและรายละเอียดของพลาสมิด pTZ57R/T	34
ภาพที่ 3.4.9	แสดงแผนที่พันธุกรรมและรายละเอียดของพลาสมิด pUC19	34
ภาพที่ 3.4.10	แสดงแผนที่พันธุกรรมและรายละเอียดของพลาสมิด pCR Blunt II TOPO	35
ภาพที่ 3.4.11	แสดงแผนที่พันธุกรรมและรายละเอียดของพลาสมิด pETDuet-1	35
ภาพที่ 3.4.12	แสดงแผนที่พันธุกรรมและรายละเอียดของพลาสมิด pET-22b(+)	36
ภาพที่ 3.4.13	แสดงการเชื่อมต่อดีเอ็นเอแบบปลายเหนียวสองสายเข้าด้วยกันด้วยเอนไซม์ไลเกส	37
ภาพที่ 3.4.14	แสดงการเชื่อมต่อดีเอ็นเอแบบปลายทู่สองสายเข้าด้วยกันด้วยเอนไซม์ไลเกส	38

ภาพที่ 3.5.1	เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (auto pipette) และทิปปิเปต (tip)	43
ภาพที่ 3.5.2	เครื่องชั่งไฟฟ้า	43
ภาพที่ 3.5.3	เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)	44
ภาพที่ 3.5.4	หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)	44
ภาพที่ 3.5.5	เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน	45
ภาพที่ 3.5.6	ตู้แช่แข็ง	45
ภาพที่ 3.5.7	ตู่บ่มเชื้อ	46
ภาพที่ 3.5.8	ตู้อบความร้อนแห้ง	46
ภาพที่ 3.5.9	เครื่อง thermocycle	47
ภาพที่ 3.5.10	หลอดไมโครเซนติฟิวขนาด 1,500 และ 200 ไมโครลิตร	47
ภาพที่ 3.5.11	ถาดเตรียม agarose gel	48
ภาพที่ 3.5.12	กล่องบรรจุบัฟเฟอร์ที่มีขั้วฟ้า (gel chamber) ที่ต่อกับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า (power supply)	48
ภาพที่ 4.2.1	แสดงการเตรียมตัวอย่างพืชเพื่อสกัดดีเอ็นเอ	55
ภาพที่ 4.2.2	แสดงการบดใบพืชเพื่อสกัดดีเอ็นเอ	55
ภาพที่ 4.2.3	แสดงการตักใส่ใบพืชบดละเอียดลงในหลอดเก็บตัวอย่างขนาด 1.5 มิลลิลิตร	55
ภาพที่ 4.2.4	เซลล์แบคทีเรียในหลอดเก็บตัวอย่างขนาด 1.5 มิลลิลิตร	57
ภาพที่ 4.2.5	แสดงการเตรียม PCR master mix	59
ภาพที่ 4.2.6	แสดงบริเวณฝาเครื่องที่เป็นบริเวณที่มีความร้อนสูง	60
ภาพที่ 4.2.7	agarose gel ที่ถูกอุ่นจนละลายเข้ากัน	61
ภาพที่ 4.2.8	แสดงจากนั้นเทเจลลงในถาดแม่พิมพ์	62
ภาพที่ 4.2.9	แสดงการหยอด PCR product ที่ผสมกับ loading dye ลงในเจล	62

บทที่1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ความรู้ทางวิทยาศาสตร์สามารถใช้พัฒนาและปรับปรุงพันธุ์ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ เพื่อเพิ่มคุณภาพและผลผลิตให้พอเพียงกับความต้องการของประชากรโลกที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในทุกปี มนุษย์ได้เพาะพันธุ์พืช สัตว์ และจุลินทรีย์เพื่อให้ได้ลักษณะตามที่ต้องการสำหรับการใช้งานที่แตกต่างกัน ในอดีตการปรับปรุงพันธุ์สิ่งมีชีวิตมักทำโดยการคัดเลือกอย่างง่ายหรือแบบดั้งเดิมด้วยการผสมข้ามพันธุ์ โดยพิจารณาจากคุณสมบัติที่ต้องการ เช่น ความแข็งแรงของพืชหรือสัตว์ มีลักษณะและรสชาติที่ต้องการ เติบโตเร็ว จนกระทั่งในช่วงปี ค.ศ. 1860 Gregor Mendel ได้แสดงให้เห็นถึงกระบวนการถ่ายทอดทางพันธุกรรม โดยการทดลองผสมพันธุ์ถั่วหลายชนิดเข้าด้วยกัน ความรู้ที่ได้จากการทดลองนี้ปูทางไปสู่การปรับปรุงพันธุ์ทางเกษตรแบบใหม่โดยแสดงให้เห็นว่าลักษณะทางพันธุกรรมได้รับการถ่ายทอดในรูปแบบที่คาดการณ์ได้ (Mendel, 1866) นับแต่นั้นเป็นต้นมา พืชจำนวนมากได้รับการคัดเลือกให้มีคุณลักษณะตามที่เกษตรกรต้องการ เช่น สามารถต้านทานศัตรูพืชและโรคได้ดี ทนทานต่อสภาพแวดล้อม การผสมพันธุ์แบบเดิมยังคงมีบทบาทสำคัญในการปรับปรุงพืชผลทางการเกษตรและสัตว์เลี้ยงที่ใช้ในการผลิตอาหาร อย่างไรก็ตามการผสมพันธุ์แบบดั้งเดิมใช้ระยะเวลาในการทดลองนานรวมถึงต้องใช้แรงงานและพื้นที่ในการทดลองเป็นจำนวนมาก

พันธุวิศวกรรม หมายถึง กระบวนการเปลี่ยนแปลงหรือดัดแปลงสารพันธุกรรม (genetic material) ของสิ่งมีชีวิตโดยการถ่ายทอดยีนที่สนใจศึกษาจากสิ่งมีชีวิตหนึ่งสู่อีกสิ่งมีชีวิตเพื่อพัฒนาสิ่งมีชีวิตให้มีลักษณะตามที่ต้องการ โดยการสร้างดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA) ที่เกิดจากการเชื่อมสายดีเอ็นเอจากต่างแหล่งเข้าด้วยกัน เทคโนโลยีดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA technology) หรือ genetic manipulation จึงเป็นเทคนิคในการสร้างดีเอ็นเอใหม่ มีขั้นตอนในการเพิ่มปริมาณยีนที่ต้องการ (gene cloning) และเกี่ยวข้องกับกลุ่มของเทคนิคที่ใช้ในการออกแบบ ตัดและรวมสารพันธุกรรมเข้าด้วยกันโดยเฉพาะดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกัน เพื่อนำดีเอ็นเอลูกผสมถ่ายทอดไปสู่อีกสิ่งมีชีวิตนึง (Rosenberg, 2017) เพื่อเปลี่ยนแปลง ซ่อมแซม หรือปรับปรุงรูปแบบหรือการทำงาน นำไปสู่การพัฒนาลักษณะของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการได้อย่างจำเพาะเจาะจง หรือเพิ่มผลผลิตของสิ่งมีชีวิตหนึ่งในจุลชีพอื่น ๆ เช่นการผลิตอินซูลินของมนุษย์ในแบคทีเรีย และวัคซีนต่าง ๆ (Amarakoon et al., 2017) โดยการสร้างดีเอ็นเอสายผสมมีขั้นตอนหลัก ๆ ดังนี้

1.1.1 การเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ (DNA extraction)

1.1.2 การเพิ่มปริมาณยีน (gene cloning)

1.1.3 การเลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะในการโคลนยีน (restriction enzyme)

1.1.4 การเลือกใช้ดีเอ็นเอพาหะและการเชื่อมชิ้นส่วนยีนเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ (vector and ligation)

1.1.5 การส่งถ่ายดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (transformation)

1.1.6 การติดตามคัดเลือกเซลล์เจ้าบ้านที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสม (screening recombinant vector)

จากที่กล่าวมาข้างต้น การทำงานด้านพันธุวิศวกรรมเป็นการทำงานกับสารพันธุกรรมโดยตรงเพื่อปรับปรุงสิ่งมีชีวิตให้มีคุณสมบัติตามที่ต้องการในระยะเวลาอันสั้น คู่มือปฏิบัติการนี้กล่าวถึงขั้นตอนการปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการพันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพเบื้องต้น อันประกอบไปด้วยการสกัดดีเอ็นเอซึ่งเป็นสารพันธุกรรมจากพืชและแบคทีเรียตลอดจนการเพิ่มปริมาณยีนที่สนใจ การเชื่อมต่อและส่งถ่ายดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน โดยการใช้ขั้นตอนที่อ้างอิงจากงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์และทำการดัดแปลงให้เหมาะสมต่อการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ Plasma bioengineering คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการทำวิจัยตลอดจนการศึกษาของนิสิตและผู้ที่สนใจต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อให้ผู้ปฏิบัติงานสามารถวางแผนงานเป็นขั้นตอน จัดเตรียมอุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการปฏิบัติการด้านพันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพได้

1.2.2 เพื่อใช้สนับสนุนการเรียนการสอน การวิจัยของอาจารย์ นิสิต และบุคลากรในคณะให้ดำเนินงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ

1.2.3 เพื่อให้การปฏิบัติงานเป็นไปตามมาตรฐานเดียวกันและปฏิบัติงานได้อย่างถูกต้อง ใช้เวลาในการทำงานน้อยลงและสามารถปฏิบัติงานแทนกันได้

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ผู้ปฏิบัติงานสามารถวางแผนงานเป็นขั้นตอน จัดเตรียมอุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการปฏิบัติการด้านพันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพได้

1.3.2 ได้คู่มือปฏิบัติงานสำหรับใช้สนับสนุนการเรียนการสอน การวิจัยของอาจารย์และบุคลากรในคณะให้ดำเนินงานได้อย่างมีประสิทธิภาพทำให้สามารถปฏิบัติงานได้อย่างถูกต้อง โดยเข้าใจ หลักเกณฑ์ วิธีปฏิบัติงานและขั้นตอนการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวดเร็ว และปลอดภัย

1.3.3 การปฏิบัติงานเป็นไปตามมาตรฐานเดียวกันและปฏิบัติงานได้อย่างถูกต้อง ใช้เวลาในการทำงานน้อยลงและสามารถปฏิบัติงานแทนกันได้

1.4 ขอบเขต

คู่มือฉบับนี้เป็นคู่มือปฏิบัติการเพื่อใช้ในหน่วย Plasma bioengineering คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา โดยมีขอบเขตครอบคลุมเนื้อหาพื้นฐานของกระบวนการพันธุวิศกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพเบื้องต้น รวมไปถึงการปฏิบัติงานการเตรียมสารเคมีและการเลือกใช้อุปกรณ์สำหรับการทำวิจัยเกี่ยวกับดีเอ็นเอตั้งแต่การสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ การตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอและการประยุกต์ใช้ในการทำวิจัย เพื่อใช้เป็นแนวทางในการทำวิจัยและเพื่อสนับสนุนการเรียนการสอนรายวิชาการศึกษาอิสระและวิชาเทคโนโลยีชีวภาพเบื้องต้น ที่ต้องวางแผนการทดลองและจัดเตรียมสารเคมีและอุปกรณ์เป็นประจำก่อนการทดลอง ซึ่งเป็นการใช้แนวทางการปฏิบัติให้เป็นมาตรฐานเดียวกัน ลดเวลาในการทำงานและทำให้การปฏิบัติการเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ

1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ

ดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid; DNA) คือ สารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตทำหน้าที่เก็บข้อมูลทางพันธุกรรม ทำหน้าที่เก็บรักษาและถ่ายทอดรหัสพันธุกรรมซึ่งมีความสำคัญต่อการกำหนดลักษณะต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิต แต่ละสายของดีเอ็นเอประกอบด้วย น้ำตาล deoxy ribose หมู่ฟอสเฟต และเบส ได้แก่ อะดีนีน (A) ไทมีน (T) ไซโตซีน (C) และกัวนีน (G)

กรดนิวคลิอิก (nucleic acid) คือ สารชีวโมเลกุลประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) หลาย ๆ หน่วยที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ (phosphodiester bond)

นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) คือ เป็นโครงสร้างที่ประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟตและนิวคลีโอไซด์ (nucleoside) โดยนิวคลีโอไซด์ประกอบด้วยไนโตรจีนัสเบส (nitrogenous base; เรียกสั้นๆ ว่าเบส) กับน้ำตาลเพนโทส (มีคาร์บอน 5 โมเลกุล)

จีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) คือ ดีเอ็นเอทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น

สารคีเลต (chelating agent) คือ สารอินทรีย์ซึ่งสามารถจับกับแร่ธาตุประจุบวก โดยสารคีเลตจะล้อมแคตไอออน หรือประจุบวกของธาตุที่เป็นโลหะไว้ เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีโลหะถูกจับอยู่ในโมเลกุลไม่เปิดโอกาสให้ประจุลบจากที่อื่นเข้าทำปฏิกิริยาได้

บัฟเฟอร์ คือ สารละลายที่มีความสามารถในการควบคุมระดับ pH เอาไว้ได้ในระดับหนึ่ง เมื่อเติมสารละลายกรดหรือเบสจำนวนที่ไม่มากเกินไป

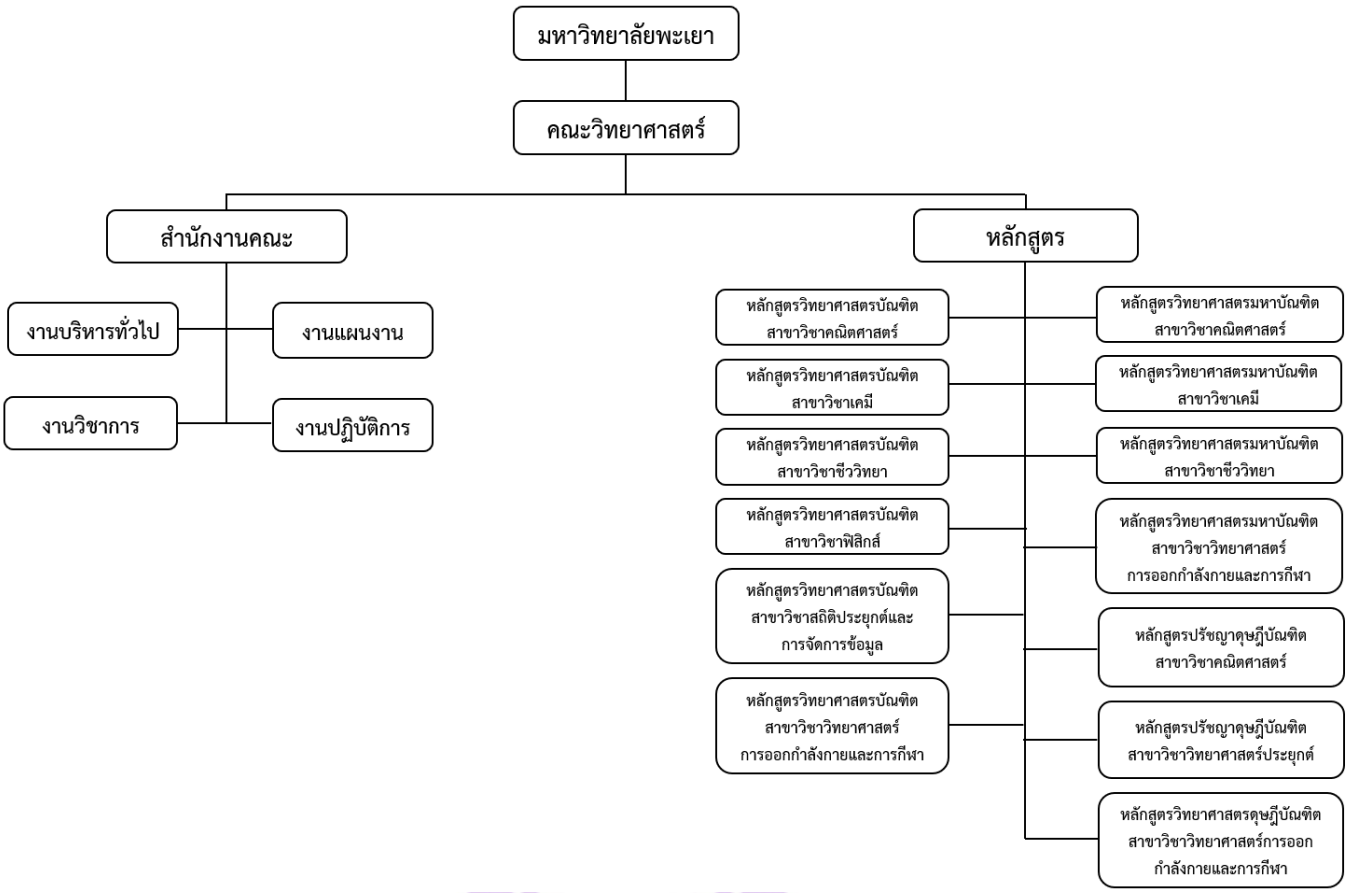
บทที่2
บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบ

2.1 โครงสร้างองค์กร

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา เป็นหน่วยงานวิชาการระดับคณะ ของมหาวิทยาลัยพะเยาเปิดทำการเรียนการสอนด้านวิทยาศาสตร์ เพื่อผลิตบัณฑิตที่มีความรู้ความสามารถ ส่งมอบบัณฑิตที่มีสมรรถนะ ผลิตงานวิจัยและนวัตกรรมสู่ชุมชนและผู้ประกอบการ สร้างผลงานเป็นที่ประจักษ์ในระดับสากล พร้อมปรับตัวเพื่อโลกอนาคตสู่การพัฒนาที่ยั่งยืน ซึ่งได้มีการแบ่งโครงสร้างภายในองค์กร ออกเป็น 2 ส่วนงาน ได้แก่

2.1.1 สำนักงานคณะวิทยาศาสตร์ โดยมีหัวหน้าสำนักงานคณะเป็นผู้บังคับบัญชาชั้นต้น ซึ่งประกอบด้วย งานบริหารทั่วไป งานวิชาการ งานแผนงาน และงานปฏิบัติการ

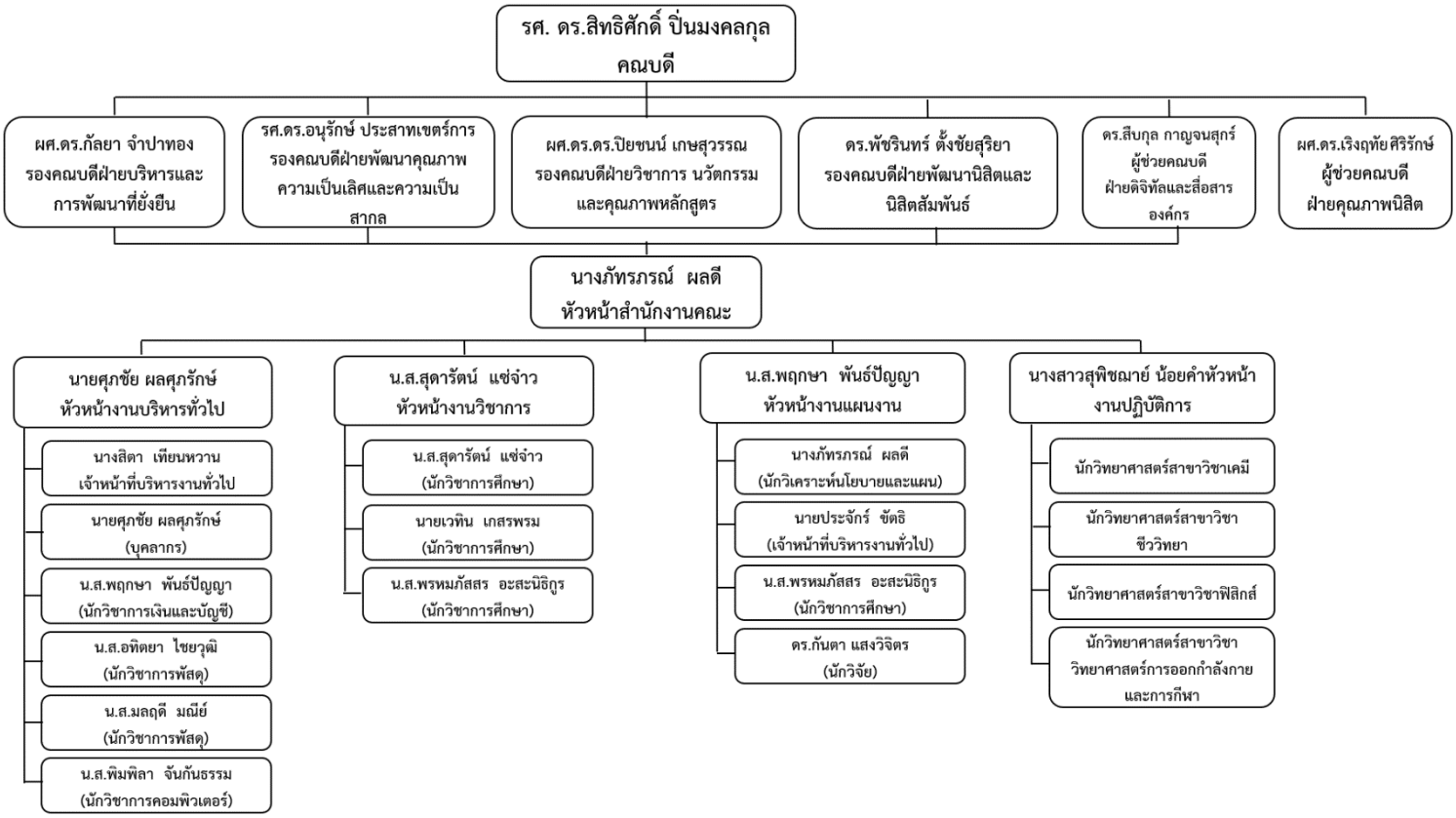
2.1.2 หลักสูตร โดยมีประธานหลักสูตร เป็นผู้บังคับบัญชาชั้นต้น ซึ่งประกอบด้วย หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาคณิตศาสตร์ หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาฟิสิกส์ หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการกีฬา หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาสถิติประยุกต์และการจัดการข้อมูล หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาคณิตศาสตร์ หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การออกกำลังกายและการกีฬา หลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ หลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาคณิตศาสตร์ หลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การออกกำลังกายและการกีฬา ดังภาพที่ 2.1.1 ต่อไปนี้



ภาพที่ 2.1.1 โครงสร้างองค์กร คณะวิทยาศาสตร์

โครงสร้างการบริหารงาน

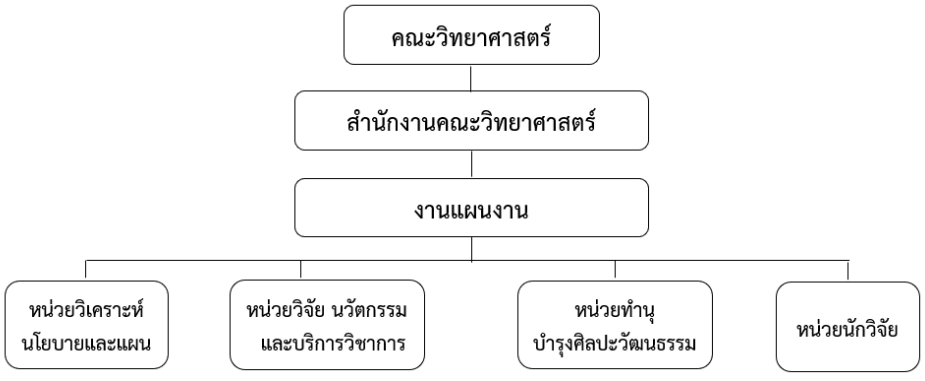
โครงสร้างการบริหารงาน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา มีฐานะเป็นคณะวิชา สังกัดของมหาวิทยาลัยพะเยา ตามพระราชบัญญัติมหาวิทยาลัยพะเยา พ.ศ.2553 ได้แบ่งโครงสร้างการบริหารงาน โดยมีคณบดีเป็นผู้บริหารสูงสุด และมีผู้บริหารระดับลำดับถัดไป คือ รองคณบดี ผู้ช่วยคณบดี ประธานหลักสูตร หัวหน้าสำนักงานคณะ และหัวหน้างาน ตามลำดับ ทั้งนี้ภายในสำนักงานคณะ ได้มีการแบ่งส่วนงานย่อยในการปฏิบัติงานเพื่อให้สอดคล้องกับนโยบายของมหาวิทยาลัย โดยแบ่งงานย่อยออกเป็น 4 งาน ดังนี้ งานบริหารทั่วไป งานวิชาการ งานแผนงาน และงานปฏิบัติการ ซึ่งในทุกหน่วยงานย่อยจะมีหัวหน้างานเป็นผู้รับผิดชอบงานในหน่วย ดังภาพที่ 2.1.2 ต่อไปนี้



ภาพที่ 2.1.2 โครงสร้างการบริหาร คณะวิทยาศาสตร์

โครงสร้างการบริหารงานสำนักงาน

โครงการการบริหารงานของสำนักงานคณะวิทยาศาสตร์ ประกอบด้วย งานบริหารทั่วไป งานวิชาการ งานปฏิบัติการ และ งานแผนงาน โครงสร้างการแบ่งส่วนงานงานแผนงานแสดงดังภายที่ 2.1.3 ดังต่อไปนี้



ภาพที่ 2.1.3 โครงสร้างการแบ่งส่วนงาน งานแผนงาน

โครงสร้างบริหารงานแผนงานของคณะวิทยาศาสตร์ ประกอบด้วย 1. พฤกษา พันธ์ปัญญา เป็นผู้รักษาการแทนหัวหน้างานแผนงาน 2. นางภัทรภรณ์ ผลดี ตำแหน่งนักวิเคราะห์นโยบายและแผน 3. นายประจักร์ ขัตธิ ตำแหน่งเจ้าหน้าที่บริหารงานทั่วไป 4. นางสาวพรหมภัสสร อะสะนิธิกูร นักวิชาการศึกษา ปฏิบัติงานหน่วยบริการวิชาการ 4. ดร.กันตา แสงวิจิตร** ตำแหน่งนักวิจัย ปฏิบัติงานหน่วยวิจัย ดังภาพที่ 2.1.4

ภาพที่ 2.1.4 โครงสร้างบริหารงานแผนงานของคณะวิทยาศาสตร์

2.2 ลักษณะงานที่ปฏิบัติ และภาระหน้าที่ของนักวิจัย

ปฏิบัติงานเกี่ยวกับการวิเคราะห์ วิจัยซึ่ง มีลักษณะงานที่ปฏิบัติเกี่ยวกับการศึกษา ค้นคว้า ทดลอง ทดสอบ วิเคราะห์ เพื่อประโยชน์ในทางวิชาการ ปฏิบัติงานวิจัยเพื่อพัฒนาแนวทางในงานวิจัยให้ทันสมัย บริการวิชาการ เช่น การถ่ายทอดความรู้จากงานวิจัยสู่ชุมชน ช่วยจัดการเรียนการสอน การให้คำปรึกษา แนะนำ และถ่ายทอดความรู้แก่ผู้ที่สนใจ ฝึกอบรมเผยแพร่ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับหลักการและวิธีการของงานในความรับผิดชอบ ให้คำปรึกษา แนะนำ ตอบปัญหา และชี้แจงเรื่องต่าง ๆ เกี่ยวกับงานในหน้าที่ตามที่ได้รับมอบหมายและปฏิบัติหน้าที่อื่นที่เกี่ยวข้อง

2.3 บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบของตำแหน่ง

2.3.1 หน้าที่ความรับผิดชอบของนักวิจัยตามมาตรฐานกำหนดตำแหน่ง

ตามมาตรฐานกำหนดตำแหน่งนักวิจัยที่กำหนดโดย ก.พ.อ. เมื่อวันที่ 21 กันยายน พ.ศ. 2553 ระบุบทบาทหน้าที่ของนักวิจัยระดับปฏิบัติการ ดังนี้

ปฏิบัติงานในฐานะผู้ปฏิบัติงานระดับต้นที่ต้องใช้ความรู้ความสามารถทางวิชาการในการทำงาน ปฏิบัติงานเกี่ยวกับการวิจัยต่าง ๆ ภายใต้การกำกับ แนะนำ ตรวจสอบและปฏิบัติงานอื่นตามที่ได้รับมอบหมาย

โดยมีลักษณะงานปฏิบัติในด้านต่าง ๆ ดังนี้

1) ด้านการปฏิบัติการ

(1) ศึกษา ทดสอบ รวบรวม วิเคราะห์ข้อมูลสถิติเกี่ยวกับเรื่องที่จะทำการวิจัย ร่วมกำหนดหัวข้อเรื่อง รวมถึงรายละเอียดในการทำวิจัยและการจัดหาข้อมูลร่วมกำหนดหัวข้อในการศึกษาและระเมินผล ช่วยนักวิจัยระดับสูงศึกษาค้นคว้าวิจัยเรื่องหนึ่งเรื่องใดตามที่ได้รับมอบหมาย จัดทำรายงานผลการศึกษา ทดสอบ รวบรวม วิเคราะห์ เพื่อให้การปฏิบัติงานบรรลุวัตถุประสงค์ตามแผนงานที่กำหนด ตลอดจนนำไปพิจารณาหาทางแก้ไขปัญหา และวางแผนดำเนินงานในด้านต่าง ๆ

