ความรู้พื้นฐานเรื่องเวชพันธุศาสตร์

II. Polymerase Chain Reaction

อำไพวรรณ จวนสัมฤทธิ์ พ.บ., ธันยชัย สุระ* พ.บ.

Polymerase chain reaction หรือ PCR หมายถึงปฏิกิริยาที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณของ DNA ชนิดใดชนิดหนึ่งได้ในหลอดทดลอง ชื่อที่ถูกต้องคือ DNA amplification reaction ส่วนคำว่า polymerase chain reaction เป็นชื่อที่ตั้งขึ้นโดยกลุ่มนักวิจัยจากบริษัท ซีตัส (Cetus Cooperation) สหรัฐอเมริกา เริ่มด้วย Mullis[1] ค้นพบเทคนิค PCR เป็นครั้งแรกเมื่อ พ.ศ. 2526 ต่อมานักวิจัยจากบริษัทเดียวกัน คือ Saiki และคณะ[2,3] ได้นำเทคนิค PCR มาประยุกต์ใช้กับการศึกษาต่าง ๆ PCR จึงเป็นที่รู้จักกันแพร่หลาย และนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกได้ให้ความสนใจและศึกษาอย่างละเอียดลึกซึ้งมีผลงานทางวิชาการตีพิมพ์ปีละหลายร้อยเรื่อง

ในปัจจุบันสามารถผลิตเครื่องมืออัตโนมัติสำหรับเทคนิค PCR เรียกว่า thermal cycler ซึ่งใช้ได้สะดวก และมีประสิทธิภาพสูง ดังนั้น **เทคนิค PCR จึงเป็นเทคนิคที่ง่าย สามารถเรียนรู้ได้เร็ว และทำได้ในเวลาสั้น**

I. หลักการของ PCR

เทคนิค PCR[4] เป็นเทคนิคที่เลียนแบบการสังเคราะห์ DNA ในธรรมชาติ เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณของ DNA ช่วงใดช่วงหนึ่งซึ่งอยู่ระหว่างส่วนของ DNA ที่ทราบลำดับเบสแล้ว เราเรียก DNA ส่วนที่ทราบลำดับเบสนี้ว่า primer เรียก DNA ที่เป็นต้นแบบเพื่อเพิ่มปริมาณว่า template DNA หลักการของ PCR ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังนี้

1. Denaturing เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในหลอดทดลองสูงประมาณ 91-96° ซ. template DNA สองสายที่พันกันเป็นเกลียวคู่ (double helix) จะแยกออกจากกัน กลายเป็น DNA สายเดี่ยว DNA สายเดี่ยวนี้จะเป็นต้นแบบของการสังเคราะห์ DNA สายใหม่

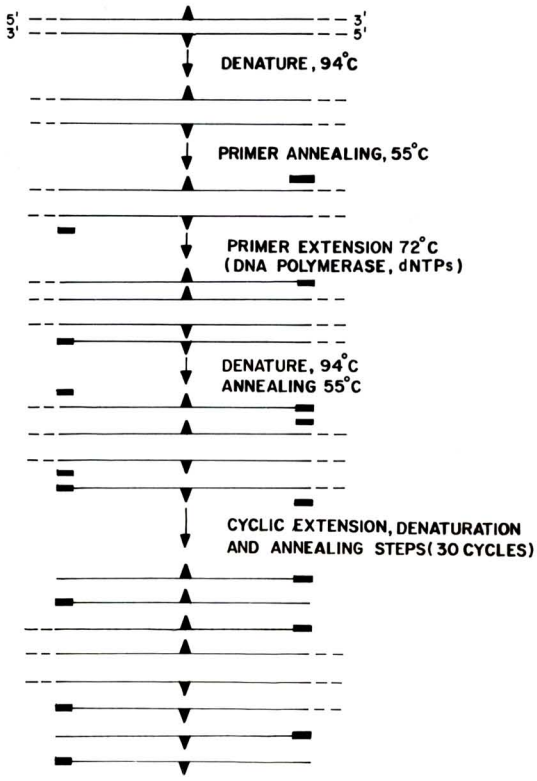
2. Primer annealing เมื่อลดอุณหภูมิในหลอดทดลองให้ต่ำลงเหลือ 50-55°ซ. primer จะจับกับ DNA สายเดี่ยว เรียกปฏิกิริยานี้ว่า primer annealing Primer จะจับกับ DNA สายเดี่ยวด้วยเบสที่เป็นคู่สมกัน (complementary) คือ adenine (A) จับกับ thymine (T) และ guanine (G) จับกับ cytosine (C)