(2) ให้บริการวิชาการด้านต่าง ๆ เช่น ให้คำปรึกษา แนะนำ ในการปฏิบัติงานแก่เจ้าหน้าที่ระดับรองลงมาและแก่นิสิตที่มาฝึกปฏิบัติงาน ตอบปัญหาและชี้แจงเรื่องต่าง ๆ เกี่ยวกับงานในหน้าที่ เพื่อให้สามารถปฏิบัติงานได้อย่างถูกต้อง มีประสิทธิภาพ และปฏิบัติงานอื่นที่เกี่ยวข้อง

2) ด้านการวางแผน

วางแผนการทำงานที่รับผิดชอบ ร่วมวางแผนการทำงานของหน่วยงานหรือโครงการเพื่อให้การดำเนินงานเป็นไปตามเป้าหมายเกิดผลสัมฤทธิ์ตามที่กำหนด

3) ด้านการประสานงาน

(1) ประสานการทำงานร่วมกันระหว่างทีมงานหรือหน่วยงานทั้งภายในและภายนอกเพื่อให้เกิดความร่วมมือและผลสัมฤทธิ์ตามที่กำหนดไว้

(2) ชี้แจงและให้รายละเอียดเกี่ยวกับข้อมูล ข้อเท็จจริง แก่บุคคลหรือหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง เพื่อสร้างความเข้าใจหรือความร่วมมือในการดำเนินงานตามที่ได้รับมอบหมาย

4) ด้านการบริการ

(1) ให้คำปรึกษา แนะนำเบื้องต้น เผยแพร่ ถ่ายทอดความรู้ ทางด้านการวิจัยรวมทั้งตอบปัญหาและชี้แจงเรื่องต่าง ๆ เกี่ยวกับงานในหน้าที่ เพื่อให้ผู้รับบริการได้รับทราบข้อมูลความรู้ต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์

(2) จัดเก็บข้อมูลเบื้องต้น และให้บริการข้อมูลวิชาการเกี่ยวกับการวิจัย เพื่อให้บุคลากรทั้งภายในและภายนอกหน่วยงาน นิสิต ตลอดจนผู้รับบริการ ได้ทราบข้อมูลและความรู้ต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์สอดคล้อง และสนับสนุนภารกิจของหน่วยงาน และใช้ประกอบพิจารณากำหนด นโยบาย แผนงาน หลักเกณฑ์ มาตรการต่าง ๆ

2.4 ลักษณะงานที่ปฏิบัติ

บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบของตำแหน่งนักวิจัย ระดับปฏิบัติการ ตามที่ได้รับมอบหมายมีดังนี้

2.4.1 ทำวิจัยเพื่อตีพิมพ์ผลงานในวารสารวิชาการและนำเสนอผลงานในงานประชุมวิชาการ โดยรวบรวมความรู้ทางวิทยาศาสตร์และองค์ความรู้หรือเทคนิคในงานวิจัยสมัยใหม่ที่เกี่ยวกับงานวิจัยที่ต้องการศึกษา กำหนดหัวข้อการวิจัยด้วยตัวเอง วิเคราะห์ข้อมูลและหาความเชื่อมโยงความเป็นไปได้ในการทำวิจัย ออกแบบการทดลองและกำหนดระเบียบวิธีวิจัย จากนั้นทำการทดลองตามขั้นตอนที่กำหนด รวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลจากการทดลอง ตลอดจนติดตามประเมินโครงการวิจัยต่าง ๆ เพื่อให้การปฏิบัติงานบรรลุวัตถุประสงค์และแผนงานที่กำหนดอย่างมีประสิทธิภาพ พัฒนาแนวทางใหม่ให้งานวิจัย รวบรวมข้อมูลและวิเคราะห์ผลวิจัยที่ได้เพื่อเขียนเป็นผลงานนำเสนอในงานประชุมวิชาการและตีพิมพ์งานวิจัยในวารสารวิชาการ

2.4.2 ทำวิจัยเพื่อแก้ไขปัญหาชุมชนตามนโยบายของแหล่งทุน โดยทำวิจัยบูรณาการเชิงพื้นที่ มุ่งเน้นงานวิจัยแบบบูรณาการเพื่อการประยุกต์ใช้ความรู้จากงานวิจัยที่ทำมาแล้วให้สามารถตอบสนองต่อความต้องการของชุมชนหรือเอกชนเพื่อแก้ปัญหาตามโจทย์ที่ชุมชนต้องการ โดยดำเนินการลงพื้นที่เพื่อหาโจทย์วิจัยในชุมชนและทำการรวบรวมข้อมูล วิเคราะห์สาเหตุของปัญหา เมื่อทราบถึงปัญหาและความต้องการของชุมชนแล้ว เข้าร่วมรับฟังนโยบายและการจัดสรรทุน ศึกษา รวบรวม ข้อมูล และนโยบายการจัดสรรทุนจากแหล่งทุนต่าง ๆ รวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้เพื่อวางแผนเขียนข้อเสนอโครงการวิจัยเพื่อแก้ไขปัญหาแก้ชุมชนและเสน อต่อแหล่งทุนที่เกี่ยวข้อง จากนั้นยื่นข้อเสนอโครงการวิจัยต่อแหล่งทุนเพื่อพิจารณา หากได้รับการพิจารณาให้ทุน ดำเนินการดูแลการทำงานของโครงการวิจัยตามขั้นตอนการทดลองที่ได้นำเสนอในห้องปฏิบัติการ รวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลวิจัยที่ได้ พร้อมทั้งนำองค์ความรู้จากงานวิจัยใหม่ ๆ มาประยุกต์ใช้กับความรู้จากงานวิจัยที่ทำเพื่อพัฒนาเป็นขั้นตอน

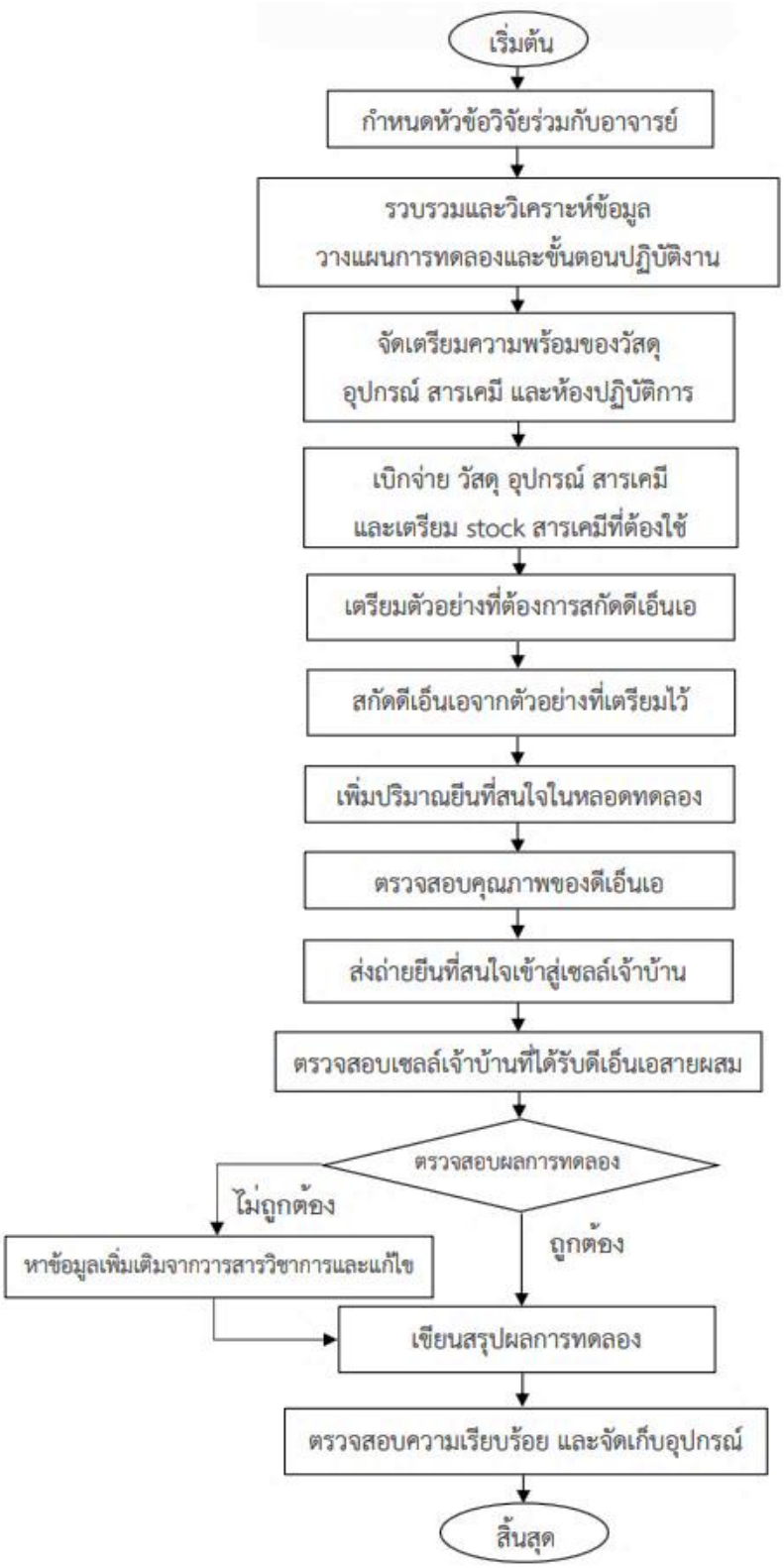
การทำงานวิจัยและออกแบบการทดลองรวมถึงปรับปรุงขั้นตอนหรือแนวทางการวิจัยให้เหมาะสมกับการปฏิบัติงาน รวมรวมและวิเคราะห์ข้อมูล ทำการแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างงานวิจัยโดยการใช้องค์ความรู้เพื่อให้งานสำเร็จด้วยดี ผลิตผลงานวิจัยที่สามารถนำไปแก้ปัญหาตามโจทย์ที่ได้รับมา จากนั้นนำผลงานวิจัยไปถ่ายทอดยังชุมชนติดตามตรวจสอบประเมินผลการนำไปใช้จริงในชุมชน จัดทำรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ส่งแก่แหล่งทุน พร้อมทั้งเผยแพร่งานวิจัยแก่ผู้ที่สนใจและนำไปเป็นแหล่งข้อมูลอ้างอิงต่อไปได้

2.4.3 ภาระงานด้านบริการวิชาการ เช่น การบริการวิชาการเพื่อถ่ายทอดเทคโนโลยีต่อชุมชน ช่วยจัดการเรียนการสอนในบางวิชา การให้คำปรึกษา แนะนำและถ่ายทอดความรู้แก่ผู้ที่สนใจ โดยมีหน้าที่ความรับผิดชอบของตำแหน่งนักวิจัยตามที่ได้รับมอบหมายจริง มีดังนี้

1) การให้บริการวิชาการแก่นิสิตในวิชาการศึกษาอิสระ (independent study : IS)
2) ควบคุมปฏิบัติการดูแลนิสิตและนิสิตในระดับบัณฑิตศึกษาในการใช้อุปกรณ์และเตรียมสารเคมีในขณะทำการทดลองให้เรียบร้อย
3) เป็นที่ปรึกษาโครงงานของนักเรียนโรงเรียนสาธิต มหาวิทยาลัยพะเยา โครงการสนับสนุนการจัดตั้งห้องเรียนวิทยาศาสตร์ในโรงเรียน (วมว.)
4) ต่อยอดองค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยเพื่อแก้ไขปัญหาในชุมชน
5) ภาระงานอื่น ๆ ที่ได้รับมอบหมาย

ในภาระงานหลายอย่างที่ได้รับมอบหมายนั้น ผู้เขียนได้นำภาระงานด้านการทำวิจัยในห้องปฏิบัติการเกี่ยวกับการสกัดสารพันธุกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพเบื้องต้น เพื่อให้นักวิจัย อาจารย์ นิสิต นักวิทยาศาสตร์ ผู้ที่สนใจ หรือผู้ปฏิบัติงานแทนสามารถดำเนินงานได้อย่างมีประสิทธิภาพมาจัดทำ “คู่มือปฏิบัติการ การสกัดสารพันธุกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพเบื้องต้น” โดยมี Flow Chart และขั้นตอนปฏิบัติงาน ดังนี้

ขั้นตอนการปฏิบัติงาน (Flow Chart)



บทที่ 3
หลักเกณฑ์ วิธีการปฏิบัติงาน และเงื่อนไข

คู่มือปฏิบัติงาน เรื่อง การสกัดสารพันธุกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพเบื้องต้น มีวัตถุประสงค์เพื่อเป็นแนวปฏิบัติในการทำวิจัยเกี่ยวกับเทคโนโลยีชีวภาพและพันธุวิศวกรรมเบื้องต้น ทำให้สามารถปฏิบัติงานและเตรียมความพร้อมการทำงานในห้องปฏิบัติการ Plasma bioengineering เพื่อการทำวิจัยและสนับสนุนการเรียนการสอนของอาจารย์ นิสิต และบุคลากรที่เกี่ยวข้องได้ โดยในการปฏิบัติงานจะมีหลักเกณฑ์การปฏิบัติงาน วิธีปฏิบัติงาน เงื่อนไข ข้อสังเกต ข้อควรระวัง และแนวคิด ทฤษฎีหรืองานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ดังนี้

3.1 หลักเกณฑ์การปฏิบัติงาน

การใช้ห้องปฏิบัติการต้องยึดหลักปฏิบัติเพื่อความเป็นระเบียบ ปลอดภัย และให้บรรลุวัตถุประสงค์ของการทำงานในห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งอาจตั้งระเบียบและหลักเกณฑ์การปฏิบัติงาน ดังนี้

3.1.1 นิสิตที่ทำงานในห้องปฏิบัติการต้องแต่งกายให้เรียบร้อยตามระเบียบการใช้ห้องปฏิบัติการของมหาวิทยาลัย หรือตามระเบียบของคณะวิทยาศาสตร์

3.1.2 ห้ามนิสิตนำอาหารเข้ามารับประทานในห้องปฏิบัติการโดยเด็ดขาด

3.1.3 ต้องวางแผนการทดลองและนำขั้นตอนการทำงานในแต่ละวันให้นักวิจัยหรืออาจารย์ผู้ดูแลตรวจสอบก่อนเริ่มลงมือปฏิบัติงาน

3.1.4 ก่อนการปฏิบัติงานต้องทำความสะอาดบริเวณโต๊ะที่ต้องทำงานทุกครั้ง หลังจากทำงานเสร็จต้องเก็บให้เรียบร้อย

3.1.5 การเบิก-จ่ายเครื่องมือ สารเคมี วัสดุและอุปกรณ์ ต้องเป็นไปอย่างถูกต้องตามลำดับก่อนหลัง

3.1.6 นิสิตต้องปฏิบัติตามคำแนะนำและข้อกำหนดของการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการอย่างเคร่งครัด หากเครื่องมือเกิดการเสียหายหรือชำรุดนิสิตต้องแจ้งเจ้าหน้าที่ทันที เพื่อดำเนินการต่อไป

3.1.7 นิสิตหรือผู้ปฏิบัติงานต้องล้าง เช็ด เครื่องแก้วและอุปกรณ์และจัดเก็บส่งคืนให้เสร็จเรียบร้อยหลังจากปฏิบัติงานทุกครั้ง

3.2 วิธีการปฏิบัติงาน

ข้อปฏิบัติก่อนเริ่มทำการทดลอง

1) นิสิตและผู้ปฏิบัติงานต้องวางแผนการทดลองรวมถึงศึกษาข้อมูลที่จำเป็นต่อการทดลองก่อนเข้าห้องปฏิบัติการ เพื่อทำให้การปฏิบัติงานเป็นไปอย่างมีระบบ และไม่เสียเวลา
2) ทบทวนข้อควรระวังในการทดลองก่อนการปฏิบัติงานทุกครั้ง ซึ่งเป็นการลดโอกาสการเกิดอันตรายระหว่างการทดลอง การเตรียมความพร้อมจะช่วยป้องกันความผิดพลาดและช่วยให้การทดลองเสร็จทันเวลา

ข้อปฏิบัติระหว่างทำการทดลอง

1) ทำการทดลองตามขั้นตอนการปฏิบัติงาน (Flow Chart) และปฏิบัติตัวตามหลักเกณฑ์การปฏิบัติงาน
2) เตรียมสิ่งของจำเป็นที่ต้องใช้ในการทดลอง ได้แก่ คู่มือปฏิบัติการ สมุดบันทึก เครื่องคิดเลข เสื้อคลุมปฏิบัติการ แว่นตา กระดาษทิชชูและผ้าเช็ดโต๊ะ
3) ควรสวมถุงมือยางเมื่อต้องทำการทดลองที่ต้องสัมผัสกับจุลินทรีย์หรือ เตรียมสารเคมีที่ก่อให้เกิดการระคายเคือง
4) ทำการตรวจสภาพของเครื่องแก้วและอุปกรณ์ทุกชิ้นก่อนใช้งานทุกครั้ง รวมถึงตรวจสอบอุปกรณ์ไฟฟ้าและถังแก๊สให้อยู่ในสภาพที่พร้อมใช้งานและไม่ชำรุด

ข้อปฏิบัติหลังการทดลอง

1) เมื่อทำการทดลองเสร็จเรียบร้อย ต้องทำความสะอาดเครื่องแก้ว อุปกรณ์ และเก็บให้เรียบร้อย พร้อมตรวจสอบให้อยู่ในสภาพที่สมบูรณ์
2) การเขียนรายงานการทดลองควรกระชับและมีรายละเอียดครอบคลุมการทดลองนั้น แสดงผลการทดลอง อภิปรายผลการทดลองว่ามีความสอดคล้องกับทฤษฎีหรือไม่ อย่างไร หากผลไม่เป็นไปตามที่คาดหมายควรค้นคว้าเพิ่มเติมจากวารสารวิชาการเพื่อวิเคราะห์หาสาเหตุและแนวทางในการปรับปรุงการทดลองในครั้งต่อไป

3.3 ข้อควรระวังและสิ่งที่ควรคำนึงถึงในการปฏิบัติงาน

ข้อควรระวัง

การปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ ผู้ปฏิบัติงานจำเป็นต้องทราบข้อควรระวังในการปฏิบัติตัวเพื่อความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการ ทั้งนี้เพื่อเป็นการป้องกันการเกิดอุบัติเหตุที่อาจเป็นอันตรายต่อร่างกายผู้ทำการทดลองหรือผู้อื่น และหลีกเลี่ยงการสร้างความเสียหายต่อเครื่องมือ อุปกรณ์ และทรัพย์สินอื่น ๆ โดยผู้ปฏิบัติงานต้องอ่านคู่มือก่อนทุกครั้งเพื่อทำความเข้าใจถึงวัตถุประสงค์ หลักการ วิธีการทดลอง วางแผนงานการทดลอง ตลอดจนข้อควรระวังต่าง ๆ และเพิ่มความระมัดระวังเป็นพิเศษ เมื่อต้องปฏิบัติงานเกี่ยวข้องกับเครื่องมือที่ซับซ้อน

สิ่งที่ควรคำนึงถึงในการปฏิบัติงาน

สิ่งที่ควรคำนึงเพื่อความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการ แบ่งเป็น 3 ด้าน คือ

3.3.1 ด้านกายภาพ เพื่อความปลอดภัยผู้ใช้ห้องปฏิบัติการควรรู้แผนผังอาคาร แผนผังห้องปฏิบัติการ ทางเข้าทางออก ทางหนีไฟ รวมถึงตำแหน่งอ่างล้างหน้า ตำแหน่งเครื่องดับเพลิง จุดทิ้งกากสารเคมี

3.3.2 ด้านการแต่งกาย ผู้ใช้ห้องปฏิบัติการต้องสวมเสื้อคลุมปฏิบัติการ สวมรองเท้าหุ้มปลายเท้า รวมถึงสวมใส่อุปกรณ์ป้องกันให้เรียบร้อย เช่น หน้ากาก ถุงมือ แว่นนิรภัย ขณะทำการปฏิบัติการใส่อุปกรณ์ป้องกันอันตรายทุกครั้ง เมื่อปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้องกับอุปกรณ์ไฟฟ้าแรงสูง

3.3.3 ด้านการปฏิบัติการ ผู้ใช้ห้องปฏิบัติการต้องทำการทดลองด้วยความระมัดระวัง ไม่ประมาทหรือหยอกล้อกันในขณะทำการทดลอง ปฏิบัติตามขั้นตอนการทดลองที่มีไว้ในคู่มือปฏิบัติการหรือที่ได้รับมอบหมายจากอาจารย์ผู้ดูแลอย่างเคร่งครัด หากทำการทดลองที่เกี่ยวข้องกับสารที่มีกลิ่นรุนแรงให้ทำการทดลองในตู้ดูดไอสารเท่านั้น ห้ามชิมสารใด ๆ และหลีกเลี่ยงการดมสารเคมีโดยไม่จำเป็น หากมีสารเคมีหกต้องรีบทำความสะอาดทันทีด้วยวิธีที่เหมาะสม ใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ให้ถูกประเภทเหมาะสมกับงาน และดูแลรักษาอุปกรณ์ไม่ให้ชำรุด รักษาความสะอาดของสถานที่ปฏิบัติงาน โดยจัดเก็บสิ่งของและอุปกรณ์ให้เป็นระเบียบเสมอ เมื่อทำงานเกี่ยวกับสารเคมีเสร็จแล้ว ต้องล้างมือให้สะอาดด้วยสบู่และน้ำ ห้ามวิ่งเล่น สูบบุหรี่ รับประทานอาหารและเครื่องดื่มในห้องปฏิบัติการ

3.4 แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พันธุวิศวกรรมหรือที่เรียกว่าเทคโนโลยีดีเอ็นเอรีคอมบิแนนท์หรือดีเอ็นเอสายผสมเกี่ยวข้องกับกลุ่มเทคนิคที่ใช้ในการตัดและรวมสารพันธุกรรมเข้าด้วยกัน โดยเฉพาะดีเอ็นเอจากสายพันธุ์ที่แตกต่างกันเพื่อนำดีเอ็นเอลูกผสมที่เกิดขึ้นส่งถ่ายเข้าสู่สิ่งมีชีวิตใหม่เพื่อให้ได้ผลผลิตตามที่ต้องการ ผู้คิดค้นเทคโนโลยีเหล่านี้บางส่วนตระหนักถึงศักยภาพทางการค้าและก่อตั้งบริษัทเทคโนโลยีชีวภาพเอกชนขึ้น หนึ่งในคนกลุ่มแรก ๆ ที่ทำเช่นนี้คือ Boyer ผู้ก่อตั้ง Genentech Inc. บริษัทได้พัฒนาการผลิตอินซูลินของมนุษย์ในแบคทีเรีย ซึ่งอินซูลินของมนุษย์ที่ได้รับการดัดแปลงพันธุกรรมช่วยรักษาอาการให้ผู้ป่วยโรคเบาหวานทั่วโลก จากตัวอย่างนี้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของพันธุวิศวกรรมซึ่งเป็นกระบวนการที่ใช้เทคโนโลยีในห้องปฏิบัติการเพื่อเปลี่ยนแปลงการสร้างดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง ซ่อมแซม หรือปรับปรุงรูปแบบการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้อง จากการทดลองของ Avery Macleod และ McCarty ในปี ค.ศ. 1944 และงานวิจัยของ Hershey และ Chase ในปี ค.ศ. 1952 ทำให้ทราบว่าดีเอ็นเอคือสารพันธุกรรมที่ทำหน้าที่ควบคุมลักษณะของสิ่งมีชีวิตและสามารถส่งถ่ายลักษณะทางพันธุกรรมนี้ไปสู่ลูกหลานได้ เมื่อสามารถวิเคราะห์โครงสร้างโมเลกุลของดีเอ็นเอได้ในอีกหนึ่งทศวรรษต่อมา ยุคของวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีของดีเอ็นเอจึงได้เกิดการพัฒนาอย่างรวดเร็ว จนกระทั่งช่วงทศวรรษ 1970 นักวิจัยทำการทดลองทางอณูชีววิทยาและค้นพบเอนไซม์ที่สามารถทำการตัดและต่อดีเอ็นเอเข้าด้วยกัน (restriction endonuclease และ DNA ligase) ส่งผลให้สามารถพัฒนางานวิจัยด้านดีเอ็นเอสายผสมและพันธุวิศวกรรมได้อย่างรวดเร็ว ทีมนักวิจัยสร้างโมเลกุลดีเอ็นเอสายผสมโดยการเชื่อมยีนที่ต้องการศึกษาเข้ากับพลาสมิดของแบคทีเรีย จากนั้นนำดีเอ็นเอสายผสมที่ได้ส่งถ่ายเข้าไปในแบคทีเรียสายพันธุ์ *Escherichia coli* เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและการแสดงออกของยีนภายในเซลล์

จากข้อมูลที่กล่าวมางานทางพันธุวิศวกรรมเป็นการทำงานที่เกี่ยวข้องกับดีเอ็นเอโดยตรง ดีเอ็นเอ (deoxy ribonucleic acid) คือ สารพันธุกรรมที่สามารถถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรมไปสู่รุ่นลูกหลานโดยผ่านกระบวนการ DNA replication หรือการจำลองตัวเอง โครงสร้างของดีเอ็นเอประกอบด้วยโพลีเมอร์ของนิวคลีโอไทด์ 2 สาย พันกันเป็นเกลียวคู่ (double helix) โดยแต่ละสายของดีเอ็นเอประกอบด้วย น้ำตาล deoxyribose หมู่ฟอสเฟต และเบส ได้แก่ อะดีนีน (A) ไทมีน (T) ไซโตซีน (C) และกัวนีน (G) ซึ่งเบสเหล่านี้ก็คือ รหัสพันธุกรรมที่สามารถแปลรหัสออกมาเป็นโปรตีนเพื่อใช้ในกิจกรรมต่าง ๆ ของเซลล์ เส้นสายของดีเอ็นเอเกลียวคู่จะหดตัวและพันรอบโปรตีนฮิสโตนเพื่อเก็บรักษาข้อมูลไม่ให้ถูกทำลายและมีขนาดเล็กจนสามารถบรรจุอยู่ในนิวเคลียสได้ ดังจะเห็นได้จากขณะที่เซลล์ทำการแบ่งตัวจะเห็นเป็นโครงสร้างที่เรียกว่าโครโมโซม เรียกช่วงหนึ่งของดีเอ็นเอที่สามารถผลิตเป็นโปรตีนได้ว่า ยีน (gene) สำหรับกรดนิวคลีอิกทั้งชุดที่สมบูรณ์ซึ่งประกอบไปด้วยยีนทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่ง ๆ

จะถูกเรียกว่าจีโนม (genome) จากการศึกษาด้านจีโนมของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ พบว่าข้อมูลที่ถูกเก็บอยู่ในดีเอ็นเอมีทั้งส่วนที่สามารถแปลรหัสออกมาเป็นโปรตีน (coding region) และส่วนที่ไม่สามารถแปลรหัสได้ (non-coding region) สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีจำนวนยีนไม่เท่ากัน เช่น มนุษย์มียีนประมาณ 30,000 - 45,000 ยีน แมลงหวี่ (*Drosophila melanogaster*) มียีนประมาณ 13,601 ยีน และยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* มียีนประมาณ 5,800 ยีน เป็นต้น

3.4.1 เครื่องมือทางพันธุวิศวกรรมและเทคนิคบางอย่างที่ใช้ในงานวิจัยด้านพันธุวิศวกรรม

การเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ใช้ในการศึกษาจัดเป็นขั้นตอนแรกในกระบวนการวิจัยทางด้านพันธุวิศวกรรม การเตรียมดีเอ็นเอในห้องปฏิบัติการนั้นสามารถทำได้ 4 วิธี ได้แก่ 1) การสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์สิ่งมีชีวิตโดยตรง 2) การสร้างสายดีเอ็นเอ cDNA (complementary DNA) จากเอ็มอาร์เอ็นเอ 3) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) และ 4) การสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยกระบวนการทางเคมี (chemical synthesis of DNA) ในคู่มือฉบับนี้จะกล่าวถึงการเตรียมดีเอ็นเอจากตัวอย่างสิ่งมีชีวิตโดยตรง

3.4.2 การสกัดดีเอ็นเอ

ในห้องปฏิบัติการนิยมสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ต้องการใช้ในงานวิจัยโดยตรง เนื่องจากทำได้ง่ายใช้ต้นทุนต่ำและมีเครื่องมือที่พร้อมสำหรับการทดลอง ตัวอย่างที่ใช้สกัดดีเอ็นเออาจเป็นเนื้อเยื่อพืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์ หลักการเบื้องต้นในการสกัดดีเอ็นเอ คือ การทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ รวมถึงผนังเซลล์ในกรณีของเซลล์พืชและแบคทีเรีย เพื่อทำให้ดีเอ็นเอหลุดออกมาจากนั้นแยกดีเอ็นเอออกจากส่วนที่เหลือของเศษเซลล์ โดยคู่มือปฏิบัติการนี้จะแบ่งการสกัดดีเอ็นเอออกเป็น 3 ส่วนได้แก่