3. Primer extension เป็นขั้นตอนของการสังเคราะห์ DNA สายใหม่ โดยมี DNA สายเดี่ยวเป็นต้นแบบ สร้างต่อออกไปจาก primer โดยมีสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม มีเอนซัยม์ Taq DNA polymerase ที่ทนความร้อนช่วยในการสร้าง DNA สายใหม่ และมีวัตถุดิบสำหรับการสร้าง DNA สาย

*หน่วยโลหิตวิทยา ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ *หน่วยเวชพันธุศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล*

ใหม่ คือ deoxynucleotide triphosphate (dNTP) ซึ่งประกอบด้วย dATP, dTTP, dGTP และ dCTP อย่างละเท่า ๆ กัน อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา primer extension คือ 70-75°ซ. primer จะถูกสร้างต่อไปในทิศทาง 5′ ไปหา 3′ และลำดับเบสของ DNA สายใหม่ที่สร้างขึ้นจะเป็นคู่สมกันกับเบสของ DNA สายเดี่ยวที่เป็นต้นแบบ (A = T, G = C) DNA สายใหม่จึงมีลักษณะ antiparallel กับ DNA ต้นแบบ

ขั้นตอนที่ 1 ถึง 3 เรียกว่า PCR หนึ่งรอบ จาก DNA ต้นแบบ 2 สาย จะกลายเป็น DNA 4 สาย ทั้ง DNA ต้นแบบและ DNA ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นใหม่จะเป็นต้นแบบของการสังเคราะห์ DNA ในรอบต่อไป ดังนั้นในรอบที่สองจะกลายเป็น DNA 8 สาย จะเห็นว่า DNA เพิ่มขึ้นในอัตราทวีคูณ (exponential rate) จะได้ DNA เท่ากับ 2^n ในขณะที่ n คือ จำนวนรอบของ PCR ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงหลักการ Polymerase chain reaction

เทคนิค PCR เป็นเทคนิคที่ทำในหลอดทดลอง โดยใส่ DNA ต้นแบบ, primer, วัตถุดิบ dNTP, บัฟเฟอร์ที่เหมาะสม และเอนซัยม์ Taq DNA polymerase ในหลอดทดลองและจุ่มหลอดทดลองใน water-bath ที่ตั้งอุณหภูมิแตกต่างกัน 3 อัน แต่ปัจจุบันมีเครื่องมืออัตโนมัติสำหรับการทำ PCR โดยเฉพาะ เครื่องมืออัตโนมัติจะเปลี่ยนอุณหภูมิให้เป็น 91-96°ซ, 50-55°ซ, 70-75°ซ ที่เหมาะสำหรับ denaturing, primer annealing และ primer extension ตามลำดับ และเครื่องมือนี้จะหยุดทำงาน เมื่อได้ทำปฏิกิริยา PCR ครบจำนวนรอบที่ตั้งไว้ ดังนั้นการทำ PCR จึงสะดวกยิ่งขึ้น แต่เครื่องมือยังมีราคาแพง แต่ละสถาบันที่มีเครื่องมือ ควรจะใช้เครื่องมือนี้ในการวินิจฉัยโรคต่าง ๆ ร่วมกันหลาย ๆ หน่วยงานในสถาบันนั้น เพื่อที่จะได้ใช้ประโยชน์จากเครื่องมือที่มีราคาแพงได้คุ้มค่าที่สุด

II. PCR Protocol

ในการทำ PCR ควรจะศึกษาจากบทความทางวิชาการที่ตีพิมพ์ในวารสารต่าง ๆ ลองทำตามและปรับเปลี่ยนตามความเหมาะสมเพื่อให้ได้ DNA จำนวนมากพอที่นำมาศึกษาต่อไป

ปฏิกิริยาของ PCR ประกอบด้วยส่วนสำคัญ 2 ส่วน

I. ส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR

สารละลายที่ใช้ในเทคนิค PCR อาจเตรียมขึ้นเอง หรือซื้อชุดน้ำยาสำเร็จรูป แต่น้ำยาสำเร็จรูปจะมีราคาแพงกว่า และไม่สามารถจะพลิกแพลงความเข้มข้นของสารละลายได้ตามความต้องการ ปฏิกิริยา PCR สามารถทำได้ในปริมาตร 25-100 μl ดังแสดงในตารางที่ 1 และให้เติม mineral oil 50 μl ฉาบผิวบนก่อนนำไปใส่ในเครื่องมืออัตโนมัติ PCR เพื่อป้องกันสารละลายระเหย ส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR มีดังนี้

1. DNA ต้นแบบ (template DNA) มักใช้

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR

	large-scale 100 μl	**moderate-scale 50 μl**	**small-scale 25 μl**
DNA	X μl	X μl	X μl
Primers	2 μl	2 μl	2 μl
dNTP mix	4 μl	2 μl	1 μl
10 × buffer	10 μl	5 μl	2.5 μl
enzyme	1 μl	1 μl	1 μl
add H_2O to	100 μl	50 μl	25 μl

genomic DNA 10^5-10^6 target molecule ต่อหนึ่งปฏิกิริยา สามารถใช้ DNA ตั้งแต่ 50 ng ถึง 2 μg ในสารละลาย DNA 1-5 μl โดยที่ DNA ของคน 1 μg เท่ากับ 3×10^5 target molecule

DNA ต้นแบบในปฏิกิริยา PCR ไม่จำเป็นต้องบริสุทธิ์มาก สามารถเตรียม DNA ต้นแบบได้จากเลือด, chorionic villi, เชื้อจุลินทรีย์หรือเส้นผม

2. Primer ในปฏิกิริยา PCR ต้องการ primer 2 สาย สามารถใช้ primer แต่ละสายมีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1 μM หรือ 1 μM นิยมเติม primer แต่ละสาย 1 μl ดังนั้นจึงต้องเตรียม stock primer ให้มีความเข้มข้นที่ถูกต้อง เก็บไว้ที่ -20°ซ

Primer เป็น DNA ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นได้ด้วยเครื่องมือ DNA oligonucleotide synthesizer สามารถสั่งซื้อ primer ที่ต้องการจากบริษัทในต่างประเทศ ราคาเบสละประมาณ 25 บาท บริษัทจะบอก OD ที่ 260 nm per ml และนำมาคำนวณน้ำหนักของ primer แล้วละลาย primer ให้เป็น stock primer สำหรับเติมลงในปฏิกิริยา PCR เพื่อให้มีความเข้มข้นของ primer ตามที่ต้องการ (ดูตัวอย่างการคำนวณใน appendix)

ปัจจุบันมีการใส่ primer หลายคู่ในปฏิกิริยา PCR เดียวกันเรียกว่า multiplex PCR[5] จะได้ DNA ขนาดต่าง ๆ กันรวมกันอยู่ในหลอดทดลองเดียวกัน

3. dNTP เป็นวัตถุดิบสำหรับสร้าง DNA สายใหม่ ประกอบด้วย dATP, dTTP, dGTP และ dCTP อย่างละเท่า ๆ กัน สามารถใช้ความเข้มข้นของ dNTP แต่ละชนิดตั้งแต่ 20 μM ถึง 200 μM มักเตรียม dNTP ทั้ง 4 ชนิดไว้ในหลอดทดลองเดียวกัน ซึ่งมีความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของที่ต้องการใช้ แบ่งเป็นหลอดเล็ก ๆ เก็บไว้ที่ตู้เย็น -20°ซ

4. บัฟเฟอร์ ที่ใช้กันบ่อย มี 2 แบบ คือ

4.1 67 mM Tris-HCl pH 8.8, 16.6 mM ammonium sulphate, 7 mM magnesiam chloride, 10 mM betamercaptoethanol, 100 μg/ml bovine serum albumin

4.2 10 mM Tris-HCl pH 8.5, 50 mM potassium chloride, 1.5 mM magnesium chloride, 0.01% gelatin บางทีเรียกว่า "Cetus" buffer

ในบทความทางวิชาการที่ตีพิมพ์ในวารสารที่อ้างถึง "Standard PCR buffer" อาจเป็นสูตรใดสูตรหนึ่งข้างต้นนี้ ส่วนประกอบที่สำคัญที่สุดของบัฟเฟอร์ คือ **แมกนีเซียม** สามารถใช้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5 mM ถึง 10 mM **ต้องทดลองหาความเข้มข้นของแมกนีเซียมที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา PCR นั้น ๆ ในสถานะของห้องปฏิบัติการที่ทำอยู่**