1) การสกัดดีเอ็นเอพืช (genomic DNA)

2) การสกัดดีเอ็นเอแบคทีเรีย (genomic DNA)

3) การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (plasmid DNA)

จีโนมิกดีเอ็นเอ เป็นดีเอ็นเอที่อยู่ภายในเซลล์สิ่งมีชีวิตมักอยู่รวมกับโปรตีนฮิสโตนและโปรตีนอื่น ๆ เกิดเป็นโครงสร้างเชิงซ้อน ทั้งนี้ภายในเซลล์ยังมีองค์ประกอบอื่น ๆ ได้แก่ โปรตีน ไขมัน และอาร์เอ็นเอ ดังนั้น ขั้นตอนหลักในการเตรียมดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตมี 3 ขั้นตอน ได้แก่ (1) การทำให้เซลล์แตก (2) การทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ และ (3) การตกตะกอนดีเอ็นเอ

(1) การทำให้เซลล์แตก (cell lysis) สิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น พืชและแบคทีเรียมีผนังเซลล์และแคปซูลหุ้มเยื่อหุ้มเซลล์อีกชั้น การทำให้เซลล์แตกสามารถทำได้ทั้งวิธีการทางกายภาพด้วยการใช้แรงกล หรือวิธีการทางเคมีด้วยการใช้เอนไซม์ เช่น การทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกด้วยการใช้ไลโซไซม์ (lysozyme) หรือการใช้สาร detergent เช่น sodium dodecyl sulfate (SDS) หรือ CTAB หรือใช้ทั้งสองอย่างร่วมกันเพื่อทำลายโมเลกุลไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ สำหรับเซลล์พืชสามารถใช้ไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิต่ำเพื่อแช่แข็งเซลล์ก่อนทำการบดให้แตก จากนั้นค่อยนำตัวอย่างที่ถูกบดเป็นผงแล้วมาทำการสกัดดีเอ็นเอด้วย lysis buffer ต่อไป

(2) การกำจัดองค์ประกอบที่ไม่ต้องการออก เมื่อเซลล์ถูกทำให้แตกออกจะมีสารอื่น ๆ ที่อยู่ในเซลล์ถูกปล่อยออกมาด้วย ก่อนนำดีเอ็นเอไปใช้ต้องมีการทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ขึ้น โดยทั่วไปนิยมใช้ฟีนอล หรือ phenol: chloroform: isoamyl alcohol ในอัตราส่วน (24: 24 :1) หรือการเติมเกลือลงไปเพื่อให้เกิดการจับกับโปรตีนและเศษเซลล์ จากนั้นเมื่อปั่นเหวี่ยงจะพบว่ามีการแยกชั้นซึ่งดีเอ็นเอจะอยู่ในชั้นส่วนใสด้านบน ส่วนโปรตีนอยู่ในชั้นตะกอนขาวขุ่น และชั้นล่างเป็นสารอินทรีย์อื่น ๆ สามารถใช้ไรโบนิวคลีเอส (ribonuclease) กำจัดอาร์เอ็นเอออกไป

(3) การตกตะกอนดีเอ็นเอโดยการใช้เอทานอลเย็น ร่วมกับการเติมเกลือ sodium acetate เพื่อเร่งให้เกิดการแยกน้ำออกจากสายดีเอ็นเอ

3.4.3 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอมีหลายชนิดแตกต่างกันตามกระบวนการในแต่ละห้องปฏิบัติการ ส่วนมากประกอบไปด้วยสารต่าง ๆ ดังนี้

1) Lysis buffer จะมีองค์ประกอบแตกต่างกันตามชนิดของเนื้อเยื่อที่ต้องการสกัดดีเอ็นเอ CTAB บัฟเฟอร์นิยมใช้สำหรับการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์พืช ส่วน SDS บัฟเฟอร์นิยมใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์สัตว์และแบคทีเรีย สารลดแรงตึงผิวและสารซักฟอก (detergents) ได้แก่ CTAB และ SDS ทำหน้าที่สลายเยื่อหุ้มเซลล์ โดยทำลายโปรตีนและไขมันในชั้นฟอสโฟลิพิดไบเลเยอร์ ทั้งนี้สามารถเติม Proteinase K เพื่อย่อยโปรตีน ซึ่งนำไปสู่การสลายของเยื่อหุ้มของออร์แกเนลล์ภายในเซลล์

2) β-mercaptoethanol เป็นสารรีดิวซ์ (reducing agent) ทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์และแยกพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างพอลิเพปไทด์ของโปรตีนที่นำไปสู่การทำให้โปรตีนเสื่อมสภาพ

3) Chelating agents ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของ DNase ที่อยู่ในเซลล์ซึ่งสามารถย่อยสลายดีเอ็นเอได้ EDTA ทำหน้าที่เป็นสารคีเลตโดยการเข้าไปจับไอออน (chelating divalent ions) Mg^{2+} ที่จำเป็นต่อการ

ทำงานของเอนไซม์ DNase การขาดไอออน Mg^{2+} นำไปสู่การหยุดการทำงานของ DNase และด้วยเหตุนี้จึงช่วยรักษาดีเอ็นเอจากการถูกย่อย

4) Tris buffer เนื่องจากดีเอ็นเอมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของ pH และสามารถถูกย่อยสลายได้เมื่อ pH เกิดการเปลี่ยนแปลง Tris buffer ทำหน้าที่ปรับ pH ให้คงที่ในระหว่างการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์
5) เกลือ (NaCl / KCl) โซเดียม (Na^+) และโพแทสเซียมไอออน (K^+) มีประจุเป็นบวก (+) สามารถจับกับกลุ่มฟอสเฟตที่มีประจุเป็นลบของดีเอ็นเอและทำให้มีความเสถียรมากขึ้นในสารละลาย
6) phenol: chloroform: isoamyl alcohol การเติมฟีนอลและคลอโรฟอร์มไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (25: 24: 1) ในสารละลายและทำการปั่นเหวี่ยงจะทำให้เกิดการแยกชั้นของสารละลายได้ 2 เฟส ได้แก่ เฟสที่ไม่ละลายน้ำและเฟสที่ละลายน้ำ (hydrophobic phase และ hydrophilic phase) โดยกรดนิวคลีอิกอยู่ในเฟสที่ละลายในน้ำในขณะที่โปรตีน ไขมัน และเศษเซลล์อื่น ๆ ที่สลายตัวจะอยู่ในเฟสที่ไม่ละลายในน้ำ (phenol: chloroform) โดยโปรตีนที่ถูกย่อยจะอยู่ในชั้นระหว่างเฟสที่ไม่ละลายน้ำและเฟสที่ละลายน้ำ (ชั้นสีขาว) ประกอบด้วยชิ้นส่วนสีขาวของโปรตีน ฟีนอลมีขั้วน้อยกว่าน้ำจึงทำให้โปรตีนเสียสภาพและละลายในฟีนอลเฟส ส่วนดีเอ็นเอมีขั้วมากกว่าจึงละลายอยู่ในเฟสของน้ำที่อยู่ด้านบน คลอโรฟอร์มจะเพิ่มความหนืดของอินทรีย์เฟส (hydrophobic phase) ทำให้การแยกเฟสที่แม่นยำยิ่งขึ้น
7) การตกตะกอนดีเอ็นเอ (DNA precipitation) ด้วยเอทานอล ดีเอ็นเอสามารถตกตะกอนโดยใช้ไอโซโพรพานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 หรือเอทานอลที่มีความบริสุทธิ์สูง (absolute ethanol) แช่เย็นเนื่องจากเอทานอลและไอโซโพรพานอลมีความหนาแน่นมากกว่าน้ำ ดังนั้นเมื่อเติมเอทานอลลงไปจะไปแย่งจับโมเลกุลของน้ำที่จับกับดีเอ็นเออยู่ทำให้ดีเอ็นเอจับตัวกันเองแล้วตกตะกอนอยู่ก้นหลอด ในขั้นตอนนี้สามารถเติมเกลือ sodium acetate เพื่อช่วยเพิ่มการดึงน้ำออกจากสายดีเอ็นเอ

เครื่องมือและเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม

3.4.4 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction ; PCR)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส หรือ PCR เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการจำลองตัวของดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบในหลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้นโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ polymerase ที่มีคุณสมบัติทนความร้อน (thermostable) มีรายงานเกี่ยวกับเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ในปี 1985 โดย Kary Mullis และคณะ ณ American Society of Human Genetics Conference โดยจำนวนดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นในแต่ละรอบปฏิกิริยาจะเป็นการเพิ่มจำนวนแบบ exponential curve

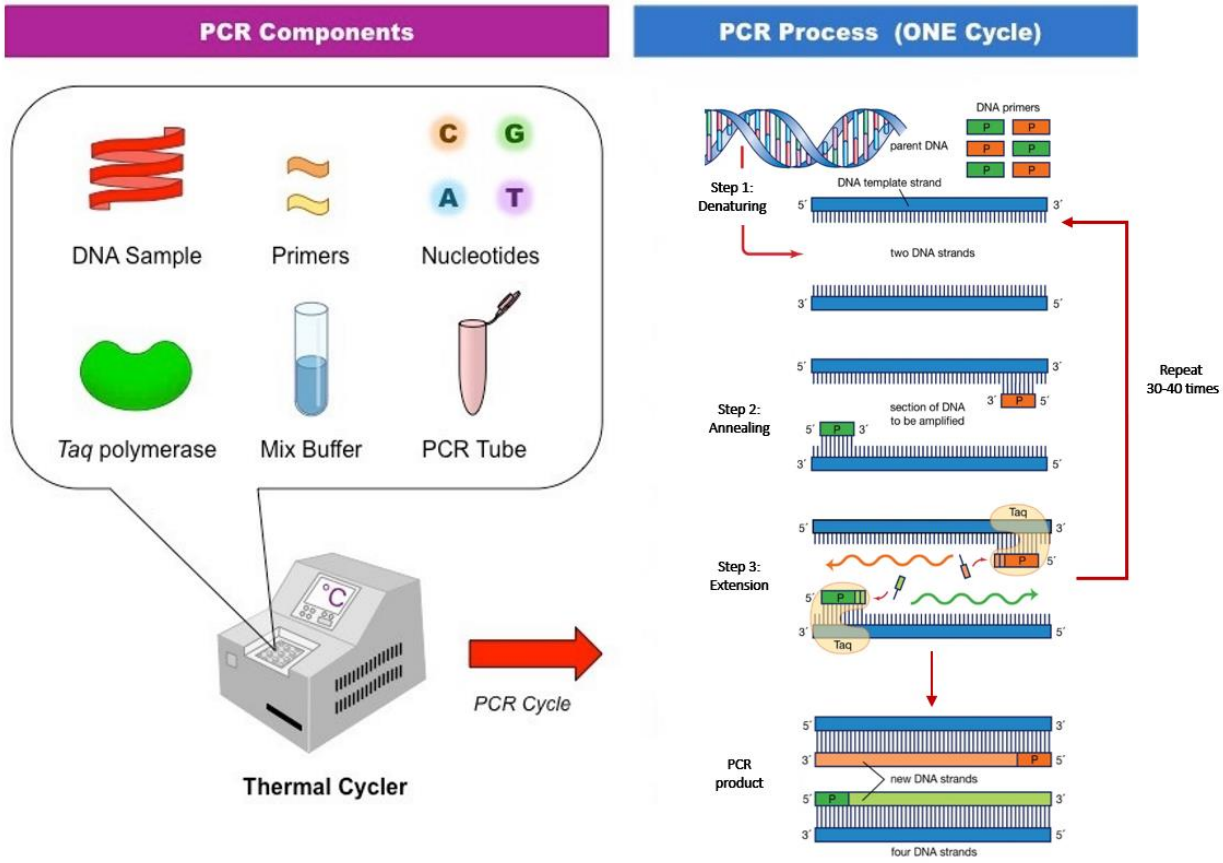
คำนวณได้เท่ากับ 2^n (เมื่อ n คือ จำนวนรอบของการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส) จุดเด่นของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส คือ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างรวดเร็วและใช้ดีเอ็นเอต้นแบบในปริมาณน้อยและใช้ระยะเวลาไม่นาน ในปัจจุบันปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสได้รับการยอมรับว่าเป็นเทคนิคที่สำคัญมากต่องานด้านอณูชีวโมเลกุลและพันธุวิศวกรรมโดยสามารถนำไปใช้กับงานวิจัยทางได้หลายรูปแบบ เช่น การเพิ่มปริมาณยีน (gene cloning) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน (gene sequencing) การตรวจวิเคราะห์ความเหมือนหรือแตกต่างของสายพันธุ์สิ่งมีชีวิตโดยการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) เช่น การตรวจสอบในพืชและปรสิตหลายชนิด (Sripalwit *et al*., 2007; Anuntalabhochai *et al*., 2000; Phromthep, 2012) และการประยุกต์เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายบอกสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต (SCARs marker) (Kiran *et al*., 2010; Sangwijit *et al*., 2012)

หลักการพื้นฐานของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ประกอบไปด้วย 3 ขั้นตอนหลักดังต่อไปนี้

1) Denaturation step เป็นขั้นตอนการทำให้สายดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ที่เป็นเกลียวคู่ (double stranded DNA) แยกตัวออกเป็นสายเดี่ยวเพื่อให้ไพรเมอร์สามารถจับกับดีเอ็นเอในบริเวณที่เป็นเบสคู่สมได้ โดยการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส
2) Annealing step เป็นขั้นตอนที่ไพรเมอร์จะเข้าจับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวตรงตำแหน่งคู่สมในตำแหน่งที่จำเพาะเพื่อเตรียมสร้าง PCR product ขั้นตอนนี้ใช้อุณหภูมิในช่วงประมาณ 40 - 65 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับรูปแบบของไพรเมอร์ที่ใช้ หากไพรเมอร์ที่ใช้เป็นไพรเมอร์แบบสุ่มอุณหภูมิที่ใช้มักจะอยู่ที่ 40 - 46 องศาเซลเซียส หากเป็นการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อเพิ่มจำนวนยีนที่จำเพาะ อุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอนนี้มักจะอยู่ในช่วง 50-65 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับค่า Tm (melting temperature) ของไพรเมอร์ที่ใช้ โดยทั่วไปมักกำหนดให้อุณหภูมิในขั้นตอนนี้ต่ำกว่าค่า Tm ของไพรเมอร์ประมาณ 3 - 5 องศาเซลเซียส
3) Extension step เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase ทำหน้าที่นำนิวคลิโอไทด์ (dNTPs) มาต่อกันในลักษณะที่เป็นคู่สมกับสายดีเอ็นเอแม่แบบในทิศทาง 5’ > 3’ โดยจะต้องใช้อุณหภูมิให้เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ เช่น การใช้ *Taq* DNA polymerase จะใช้อุณหภูมิในช่วงที่เหมาะสมคือ 68 - 72 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่นิยมใช้คือ 72 องศาเซลเซียส

ทุกรอบ (cycle) ของปฏิกิริยา PCR จะประกอบไปด้วยสามขั้นตอนที่กล่าวมาโดยเกิดการทำซ้ำภายในเครื่อง thermocycle เป็นจำนวน 35-40 รอบ ทำให้ได้ผลผลิต (PCR product) เป็นจำนวนมาก (2^n) ในช่วงต้นของปฏิกิริยา PCR นั้นจะมีการให้อุณหภูมิสูงเป็นเวลานานประมาณ 3-5 นาที เรียกขั้นตอนนี้ว่า Pre-denaturation

step เพื่อช่วยให้สายดีเอ็นเอแยกตัวกลายเป็นสายเดี่ยวได้ดีขึ้น อีกทั้งยังเป็นการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase แบบ Hot Start *Taq* DNA polymerase ได้ด้วย จากนั้นจะเกิดการทำปฏิกิริยาตามขั้นตอนจนครบจำนวนรอบที่ต้องการ ในขั้นสุดท้ายอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาจะอยู่ที่ 68 หรือ 72 องศาเซลเซียส ตามชนิดของ *Taq* DNA polymerase ที่ใช้เป็นเวลา 5-10 นาทีเพื่อให้ปฏิกิริยาในการสร้างดีเอ็นสายใหม่เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ ดังภาพที่ 3.4.1



ภาพที่ 3.4.1 แสดงองค์ประกอบและขั้นตอนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction) ดัดแปลงจาก https://facellitate.com/advantages-and-disadvantages-of-pcr-และ technology/https://www.britannica.com/science/polymerase-chain-reaction

การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเป็นการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ในหลอดทดลอง จึงต้องมีการเติมสารเคมีและสารองค์ประกอบที่เกี่ยวข้องเพื่อใช้ในการสร้างเป็นดีเอ็นเอสายใหม่ สารเคมีที่ต้องใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

(1) Deoxynucleotides (dNTPs) เป็นนิวคลีโอไทด์ซึ่งเป็นหน่วยย่อยสำหรับนำไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ ประกอบด้วย dATP dTTP dCTP และ dGTP ควรเตรียมเป็น stock solution ที่มีความเข้มข้นประมาณ 10-25 mM เพื่อหลีกเลี่ยงการจับคู่เบสผิดพลาดเนื่องจากความเข้มข้นที่สูงเกินไป

(2) DNA polymerase เป็นเอนไซม์สำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เป็นเอนไซม์ที่สามารถทนร้อนได้หรือ Thermostable DNA polymerase ซึ่งแยกมาได้จากแบคทีเรียที่ทนร้อนได้สูง (*Thermus aquaticus*) ทำให้ไม่เสียคุณสมบัติของเอนไซม์เมื่อผ่านขั้นตอน denature เอนไซม์ทำงานโดยการเร่งปฏิกิริยาเชื่อมต่อ dNTPs มาต่อในตำแหน่งที่ถัดจากไพรเมอร์ด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์โดยเอนไซม์ทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 70-85 องศาเซลเซียส มีความจำเพาะกับดีเอ็นเอต้นแบบในทิศทาง 5’ > 3’ ทั้งนี้มีเอนไซม์ polymerase ที่สามารถตรวจสอบความผิดพลาดของการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ หรือ proofreading activity ได้แก่ *Pfu* DNA polymerase โดยเอนไซม์ชนิดนี้ทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส

(3) Primer เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (oligonucleotides) สายสั้นที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอ ในตำแหน่งที่เป็นต้นแบบของการสังเคราะห์ ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจึงต้องทราบลำดับของดีเอ็นเอที่ต้องการจะเพิ่มจำนวนเพื่อใช้ในการสร้างไพรเมอร์จำเพาะ โดยทั่วไปนิยมสังเคราะห์ไพรเมอร์มีความยาว 20-28 คู่เบสและควรมีองค์ประกอบของเบส C และ G ในช่วงร้อยละ 40-60

(4) PCR buffer เป็นสารละลายที่ควบคุมสภาวะของการทำปฏิกิริยาให้เหมาะสม เช่น pH และเกลือต่าง ๆ ซึ่งจะต้องมี co-factor ของเอนไซม์ DNA polymerase เช่น $MgCl_2$ หรือ $MgSO_4$ อยู่ด้วยซึ่ง co-factor จะส่งผลต่อประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์

(5) Template DNA คือ ดีเอ็นเอต้นแบบหรือยีนส่วนที่ต้องการเพิ่มปริมาณ หรือเป็นตัวอย่างดีเอ็นเอที่ต้องการนำมาศึกษา

ข้อควรระวังในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสควรปรับความเข้มข้นขององค์ประกอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสให้เหมาะสมตามข้อกำหนดของเอนไซม์ตามที่แต่ละบริษัทกำหนดซึ่งมักอยู่ในช่วงความเข้มข้นต่อไปนี้

- Deoxynucleotides (dNTPs): ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาของ dNTPs คือ 0.2 mM
- Primer: ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของไพรเมอร์แต่ละเส้นอยู่ในช่วง 0.1-2.0 μM
- DNA polymerase: ความเข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์อยู่ในช่วง 2.5-5 unit/100μl ของ PCR reaction
- Co-factor: ความเข้มข้นควรอยู่ในช่วง 1-5 mM ขึ้นกับลักษณะของดีเอ็นเอต้นแบบและไพรเมอร์ ที่ใช้
- Template DNA: ความเข้มข้นควรอยู่ในช่วง 10-50 ng/reaction

สารเคมีที่เป็นส่วนผสมของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจะผสมกันไว้ในหลอดทดลองเล็ก (PCR tube) ปริมาตรของสารละลายอยู่ในช่วง 20-100 ไมโครลิตร เมื่อนำหลอดส่วนผสมไปใส่ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่เรียกว่า DNA thermal cycler หรือ PCR machine ที่ปรับอุณหภูมิได้ตามโปรแกรมที่กำหนดจะเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้นในหลอดเมื่อเกิดปฏิกิริยาจนครบรอบและระยะเวลาที่กำหนดจะได้ผลผลิตดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการเป็นจำนวนมาก

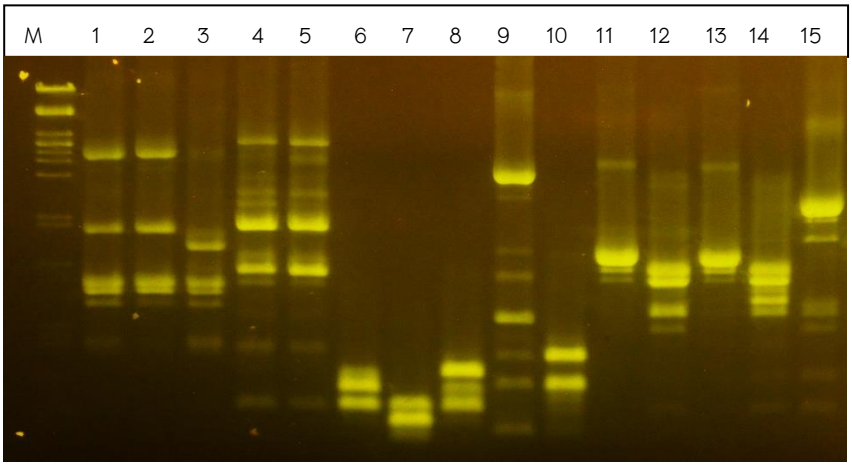
3.4.5 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR machine)

เครื่อง Thermal cycler หรือ PCR machine เป็นเครื่องที่ใช้ในการทำ PCR ซึ่งเครื่องนี้มีอยู่หลายรุ่นและหลายระบบขึ้นกับการออกแบบและการคิดค้นของบริษัทผู้ผลิต (ภาพที่ 3.4.2) คุณสมบัติที่สำคัญคือต้องสามารถปรับเปลี่ยนอุณหภูมิเป็นขั้นตอนตามที่ตั้งไว้และทำงานหมุนเวียนกันหลาย ๆ รอบได้และการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในแต่ละขั้นตอนใช้ระยะเวลาไม่นานนัก ระยะเวลาที่ใช้แต่ละขั้นคือ 1) denaturing 2) annealing และ 3) extension อยู่ในช่วง 10 วินาที ถึง 10 นาที ดังนั้นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 25-40 รอบ จะใช้เวลาประมาณ 1.5-3 ชั่วโมง

ภาพที่ 3.4.2 แสดงเครื่อง Thermal cycler รุ่นT100 จากบริษัท BIO-RAD

3.4.6 การวิเคราะห์ผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ผลผลิตที่เกิดจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในหลอดทดลองเรียกว่า PCR product จะไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ การวิเคราะห์ผลผลิตที่ได้จะต้องนำตัวอย่าง PCR product มาตรวจสอบโดยใช้เทคนิค gel electrophoresis ซึ่งเป็นการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นวุ้นอะกาโรส (agarose gel) โดยระยะทางที่ดีเอ็นเอสามารถเคลื่อนที่ไปได้จะขึ้นอยู่กับขนาดของดีเอ็นเอและกระแสไฟฟ้าที่ใช้ ดีเอ็นเอที่แยกโดยวิธีนี้สามารถมองเห็นได้เมื่อย้อมด้วยสีพิเศษ ซึ่งจะเรืองแสงเมื่อเจอกับแสง UV หรือแสงสีฟ้าที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร จะเห็นแถบดีเอ็นเอเรืองแสงบนแผ่นวุ้นดังตัวอย่างในภาพที่ 3.4.3 ซึ่งเป็นการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสกุล *Zanthoxylum* spp. จำนวน 15 ตัวอย่างที่เก็บมาจากจังหวัดต่าง ๆ ในภาคเหนือและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบความเกี่ยวข้องกันในระดับพันธุกรรม

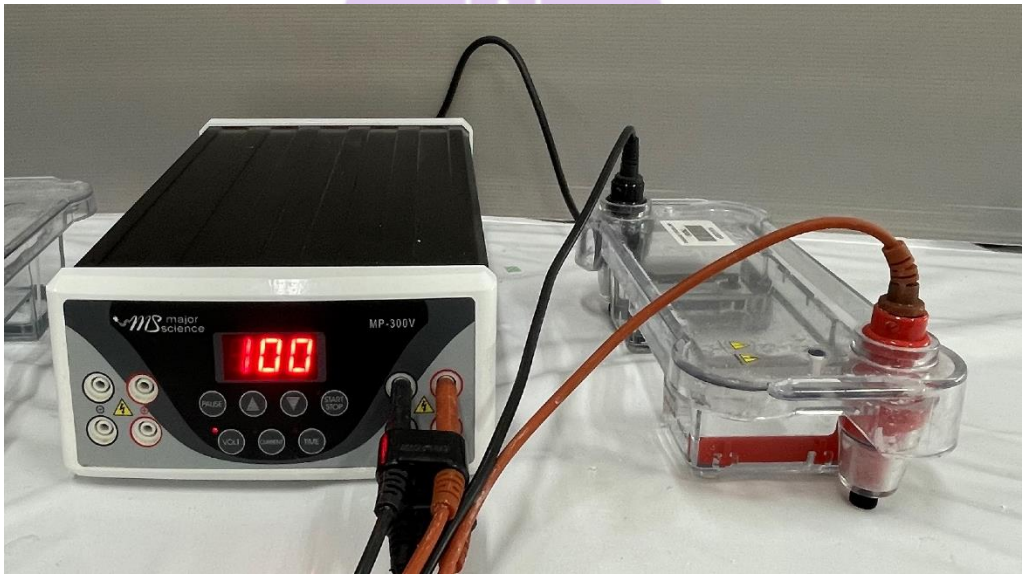


ภาพที่ 3.4.3 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสกุล *Zanthoxylum* spp. 15 ตัวอย่างที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยกระบวนการ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ OPAO20; M คือ DNA marker ช่อง 1-15 คือตัวอย่างพืชจาก (1) ท่าขัวยา จังหวัดน่าน (2) บ้านสาน จังหวัดลำปาง (3) วังชิ้น จังหวัดแพร่ (4) อำเภอลอง จังหวัดแพร่ (5) อำเภอเชียงคำ จังหวัดพะเยา (6) มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา (7) ห้วยลึก จังหวัดเชียงราย (8) อินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ (9) แม่แตง จังหวัดเชียงใหม่ (10) จังหวัดอุตรดิตถ์ (11) ภูลังกา จังหวัดพะเยา (12) นาน้อย จังหวัดน่าน (13) เวียงป่าเป้า จังหวัดเชียงราย (14) ริมกก จังหวัดเชียงราย และ (15) ดอยฮาง จังหวัดเชียงราย

3.4.7 Gel electrophoresis

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์โมเลกุลของ ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และโปรตีน โดยใช้ความแตกต่างของขนาดโมเลกุลของสารที่ต้องการวิเคราะห์ โดยโมเลกุลจะถูกผลักด้วยสนามไฟฟ้าผ่านเจลที่มีรูพรุนขนาดเล็ก โดยเจลถูกละลายในบัฟเฟอร์และแช่ในบัฟเฟอร์ที่มี pH ที่เหมาะสมในกล่องบรรจุบัฟเฟอร์ที่มีขั้วไฟฟ้า (gel chamber) ที่ต่อกับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า (power supply) ดังภาพที่ 3.4.4 และ 3.4.5 เมื่อต่อวงจรไฟฟ้าให้ครบวงจรและเริ่มทำงาน ประจุลบจากหมู่ฟอสเฟสที่เป็น sugar-phosphate backbone บนโมเลกุลของดีเอ็นเอจะแตกตัวให้โปรตอนได้ดีจึงทำให้กรดนิวคลีอิกมีประจุเป็นลบ และประจุลบบนโมเลกุลของดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ไปยังปลายด้านบวกของสนามไฟฟ้า ซึ่งอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของโมเลกุลนั้นขึ้นอยู่กับประจุสุทธิ ขนาดและรูปร่างของโมเลกุล

ภาพที่ 3.4.4 แสดงกล่องบรรจุบัฟเฟอร์ที่มีขั้วฟ้า (gel chamber)