ในบางปฏิกิริยา อาจเติม 10% W/V dimethylsulfoxide (DMSO) หรือ 10% (W/V) formamide ในปฏิกิริยา PCR

5. เอนซัยม์ Taq DNA polymerase เป็นเอนซัยม์สำหรับสร้าง DNA สายใหม่ เอนซัยม์ของแต่ละบริษัทให้ผลไม่เหมือนกัน สามารถใช้เอนซัยม์ได้ตั้งแต่ 1 unit ถึง 2.5 unit ต่อปฏิกิริยา PCR 100 μl นิยมเตรียมเอนซัยม์ให้มีความเข้มข้น 1 unit/μl สามารถปรับให้ใช้เอนซัยม์ให้ต่ำที่สุดถึง 0.3 unit/μl ในปฏิกิริยา PCR 25-50 μl ถ้าใช้ปริมาณเอนซัยม์ที่สูงเกินจำเป็นจะก่อให้เกิด nonspecific background ได้

เอนซัยม์จะเสื่อมคุณภาพได้ง่ายมาก ให้เก็บไว้ในตู้เย็น -20°ซ พยายามให้เอนซัยม์อยู่นอกตู้เย็นให้น้อยที่สุด ในทางปฏิบัติให้นำเอนซัยม์ออกมาเมื่อต้องการเติมเอนซัยม์ในหลอดทดลองที่ได้เติมสารทุกอย่างไว้พร้อมแล้ว และต้องแช่เอนซัยม์ในน้ำแข็งตลอดเวลา

II. PCR Cycle

Denaturing 91-96°ซ นาน 1 นาที

Primer annealing 50-55°ซ นาน 0.5-1 นาที

Primer extension 70-75°ซ นาน 1-2 นาที

อุณหภูมิที่เหมาะสมของ primer annealing ขึ้นอยู่กับชนิดและจำนวนของเบสของ primer โดยทั่วไปจะใช้ primer 2 สายที่มี annealing temperature ใกล้เคียงกัน เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ดี

หลังจากทำ PCR ครบจำนวนรอบที่ตั้งไว้ จะเพิ่ม final extension ที่ 70-75°ซ อีก 5 นาที แล้วจึงหยุดปฏิกิริยา PCR ด้วยการลดอุณหภูมิลงเหลือ 4°ซ

ในรอบแรกของ PCR cycle อาจให้ denaturing time นาน 5-7 นาที เพื่อให้ genomic DNA ถูก denature ได้อย่างสมบูรณ์ และอาจเติมเอนซัยม์ Taq DNA polymerase ในหลอดทดลองหลังจากครบ denaturing time ของรอบแรกแล้วเพื่อไม่ให้เอนซัยม์เสื่อมคุณภาพ สำหรับรอบต่อไปของ PCR ก็ใช้ denaturing time เพียง 1 นาทีก็เพียงพอ

เวลาในระยะ denaturing, annealing และ extension ก็สามารถปรับเปลี่ยนให้ยาวขึ้นหรือสั้นลงได้ตามความเหมาะสม แต่จำนวนรอบของ PCR มักไม่เกิน 40-45 รอบ หากต้องใช้จำนวนรอบของ PCR มากกว่านี้ แสดงว่าปฏิกิริยา PCR ที่ทำอยู่ไม่ถูกต้อง ควรจะได้ปรับเปลี่ยนที่ส่วนประกอบของ PCR หรือ PCR cycle

III. ข้อจำกัดของ PCR

ข้อจำกัดของเทคนิค PCR คือต้องทราบลำดับเบสของ DNA ที่ขนาบข้าง DNA ที่ต้องการเพิ่มปริมาณ เพื่อนำมาสังเคราะห์ DNA ที่จะทำหน้าที่ primer และปัจจุบันมีบทความทางวิชาการเกี่ยวกับ PCR ตีพิมพ์ในวารสารต่าง ๆ ทั่วโลกปีละหลายร้อยเรื่อง มีข้อมูลเกี่ยวกับ primer สำหรับศึกษาโรคต่าง ๆ มากมาย ขอยกตัวอย่างแต่พอสังเขปในตารางที่ 2 และ 3[6]

เนื่องจากเทคนิค PCR มีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณ DNA สูง จึงอาจก่อให้เกิดปัญหาผลบวกปลอมได้ง่าย เพื่อหลีกเลี่ยงข้อผิดพลาดดังกล่าว พึงปฏิบัติดังนี้