ภาพที่ 3.4.5 แสดงรูปเครื่องกำเนิดไฟฟ้าที่ต่อกับกล่องบรรจุบัฟเฟอร์ที่มีขั้วฟ้า (gel chamber)

Agarose gel electrophoresis เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ โดย agarose เป็นสารที่แยกมาได้จากผนังเซลล์สาหร่ายทะเล เป็นสารประเภทพอลิแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วย galactose และอนุพันธ์ของ galactose เมื่อถูกความร้อนโมเลกุลของพอลิแซคคาไรด์จะละลายในบัฟเฟอร์ที่เตรียมไว้และขยายตัวออก เมื่ออุณหภูมิลดลงโมเลกุลของพอลิแซคคาไรด์จะพับม้วนและพันไขว้กัน (crosslinked) เป็นเกลียวทำให้เกิด

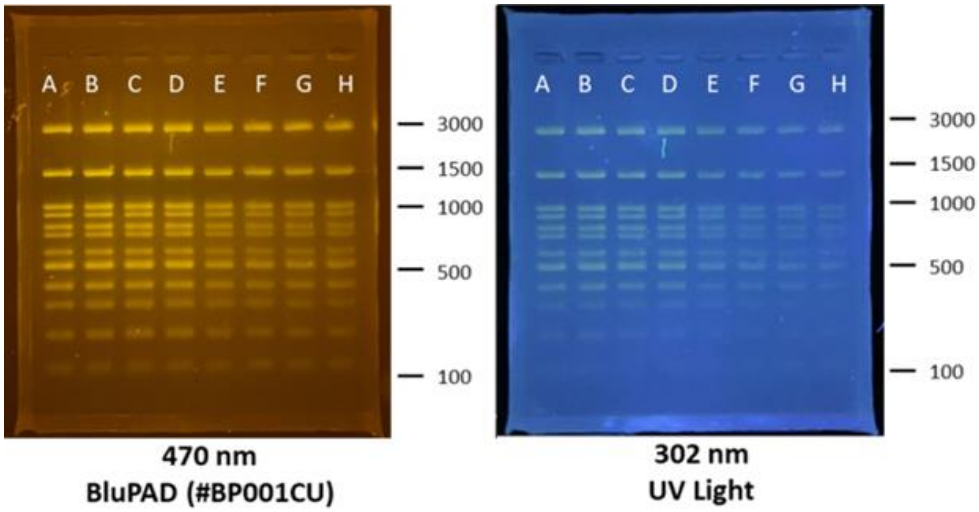
เป็นโครงตาข่ายทำให้เจลมีลักษณะเป็นรูพรุนที่มีความสม่ำเสมอเหมาะสมกับการใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่กว่า 100 คู่เบส (หากดีเอ็นเอมีขนาดเล็กกว่านี้ควรใช้ acrylamide) agarose gel นิยมใช้ในการศึกษาและวิเคราะห์กรดนิวคลีอิก เนื่องจาก agarose ไม่เป็นพิษ และขนาดรูพรุนที่เกิดขึ้นมีความสม่ำเสมอ สามารถเตรียม agarose gel ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันตั้งแต่ร้อยละ 0.3-2 น้ำหนักต่อปริมาตร และความหนาประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ให้มีความเหมาะสมกับลักษณะงานที่ต้องการวิเคราะห์ เจลมีรูพรุนขนาด 500 นาโนเมตร เมื่อเตรียม agarose ความเข้มข้นร้อยละ 0.16 น้ำหนักต่อปริมาตร และจะมีรูพรุนขนาด 150 นาโนเมตร เมื่อเตรียม agarose ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 น้ำหนักต่อปริมาตร ดังนั้นการตรวจสอบจีโนมิกดีเอ็นเอควรเตรียม agarose gel ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.8-1 น้ำหนักต่อปริมาตร เพราะดีเอ็นเอมีขนาดโมเลกุลใหญ่ หากต้องการตรวจสอบดีเอ็นเอที่มีหลายขนาดอยู่ด้วยกันเช่น การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นด้วยเทคนิค HAT-RAPD หรือตรวจสอบการตัดชิ้นส่วนของยีนออกจากพลาสมิดดีเอ็นเอมักใช้ agarose gel ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.2-1.5 น้ำหนักต่อปริมาตร ขนาดของโมเลกุลของดีเอ็นเอที่สามารถวิเคราะห์ด้วย agarose gel แสดงไว้ในตารางที่ 3.4.1

ตารางที่ 3.4.1 แสดงความเข้มข้นของ agarose gel ที่ใช้ในการแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอในช่วงต่าง ๆ

ความเข้มข้นของ agarose gel (ร้อยละน้ำหนักต่อปริมาตร)	ขนาดของดีเอ็นเอที่สามารถแยกได้ใน agarose gel (คู่เบส)
0.3	5000-60000
0.6	1000-20000
0.7	800-10000
0.9	500-7000
1.2	400-6000
1.5	100-3000

การย้อมสีดีเอ็นเอใน agarose gel เดิมนิยมใช้ ethidium bromide ซึ่งสามารถแทรกตัวเข้าไปจับอยู่ระหว่างชั้นของคู่เบสในดีเอ็นเอเกลียวคู่ เมื่อกระตุ้นด้วยแสงอัลตราไวโอเลตจะเห็นดีเอ็นเอเป็นแถบสีส้มแดงอยู่ในเนื้อเจล เนื่องจาก ethidium bromide เป็นสารก่อมะเร็ง ปัจจุบันจึงมีการพัฒนาสีย้อมชนิดอื่น ๆ ที่มีความปลอดภัยมากขึ้น เช่น SYBR Safe หรือ Novel Juice เป็นสีย้อมที่มีความไวสูงสำหรับการแสดงภาพดีเอ็นเอในเจล ซึ่งมีความไว (sensitivity) เทียบเท่ากับ ethidium bromide แต่มีความปลอดภัยมากกว่า เนื่องจากเป็นสารเรือง

แสงที่ไม่ใช่สารก่อมะเร็งประกอบด้วยสีสามชนิด ได้แก่ 1) Bromophenol Blue 2) Xylene Cyanol FF และ 3) Orange G สีย้อมแบบเรืองแสงนี้สามารถกระตุ้นให้เกิดการมองเห็นภาพแถบดีเอ็นเอได้ด้วยแสงสีฟ้าที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร หรือด้วยแสง UV ที่ความยาวคลื่น 302 นาโนเมตร ดังภาพที่ 3.4.6



ภาพที่ 3.4.6 แสดงการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอโดยแถบดีเอ็นตัวอย่าง คือ DNA Ladder (DM003-R500, Bio-Helix) ในอะกาโรสเจลความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ถูกย้อมด้วยสี Novel Juice ภาพซ้าย คือ เจลที่ส่องผ่านแสงสีฟ้าที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร ภาพขวา คือ เจลที่ส่องผ่านแสง UV ที่ความยาวคลื่น 302 นาโนเมตร

3.4.8 เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction endonucleases)

ในกระบวนการโคลนยีนโดยเฉพาะอย่างยิ่งการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สนใจและเชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะ (vector หรือ plasmid) ต้องใช้เครื่องมือในการตัดดีเอ็นเอในบริเวณจำเพาะ ได้แก่ เอนไซม์ตัดจำเพาะ ก่อนที่จะนำไปเชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะด้วยเอนไซม์ ligase เพื่อส่งถ่ายพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม (recombinant plasmid) เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (host cell)

เอนไซม์ตัดจำเพาะเป็นเอนไซม์ที่ถูกค้นพบเป็นครั้งแรกโดย Meselson และ Yaun เมื่อปี ค.ศ. 1968 โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดแรกแยกได้จาก *E. coli* จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์สามารถตัดดีเอ็นเอให้มีขนาดเล็กลงโดยจะทำหน้าที่ย่อยดีเอ็นเอของไวรัสที่บุกรุกเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย (bacteriophage) โดยการตัดดีเอ็นเอของไวรัสในบริเวณที่มีลำดับเบสที่จำเพาะ จากคุณสมบัตินี้ทำให้จัดเอนไซม์ตัดจำเพาะได้เป็น 3 ประเภท คือ

1) Type I Endonucleases สามารถตัดดีเอ็นเอและเติมหมู่เมธิล (methylation) บนนิวคลีโอไทด์ได้ เอนไซม์จะทำงานโดยจับกับดีเอ็นเอที่ลำดับเฉพาะหรือเรียกว่าบริเวณจดจำ (recognition site) และทำการตัดดีเอ็นเอที่ห่างออกไป 100-1000 คู่เบสแบบไม่เจาะจง

2) Type II Endonucleases สามารถตัดดีเอ็นเอและเติมหมู่เมธิล (methylation) บนนิวคลีโอไทด์ได้โดย เอนไซม์จะจับกับดีเอ็นเอที่บริเวณจดจำและตัดดีเอ็นเอในบริเวณบริเวณจดจำหรือลำดับเบสที่ติดกับบริเวณจดจำได้ ทำให้ทราบความยาวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกตัดได้อย่างแน่นอน

3) Type III Endonucleases เป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีคุณสมบัติเหมือน Type I Endonucleases หากแต่ตัดดีเอ็นเอบริเวณที่ห่างไปจากบริเวณจดจำไปทางด้านหลังประมาณ 24-26 คู่เบส

ทั้งนี้ได้ทำการสรุปคุณสมบัติของเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 3 ประเภท ในตารางที่ 3.4.2 จากคุณสมบัติของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดทำให้ Type II Endonucleases ถูกนำมาใช้ในงานด้านพันธุวิศวกรรมและเอนไซม์นี้มีความจำเพาะต่อ ดีเอ็นเอที่มีการเรียงลำดับเบสแบบสมมาตร (symmetry) ทั้ง 2 ทิศทาง เรียกว่า palindromic sequence และจะทำการตัดดีเอ็นเอได้ 2 ลักษณะคือได้ปลายเหนียว (sticky end) และปลายทู่ (blunt end) เอนไซม์ตัดจำเพาะที่นิยมใช้ในงานทางด้านพันธุวิศวกรรมและบริเวณจดจำได้แสดงตัวอย่างไว้ดังตารางที่ 3.4.3

ตารางที่ 3.4.2 แสดงคุณสมบัติและองค์ประกอบที่ต้องใช้ในการทำงานของเอนไซม์ Endonucleases ทั้ง 3 ชนิด

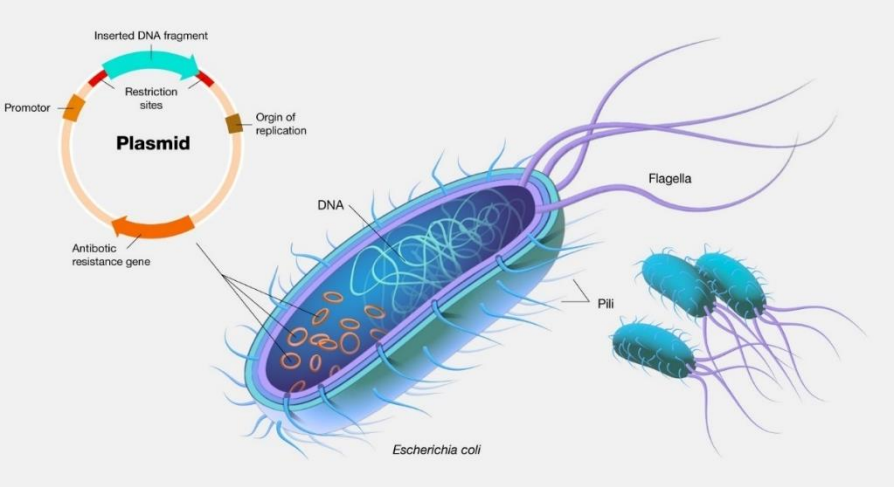
Type	Mg2+ (cofactor)	ATP	S-adenosylmethionine (SAM)	methylation	บริเวณที่ดีเอ็นเอถูกตัดด้วยเอนไซม์
I	✓	✓	✓	✓	ห่างออกไปจากบริเวณจดจำ 100-1000 คู่เบส
II	✓	✗	✗	✓	ตัดดีเอ็นเอในบริเวณบริเวณจดจำ
III	✓	✓	✗	✓	ห่างไปจากบริเวณจดจำไปทางด้านหลังประมาณ 24-26 คู่เบส

ตารางที่ 3.4.3 ตัวอย่างและบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะบางชนิดที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการ

ชื่อเอนไซม์ตัดจำเพาะ	แบคทีเรียที่เป็นแหล่งกำเนิด	บริเวณจดจำ	ลักษณะของปลายชิ้นส่วนดีเอ็นเอหลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์
*Bam*HI	*Bacillus amyloliquefaciens*	5′... G▼GATCC...3′ 3′... CCTAG▲G...5′	ปลายเหนียว
*Bgl*II	*Bacillus globigii*	5′... A▼GATCT...3′ 3′... TCTAG▲A...5′	ปลายเหนียว
*Eco*RI	*Escherichia coli*	5′... G▼AATTC...3′ 3′... CTTAA▲G...5′	ปลายเหนียว
*Eco*RV	*Escherichia coli*	5′... GAT▼ATC...3′ 3′... CTA▲TAG...5′	ปลายทู่
*Hae*III	*Haemophilus aegyptius.*	5′...GG▼CC...3′ 3′...CC▲GG...5′	ปลายทู่
*Hind*III	*Haemophilus influenzae*	5′...A▼AGCTT...3′ 3′...TTCGA▲A...5′	ปลายเหนียว
*Kpn*I	*Klebsiella pneumoniae*	5′... GGTAC▼C...3′ 3′... C▲CATGG...5′	ปลายเหนียว
*Nde*I	*Neisseria denitrificans*	5′...CA▼TATG...3′ 3′...GTAT▲AC...5′	ปลายเหนียว
*Pst*I	*Providencia stuartii*	5′... CTGCA▼G...3′ 3′... G▲ACGTC...5′	ปลายเหนียว
*Sma*I	*Serratia marcescens*	5′...CCC▼GGG...3′ 3′...GGG▲CCC...5′	ปลายทู่
*Xho*I	*Xanthomonas holcicola*	5′...C▼TCGAG...3′ 3′...GAGCT▲C...5′	ปลายเหนียว

3.4.9 ดีเอ็นเอพาหะ (vector)

เซลล์แบคทีเรียมีสารพันธุกรรมที่อยู่รวมกันคล้ายโครโมโซมเป็นดีเอ็นเอเกลียวคู่รูปวงแหวนขนาดใหญ่มาก ม้วนตัวอยู่ในไซโตพลาสซึม เรียกว่า นิวคลีออยด์ (nucleoid) เป็นส่วนสำคัญต่อการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์ ทั้งนี้ แบคทีเรียบางชนิดยังมีส่วนของดีเอ็นเออิสระรูปวงแหวนที่มีขนาดเล็กกว่าโครโมโซม เรียกว่า พลาสมิด (plasmid) โครงสร้างของพลาสมิดเป็นดีเอ็นเอเกลียวคู่มีการขดตัวพันเกลียวซ้อนกัน (supercoiled) มีหลายขนาดตั้งแต่ 2 ถึงหลายร้อยกิโลเบส (kb) (Marcelo E. Tolmasky, 2022)



ภาพที่ 3.4.7 แสดงองค์ประกอบและขั้นตอนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction) ดัดแปลงจาก https://facellitate.com/advantages-and-disadvantages-of-pcr-
และ technology/https://www.britannica.com/science/polymerase-chain-reaction

พลาสมิด (plasmid) เป็นหนึ่งในองค์ประกอบที่มีบทบาทสำคัญในการสร้างดีเอ็นเอสายผสม เพื่อส่งถ่ายยีนที่สนใจศึกษาเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย (host cell) หรือเรียกว่าดีเอ็นเอพาหะ (vector) เป็นสารพันธุกรรมชนิดหนึ่งในเซลล์แบคทีเรียที่อยู่นอกโครโมโซม (extrachromosomal DNA) ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของวงกลม (circular DNA) (ภาพที่ 3.4.7) แม้ว่าพลาสมิดจะไม่ได้บรรจุข้อมูลทางพันธุกรรมที่จำเป็นต่อการทำงานของเซลล์ แต่พลาสมิดบางชนิดจะมียีนที่สามารถทำให้แบคทีเรียอยู่ได้ในสภาวะแวดล้อมที่ยากต่อการดำรงชีพ เช่น ยีนที่ควบคุมการสร้างสารต่อต้านยาปฏิชีวนะ สร้างเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) สร้างสารต้านทานต่อโลหะหนัก หรือผลิตสารที่เป็นพิษต่อแบคทีเรียอื่น ๆ เป็นต้น พลาสมิดสามารถจำลองตัวเองได้เนื่องจากมีจุดเริ่มต้นของการลอกแบบ (origin of replication หรือ ori) พลาสมิดมีบทบาทสำคัญในงานด้านพันธุวิศวรรมโดยเฉพาะการใช้สร้างดีเอ็นเอสายผสมเพื่อเพิ่มจำนวนยีน (gene cloning) และส่งถ่ายยีนที่สนใจเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน และเพิ่มการแสดงออกของยีนที่ต้องการ (gene expression) พลาสมิดที่นิยมใช้ในงานด้านพันธุวิศวกรรมมีคุณสมบัติที่สำคัญดังนี้

1) มีขนาดเล็ก (ประมาณ 2.5 - 10 กิโลเบส) ง่ายต่อการเชื่อมต่อกับชิ้นดีเอ็นเอหรือยีนที่ต้องการโคลน สะดวกต่อการส่งถ่าย (transformation) เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

2) มีจุดเริ่มการจำลองตัวเอง (ori) เพื่อเพิ่มจำนวนยีนที่ต้องการ และแสดงออกในเซลล์เจ้าบ้านได้ ซึ่งจุดเริ่มการจำลองตัวเองของพลาสมิดมี 2 แบบ ได้แก่ แบบที่ 1 stringent control ซึ่งมีการจำลองตัวเองคู่ไปกับการ

จำลองตัวของโครโมโซมในเซลล์ (chromosomal DNA) จึงมีจำนวนชุดเพียง 1-3 ชุดต่อเซลล์ และ แบบที่ 2 relaxed control พลาสมิดจำลองตัวเองได้อิสระไม่ขึ้นกับการจำลองตัวเองของโครโมโซมเซลล์ ทำให้สามารถจำลองเพิ่มตัวเองได้มาก (high copy number) เช่น ได้ 30-50 หรือ 100 ชุดต่อเซลล์

3) มีบริเวณจดจำสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะหลายชนิด (multiple cloning site) เพื่อให้สามารถแทรกชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจเข้าสู่พลาสมิดได้

4) มียีนติดตามคัดเลือก (selectable marker) ที่กำหนดลักษณะซึ่งสามารถตรวจสอบได้ง่ายเพื่อบ่งชี้เซลล์เจ้าบ้านที่ได้รับดีเอ็นเอพาหะ เช่นยีนต้านทานยาปฏิชีวนะ ยีนที่สร้างสีหรือโปรตีนเรืองแสง (ตารางที่ 3.4.4)

ตารางที่ 3.4.4 แสดงยีนติดตามคัดเลือก (selectable marker) ที่นิยมใช้ในการโคลนยีน (Kurnaz, I.A, 2015)

เครื่องหมายติดตามคัดเลือก (marker)	ประเภทของสิ่งมีชีวิตที่ได้รับผลกระทบ	ลักษณะการทำงานในสิ่งมีชีวิตที่เป็นเป้าหมาย
Ampicillin	โพรคาริโอต (แบคทีเรียแกรมลบ)	ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย
Cycloheximide	ยูคาริโอต	ส่งผลกับ E site ที่ 50S ซับยูนิตของไรโบโซม
Kanamycin	โพรคาริโอตและยูคาริโอต	จับกับซับยูนิตของไรโบโซมยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน
Puromycin	โพรคาริโอตและยูคาริโอต	จับกับ A site ซับยูนิตของไรโบโซมทำให้หยุดการสังเคราะห์โปรตีนก่อนกำหนด
Tetracycline	โพรคาริโอต	จับกับ 30S ซับยูนิตของไรโบโซมยับยั้งเคลื่อนย้ายของไรโบโซม

ตารางที่ 3.4.5 แสดงตัวอย่างและคุณสมบัติของพลาสมิดที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการทางอณูชีววิทยาและภาพที่ 3.4.8 ถึง 3.4.12 แสดงภาพแผนที่พันธุกรรมของพลาสมิดที่นิยมใช้เพื่อการเพิ่มปริมาณยีนและผลิตโปรตีนที่ต้องการในเซลล์เจ้าบ้าน

ตารางที่ 3.4.5 ตัวอย่างพลาสมิดที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการและคุณสมบัติบางประการของพลาสมิด

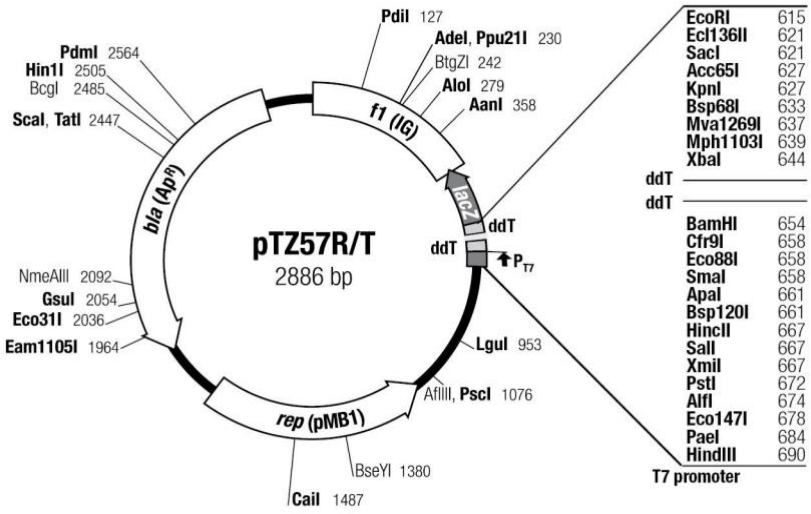
ชื่อพลาสมิด	ขนาด (kb)	ยีนติดตามคัดเลือก	คุณสมบัติ	แหล่งอ้างอิง
pTZ57r/t	2.8	*Bla* (Ap^R), *lacZ*	ใช้เพิ่มจำนวนยีน สามารถเชื่อมกับ PCR product ที่มีปลาย poly A tail ได้	https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012706_InsTAclone_PCR_Cloning_UG.pdf
pUC19	2.6	*AmpR*, *lacZ*	ใช้เพิ่มจำนวนยีน มีบริเวณตัดจำเพาะที่หลากหลาย	https://www.addgene.org/50005/
pCR Blunt II TOPO	3.5	*NroR/KanR*, *lacZ*	ใช้เพิ่มจำนวนยีน สามารถเชื่อมกับ PCR product ที่เป็นปลายทู่ (blunt end) ได้	https://tools.thermofisher.com/content/sfs/vectors/pcrbluntiitopo_map.pdf
pEtDuet1	5.4	*AmpR*, *lacI*	ใช้ผลิตโปรตีนที่ต้องการโดยการแทรกยีนต้นแบบเข้าไปในบริเวณ T7 promoter	https://www.snapgene.com/plasmids/pet_and_duet_vectors_(novagen)/pETDuet-1
pET22b	5.4	*AmpR*, *lacI*	ใช้ผลิตโปรตีนที่ต้องการโดยการแทรกยีนต้นแบบเข้าไปในบริเวณ T7 promoter	https://www.snapgene.com/plasmids/pet_and_duet_vectors_(novagen)/pET-22b(%2B)

หมายเหตุ*

ori คือจุดเริ่มต้นการจำลองดีเอ็นเอ

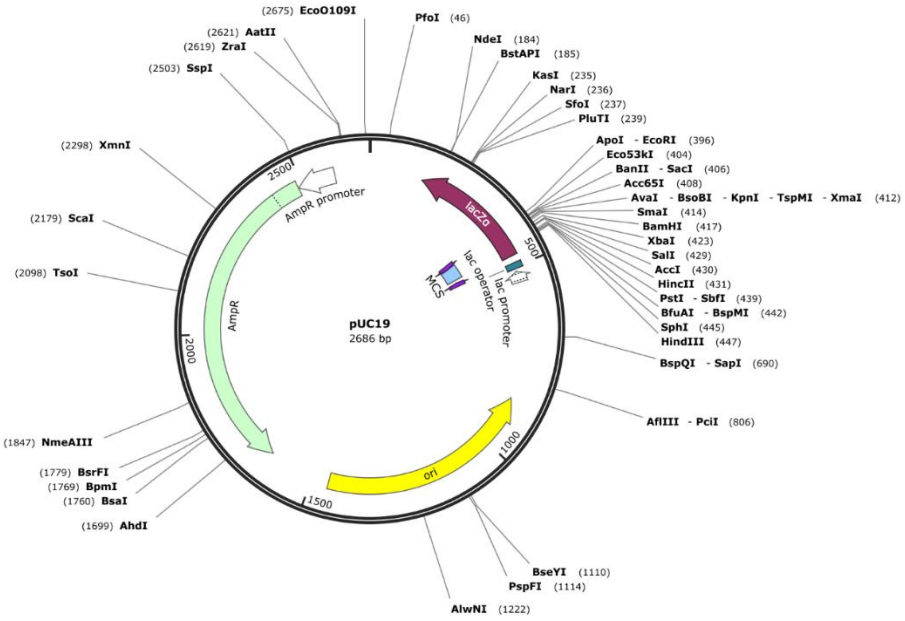
lacZ คือยีนสังเคราะห์เปปไทดอัลฟา

lacI คือยีนสังเคราะห์ lac repressor



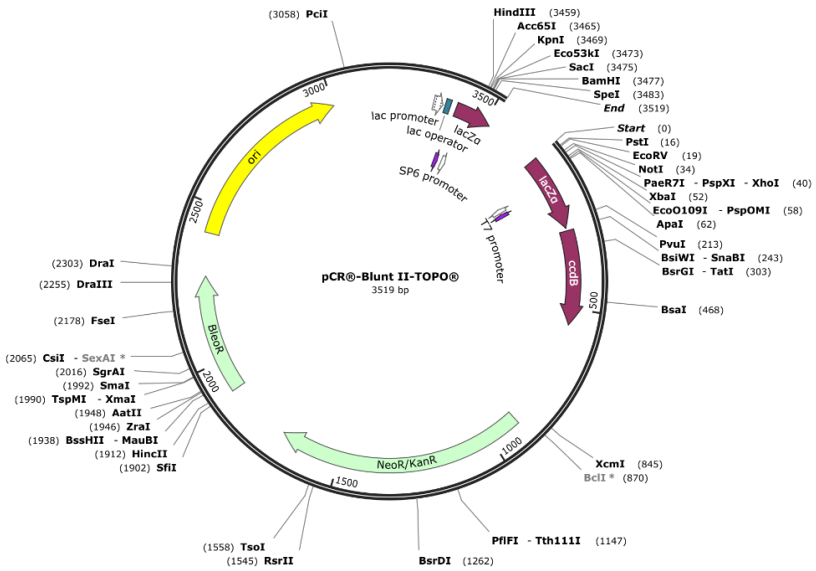
ภาพที่ 3.4.8 แสดงแผนที่พันธุกรรมและรายละเอียดของพลาสมิด pTZ57R/T แสดงตำแหน่งที่สำคัญ ได้แก่ ยีนที่ผลิตสารต่อต้านยาปฏิชีวนะ (แอมพิซิลิน) *(bla)* ตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (multiple cloning site)

ที่มา : https://www.snapgene.com/plasmids/ta_and_gc_cloning_vectors/pTZ57R_T

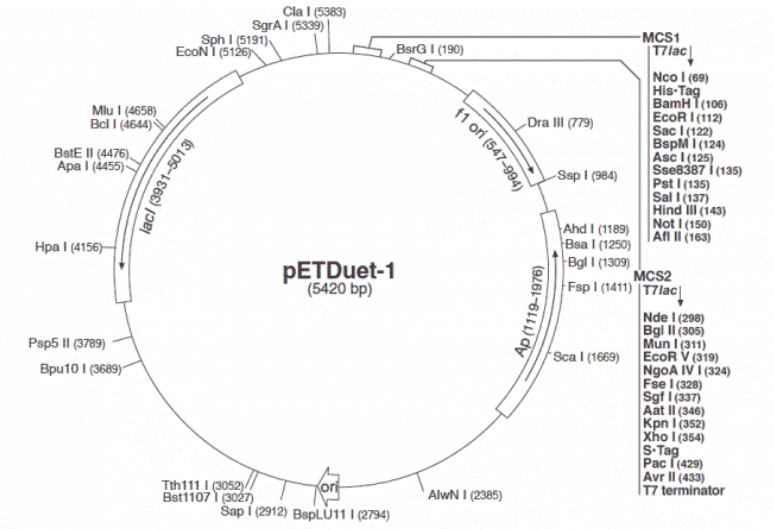


ภาพที่ 3.4.9 แสดงแผนที่พันธุกรรมและรายละเอียดของพลาสมิด pUC19 แสดงตำแหน่งที่สำคัญ ได้แก่ ยีนที่ผลิตสารต่อต้านยาปฏิชีวนะ (แอมพิซิลิน) *(bla)* ตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (multiple cloning site) ตำแหน่งจุดเริ่มตนการจำลองดีเอ็นเอ (ori)