1. ต้องมี positive และ negative control ในการทำ PCR ทุกครั้ง

2. Pipette ให้ใช้เฉพาะงาน PCR เท่านั้น ไม่นำไปใช้กับงานอื่น ๆ และควรนำไปผ่านแสงอัลตราไวโอเล็ตหลังจากใช้งานแล้ว

3. แบ่งน้ำยาต่าง ๆ เป็นหลอดเล็ก ๆ และพยายามใช้เพียงครั้งเดียวเท่านั้น

4. พื้นที่ที่เตรียมน้ำยาต่าง ๆ, การเตรียมใส่สารละลายต่าง ๆ ในหลอดทดลองเพื่อใส่ในเครื่องมืออัตโนมัติ PCR นั้น ควรเป็นพื้นที่เฉพาะที่ไม่ปนเปื้อน

ตารางที่ 2 Oligonucleotide Primers and Probes for Analysis of Factor VIII Gene Polymorphisms

Polymorphism	Primers and ASO Probes'		Expected fragment sizes(bp)
BclI			
(intron 18)			
Primers	8.1	5'-TAAAAGCTTTAAATGGTCTAGGC	142 vs. 99 & 43
	8.2	5'-TTCGAATTCTGAAATTATCTTGTTC	
ASO Probes	8.3	5'-CAATCAGTGATCAAAGCAG	
	8.4	5'-CAATCAGTGAACAAAGCAG	
XbaI			
(intron 22)			
Primers	7.1	5'-CACGAGCTCTCCATCTGAACATG	96 vs. 68 & 28
	7.10	5'-GGGCTGCAGGGGGGGGGGACAACAG	
ASO Probes	7.3	5'-GCGCATTTCTAGACTGTTG	
	7.4	5'-GCGCATTTCTGGACTGTTG	
Intron 7			
Primers	11.6	5'-TGCAGAACATGAGCCAATTC	314
	11.2	5'-TAATGTACCCAAGTTTTAGG	
ASO Probes	11.9	5'-GCAAGACACTCTGACATTG	
	11.10	5'-GCAAGACACTCTAACATTG	
Y repeat			
Primers	Y1.1	5'-TCCACTTTATTCCAGGCCTGTCC	154
	Y1.2	5'-TTGAATGGAATGGGAACGAATGG	

[a]ASO probes = allele-specific oligonucleotide probes.

ตารางที่ 3 Sequence of Oligonucleotide PCR Primers for HLA Class II Gene Amplification

HLA gene	Name	Sequence 5' to 3'	PRC amplification conditions Denature	Anneal	Extend
DRß	GH46	CCGGATCCTTCGTGTCCCCACAGCACG	96°C	55°C	72°C
	GH50	CTCCCCAACCCCGTAGTTGTGTCTGCA			
DQα	GH26	GTGCTGCAGGTGTAAACTTGTACCAG	96°C	65°C	≥65°C
	GH27	CACGGATCCGGTAGCAGCGGTAGAGTTG			
DQß	GH28	CTCGGATCCGCATGTGCTACTTCACCAAGG	96°C	55°C	72°C
	GH29	GAGCTGCAGGTAGTTGTGTCTGCACAC			
DPα	GH98	CGCGGATCCTGTGTCAACTTATGCCGC	96°C	55°C	72°C
	GH99	GTGGCTGCAGTGTGGTTGGAACGC			
DPß	UG21	CGGATCCGGCCCAAAGCCCTCACTC	96°C	65°C	≥65°C
	UG19	GCTGCAGGAGAGTGGCGCCTCCGCTCAT			

กับงานอื่น ๆ ที่อาจมี DNA มาปะปนได้ง่าย เช่น การสกัด DNA จากเซลล์ หากเป็นไปได้ ควรเตรียมใน hood

IV. การนำ PCR มาประยุกต์ใช้ในเวชปฏิบัติ

หลังจากการเสนอผลงานเกี่ยวกับ DNA amplification โดยวิธี PCR เมื่อ พ.ศ. 2528 เป็นต้นมา แพทย์และนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกมีความตื่นตัว สนใจที่จะนำวิธีการนี้มาใช้ในการเพิ่มปริมาณ DNA เพื่อการวินิจฉัยโรคต่าง ๆ ทั้งที่เป็นโรคทางพันธุกรรมและโรคอื่น ๆ รวมทั้งการรักษาโรค เช่น ผลิตฮอร์โมน วัคซีน และ interferon เป็นต้น ดังแสดงในตารางที่ 4[7-9]