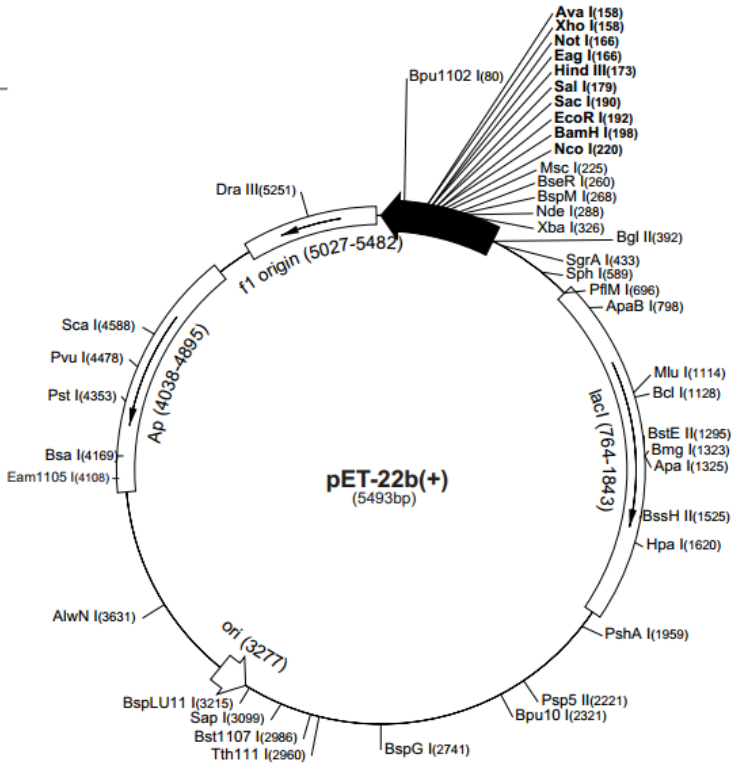
ที่มา : https://www.addgene.org/50005/



ภาพที่ 3.4.10 แสดงแผนที่พันธุกรรมและรายละเอียดของพลาสมิด pCR Blunt II TOPO แสดงตำแหน่งที่สำคัญ ได้แก่ ยีนที่ผลิตสารต่อต้านยาปฏิชีวนะ *NroR/KanR* ตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (multiple cloning site) ตำแหน่งจุดเริ่มตนการจำลองดีเอ็นเอ (ori) ที่มา : TOPO Blunt-End for Subcloning | Thermo Fisher Scientific - TH



ภาพที่ 3.4.11 แสดงแผนที่พันธุกรรมและรายละเอียดของพลาสมิด pETDuet-1ซึ่งเป็น expression vector ใช้เพื่อสร้างและเพิ่มปริมาณโปรตีนในเซลล์เจ้าบ้าน แสดงตำแหน่งที่สำคัญ ได้แก่ ยีนที่ผลิตสารต่อต้านยาปฏิชีวนะ ตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (multiple cloning site) ตำแหน่งจุดเริ่มตนการจำลองดีเอ็นเอ (ori) และT7 promoter ที่มา : https://www.snapgene.com/plasmids/pet_and_duet_vectors_(novagen)/pETDuet-1

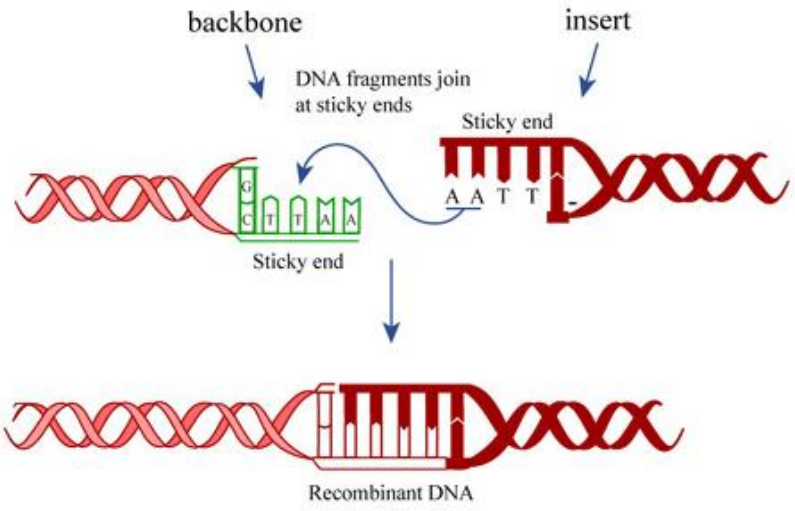


ภาพที่ 3.4.12 แสดงแผนที่พันธุกรรมและรายละเอียดของพลาสมิด pET-22b(+) เป็น expression vector ใช้เพื่อสร้างและเพิ่มปริมาณโปรตีนในเซลล์เจ้าบ้าน แสดงตำแหน่งที่สำคัญ ได้แก่ ยีนที่ผลิตสารต่อต้านยาปฏิชีวนะ ตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (multiple cloning site) ตำแหน่งจุดเริ่มตนการจำลองดีเอ็นเอ (ori)

ที่มา : Addgene: pET-22b(+)-HpENR

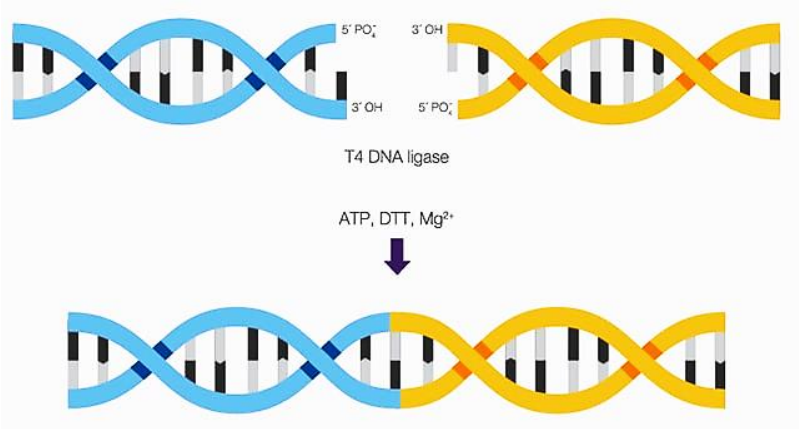
3.4.10 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ (Ligation)

เมื่อตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สนใจและพลาสมิดด้วย restriction enzyme ชนิดเดียวกันแล้ว จะสามารถเชื่อมชิ้นส่วนทั้งสองเข้าด้วยกันได้โดยใช้เอนไซม์ ligase (DNA ligase) เชื่อมสายดีเอ็นเอ โดย ligase ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ (phosphodiester bond) ระหว่างปลายดีเอ็นเอ ที่มีหมู่ 5’ phosphate กับหมู่ 3’ hydroxyl ระหว่างสายดีเอ็นเอ ligase มีอยู่หลายชนิด แต่ที่นิยมใช้เพื่อเชื่อมต่อดีเอ็นเอในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ T4 DNA ligase จากแบคทีริโอฟาจ เนื่องจากต้องการพลังงานจาก ATP ในการทำปฏิกิริยา ในขณะที่ ligase จาก *E. coli* ต้องการ NADH เพื่อเป็น cofactor ในการทำปฏิกิริยาและมีข้อจำกัดในการเชื่อมต่อสายดีเอ็นเอปลายทู่ โดย ligase สามารถเชื่อมโมเลกุลของดีเอ็นเอได้ทั้งแบบปลายทู่และปลายเหนียว (ภาพที่ 3.4.13 และ 3.4.14) ในกรณีที่โมเลกุลของดีเอ็นเอเป็นปลายเหนียว ligase จะเชื่อมต่อได้เมื่อลำดับเบสของปลายทั้งสองด้านเป็นเบสคู่สม (complementary) กันเท่านั้น ดังนั้นการทำงานในห้องปฏิบัติการจึงนิยมใช้ restriction enzyme ชนิดเดียวกันในการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอและพลาสมิดที่ต้องการเชื่อมเข้าด้วยกัน โดยปกติการเชื่อมดีเอ็นเอสองโมเลกุลที่เป็นปลายเหนียวที่มีเบสคู่สมจะเกิดได้ดีกว่าการเชื่อมดีเอ็นเอแบบปลายทู่เข้าด้วยกัน ดังนั้นในการเชื่อมดีเอ็นเอปลายทู่จึงต้องมีการปรับเปลี่ยนเงื่อนไขในการทำ ligation ให้เหมาะสมโดยการเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้และเพิ่มอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาเป็น 16 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 3.4.13 แสดงการเชื่อมต่อดีเอ็นเอแบบปลายเหนียวสองสายเข้าด้วยกันด้วย ligase

ที่มา : https://ocw.mit.edu/courses/20-109-laboratory-fundamentals-in-biological-engineering-fall-2007/pages/labs/mod1_3/



ภาพที่ 3.4.14 แสดงการเชื่อมต่อดีเอ็นเอแบบปลายทู่สองสายเข้าด้วยกันด้วยเอนไซม์ ligase

ที่มา : https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/brochures/generating-recombinant-dna-clones-white-paper.pdf

3.4.11 การส่งถ่ายดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (transformation)

เมื่อได้ดีเอ็นเอสายผสมแล้วขั้นตอนต่อไปคือส่งถ่ายดีเอ็นเอนั้นเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านเพื่อให้เกิดการเพิ่มปริมาณหรือเพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน (gene expression) โดยขั้นตอนนี้เรียกว่า transformation การส่งถ่ายดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านสามารถทำได้หลายวิธี หากแต่วิธีที่นิยมทำในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ 1) electroporation และ 2) heat shock โดยการเตรียมเซลล์เจ้าบ้านให้อยู่ในสภาวะพร้อมรับดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เรียกว่า competent cell แบคทีเรียที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการ คือ *E. coli* ซึ่งในสภาวะปกติเซลล์ของ *E. coli* จะไม่สามารถรับเอาดีเอ็นเอจากภายนอกเข้าสู่เซลล์ได้

การเตรียม competent cell สำหรับการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์มีหลายวิธี ในคู่มือปฏิบัติการฉบับนี้จะกล่าวถึง 2 วิธีที่นิยมใช้ในงานวิจัยเพื่อส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน ได้แก่ *E. coli* ได้แก่ heat shock ต้องเตรียมความพร้อมของเซลล์ด้วยวิธีการทางเคมี (chemically competent cells) การนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์โดยอาศัยสารเคมีกระตุ้นโดยอาศัยขั้นตอน heat-shock คือนำดีเอ็นเอและ competent cell ที่ผสมกันแล้ว วางไว้ในอุณหภูมิเย็น และเปลี่ยนอุณหภูมิอย่างรวดเร็วไปยังอุณหภูมิร้อน (42 องศาเซลเซียส) สารเคมีที่นิยมนำมาใช้เตรียม competent cell ได้แก่ สารที่มีไอออนบวก เช่น Mg^{2+}, Rb^{2+}, Ca^{2+}, Co^{2+}, K^{+} และ dimethyl sulforxide (DMSO) เป็นต้น โดยไอออนบวกจับกับประจุลบของ phospholipid bilayer ของเซลล์และดีเอ็นเอทำให้สามารถรับดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้

สำหรับเซลล์อีกแบบหนึ่งที่ทำให้มีความพร้อมสำหรับการรับดีเอ็นเอจากภายนอกด้วยกระแสไฟฟ้า เรียกเครื่องที่ใช้ว่า electroporator และเรียกวิธีการว่า electroporation ซึ่ง competent cell พวกนี้จะมีประสิทธิภาพในการนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ดีกว่า competent cells ที่ผ่านการเตรียมด้วยสารเคมีประเภทไอออนบวก (cation)

Electroporation คือ การเหนี่ยวนำให้ดีเอ็นเอเข้าไปในเซลล์โดยการใช้กระแสไฟฟ้าเพื่อช็อกเซลล์ โดยการใส่เซลล์ลงไปใน cuvette ซึ่งมีอิเล็กโทรดสองขั้วประกบอยู่ แล้วทำให้เกิดความต่างศักย์ระหว่างขั้วอิเล็กโทรดและเกิดการปลดปล่อยกระแสไฟฟ้าซึ่งจะไปรบกวนโครงสร้างของเซลล์เมมเบรนทำให้เซลล์เมมเบรนยอมให้สารผ่านเข้าไปได้ในช่วงระยะเวลาสั้น ๆ

Electrocompetent cells

นำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์โดยอาศัยไฟฟ้ามีประสิทธิภาพสูงกว่าใช้สารเคมี กระแสไฟฟ้าจะทำให้เซลล์เมมเบรนเกิดการจัดเรียงตัวใหม่และเกิดช่องว่างขึ้น ดีเอ็นจึงสามารถเข้าสู่เซลล์ได้

Reversible electroporation (RE): การใช้กระแสไฟฟ้าสูงถึง 1 kV จะทำให้ cell membrane เกิดรูพรุนชั่วคราวและสามารถกลับมาปกติได้

Irreversible electroporation (IRE): การใช้กระแสไฟฟ้าสูงถึง 3 kV ทำให้ cell membrane เกิดความเสียหายไม่สามารถซ่อมแซมได้ นำไปสู่การตายแบบ apoptosis

ประสิทธิภาพการส่งถ่ายดีเอ็นเอสู่เซลล์เจ้าบ้านขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ประกอบด้วย ขนาดและปริมาณของดีเอ็นเอ โดยที่ดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กกว่าสามารถส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านได้ดีกว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ ชนิดและระยะการเจริญของเซลล์เจ้าบ้าน โดยระยะที่เหมาะสมในการนำมาเตรียม competent cells ได้แก่ระยะ mid log phase เนื่องจากเป็นระยะที่มีการสร้างสารเพื่อการเจริญเติบโตมาก เซลล์มีความแข็งแรงเมื่อทำการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าไปแล้วจะพักฟื้นตัวและบางเซลล์ได้ดีกว่าเซลล์ในระยะ lag phase หรือระยะ stationary phase

3.4.12 การตรวจสอบ Clone ที่ต้องการ

หลังจากการส่งถ่ายพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านแล้ว ต้องทำการตรวจหาเซลล์หรือโคลนที่ต้องการ (พลาสมิดที่มียีนที่ต้องการแทรกอยู่) จากประชากรของเซลล์เจ้าบ้านทั้งหมดเพื่อนำโคลนนั้นไปใช้ในการทดลองต่อไป การตรวจสอบมีหลายวิธีแต่วิธีที่สะดวกและเป็นที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการได้แก่การคัดเลือกจากฟีโนไทป์ (phenotypic selection)

ภายหลังกระบวนการ transformation เพื่อส่งถ่ายพลาสมิดลูกผสมเข้าไปแล้วจะเกิดการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเซลล์เจ้าบ้านจะแบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ เซลล์ที่รับเอาพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ได้และเซลล์ที่ไม่สามารถรับพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ ซึ่งในพลาสมิดแต่ละชนิดที่ใช้จะมียีนติดตามผล (reporter gene) ได้แก่ ยีนที่สร้างสารต้านยาปฏิชีวนะ ทั้งนี้พลาสมิดบางชนิด เช่น pTZ57r/t มียีนที่สร้างสีน้ำเงิน (*LacZ*) เมื่อทำการเลี้ยงเซลล์บนอาหารที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin (อาหารคัดเลือก) เซลล์ที่รับเอาพลาสมิดเข้าไปเท่านั้นที่จะสามารถเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว หากในกระบวนการเชื่อมดีเอ็นเอเข้ากับพลาสมิดนั้นอาจเกิดการ re-ligation ของวงพลาสมิดเองซึ่งทำให้เซลล์ที่ได้รับพลาสมิดชนิดนี้เจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือก การใช้ยีนติดตามอีกชนิด ได้แก่ *LacZ* ทำให้แยกระหว่างเซลล์ที่รับพลาสมิดลูกผสมที่มียีนที่ต้องการและเซลล์ที่ได้รับ พลาสมิดที่เกิดการ re-ligate ได้ โดย *LacZ* เป็นยีนที่สร้างโปรตีนที่เป็นส่วนหนึ่งของเอนไซม์ β-Galactosidase ที่สามารถย่อย lactose ให้เป็น glucose และ galactose ทั้งนี้ยังสามารถย่อยสารสังเคราะห์ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-Gal) ให้เป็นสารสีน้ำเงิน ดังนั้นในพลาสมิดหลายชนิดโดยเฉพาะ cloning vector ที่ทำการแทรก MCS ภายในยีน *LacZ* จะทำให้ยีนไม่สามารถผลิตเอนไซม์ β-Galactosidase ได้ ดังนั้นโคลนที่ได้รับยีนลูกผสมที่มียีนแทรกอยู่ใน MCS ของ *LacZ* จะทำให้เห็นลักษณะโคโลนีที่เป็นสีขาว แต่โคลนที่ได้รับพลาสมิดที่เกิดการ re-ligate จะเห็นโคโลนีที่เป็นสีน้ำเงิน จากนั้นทำการเลือกโคลนที่มียีนแทรกในพลาสมิดไปใช้ต่อไป

3.4.13 การประยุกต์ใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR)

ได้มีการประยุกต์ใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อใช้งานในหลายด้าน ทั้งทางด้านการแพทย์โดยใช้วินิจฉัยโรคต่าง ๆ ทั้งโรคติดเชื้อโดยการตรวจหาเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรค เช่น โรคเอดส์ วัณโรค มาลาเรีย และโรคจากพันธุกรรมหรือการตรวจหายีนก่อมะเร็ง เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ใหญ่ รวมถึงการศึกษาความผันแปรหรือกลายพันธุ์ของพันธุกรรมหรือยีน การทำแผนที่ยีนและศึกษาลำดับเบสของยีนในสิ่งมีชีวิตเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ ทำให้การวินิจฉัยโรคเพื่อป้องกันและรักษาเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ทั้งนี้ยังนำไปใช้เพื่อการตรวจสอบทางนิติเวชศาสตร์ การพิสูจน์ตัวตน บุคคลหรือหลักฐานที่เกี่ยวกับบุคคล หรือการตรวจจับคนร้ายที่มีการทิ้งร่องรอยเป็นเพียงคราบเลือด คราบอสุจิ หรือในกรณีที่ไม่สามารถตรวจสอบลายพิมพ์นิ้วมือได้ รวมถึงการสืบหาความสัมพันธ์ทางสายเลือด เช่น การตรวจความเป็นพ่อ - แม่ - ลูก หรือการตรวจสอบความสัมพันธ์ในเครือญาติ จากความรู้เบื้องต้นว่าดีเอ็นเอเป็นสารพันธุกรรมที่สามารถถ่ายทอดคุณสมบัติต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิตจากรุ่น พ่อ - แม่ ไปยังรุ่นลูกหลาน โดยที่ลูกจะได้รับดีเอ็นเอจากพ่อและแม่อย่างละ

ครึ่งหนึ่ง ดังนั้นเราจึงสามารถใช้ "ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA Fingerprint)" ในการพิสูจน์บุคคลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเพื่อระบุความเป็นพ่อ-แม่ และลูกได้

ในด้านการเกษตรงานนั้นมีการประยุกต์ใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะการนำไปใช้เพื่อปรับปรุงพันธุ์พืชให้ตรงกับความต้องการของผู้บริโภค เช่น ทนทานต่อแมลงศัตรูพืช ทนแล้ง เจริญเติบโตได้ในหลายสภาพอากาศ ทั้งยังสามารถใช้ตรวจวินิจฉัยโรคพืชหรือตรวจสอบชนิดของจุลินทรีย์สาเหตุของโรคพืช รวมถึงการใช้ตรวจสอบการแสดงออกของยีนในพืชและจุลินทรีย์ที่สนใจได้ มีรายงานการใช้เทคนิค HAT-RAPD ตรวจสอบสายพันธุ์พืชต่าง ๆ ที่มีลักษณะทางสัณฐานคล้ายกันจึงทำให้ไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ได้ หรือการตรวจสอบความเกี่ยวข้องกันทางพันธุกรรม เช่น การตรวจสอบความเกี่ยวข้องทางพันธุกรรมในพืชและปรสิตหลายชนิด (Sripalwit *et al*., 2007; Anuntalabhochai *et al*., 2000; Phromthep, 2012) การตรวจสอบวิวัฒนาการระดับโมเลกุลของกล้วยด้วยเครื่องหมาย HAT-RAPD (Ruangsuttapha *et al.,* 2007) หรือการใช้เทคนิค HAT-RAPD ในการระบุชนิดของหนอนตายหยากจากส่วนราก (Suttaduk et al., 2015) รวมถึงการประยุกต์เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายติดตามและบ่งชี้สายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต (*SCARs marker*) (Kiran *et al*., 2010; Sangwijit *et al*., 2012)

ได้มีการประยุกต์ใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสและทำลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างแพร่หลายเนื่องจากเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย มีความถูกต้องแม่นยำสูง ทำได้กับส่วนต่างๆ ของสิ่งมีชีวิตแม้ในสภาวะแวดล้อมต่างกัน ใช้ตัวอย่างปริมาณน้อย สามารถประยุกต์ใช้เทคนิคนี้ในการใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต โดยใช้ตรวจสอบลักษณะที่ต้องการได้โดยไม่ต้องรอให้ตัวอย่างที่ต้องการโตเต็มที่ก่อนเป็นการย่นระยะเวลาที่ต้องใช้ ยังสามารถใช้เพื่อตรวจวินิจฉัยโรค และหาลักษณะที่ผิดปกติทางพันธุกรรมเพื่อทำให้การติดตามรักษาเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว ประยุกต์ใช้ในงานวิจัยเพื่อหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและใช้เป็นข้อมูล การอ้างอิงในการเปรียบเทียบพันธุ์พืช สัตว์และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ซึ่งการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่โดยการประยุกต์ใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมีหลายรูปแบบ ได้แก่

1) RAPD (Rapid Amplified Polymorphic DNA) เป็นการใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยการใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม ข้อดีของวิธีนี้ คือ ใช้ดีเอ็นเอน้อยไม่ต้องทราบข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยามีขนาดสั้นประมาณ 10 นิวคลีโอไทด์ หลังจากจบปฏิกิริยาปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแล้วสามารถตรวจสอบ PCR product ได้ด้วยเทคนิค gel electrophoresis เพื่อศึกษาลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ยังสามารถพัฒนาเป็นเทคนิค HAT-RAPD (High Annealing Temperature Random

Amplified Polymorphic DNA) เพื่อให้ผลการทดลองแม่นยำขึ้นโดยการเพิ่ม annealing temperature จาก 33-36 เป็น 46-50 องศาเซลเซียสเพื่อให้ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้อย่างจำเพาะเจาะจงมากขึ้นส่งผลให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอมีความชัดเจนและสามารถทำซ้ำและให้ผลที่เหมือนเดิม

2) PCR-RFLP (PCR – Restriction fragment length Polymorphism) ซึ่งเทคนิคนี้เป็นการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายแบบเฉพาะเจาะจงโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรสแล้วใช้เอน-ไซม์ตัดจำเพาะตัดดีเอ็นเอ ซึ่งสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันก็จะมีตำแหน่งของการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบนสายดีเอ็นเอต่างกันทำให้เกิดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอมีขนาดไม่เท่ากัน แล้ววิเคราะห์ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัด ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis)

3) AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ใช้เทคนิค RFLP และปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสร่วมกันเริ่มจากการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะก่อนแล้วเชื่อมต่อดีเอ็นเอด้วย adapter ที่เป็นนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆไม่เกิน 20 นิวคลีโอไทด์ จากนั้นเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอโดยใช้ไพรเมอร์ที่จะจับเฉพาะกับ adapter จากนั้นแยกชิ้นส่วนของชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีพอลีอะคลิลาไมด์เจล

4) SSR (Simple Sequence Repeat) ลายพิมพ์ชนิดนี้อาศัยชุดซ้ำของสายดีเอ็นเอในจีโนม การซ้ำของเบสชุดที่มีนิวคลีโอไทด์ขนาด 10-60 นิวคลีโอไทด์ เรียกว่า minisatellites การซ้ำของชุดที่มีนิวคลีโอไทด์ขนาด 1 - 10 นิวคลีโอไทด์ เรียกว่า microsatellites การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วงนี้ใช้ไพรเมอร์ที่จับกับช่วงซ้ำ ๆ นี้ ถ้าสิ่งมีชีวิตมีจำนวนชุดซ้ำต่างกันก็จะแสดงแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน

3.5 เครื่องมือและอุปกรณ์

การจัดเตรียมอุปกรณ์พื้นฐานในห้องปฏิบัติการนั้นต้องทำการจัดเตรียมให้เรียบร้อยและตรวจสอบเครื่องมือให้อยู่ในสภาพสมบูรณ์และก่อนการปฏิบัติงาน เพื่อให้การปฏิบัติงานเป็นไปอย่างรวดเร็วและต่อเนื่อง เครื่องมือและอุปกรณ์ที่สำคัญในห้องปฏิบัติการนี้ ได้แก่ เครื่องแก้วชนิดต่าง ๆ กระบอกตวง เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (auto pipette) ปิเปตทิป (tip) เครื่องชั่งไฟฟ้า เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน ตู้เย็น ตู้แช่แข็ง เตาไมโครเวฟ กล่องบรรจุบัฟเฟอร์ที่มีขั้วฟ้า (gel chamber) ที่ต่อกับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า (power supply) ตู่บ่มเชื้อ ตู้อบความร้อนแห้ง เป็นต้น (แสดงในภาพที่ 3.5.1 - 3.5.12)

ภาพที่ 3.5.1 เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (auto pipette) และปิเปตทิป (tip)

ภาพที่ 3.5.2 เครื่องชั่งไฟฟ้า

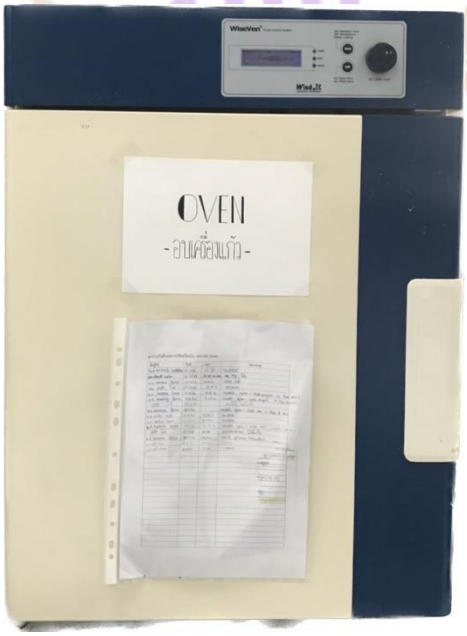
ภาพที่ 3.5.3 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

ภาพที่ 3.5.4 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)

ภาพที่ 3.5.5 เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน

ภาพที่ 3.5.6 ตู้แช่แข็ง

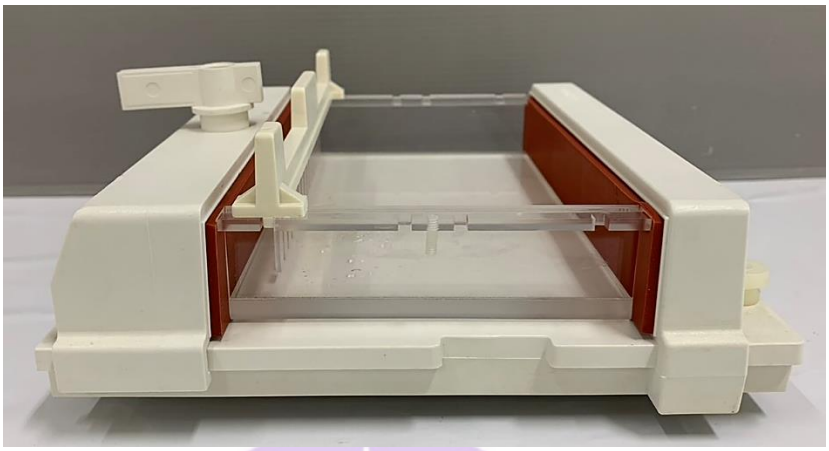
ภาพที่ 3.5.7 ตู่บ่มเชื้อ



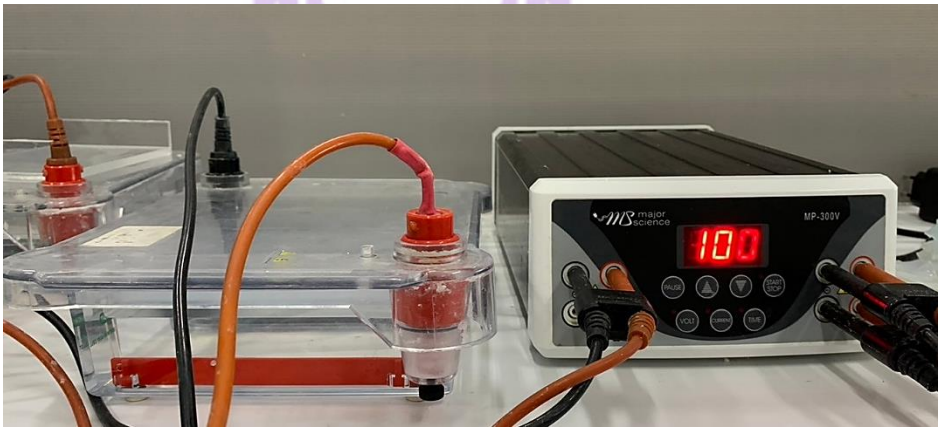
ภาพที่ 3.5.8 ตู้อบความร้อนแห้ง

ภาพที่ 3.5.9 เครื่อง thermocycle

ภาพที่ 3.5.10 หลอดไมโครเซนติฟิวขนาด 1,500 และ 200 ไมโครลิตร



ภาพที่ 3.5.11 ถาดเตรียม agarose gel



ภาพที่ 3.5.12 กล่องบรรจุบัฟเฟอร์ที่มีขั้วฟ้า (gel chamber) ที่ต่อกับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า (power supply)

บทที่ 4
เทคนิคในการปฏิบัติงาน

ในการปฏิบัติงานเกี่ยวกับการสกัดสารพันธุกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพเบื้องต้นนั้น ผู้ปฏิบัติงานต้องมีความรู้ ทักษะและความเชี่ยวชาญ ในการดำเนินการตั้งแต่การวางแผนการทดลองให้เป็นขั้นตอน จัดเตรียมวัสดุอุปกรณ์ สารเคมีรวมถึงการตรวจสอบเครื่องมือให้พร้อมสำหรับหารใช้งานอยู่เสมอ จึงจะทำให้การทำงานวิจัยและการสนับสนุนการเรียนการสอนเป็นไปได้ด้วยดี เทคนิคและขั้นตอนในการสกัดสารพันธุกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพเบื้องต้นนั้น มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. แผนการปฏิบัติงาน
2. ขั้นตอนการปฏิบัติงาน
3. การติดตามผลปฏิบัติงาน

โดยผู้ปฏิบัติงานมีหน้าที่วางแผนการทดลอง ทำการทดลอง บันทึกผลการทดลอง สรุปผลเพื่อนำงานวิจัยไปตีพิมพ์ ตลอดจนทำการประมวลผลจากปัญหาที่พบระหว่างการทดลอง เพื่อหาแนวทางการแก้ไขปัญหาและปรับปรุงกระบวนการปฏิบัติงาน เพื่อสนับสนุนการปฏิบัติงานแก่ผู้ที่ต้องปฏิบัติงาน ทำวิจัย หรือผู้ที่ต้องการขอใช้บริการ

4.1 แผนปฏิบัติงาน

แผนในการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ Plasma Bioengineering ซึ่งนักวิจัยได้กำหนดแผนงานเตรียมการทดลองเกี่ยวกับการสกัดสารพันธุกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพเบื้องต้น เพื่อใช้ในงานวิจัยรวมถึงสนับสนุนการเรียนการสอนวิชาการศึกษาอิสระและวิชาเทคโนโลยีชีวภาพเบื้องต้น โดยคำนึงถึงช่วงระยะเวลาการเรียนการสอนที่กำหนดโดยอาจารย์ประจำวิชาในแต่ละภาคเรียนรวมถึงระยะเวลาที่นิสิตต้องดำเนินการวิจัยในรายวิชาการศึกษาอิสระ ซึ่งได้เขียนแผนในการดำเนินงานให้มีความต่อเนื่องดังแสดงในตารางที่ 4.1.1

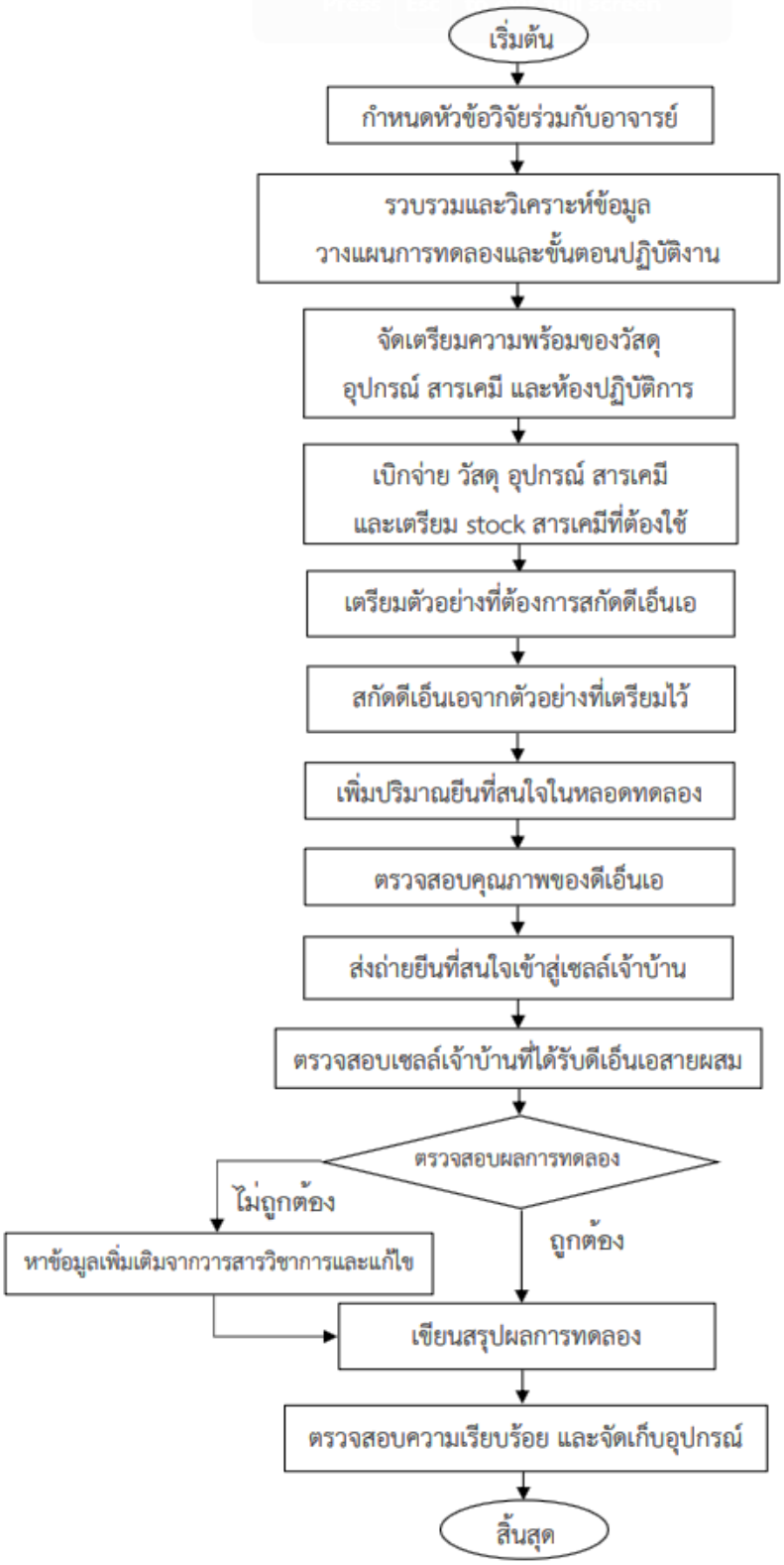
ตารางที่ 4.1.1 แผนการดำเนินเตรียมการทดลองเกี่ยวกับการสกัดสารพันธุกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพเบื้องต้น

แผนปฏิบัติงาน	เวลาดำเนินการ
ศึกษารายละเอียดของรายวิชาและตารางเรียน	1 วัน
กำหนดหัวข้อวิจัยและวางแผนการทดลองร่วมกับอาจารย์และนิสิต	7 วัน
จัดเตรียมความพร้อมของห้องปฏิบัติการ วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี	7 วัน
สอนขั้นตอนการปฏิบัติงาน เทคนิคทาง molecular genetic	30 วัน
เบิก-จ่าย วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมีตามที่ได้วางแผนไว้	1 วัน
ติดตามตรวจสอบผลการวิจัยและให้คำปรึกษาด้านการวิเคราะห์ผลการทดลอง	1-14 วัน
ให้คำแนะนำการเขียนอภิปรายและสรุปผลการทดลอง	14- 21 วัน

4.2 ขั้นตอนปฏิบัติงาน

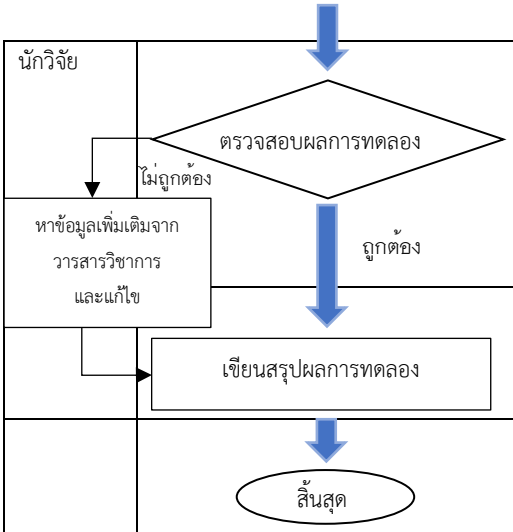
การดำเนินการทดลองในห้องปฏิบัติการของนักวิจัยผู้มีหน้าที่ดูแลห้องปฏิบัติการ Plasma Bioengineering จำเป็นต้องเตรียมความพร้อมในด้านต่าง ๆ ได้แก่ อุปกรณ์ สารเคมี เครื่องมือที่ต้องใช้ในการทดลอง โดยทั่วไปการทดลองแบ่งออกเป็น 5 ส่วนหลัก ๆ ได้แก่ การเตรียมตัวอย่างที่สนใจ การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่าง การเพิ่มปริมาณยีนที่สนใจในหลอดทดลอง การส่งถ่ายยีนที่สนใจเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านและการตรวจสอบเซลล์เจ้าบ้านที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสม โดยหลังจากการศึกษาข้อมูลที่จำเป็นต่อการทดลองและได้มีการวางแผนการทดลองตามแผนการปฏิบัติงานในการดำเนินงานวิจัยแล้วนั้นสามารถเริ่มการทำวิจัยได้ โดยมีขั้นตอนการปฏิบัติงานดังนี้

ขั้นตอนการปฏิบัติงาน (Flow Chart)



ตารางที่ 4.2.1 อธิบายขั้นตอนการปฏิบัติงานการสกัดสารพันธุกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพเบื้องต้นเพื่อใช้ในงานวิจัยมีรายละเอียด ดังนี้

ผู้รับผิดชอบ	แผนภูมิงาน	ขั้นตอน/วิธีการดำเนินงาน	เอกสารที่เกี่ยวข้อง	ระยะเวลาดำเนินงาน
	เริ่มต้น			
อาจารย์และนักวิจัย	กำหนดหัวข้อวิจัยร่วมกับอาจารย์	อาจารย์ที่ปรึกษาและนักวิจัยรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลจากนั้นกำหนดหัวข้อวิจัย	วารสารวิชาการ	7 วัน
อาจารย์และนักวิจัย	รวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลวางแผนการทดลองและขั้นตอนปฏิบัติงาน	รวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อกำหนดขั้นตอนการทดลอง	วารสารวิชาการและคู่มือปฏิบัติการการสกัดสารพันธุกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพเบื้องต้น	1 เดือน
นักวิจัย	จัดเตรียมความพร้อมของวัสดุ อุปกรณ์ สารเคมีและห้องปฏิบัติการ	นักวิจัยจัดเตรียมความพร้อมของวัสดุ อุปกรณ์ สารเคมีและห้องปฏิบัติการ	รายการการยืมเครื่องมือและวัสดุ	1 วัน
นักวิจัย	เบิกจ่าย วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมีและเตรียม stock สารเคมีที่ต้องใช้	นักวิจัยจ่ายวัสดุ อุปกรณ์ สารเคมีและห้องปฏิบัติการ	รายการการยืมเครื่องมือและวัสดุ	1 วัน
นักวิจัย	เตรียมตัวอย่างที่ต้องการสกัดดีเอ็นเอ	นักวิจัยทำการเตรียมตัวอย่างที่ต้องการสกัดดีเอ็นเอ ทำความสะอาดให้พร้อมใช้ในการทดลอง	คู่มือปฏิบัติการการสกัดสารพันธุกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพเบื้องต้น	1 วัน
นักวิจัย	สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่เตรียมไว้	นักวิจัยทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่เตรียมไว้ตามขั้นตอนที่กำหนดในคู่มือ	คู่มือปฏิบัติการการสกัดสารพันธุกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพเบื้องต้น	1 วัน
นักวิจัย	ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ	ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยเลือกใช้ความเข้มข้นของเจลให้เหมาะสมตามรายละเอียดในคู่มือ	คู่มือปฏิบัติการการสกัดสารพันธุกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพเบื้องต้น	1 วัน
นักวิจัย	ส่งถ่ายยีนที่สนใจเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน	ส่งถ่ายยีนที่สนใจเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านโดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ต้องใช้ให้เหมาะสมตามรายละเอียดในคู่มือ	คู่มือปฏิบัติการการสกัดสารพันธุกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพเบื้องต้น	3 วัน
นักวิจัย	ตรวจสอบเซลล์เจ้าบ้านที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสม	ตรวจสอบเซลล์เจ้าบ้านที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสมตามขั้นตอนที่กำหนดในคู่มือ	คู่มือปฏิบัติการการสกัดสารพันธุกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพเบื้องต้น	3 วัน

นักวิจัย		ตรวจสอบผลการทดลองว่าเป็นไปตามทฤษฎีหรือไม่ หากมีจุดที่ต้องปรับปรุง ทำการหาข้อมูลเพิ่มเติมเพื่อแก้ไขและทำการทดลองตามขั้นตอนที่ปรับปรุง จากนั้นตรวจสอบผลการทดลองอีกครั้ง	วารสารวิชาการที่เกี่ยวข้อง	2-7 วัน
		เขียนสรุปผลการทดลอง	วารสารวิชาการที่เกี่ยวข้อง	7-10 วัน

4.2.1 ขั้นตอนการปฏิบัติปฏิบัติงานการสกัดสารพันธุกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพเบื้องต้นแยกเป็นหัวข้อได้ดังนี้

1) การสกัดดีเอ็นเอพืช

การสกัดดีเอ็นเอจากพืชให้ได้คุณภาพดีมีขั้นตอนที่ยุ่งยากซับซ้อน เนื่องจากพืชมีผนังเซลล์ที่แข็งแรงและมีสารประกอบหลายอย่าง เช่น พอลีแซคคาไรด์ และโพลีฟีนอล ซึ่งส่งผลกระทบต่อคุณภาพการเก็บและการนำดีเอ็นเอไปใช้ ดีเอ็นเอที่อยู่ในเซลล์โดยทั่วไปมักจะรวมตัวอยู่กับโปรตีนฮิสโตนและโปรตีนอื่น ๆ เกิดเป็นโครงสร้างเชิงซ้อนขึ้น ทั้งนี้ภายในเซลล์ยังประกอบไปด้วย คาร์โบไฮเดรต โปรตีน สารพันธุ์กรรม ได้แก่ อาร์เอ็นเอ ดังนั้นหลักการเบื้องต้นในการสกัดดีเอ็นเอจากพืชนั้นประกอบไปด้วย 3 ขั้นตอนใหญ่ ได้แก่ 1. ทำลายผนังเซลล์ โดยการใช้ไนโตรเจนเหลวและบดให้ละเอียด ร่วมกับการใช้ใช้สาร detergent โดยนิยมใช้ CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) ที่มีประจุบวกสามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลล์และจับกับโมเลกุลของกรดนิวคลีอิกหลังจากทำให้เซลล์แตกได้ 2. การย่อยโปรตีนโดยการเติม protease และการตกตะกอนโปรตีนด้วย phenol/chloroform หรือ sodium chloride และ sodium acetate 3. ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำเพื่อให้เกิดการกำจัดน้ำ (dehydrate) ออกจากสายดีเอ็นเอ ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากพืชในห้องปฏิบัติการนี้ได้ทำการดัดแปลงจากงานวิจัยของ Doyle และ Doyle (1987) และ Healey และคณะ (2014) ซึ่งวิธีการนี้สามารถสกัดดีเอ็นเอได้จากทั้งพืชและสาหร่าย โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

(1) ทำความสะอาดตัวอย่างพืชด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70 และน้ำกลั่นจากนั้นเช็ดให้แห้งแล้วตัดชิ้นส่วนให้มีขนาดเล็ก (ภาพที่ 4.2.1) ใส่ถุงมือทุกครั้งที่ทำการทดลอง

(2) เติมไนโตรเจนเหลวและบดในโกร่งจนเป็นผงละเอียดขั้นตอนนี้ต้องใช้ความระมัดระวังไม่ให้ไนโตรเจนเหลวหกระหว่างที่บดตัวอย่างพืช (ภาพที่ 4.2.2) ตักใส่หลอดเก็บตัวอย่างขนาด 1.5 มิลลิลิตร (ภาพที่ 4.2.3)

(3) เติม SDS/ Sarkosyl lysis buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

(4) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

(5) ดูดส่วนใสด้านบนด้วยความระมัดระวังไม่ให้ตะกอนเซลล์ติดมาด้วย (ตะกอนเซลล์จะตกลงสู่ด้านล่างหลอดทดลอง) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดใหม่ เติมสารละลาย PCI ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

(6) ดูดส่วนใสด้านบนใส่ในหลอดใหม่เติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตรเท่ากับสารละลายผสมให้เข้ากันและปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

(7) ดูดส่วนใสด้านบนใส่ในหลอดใหม่ เติมเอทานอลที่เย็นจัดปริมาตรหนึ่งในสามของสารละลายที่ดูดมาได้ จากนั้นเติมสารละลาย PCI ปริมาตรเท่ากับปริมาตรรวมของสารละลายในหลอด ผสมให้เข้ากันปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้องทำซ้ำขั้นตอนที่ 5 อีกครั้ง

(8) ดูดส่วนใสด้านบนใส่ในหลอดใหม่ที่เย็นจัด (ขั้นตอนนี้ทำในกล่องรักษาอุณหภูมิ) เติม 5 M NaCl ปริมาตร 0.1 เท่าของสารละลายที่ดูดมาได้ ผสมสารละลายให้เข้ากันเติมเอทานอลที่เย็นจัดปริมาตร ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายที่ดูดมาได้ ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมงหรือข้ามคืน

(9) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนสารละลายทิ้ง จากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส

(10) เทสารละลายทิ้งปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติม deionize water หรือ TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมสารละลายใหเข้ากัน เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

(11) ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธี gel electrophoresis ใช้ agarose ความเข้มข้น ร้อยละ 1.0

ภาพที่ 4.2.1 แสดงการเตรียมตัวอย่างพืชเพื่อสกัดดีเอ็นเอ

ภาพที่ 4.2.2 แสดงการบดใบพืชเพื่อสกัดดีเอ็นเอ

ภาพที่ 4.2.3 แสดงการตักใส่ใบพืชบดละเอียดลงในหลอดเก็บตัวอย่างขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2) การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย

การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการดัดแปลงจากวิธีการของ Maniatis และ คณะ (1982) โดยมีขั้นตอนดังนี้

(1) เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการในอาหารเหลว เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมง หรือ 1 คืน

(2) เก็บเซลล์แบคทีเรียโดยการปั่นเหวี่ยงในหลอดเก็บตัวอย่างขนาด 1.5 มิลลิลิตร ด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที (ภาพที่ 4.2.4)

(3) เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งจากนั้นละลายเซลล์ด้วยสารละลาย I ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที

(4) เติม SDS ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีจนกว่าสารละลายจะเปลี่ยนเป็นลักษณะใส

(5) เติม phenol ปริมาตร 550 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

(6) ดูดของเหลวส่วนใสด้านบนด้วยความระมัดระวังไม่ให้ตะกอนเซลล์ติดมาด้วย ย้ายไปในหลอดเก็บตัวอย่างขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นทำซ้ำขั้นตอนที่ 5 อีกครั้ง

(7) ดูดของเหลวส่วนใสด้านบนย้ายไปในหลอดเก็บตัวอย่างขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม 3 M sodium acetate ปริมาตร 0.1 เท่าของตัวอย่างสารละลายที่ได้

(8) เติมเอทานอลเย็นปริมาตร 2 เท่าของสารละลายในข้อ 7 ผสมให้เข้ากัน เก็บตัวอย่างไว้ที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

(9) ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

(10) เทส่วนสารละลายทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส

(11) เทสารละลายทิ้งปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติม deionize water หรือ TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

(12) ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธี gel electrophoresis ใช้ agarose ความเข้มข้น 1.0

ภาพที่ 4.2.4 เซลล์แบคทีเรียในหลอดเก็บตัวอย่างขนาด 1.5 มิลลิลิตร ภาพซ้ายแสดงลักษณะเซลล์แบคทีเรียก่อนการปั่นเก็บเซลล์ภาพขวาแสดงลักษณะเซลล์แบคที่เรียที่ตกตะกอนภายหลังการปั่นเก็บเซลล์

3) การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย

(1) เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอที่ต้องการในอาหารเหลว เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมง หรือ 1 คืน

(2) เก็บเซลล์แบคทีเรียโดยการปั่นเหวี่ยงในหลอดเก็บตัวอย่างขนาด 1.5 มิลลิลิตร ด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

(3) เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งจากนั้นละลายเซลล์ด้วย BP1 buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน

(4) เติม lysis solution ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยการพลิกหลอดขึ้นลง

(5) เติม neutralize solution ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดขึ้นลง แช่ในน้ำแข็ง 30 นาที

(6) ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

(7) ดูดของเหลวส่วนใสด้านบนด้วยความระมัดระวังไม่ให้ตะกอนเซลล์ติดมาด้วย ย้ายไปในหลอดเก็บตัวอย่างขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Isopropanol 0.7 เท่าของตัวอย่างสารละลายที่ได้พลิกหลอดเบา ๆ ให้เข้ากัน เก็บตัวอย่างไว้ที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

(8) ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

(9) เทส่วนสารละลายทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส

(10)เทสารละลายทิ้งปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติม deionize water หรือ TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้ข้ากัน เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

(11)ตรวจสอบคุณภาพของพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธี gel electrophoresis ใช้ agarose ความเข้มข้นร้อยละ 1.0

4) การตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้

(1) วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร โดยที่ดีเอ็นเอสามารถดูดกลืนแสงได้ดีที่ 260 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณค่าความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากผลค่าการดูดกลืนแสง

(2) ทำการวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้โดยวิธี gel electrophoresis โดยวิธีนี้สามารถตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ว่ามีคุณภาพดี มีการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอ หรือเกิดการแตกหักได้

5) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส (PCR)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรสซึ่งเป็นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบในหลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้นโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymeraseและใช้การเพิ่มจำนวนโดยเครื่อง Thermal cycler สามารถแบ่งเป็น 3 ขั้นตอนดังนี้

(1) ขั้นตอน Denaturation ใช้อุณหภูมิสูงประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส

(2) ขั้นตอน Annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงเพื่อให้ primers สามารถจับกับดีเอ็นเอแม่แบบสายเดี่ยวตรงตำแหน่งคู่สม ขั้นตอนนี้ใช้อุณหภูมิในช่วงประมาณ 46-65 องศาเซลเซียส

(3) ขั้นตอน extension เป็นขั้นตอนการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase จะใช้อุณหภูมิในช่วงที่เหมาะสมคือ 68 -75 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่นิยมใช้คือ 72 องศาเซลเซียส

ตัวอย่างการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส (PCR)

ในคู่มือปฏิบัติการนี้เป็นการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชหรือจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค HAT-RAPD เพื่อบ่งบอกความความสัมพันธ์ของตัวอย่างที่นำมาศึกษาว่ามีความเหมือนหรือแตกต่างกัน ในการทดลองนี้จะใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ในห้องปฏิบัติการและตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธี gel electrophoresis

จากนั้นแบ่งดีเอ็นเอที่สกัดได้นำไปเจือจางในให้ได้ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เตรียมสารละลายในหลอดทดลองซึ่งประกอบด้วย PCR master mix มีองค์ประกอบดังตารางที่ 8 โดยต้องทำการเตรียม PCR master mix ในถังน้ำแข็งหรือบนเจลรักษาความเย็นดังภาพที่ 4.2.5 และต้องทำอย่างรวดเร็วและระมัดระวังเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของ DNase

ภาพที่ 4.2.5 แสดงการเตรียม PCR master mix

ตารางที่ 4.2.2 ส่วนผสมของสารละลายเพื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชด้วยเทคนิค HAT-RAPD

สารละลาย	ความเข้มข้น
10X Reaction Buffer	1X
1.25 M $MgCl_2$	1.5 mM
Random primer	50 ng
Template DNA	25 ng
10 mM dNTPs	100 µM
Taq DNA polymerase	0.5 Unit
ddH_2O	

เมื่อเตรียมส่วนผสมและเขย่าให้เข้ากันแล้วทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Thermal cycler มีรอบปฏิกิริยาดังตารางที่ 4.2.3 การนำหลอด PCR ออกจากเครื่อง Thermal cycler หลังจากทำปฏิกิริยาเสร็จแล้วต้องระวังบริเวณฝาเครื่อง Thermal cycler เนื่องจากบริเวณฝาจะเป็นส่วนที่มีอุณหภูมิสูงประมาณ 105 องศาเซลเซียสเพื่อป้องกันการระเหยของสารละลายในหลอด PCR ดังนั้นเมื่อเปิดเครื่องต้องไม่สัมผัสบริเวณฝาเครื่องที่มีเครื่องหมาย Heat lid ดังภาพที่ 4.2.6

ภาพที่ 4.2.6 แสดงบริเวณฝาเครื่องที่เป็นบริเวณที่มีความร้อนสูงต้องระวังเมื่อนำหลอด PCR ออกจากเครื่อง

ตารางที่ 4.2.3 ขั้นตอนการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	94	3 นาที	1
Denaturation	94	30 วินาที	35
Annealing	46	30 วินาที	
Extension	72	60 วินาที	
Final extension	72	5 นาที	1

6) การตรวจดูแถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส

(1) ชั่ง agarose 1 กรัม ใส่ใน 0.5X TBE Buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปต้มหรือเข้าไมโครเวฟจนวุ้นละลายหมด สังเกตจากวุ้นจะเดือดเป็นฟองใหญ่ไม่มีเกล็ดเล็ก ๆ เหลือในสารละลายดังภาพที่ 4.2.7

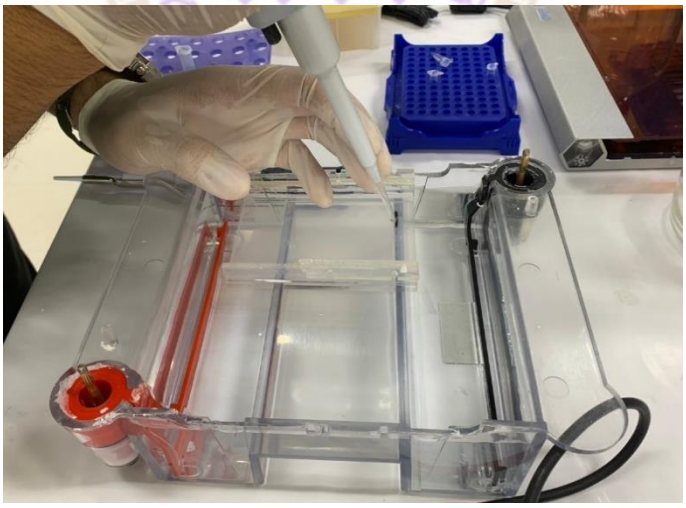
(2) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเจลอุ่น (อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส) จากนั้นเทเจลลงในถาดแม่พิมพ์ที่ประกอบไว้แล้วดังภาพที่ 4.2.8 รอประมาณ 20-30 นาทีให้เจลแข็งตัว

(3) ผสมดีเอ็นเอหรือ PCR product ที่ต้องการตรวจสอบกับ loading dye ในอัตราส่วน ดีเอ็นเอ : สี = 5:1 ผสมให้เข้ากันแล้วหยอดลงในช่องเจลดังภาพที่ 4.2.9

(4) ต่อขั้วอิเล็กโทรดเข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า กำหนดความต่างศักย์ 100 โวลต์ ระยะเวลา 60 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำเจลไปส่องบน LED transilluminator และทำการบันทึกภาพ

ภาพที่ 4.2.7 agarose gel ที่ถูกอุ่นจนละลายเข้ากัน

ภาพที่ 4.2.8 แสดงการเทเจลลงในถาดแม่พิมพ์



ภาพที่ 4.2.9 แสดงการหยอด PCR product ที่ผสมกับ loading dye ลงในเจล

7) การเตรียม competent cell

(1) เขี่ยเชื้อ *E. coli* จากโคโลนีเดี่ยวที่เลี้ยงบนอาหาร LB agar ลงในอาหาร LB broth ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน

(2) ดูดเชื้อไปเลี้ยงในอาหารใหม่โดยใช้เชื้อตั้งต้น 10 % เขย่าที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที จนกว่าจะถึงช่วง log phase หรือวัดค่าความยาวคลื่นที่ 600 นาโนเมตร ได้ 0.4 - 0.6

(3) แบ่งเชื้อใส่หลอดไมโครเซ็นติฟิวก์แช่บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาทีจากนั้นปั่นเก็บเชื้อที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาทีที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

(4) เทส่วนใส (supernatant) ทิ้ง จากนั้นละลายเซลล์ด้วย 50 mM $CaCl_2$ แช่เย็น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ ให้ตะกอนเซลล์ละลายบนน้ำแข็งจนกว่าเซลล์จะละลายหมดต้องทำด้วยความระมัดระวังและให้เซลล์เย็นคงที่ตลอดเวลา

(5) จากนั้นปั่นเก็บเชื้อที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาทีที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และ เทส่วนใสทิ้ง

(6) ละลายเซลล์ด้วย 50 mM $CaCl_2$ ที่ละลายในกลีเซอรอลเข้มข้นร้อยละ 15 แช่เย็น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ ให้ตะกอนเซลล์ละลายบนน้ำแข็งจนกว่าเซลล์จะละลายหมด จากนั้นปั่นเก็บเชื้อที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาทีที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และเทส่วนใสทิ้ง

(7) เติม 50 mM $CaCl_2$ ที่ละลายในกลีเซอรอลเข้มข้นร้อยละ 15 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แช่ในไนโตรเจนเหลว เก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้

8) การส่งถ่ายพลาสมิดดีเอ็นเอเขาสู่เซลล์เจ้าบ้านโดยวิธี heat shock

(1) แช่ competent cell ที่เตรียมไว้ในหลอดไมโครเซ็นติฟิวก์บนน้ำแข็งจนกว่าเซลล์จะละลายหมด

(2) เติมพลาสมิดดีเอ็นเอความเข้มข้น 50-100 นาโนกรัมลงไปในหลอดเขย่าเบาๆให้เข้ากันกับ competent cell แช่ในน้ำแข็งเวลา 30 นาที

(3) แช่เซลล์ที่ อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาทีจากนั้นนำเซลล์แช่ลงในถังน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที

(4) เติม LB broth ปริมาตร 900 ไมโครลิตร เขย่าเชื้อที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้น แบ่งเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตรมาเกลี่ยบนอาหาร LB agar ที่มี ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จนกว่าอาหารจะแห้งสนิท และบ่มเชื้อที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน

(5) หากมีเชื้อเกิดขึ้นบนอาหารให้นำไปเลี้ยงในอาหาร LB broth ที่มี ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป โดยการสกัดพลาสมิดและตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่หลุดออกมาจากพลาสมิดเปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตราฐานใน agarose gel

4.2.2 การเตรียมสาร

การเตรียมสารเคมีเพื่อการปฏิบัติงานนั้นต้องตรวจสอบสต๊อกสารเคมีที่ต้องใช้อยู่เสมอว่ามีเพียงพอต่อการใช้งานหรือไม่ ทั้งยังต้องตรวจสอบอายุการใช้งานรวมถึงคุณสมบัติของสารที่ต้องใช้อยู่เสมอ โดยสารเคมีที่ต้องใช้เป็นประจำในห้องปฏิบัติการมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1) 0.5 M EDTA pH 8.0

ละลาย EDTA (disodium ethylenediaminetetraacetate·2H_20) 168.1 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร คนให้ละลาย ปรับ pH ให้เป็น 8.0 ด้วย NaOH จากนั้น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้ครบ 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน

2) 3 M sodium acetate

ละลาย sodium acetate trihydrate ($CH_3COONa·3H_20$) 40.82 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 5.2 glacial acetic acid ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้ครบ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน เครื่องThermal cycler

3) 5 M sodium chloride

ละลาย sodium chloride (NaCl; M.W. 58.44) 292.2 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร คนให้ละลาย ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้ครบ 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน

4) 1 M Tris-HCl pH 8.0

ละลาย Tris base 12.11 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร คนให้ละลายปรับ pH ให้เป็น 8.0 ด้วย HCl ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้ครบ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน

5) 10% SDS

ละลาย SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) 10 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้ครบ 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

6) 5x TBE (Tris-Borate/EDTA buffer)

ละลาย Tris base 54 กรัม boric acid 27.5 กรัมและ 0.5 MEDTA (pH 8.0) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้ครบ 1000 มิลลิลิตร เก็บเป็นสารละลายสต๊อก (stock solution) เมื่อต้องการใช้ปรับความเข้มข้นเป็น 0.5 X TBE ก่อนนำไปใช้ในขั้นตอน Gel Electrophoresis

7) สารละลายPCI (phenol: chloroform: isoamyl alcohol)

เตรียมโดยการผสม phenol chloroform และ isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 25:24:1 โดยปรับค่า pH ให้อยู่ในช่วง 7.5-8.0

8) 5% Sarkosyl buffer

เตรียมโดยละลาย sarkosyl 25 กรัม ในสารละลาย 5 M sodium chloride ปริมาตร 15 มิลลิลิตร เติม 0.5 M EDTA ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้ครบ 500 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

9) 4% SDS buffer

เตรียมโดยละลาย SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) 20 กรัม ในสารละลาย 5 M sodium chloride ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เติม 1.0M Tris-HCl (pH8.0) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร และ 0.5 M EDTA ปริมาตร 100 มิมิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้ครบ 500 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

10) SDS/Sarkosyl lysis buffer

เติม 4% SDS ปริมาตร 60 มิลลิลิตร 5% Sarkosyl Buffer ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เติม proteinase K ให้มีความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เติม β-mercaptoethanol ปรับความเข้มข้นให้เป็น 0.12% เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

11) สารละลาย I

ประกอบด้วย 50 mM glucose 25 mM Tris-HCl (pH 8.0) และ 10 mM EDTA (pH 8.0) ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน จากนั้นเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

12) BP1 buffer

ประกอบด้วย 50 mM Tris-HCl และ 10 mM EDTA ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน จากนั้นเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

13) Lysis solution

ประกอบด้วย 200 mM NaOH และ 1% SDS ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน จากนั้นเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

14) Neutralize solution

ประกอบด้วย 3 M Potassium acetate pH 5.5, TE buffer, 10 mM Tris-HCl และ 1 mM EDTA ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน จากนั้นเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

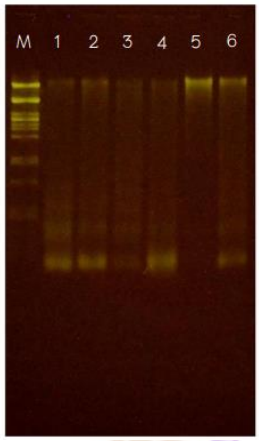
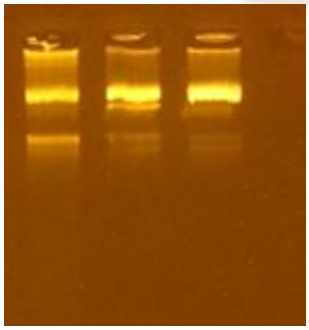
15) อาหารเหลว LB medium (Luria Bertani)

ประกอบด้วย Tryptone 10 กรัม east extract 5 กรัม และ NaCl 5 กรัม เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน จากนั้นเก็บไว้ที่ อุณหภูมิห้อง

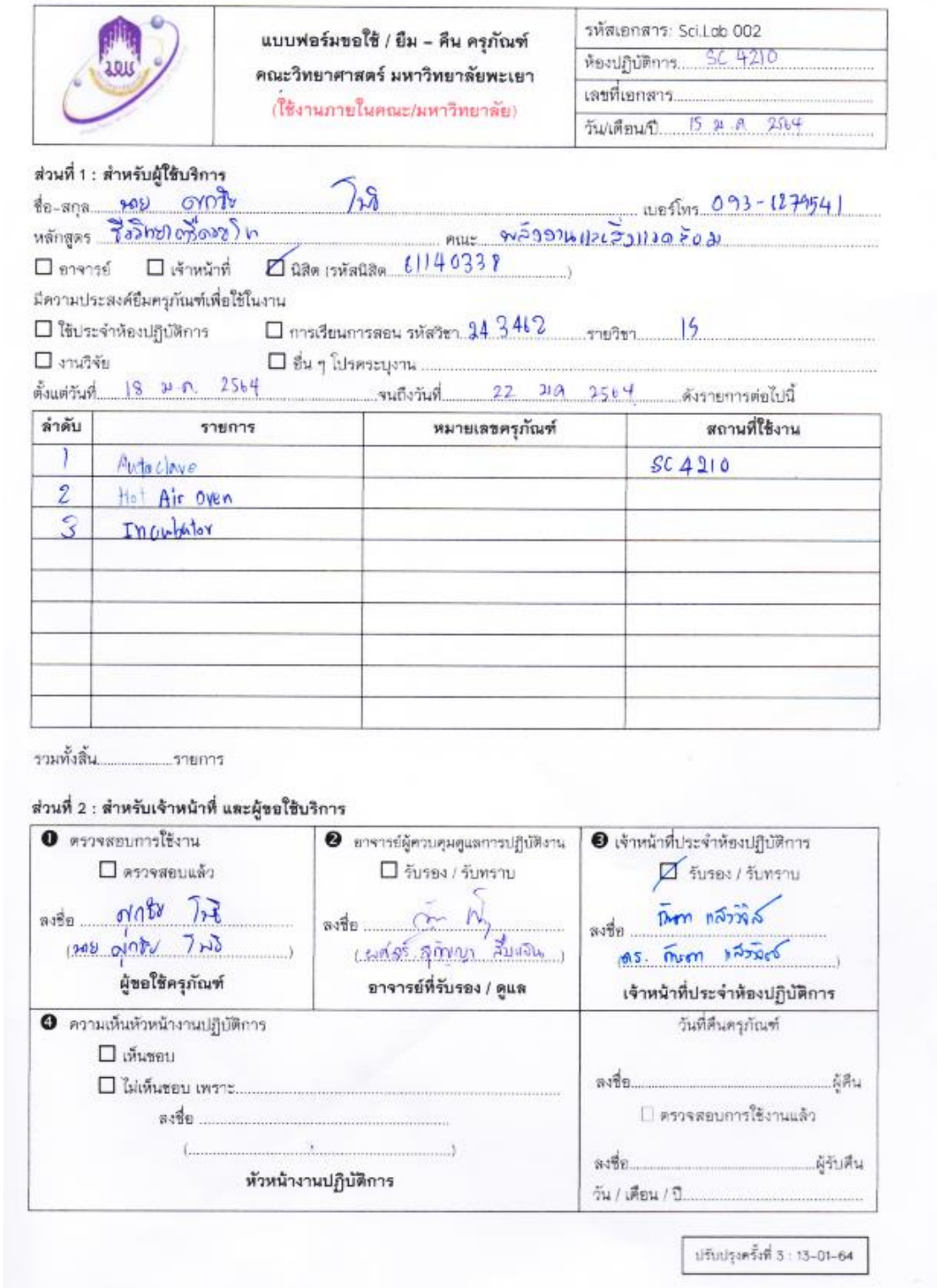
4.3 การติดตามผลปฏิบัติงานและสรุปผลการทดลอง

4.3.1 ตัวอย่างตารางบันทึกผลการทดลอง

ตารางที่ 4.3.1 บันทึกผลการทดลองการสกัดดีเอ็นเอพืช แบคทีเรียและพลาสมิดดีเอ็นเอ

ตัวอย่างที่นำมาสกัด	ภาพของดีเอ็นเอ	ผลการทดลอง
ดีเอ็นเอพืช ได้แก่กาแฟ จำนวน 2 ตัวอย่าง		ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดี
ดีเอ็นเอแบคทีเรีย จำนวน 6 ไอโซเลท		ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดีแต่มีอาร์เอ็นเอปนเปื้อน ควรกำจัดอาร์เอ็นเอออกก่อนนำไปใช้
พลาสมิดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียจำนวน 3 โคโลนี		พลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดี

4.3.2 ตัวอย่างแบบฟอร์มการขอใช้งานอุปกรณ์/เครื่องมือในห้องปฏิบัติการ



แบบฟอร์มขอใช้ / ยืม – คืน ครุภัณฑ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา (ใช้งานภายในคณะ/มหาวิทยาลัย)	รหัสเอกสาร: Sci.Lab 002 ห้องปฏิบัติการ SC 4210 เลขที่เอกสาร วัน/เดือน/ปี 15 ม.ค. 2564

ส่วนที่ 1 : สำหรับผู้ใช้บริการ

ชื่อ-สกุล นาย ยุทธิ โวฮี เบอร์โทร 093-1279541

หลักสูตร วิทยาศาสตรบัณฑิต คณะ พลังงานและสิ่งแวดล้อม

☐ อาจารย์ ☐ เจ้าหน้าที่ ☑ นิสิต (รหัสนิสิต 61140338)

มีความประสงค์ยืมครุภัณฑ์เพื่อใช้ในงาน

☐ ใช้ประจำห้องปฏิบัติการ ☐ การเรียนการสอน รหัสวิชา 24 3412 รายวิชา 15

☐ งานวิจัย ☐ อื่น ๆ โปรดระบุงาน .....

ตั้งแต่วันที่ 18 ม.ค. 2564 จนถึงวันที่ 22 มิ.ย. 2564 ดังรายการต่อไปนี้

ลำดับ	รายการ	หมายเลขครุภัณฑ์	สถานที่ใช้งาน
1	Autoclave		SC 4210
2	Hot Air Oven		
3	Incubator		

รวมทั้งสิ้น ..... รายการ

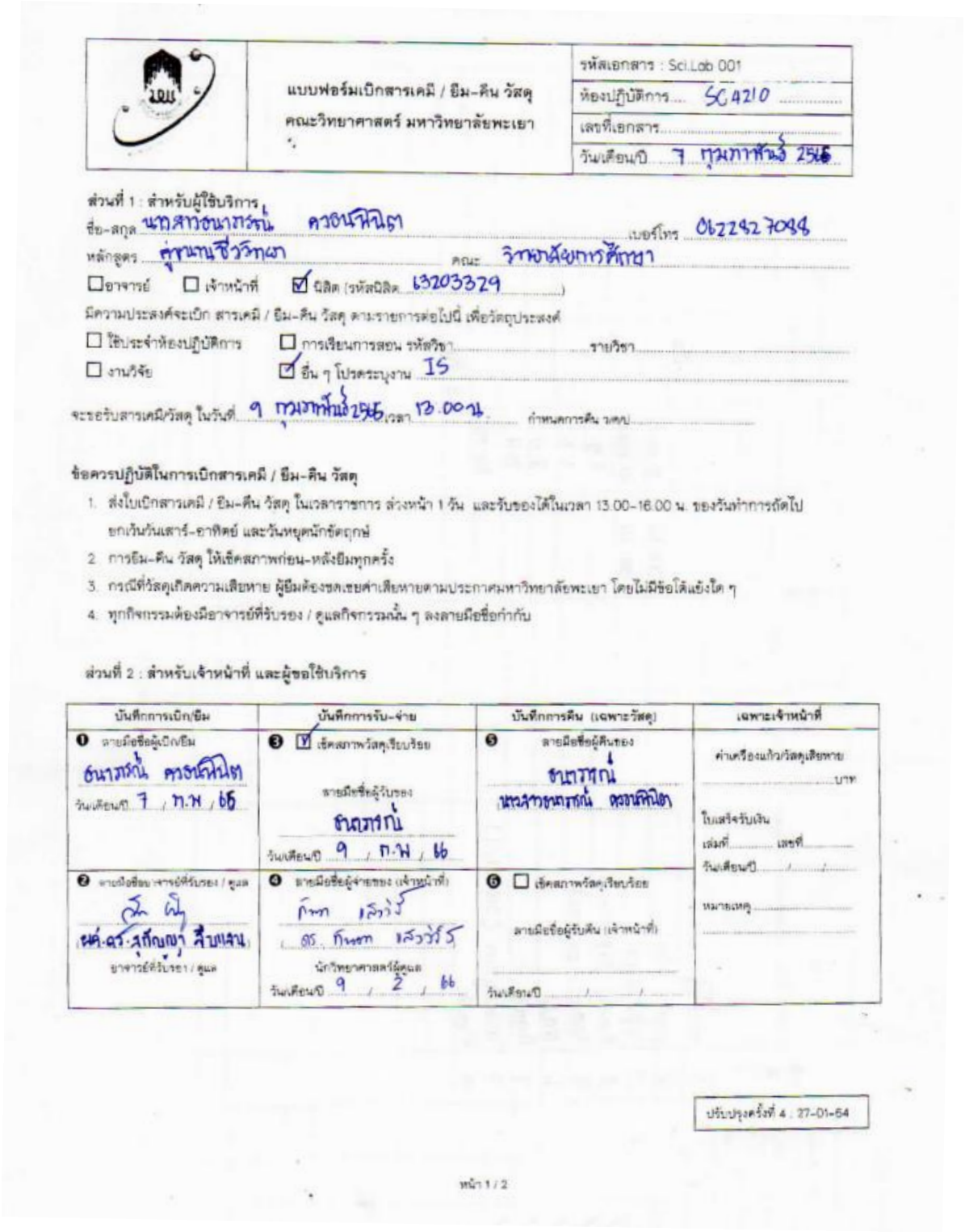
ส่วนที่ 2 : สำหรับเจ้าหน้าที่ และผู้ขอใช้บริการ

❶ ตรวจสอบการใช้งาน	❷ อาจารย์ผู้ควบคุมดูแลการปฏิบัติงาน	❸ เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการ
☐ ตรวจสอบแล้ว	☐ รับรอง / รับทราบ	☑ รับรอง / รับทราบ
ลงชื่อ ยุทธิ โวฮี	ลงชื่อ	ลงชื่อ .....
(นาย ยุทธิ โวฮี)	(รองศาสตร์ สุกัญญา สืบสงวน)	(ดร. กิตติ สลิวสิส)
ผู้ขอใช้ครุภัณฑ์	**อาจารย์ที่รับรอง / ดูแล**	**เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการ**

❹ ความเห็นหัวหน้างานปฏิบัติการ	วันที่คืนครุภัณฑ์
☐ เห็นชอบ ☐ ไม่เห็นชอบ เพราะ ..... ลงชื่อ ..... (.....) **หัวหน้างานปฏิบัติการ**	ลงชื่อ ..... ผู้คืน ☐ ตรวจสอบการใช้งานแล้ว ลงชื่อ ..... ผู้รับคืน วัน / เดือน / ปี .....

ปรับปรุงครั้งที่ 3 : 13-01-64

4.3.3 ตัวอย่างแบบฟอร์มการเบิกสารเคมี ยืม-คืน วัสดุ ในห้องปฏิบัติการ



	แบบฟอร์มเบิกสารเคมี / ยืม-คืน วัสดุ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา	รหัสเอกสาร : Sci.Lab 001 ห้องปฏิบัติการ SC 4210 เลขที่เอกสาร วัน/เดือน/ปี 7 กุมภาพันธ์ 2566

ส่วนที่ 1 : สำหรับผู้ใช้บริการ

ชื่อ-สกุล นางสาวธนาภรณ์ ควรนาหินตา เบอร์โทร 0622927088

หลักสูตร คุ้มครองผู้บริโภค คณะ วิทยาศาสตร์การศึกษา

☐ อาจารย์ ☐ เจ้าหน้าที่ ☑ นิสิต (รหัสนิสิต 63203329)

มีความประสงค์จะเบิก สารเคมี / ยืม-คืน วัสดุ ตามรายการต่อไปนี้ เพื่อวัตถุประสงค์

☐ ใช้ประจำห้องปฏิบัติการ ☐ การเรียนการสอน รหัสวิชา รายวิชา

☐ งานวิจัย ☑ อื่น ๆ โปรดระบุงาน IS

จะขอรับสารเคมี/วัสดุ ในวันที่ 9 กุมภาพันธ์ 2566 เวลา 13.00 น. กำหนดการคืน วดบ.

ข้อควรปฏิบัติในการเบิกสารเคมี / ยืม-คืน วัสดุ

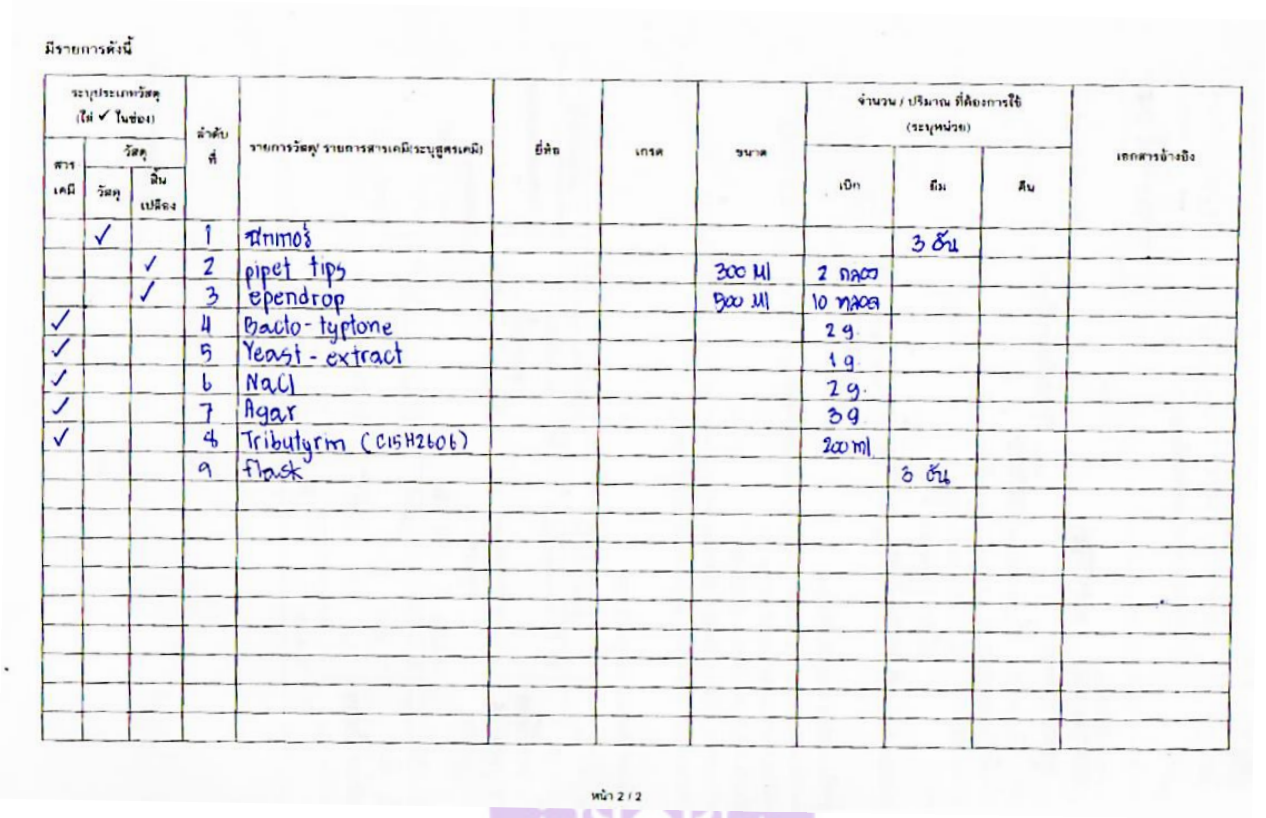
1. ส่งใบเบิกสารเคมี / ยืม-คืน วัสดุ ในเวลาราชการ ล่วงหน้า 1 วัน และรับของได้ในเวลา 13.00-16.00 น. ของวันทำการถัดไป ยกเว้นวันเสาร์-อาทิตย์ และวันหยุดนักขัตฤกษ์
2. การยืม-คืน วัสดุ ให้เช็คสภาพก่อน-หลังยืมทุกครั้ง
3. กรณีที่วัสดุเกิดความเสียหาย ผู้ยืมต้องชดเชยค่าเสียหายตามประกาศมหาวิทยาลัยพะเยา โดยไม่มีข้อโต้แย้งใด ๆ
4. ทุกกิจกรรมต้องมีอาจารย์ที่ปรึกษา / ดูแลกิจกรรมนั้น ๆ ลงลายมือชื่อกำกับ

ส่วนที่ 2 : สำหรับเจ้าหน้าที่ และผู้ขอใช้บริการ

บันทึกการเบิก/ยืม	บันทึกการรับ-จ่าย	บันทึกการคืน (เฉพาะวัสดุ)	เฉพาะเจ้าหน้าที่
❶ ลายมือชื่อผู้เบิก/ยืม ธนาภรณ์ ควรนาหินตา วัน/เดือน/ปี 7 / ก.พ / 66	❸ ☑ เช็คสภาพวัสดุเรียบร้อย ลายมือชื่อผู้รับของ ธนาภรณ์ วัน/เดือน/ปี 9 / ก.พ / 66	❺ ลายมือชื่อผู้คืนของ ธนาภรณ์ หนาภรณ์ ควรนาหินตา	ค่าเครื่องแก้ว/วัสดุเสียหาย บาท ใบเสร็จรับเงิน เล่มที่ เลขที่ วัน/เดือน/ปี / / หมายเหตุ
❷ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา / ดูแล (ผศ.ดร.สุกัญญา สืบแสน) อาจารย์ที่ปรึกษา / ดูแล	❹ ลายมือชื่อผู้จ่ายของ (เจ้าหน้าที่) (นส. กันยกร เสวิรัง) นักวิทยาศาสตร์ผู้ดูแล วัน/เดือน/ปี 9 / 2 / 66	❻ ☐ เช็คสภาพวัสดุเรียบร้อย ลายมือชื่อผู้รับคืน (เจ้าหน้าที่) วัน/เดือน/ปี / /	

ปรับปรุงครั้งที่ 4 : 27-01-64

หน้า 1 / 2



มีรายการดังนี้

ระบุประเภทวัสดุ (ใส่ ✓ ในช่อง)			ลำดับที่	รายการวัสดุ/ รายการสารเคมี(ระบุสูตรเคมี)	ยี่ห้อ	เกรด	ขนาด	จำนวน / ปริมาณ ที่ต้องการใช้ (ระบุหน่วย)			เอกสารอ้างอิง
สารเคมี	วัสดุ	สิ้นเปลือง						เบิก	ยืม	คืน	
	✓		1	Animo3					3 อัน		
		✓	2	pipet tips			300 ml	2 กล่อง			
		✓	3	ependrop			500 ml	10 กล่อง			
✓			4	Bacto-tyrtone				2 g			
✓			5	Yeast-extract				1 g			
✓			6	NaCl				2 g			
✓			7	Agar				3 g			
✓			8	Tributyrin ($C_{15}H_{26}O_6$)				200 ml			
			9	flask					3 อัน		

หน้า 2 / 2

4.4 จรรยาบรรณและจริยธรรมในการปฏิบัติงาน

จรรยาบรรณนักวิจัย อ้างอิงจาก สภาวิจัยแห่งชาติ คณะกรรมการบริหารสภาวิจัยแห่งชาติได้กำหนดจรรยาบรรณนักวิจัยขึ้น เพื่อใช้เป็นแนวหลักเกณฑ์ควรประพฤติของนักวิจัยทั่วไปไม่ว่าสาขาวิชาการใด ๆ โดยให้มีลักษณะเป็นข้อพึงสังวรณ์คุณธรรมและจริยธรรมในการทำงานวิจัยของนักวิจัยไทย ดังนี้ นักวิจัย หมายถึง ผู้ที่ดำเนินการค้นคว้าหาความรู้อย่างเป็นระบบ เพื่อตอบประเด็นที่สงสัย โดยมีระเบียบวิธีอันเป็นที่ยอมรับในแต่ละศาสตร์ที่เกี่ยวข้อง ระเบียบวิธีดังกล่าวจึงครอบคลุมทั้งแนวคิด มโนทัศน์ และวิธีการที่ใช้ในการรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล

จรรยาบรรณ หมายถึง หลักความประพฤติอันเหมาะสม แสดงถึงคุณธรรมและจริยธรรมในการประกอบอาชีพที่กลุ่มบุคคลและแต่ละสาขาวิชาชีพประมวลขึ้นไว้เป็นหลักเพื่อให้สมาชิกในวิชาชีพนั้น ๆ ยึดถือปฏิบัติ เพื่อรักษาชื่อเสียงและส่งเสริมเกียรติคุณของสาขาวิชาชีพของตน

จรรยาบรรณในการวิจัย จัดเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของระเบียบวิธีวิจัย เนื่องด้วยในกระบวนการค้นคว้าวิจัยนักวิจัยจะต้องเข้าไปเกี่ยวข้องใกล้ชิดกับสิ่งที่ศึกษา ไม่ว่าจะเป็นสิ่งมีชีวิตหรือไม่มีชีวิต การวิจัยจึงอาจส่งผลกระทบในทางลบต่อสิ่งที่ศึกษาได้ หากผู้วิจัยขาดความรอบคอบระมัดระวัง การวิจัยเป็นกิจกรรมที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการวางแผน และกำหนดนโยบายในการพัฒนาประเทศทุกด้าน โดยเฉพาะการพัฒนาคุณภาพชีวิตของคนใน

ประเทศ ผลงานวิจัยที่มีคุณภาพขึ้นอยู่กับความรู้ความสามารถของนักวิจัยในเรื่องที่ศึกษา และขึ้นอยู่กับคุณธรรมจริยธรรมของนักวิจัยในการทำงานวิจัยด้วย ผลงานวิจัยที่ด้อยคุณภาพด้วยสาเหตุใดก็ตาม หากเผยแพร่ออกไปอาจเป็นผลเสียต่อวงวิชาการและประเทศชาติได้ ด้วยเหตุนี้ สภาวิจัยแห่งชาติจึงกำหนด จรรยาบรรณนักวิจัยไว้เป็นแนวทางสำหรับนักวิจัยยึดถือปฏิบัติเพื่อให้การดำเนินงานวิจัยตั้งอยู่บนพื้นฐานของจริยธรรมและหลักวิชาการที่เหมาะสม ตลอดจนประกันมาตรฐานของการศึกษาค้นคว้าให้เป็นไปอย่างสมศักดิ์ศรีและเกียรติภูมิของนักวิจัยไว้ 9 ประการ ดังนี้

(1) นักวิจัยต้องซื่อสัตย์และมีคุณธรรมในทางวิชาการและการจัดการ นักวิจัยต้องมีความซื่อสัตย์ต่อตนเอง ไม่นำผลงานของผู้อื่นมาเป็นของตน ไม่ลอกเลียนงานของผู้อื่น ต้องให้เกียรติและอ้างถึงบุคคลหรือแหล่งที่มาของข้อมูลที่นำมาใช้ในงานวิจัย ต้องซื่อตรงต่อการแสวงหาทุนวิจัย และมีความเป็นธรรมเกี่ยวกับผลประโยชน์ที่ได้จากการวิจัย

(2) นักวิจัยต้องตระหนักถึงพันธกรณีในการทำวิจัยตามข้อตกลงที่ทำไว้กับหน่วยงานที่สนับสนุน การวิจัย และต่อหน่วยงานที่ตนสังกัด นักวิจัยต้องปฏิบัติตามพันธกรณีและข้อตกลงการวิจัยที่ผู้เกี่ยวข้องทุกฝ่ายยอมรับร่วมกัน อุทิศเวลาทำงานวิจัยให้ได้ผลดีที่สุดและเป็นไปตามกำหนดเวลา มีความรับผิดชอบไม่ละทิ้งงานระหว่างดำเนินการ

(3) นักวิจัยต้องมีพื้นฐานความรู้ในสาขาวิชาการที่ทำวิจัย นักวิจัยต้องมีพื้นฐานความรู้ในสาขาวิชาการที่ทำการวิจัยอย่างเพียงพอ และมีความรู้ความชำนาญหรือมีประสบการณ์เกี่ยวเนื่องกับเรื่องที่ทำวิจัยเพื่อนำไปสู่งานวิจัยที่มีคุณภาพและเพื่อป้องกันปัญหาการวิเคราะห์ การตีความ หรือการสรุปที่ผิดพลาด อันอาจก่อให้เกิดความเสียหายต่องานวิจัย

(4) นักวิจัยต้องมีความรับผิดชอบต่อสิ่งที่ศึกษาวิจัย ไม่ว่าจะเป็นสิ่งที่มีชีวิตหรือไม่มีชีวิต นักวิจัยต้องดำเนินการด้วยความรอบคอบระมัดระวังและเที่ยงตรงในการทำวิจัย

(5) นักวิจัยต้องเคารพศักดิ์ศรีและสิทธิมนุษย์ที่ใช้เป็นตัวอย่างในการวิจัย นักวิจัยต้องไม่คำนึงถึงผลประโยชน์ทางวิชาการจนละเลยและขาดความเคารพในศักดิ์ศรีของเพื่อนมนุษย์ต้องถือเป็นภาระหน้าที่ที่จะอธิบายจุดมุ่งหมายของการวิจัยแก่บุคคลที่เป็นกลุ่มตัวอย่างโดยไม่หลอกลวงหรือบีบบังคับ และไม่ละเมิดสิทธิส่วนบุคคล

(6) นักวิจัยต้องมีอิสระทางความคิดโดยปราศจากอคติในทุกขั้นตอนของการวิจัย นักวิจัยต้องมีอิสระทางความคิด ต้องตระหนักว่าอคติส่วนตนหรือความลำเอียงทางวิชาการอาจส่งผลให้มีการบิดเบือนข้อมูลและข้อค้นพบทางวิชาการ อันเป็นเหตุให้เกิดเสียหายต่องานวิจัย

(7) นักวิจัยพึงนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ในทางที่ชอบและเผยแพร่งานวิจัยเพื่อประโยชน์ทางวิชาการและสังคม ไม่ขยายผลต่อข้อค้นพบจนเกินความเป็นจริง

(8) นักวิจัยพึงเคารพความคิดเห็นทางวิชาการของผู้อื่น นักวิจัยพึงมีใจกว้าง พร้อมที่จะเปิดเผยข้อมูลและขั้นตอนการวิจัย ยอมรับฟังความคิดเห็นและเหตุผลทางวิชาการของผู้อื่น และพร้อมที่จะปรับปรุงแก้ไขงานวิจัยของตนให้ถูกต้อง

(9) นักวิจัยพึงมีความรับผิดชอบต่อสังคมทุกระดับ นักวิจัยพึงมีจิตสำนึกที่จะอุทิศกำลังสติปัญญาในการทำวิจัยเพื่อความก้าวหน้าทางวิชาการเพื่อความเจริญและประโยชน์สุขของสังคมและมวลมนุษยชาติ

บทที่ 5

ปัญหา อุปสรรค และข้อเสนอแนะ

5.1 ปัญหา อุปสรรคในการปฏิบัติงาน

จากการปฏิบัติหน้าที่ในการทำงานวิจัยและดูแลนิสิตในห้องปฏิบัติการ Plasma Bioengineering ได้ทำการสังเกตและพบปัญหา หรืออุปสรรคที่เกิดขึ้นในระหว่างการปฏิบัติงาน เพื่อให้การดำเนินงานเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ จึงได้รวบรวมปัญหา อุปสรรคและแนวทางการแก้ไข ดังแสดงในตารางที่ 5.1.1

ตารางที่ 5.1.1 แสดงปัญหาและอุปสรรคและแนวทางแก้ไขและพัฒนางาน

ขั้นตอนการดำเนินงาน	ปัญหา/อุปสรรค	แนวทางการแก้ไข
ศึกษารายละเอียดของรายวิชาและตารางเรียน	1.การใช้ห้องปฏิบัติการในการทำวิจัยซ้อนทับกับตารางเรียนของนิสิต	1.อาจารย์ที่ปรึกษาและนักวิจัยทำการตรวจสอบตารางการเรียนของนิสิตและวางแผนการทดลองและการใช้ห้องปฏิบัติงานในระยะยาวก่อนนิสิตจะเข้ามาทำงานวิจัย
รวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล ให้คำแนะนำการวางแผนการทดลองและขั้นตอนปฏิบัติงานแก่นิสิต	1.นิสิตมีพื้นฐานความรู้และความเข้าใจต่องานวิจัยไม่เพียงพอ	1.ให้คำแนะนำเกี่ยวกับวารสารวิชาการและคู่มือปฏิบัติงานหรือหนังสือที่นิสิตต้องไปอ่านเพิ่มเติมและทำการทดสอบความเข้าในเนื้อหาและขั้นตอนการทดลองของนิสิตโดยให้นำเสนองานวิจัย (journal club)
จัดเตรียมความพร้อมของวัสดุ อุปกรณ์ สารเคมีและห้องปฏิบัติการ	1.สารเคมีที่ต้องใช้ในงานวิจัยบางรายการมีไม่ครบ 2.อุปกรณ์หรือเครื่องมือบางชิ้นต้องการการซ่อมบำรุง	1.นักวิจัยประสานงานกับอาจารย์ที่ปรึกษาเพื่อทำการซื้อสารเคมีโดยต้องทำการสำรวจสารเคมีที่ต้องใช้ก่อนลงมือทำงานวิจัย 30-45 วันเนื่องจากสารเคมีบางชนิดต้องทำเข้าจากต่างประเทศ

		2. ทำการตรวจเช็คอุปกรณ์และเครื่องมืออย่างสม่ำเสมอเพื่อทำการซ่อมบำรุงก่อนเกิดความเสียหาย
การเบิก-จ่าย สารเคมีหรือวัสดุอุปกรณ์ตามรายชื่อ	1.นิสิตไม่ตรวจสอบสารเคมี วัสดุ หรืออุปกรณ์ที่ต้องการใช้ก่อนการปฏิบัติงาน 2. นิสิตรส่งใบยืมคืนล่าช้า 3. เครื่องแก้วหรืออุปกรณ์เกิดการชำรุดเสียหาย	1. กำหนดระยะเวลาที่ต้องเบิกสารเคมีและอุปกรณ์ก่อนการปฏิบัติงาน 2. กำหนดวัน เวลาส่งใบยืมคืน 3. ให้นิสิตปฏิบัติตามระเบียบการปลอดหนี้ก่อนจบภาคการศึกษา
การใช้เครื่องมือหรือครุภัณฑ์	1.นิสิตหลายกลุ่มที่ปฏิบัติงานพร้อมกันต้องการใช้เครื่องมือหรืออุปกรณ์ในเวลาเดียวกัน 2. นิสิต/ผู้ปฏิบัติงานไม่มีความรู้เกี่ยวกับการใช้เครื่องมือ หรือใช้ผิดวิธี	1. จัดทำสมุดบันทึกการใช้งานประจำเครื่องมือหรือครุภัณฑ์แต่ละชนิดโดยต้องการทำการจองการใช้งานล่วงหน้าโดยแจ้งนักวิจัยที่ดูแลเครื่อง 2. ให้การแนะนำการใช้เครื่องมือโดยจัดทำคู่มือการใช้งานประจำเครื่องมือแต่ละชนิดและทำการทบทวนความเข้าใจของการใช้เครื่องมือก่อนทำการปฏิบัติงานทุกครั้ง
ตรวจสอบผลการวิจัยให้คำปรึกษาด้านการวิเคราะห์ผลการทดลอง	1.ผลการทดลองไม่เป็นไปตามสมมุติฐาน	1.ทำการตรวจสอบขั้นตอนการทดลองและสารเคมีที่ใช้ว่าถูกต้องหรือไม่ และหาข้อมูลเพิ่มเติมจากวารสารวิชาการที่เกี่ยวข้องเพื่อวางแผนการทดลองเพิ่มเติมและทำการทดลองใหม่
ให้คำแนะนำการเขียนอภิปรายและสรุปผลการทดลอง	1.นิสิตสรุปผลการทดลองคลาดเคลื่อนหรืออภิปรายผลการทดลองไม่ตรงประเด็น	1. ตรวจสอบและแนะนำการเขียนสรุปและช่วยวิเคราะห์ผลการทดลองพร้อมทั้งแนะแนวทางการเขียน

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 นักวิจัยและอาจารย์ที่ปรึกษาควรชี้แจงเรื่องขั้นตอนการปฏิบัติงานให้แก่นิสิตก่อนการปฏิบัติงานอย่างเคร่งครัดและต้องทำการสำรวจสารเคมีและอุปกรณ์ที่ต้องใช้ก่อนการเริ่มปฏิบัติงานอย่างน้อย 30 วัน เนื่องจากสารเคมีบางอย่างใช้ระยะเวลานานในการนำเข้าจากต่างประเทศ

5.2.2 ควรจัดทำระเบียบข้อบังคับในการเข้าใช้ห้องปฏิบัติการ และเครื่องมือต่างๆ และให้นิสิตหรือผู้ปฏิบัติงานได้ทบทวนการใช้งานก่อนการปฏิบัติงานทุกครั้ง

5.2.3 ควรกำหนดระยะเวลาที่แน่นอนก่อนการเบิก-จ่ายวัสดุ และสารเคมีแก่นิสิตเพื่อให้การดำเนินงานเป็นไปตามขั้นตอน

5.2.4 หากเป็นการทำงานวิจัยเชิงลึกควรหาเครือข่ายหรือนักวิจัยที่เชี่ยวชาญในสาขาต่าง ๆ กัน เพื่อช่วยวางแผนงานวิจัยและควรติดตามศึกษางานวิจัยและความรู้สมัยใหม่เพื่อนำมาปรับใช้กับงานวิจัยเพื่อให้งานวิจัยทำได้อย่างรวดเร็ว และสามารถสร้างองค์ความรู้ใหม่ที่สามารถนำไปต่อยอดงานวิจัยได้

.

บรรณานุกรม

Anuntalabhochai S, Chiangda J, Chandet R, Apawat P. Genetic diversity within Lychee (*Litchi chinensi*s Soonn.) based on RAPD analysis. Cairhs: International Symposium on Tropical and Subtropical Fruit. 26th November-1st December 2000: 45

Amarakoon I.I, Hamilton C.L, Mitchell S.A, Tennant P.F, Roye M.E, Chapter 28 - Biotechnology, Editor(s): Simone Badal, Rupika Delgoda, Pharmacognosy, Academic Press. 2017. 549-563

Avery O, Colin M, and Maclyn M. Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types: Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type III. The Journal of Experimental Medicine. 1944: 137–58.

Chundet R, Cutler RW, Tasanon M, Anuntalabhochai S. Hybrid detection in lychee *(Litchee chinensis* Sonn.) cultivars using HAT-RAPD markers. Sci Asia. 2007. 33: 307–311

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. 1987. 19(1), 11-15

Healey A, Furtado A, Cooper T, Henry RJ. Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. Plant Methods. 2014: (27)10-21.

Hershey A.D, and Martha Chase. Independent Functions of Viral Protein and Nucleic Acid in Growth of Bacteriophage. The Journal of General Physiology. 1952: 39–56.

Kiran U, Khan S, Mirza K. J, Ram M and M. Z. Abdin. SCAR markers: A potential tool for authentication of herbal drugs, Fitoterapia. 2010. 81 (8): 969-976

Kurnaz, I.A. Techniques in Genetic Engineering (1st ed.). CRC Press. 2015.

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. NY. 1982

Marcelo E. Tolmasky, Plasmids, Reference Module in Life Sciences. Elsevier. 2022. ISBN 9780128096338,

Mendel, G. Versuche über Plflanzen-hybriden. Verhandlungen des naturforschenden Ver-eines in Brünn, Bd. IV für das Jahr. 1865. Abhand-lungen. 1866. 3–47 (Bateson translation)

Meselson M, Yuan R. DNA Restriction Enzyme from *E. coli*. Nature. 1968. 217: 1110–1114

Micheli M.R, Bova R, Pascale E, D'Ambrosio E. Reproducible DNA fingerprinting with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method. Nucleic Acids Res. 1994. 22: 1921–1922

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1986. 51(1) :263-73

Phromthep W. A new genetic analysis of *Ficus* spp. By HAT-Random amplified Polymorphic DNA Technique. Procedia Engineering. 2012. 32: 1073-1079

Rosenberg Eugene, Genetic Engineering, It's in Your DNA: Chapter 10, Academic Press, 2017, 81-93, https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812502-1.00010-X.

Ruangsuttapha S. Eimert K. Schröder MB. Silayoi B. Denduangboripant J. and Kanchanapoom K. Molecular phylogeny of banana cultivars from Thailand based on HAT-RAPD markers. Genetic Resources and Crop Evolution. 2007. 54: 1565-1572

Sangwijit K, Thangsunan P, Cutler R and Anuntalabhochai S. Development of SCAR Marker for Thai Fragrant Rice (*Oryza sativa* L. var.indica cv. Pathumthani 1) Mutants Induced by Low Energy Ion Beam. Chiang Mai Journal of Science. 2012. 39: 545-553

Sripalwit P, Wongsawad C, Wongsawad and Anuntalabhochai S. High annealing temperature-random amplified polymorphic DNA (HAT-RAPD) analysis of three paramphistome flukes from Thailand. Experimental Parasitology. 2007. 115 (1): 98-102

Suttaduk N. Dheeranupattana S. Rotarayanont S. Using HAT-RAPD technique for species identification of *Stemona* spp. roots. Thai J. Genet. 2015. 8(2): 106–110

การเชื่อมต่อดีเอ็นเอแบบปลายทู่สองสายเข้าด้วยกันด้วยเอนไซม์ ligase, 2022 สืบค้นจาก https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/brochures/generating-recombinant-dna-clones-white-paper.pdf

การเชื่อมต่อดีเอ็นเอแบบปลายเหนียวสองสายเข้าด้วยกันด้วย ligase, 2022. สืบค้นจาก https://ocw.mit.edu/courses/20-109-laboratory-fundamentals-in-biological-engineering-fall-2007/pages/labs/mod1_3/

แผนที่พันธุกรรมและรายละเอียดของพลาสมิด pCR Blunt II TOPO, 2022. สืบค้นจาก TOPO Blunt-End for Subcloning | Thermo Fisher Scientific - TH

แผนที่พันธุกรรมและรายละเอียดของพลาสมิด pET-22b(+), 2022. สืบค้นจาก Addgene: pET-22b(+)-HpENR

แผนที่พันธุกรรมและรายละเอียดของพลาสมิด pETDuet-1, 2022. สืบค้นจาก https://www.snapgene.com/plasmids/pet_and_duet_vectors_(novagen)/pETDuet-1

แผนที่พันธุกรรมและรายละเอียดของพลาสมิด pTZ57R/T, 2022. สืบค้นจาก https://www.snapgene.com/plasmids/ta_and_gc_cloning_vectors/pTZ57R_T

แผนที่พันธุกรรมและรายละเอียดของพลาสมิด pUC19, 2022. สืบค้นจาก https://www.addgene.org/50005/

องค์ประกอบและขั้นตอนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส, 2022. สืบค้นจาก https://facellitate.com/advantages-and-disadvantages-of-pcr- และ technology/https://www.britannica.com/science/polymerase-chain-reaction

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) ดร. กันตา แสงวิจิตร

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Dr. Kanta Sangwijit

ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิจัยหน่วย Plasma Bioengineering
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา

โทรศัพท์ 0622474598

E-mail: sangwijit.k@gmail.com

ประวัติการศึกษา วท.บ. ชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ (2006)
วท.ด. ชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ (2012)
(**The Royal Golden Jubilee Ph.D Program/**5 years program)

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ Gene engineering and biotechnology, Plasma technology for crop and microorganism improvement

ประวัติการฝึกงาน Department of Biotechnology, college of Life Science, Ritsumeikan University, Shika, Japan (2011–2012)

ผลงานวิจัย

1. N. Dum-Ampai, S. Sitthiphrom, J. Marha, B. Thakumphu, S. Anuntalabhochai, **K. Sangwijit** and S. Suebsan, 2023. Evaluation of genetic variation in longan (*Dimocarpus longan* Lour) by high annealing temperature random amplified polymorphic DNA (HAT–RAPD). CREATIVE SCIENCE. Vol. 15 NO. 2

2. S. Suebsan, C. Mee-u-sah, S. Suyana, M. Onprachoo, **K. Sangwijit** and S. Anantalabhochai, 2023. Evaluation of Antifungal Activity from *Bacillus subtilis* strain AS80 Against Pathogenic Fungi Isolated from Hass Avocado Fruits. CMJS. Vol.50 No.2
3. N. Polsa, W. Suyotha, S. Suebsan, S. Anuntalabhochai, **K. Sangwijit**. 2020. Increasing xylanase activity of Bacillus subtilis by atmospheric pressure plasma jet for biomass hydrolysis. 3 Biotech, Vol 10:22
4. H. Laksuk, , S. Anuntalabhochai, **K. Sangwijit**, N. Boonrueng, S. Suebsan, C. Thongrote. 2019. Induced Mutations of Naked DNA by Atmospheric Pressure Plasma Jet (APPJ). SWU Sci. J. Vol. 35 No. 2
5. R. Kalawong, M.Wakayama, S. Anuntalabhochai, C. Wongsawad, **K. Sangwijit.** 2018. Comparison and Characterization of Purified Cellulase and Xylanase from *Bacillus amyloliquefaciens* CX1 and *Bacillus subtilis* B4. Chiang Mai Journal of Science, Vol. 45(1): 92-105
6. S. Suebsan, S. Sitthiphrom, **K. Sangwijit**, M. Sanguansermsri, S. Anuntalabhochai. 2017. Expression Analysis of Rice Polygalacturonase cDNA Responding to Brown Planthopper [Nilaparvata lugens (Stål)]. Genomics and Genetics 2017, 10(1&2): 13–20 10
7. **K Sangwijit,** J. Jitonnom, S. Pitakrattananukool, L.D. Yu, S**.** Anuntalabhochai**.** 2016. Low-energy plasma immersion ion implantation modification of bacteria to enhance hydrolysis of biomass material. Surface and Coatings Technology. Vol 306: 336-340
8. **K. Sangwijit**, L.D. Yu. S. Sarapirom, S. Pitakrattanukool, S. Anuntalabhochai. 2015. Low-energy plasma immersion ion implantation to induce DNA transfer into bacterial *E. coli.* Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B. vol. 365: 389 -393
9. L.D. Yu, **K Sangwijit**, K. Prakrajang, B. Phanchaisri, P. Thongkumkoon, P. Thopan, S. Singkarat, S. Anuntalabhochai. 2014. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B. vol.326: 204-208

10. P. Thongkumkoon, **K. Sangwijit**, C. Chaiwong, S. Thongtem, P. Singjai, L.D. Yu. 2014. Direct nanomaterial-DNA contact effects on DNA and mutation induction. Toxicology Letters, Vol. 226: 90-97
11. L.D. Yu, W. Wongkham, K. Prakrajang, **K. Sangwijit**, K. Inthanon, P. Thongkumkoon, P. Wanichapichart, S. Anuntalabhochai. 2013. Nano-ranged low-energy ion-beam-induced DNA transfer in biological cells. Applied Surface Science, Vol. 275: 136–141
12. **K. Sangwijit**, P Thangsunan, R. W. Cutler and S Anuntalabhochai. 2012. Development of SCAR marker for Thai fragrant rice (*Oryza sativa* L. var.indica cv. Pathumthani 1) mutants Induced by Low Energy Ion Beam. Chiang Mai Journal of Science, Vol. 39(4): 545-553.
13. K. Prakrajang, **K. Sangwijit**, S. Anuntalabhochai, P. Wanichapichart and L.D. Yu. 2012. Low-energy ion beam bombardment effect on the plant-cell-envelope mimetic membrane for DNA transfer, Nucl. Instr. Meth. B, 28:329-333.
14. K. Prakrajang, **K. Sangwijit**, S. Anuntalabhochai, P. Wanichapichart and L.D. Yu. 2012. Neutralized ion beam modification of cellulose membranes for study of ion charge effect on ion-beam-induced DNA transfer, Nucl. Instr. Meth. B, Vol. 272, 1, P.382-385.
15. S. Sarapirom, **K. Sangwijit**, S. Anuntalabhochaiand L.D. Yu. 2010. Plasma immersion low-energy-ion bombardment of naked DNA, Surf. Coat.Technol, Vol. 204, Issues 18–19, P. 2960-2965.

การนำเสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์

1. S. Suebsan, C. Mee-u-sah, S. Suyana, M. Onprachoo, **K. Sangwijit**, S. Anantalabhochai, 2022. Antifungal Activity of Bacillus subtilis Against Pathogenic Fungi Associated with Avocado Fruits, poster presentation to the Innovation for Resilient Agriculture Conference, Chiang Mai, Thailand.
2. N. Polsa, C. Thongrote, S. Anuntalabhochai, **K. Sangwijit**, 2020. DNA modification of purple glutinous rice seeds by Radio Frequency Capacitively Coupled Plasma system, poster

presentation to the 3rd International Conference on Radiation and Emission in Materials ITSC, Chiang Mai University Chiang Mai, Thailand.

3. N. Polsa, **K. Sangwijit**, C. Thongrote. S. Anuntalabhochai, 2019. Induction mutation of cellulase and xylanase genes by low-energy plasma for cattle feed, poster presentation to The 14th Asian Congress on Biotechnology in conjunction with 2019 BEST Conference & International Symposium on Biotechnology and Bioengineering. Tamsui Fishermen's Wharf, Taiwan.
4. K. Prakrajang, **K. Sangwijit,** S. Anuntalabhochai, P. Wanichapichart, L.D. Yu. 2011. Effect on the Plant-Cell-Envelope Mimetic Membrane for DNA Transformation, poster presentation to 16th international Conference on Radiation Effects in Insulators. Beijing, China.
5. K. Prakrajang, **K. Sangwijit,** S. Anuntalabhochai, P. Wanichapichart, L.D. Yu. 2010. Neutralized Ion Beam Modification of Cellulose Membrane for Study of Ion Charge Effect on Ion-beam-induce DNA Transfer, presented and submitted to the 17th international Conference on Ion Beam Modification of Materials. Montreal, Canada.
6. K. Prakrajang, **K. Sangwijit,** S. Sarapirom, S. Anuntalabhochai, P. Wanichapichart, D. Suwannakachorn, L.D. Yu. 2009. Charge Effect on Membrane Impedance Modification of Ion Bombarded Cellulose-Mimetic Plant Cell Envelope, presented and submitted to the 16th international Conference on Surface Modification by Ion Beams (SMMIB2009). Tokyo, Japan
7. W. Yawichai, S. Krudngirn, **K. Sangwijit,** S. Anuntalabhochai. 2007. Low energy ion beam induced mutation in Pathumthani 1 Rice (*Oryza sativa* L.var. *indica*). Poster presentation at The 33rd Congress on Science & Technology of Thailand, Nakhonsithammarat, Thailand.
8. **K**. **Sangwijit,** K. Cheawchan, S. Anuntalabhochai. 2007. Identification of some intestinal bacteria from cattle rumen and termites. Poster presentation at The 33rd Congress on Science & Technology of Thailand, Nakhonsithammarat, Thailand.

การนำเสนอผลงานวิจัยแบบบรรยาย

1. Invited speaker at the 2nd International Symposium on Sustainable Healthcare Innovation for Future Society 2024. February 1 – 2, 2024,at Northern Science Park Building, Chiang Mai
2. Committees at The 5th International Conference on Radiation and Emission in Materials ICREM 2023 Program December 12 th to 15th, 2023 at MÖvenpick Chiang Mai
3. Invited speaker at the 2022 MRS Spring Meeting In the symposium " Cutting-Edge Plasma Processes Contributing to Sustainable Development Goals" (Virtual Session). (23 May 2022)
4. The 3rd International Conference on Radiation and Emission in Materials ITSC. Chiang Mai University Chiang Mai, Thailand. 2020.
5. Invited speaker at the 1st International Symposium on Applied Plasma Science and Engineering for Agro and Bio Industry. (13 February 2020)
6. Invited speaker at the 30th Annual Meeting of MRS-J International Symposium: K Plasma Life Science. (10 December 2020)

ทุนวิจัย

1. The project, "Increasing antagonistic effect of bacteria against pathogenic fungus of avocado by plasma technology, " supported by the School of Science, University of Phayao, 2022.
2. The project, "Mutation induction of xylanase by plasma technology for feed production," supported by the School of Science, University of Phayao, 2021.
3. The project, "Development of microbial products promote growth and against fungal causing anthracnose and root rot disease in avocado," supported by Innovation and Technology Assistance Program (ITAP), 2021 (research co-investigator).
4. Research co-investigator in the Research Unit for Excellence (Unit of Excellence) in the application of plasma technology to agriculture for the fiscal year 2021 supported by the University of Phayao.
5. The project "Development of molecular markers for plant identification family *Zanthoxylum* spp. source of funds National budget of the University of Phayao, 2019 (research co-investigator).

6. The project “Enhancement of phosphate solubility by bacteria induced by plasma technique for organic farming, funding source National budget of the University of Phayao, 2017 (research co-investigator).
7. The project “Innovative physics with ion beam/plasma for breeding plants/bacteria to increase the productivity of dairy cows/beef cows” which received funding from Thailand Center of Excellence in Physics, 3 years program from December 2016 to November 2018 (research co-investigator).
8. The project "Indigenous traits and tracer molecular markers drought tolerance in native rice varieties, Loei province which received funding from the Office of The Higher Education Commission, 2016 (research co-investigator).
9. The project “Application of low energy plasma to breed bacteria for ethanol production” from the Thailand Research Fund (TRF), 2015-2016.
10. The project “Development of rice cultivar RD 15 resistant to blast disease” which was funded by the National Science and Technology Agency, Northern Region (NSTDA) and supported by University of Phayao, 2015.
11. The project “Using microorganisms from termites for the elimination of biological waste agriculture, which received funding from the National Science and Technology Agency, Northern Region (NSTDA) and supported by University of Phayao, 2015 (research co-investigator).