ตารางที่ 4 การนำ PCR มาประยุกต์ใช้ในเวชปฏิบัติ

I. Genetic diseases
- Sickle cell anemia
- Thalassemia
- Hemophilia
- Phenylketonuria
- Antitrypsin deficiency
- Diabetes mellitus (Insulin gene)
- Mitochondrial neuropathy
- Duchene's muscular dystrophy
- Huntington's disease
- Lymphoma marker
- Leukemia marker

II. Infectious diseases
- HIV
- Cytomegalovirus
- Papillomavirus
- Herpes simplex
- Hepatitis B virus
- Slow virus
- Enterotoxogenic E coli
- Salmonella typhi
- Mycobacterium tuberculosis
- Toxoplama group

III. Protein synthesis
- Insulin
- Growth hormone
- Interferon
- Factor VIII concentrate
- Vaccine e.g. Hepatitis B vaccine, malaria vaccine

1. การวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรม

โรคทางพันธุกรรมที่เป็น single gene defect เกิดจากกลุ่มของ DNA หรือยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างโปรตีน หรือควบคุมรูปร่างที่ปรากฏออกมา (phenotypic) มีความผิดปรกติไปจากที่เคยเป็นอยู่ โดยความผิดปรกตินั้นอาจเป็น base substitution หรือ frameshift mutation

วิธีการนำ PCR มาใช้ประโยชน์ในการวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรม ทำได้โดยการเพิ่มปริมาณ DNA ส่วนที่มีความผิดปรกติ โดยใช้ primer คู่ที่อยู่ระหว่าง DNA ส่วนที่ต้องการ หรือใช้ primer สายหนึ่งที่มีลำดับเบสตาม DNA ส่วนที่ความผิดปรกติ ส่วนอีกสายหนึ่ง เหมือน primer ที่ใช้กับ DNA ปรกติ เมื่อมี template DNA ที่ผิดปรกติก็จะได้ amplicon (DNA ส่วนที่ได้จาก DNA amplification) ที่มี DNA ตามลักษณะของโรคได้ วิธีหลังนี้เรียกว่า Allele specific recombinant method (ARM) ซึ่งในปฏิกิริยา PCR ต้องมี positive และ negative control ด้วยเสมอ

หลังจากปฏิกิริยา PCR แล้วจึงนำ amplicon ที่ได้มาตรวจสอบดูว่าเป็นส่วนของ DNA ที่ต้องการหรือไม่ โดยดูจากขนาดความยาวของ amplicon จากการทำ gel electrophoresis ซึ่งอาจใช้ agarose หรือ polyacrylamide gel ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับ DNA ใน amplicon นั้น (รายละเอียดใน appendix) บนแผ่น gel จะต้องมี DNA ที่รู้ขนาดความยาวแน่นอนเป็นมาตรฐาน (DNA marker) เพื่อที่จะได้ตรวจดูความยาวของ DNA ที่ต้องการศึกษา ขณะเดียวกัน positive และ negative control ก็จะเป็นตัวบ่งบอกถึงความเชื่อถือได้ของปฏิกิริยา

ในการทดลองแต่ละครั้ง

ในบางกรณีที่ต้องการความแม่นยำ (specificity) มากขึ้น ก็สามารถทำ Southern blot hybridization โดยใช้ DNA probe ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกันกับ DNA ที่สร้างขึ้นนี้ หรืออาจตรวจสอบโดยเลือกใช้ restriction endonuclease ที่สามารถตัดตำแหน่งเฉพาะจุดใดจุดหนึ่งบนเส้น DNA นั้นให้ออกเป็น 2 ท่อน ที่มีขนาดความยาวต่างกัน ซึ่งความยาวของ DNA 2 ท่อนนี้สามารถบอกถึงลำดับการเรียงตัวของเบสของ DNA ที่มีอยู่ แล้วจึงนำ DNA ที่ถูกตัดเป็น 2 ท่อนนี้ไปผ่านขบวนการ gel electrophoresis เมื่อย้อมด้วยสี ethidium bromide แล้วจะรู้ขนาด DNA เมื่อเทียบกับ DNA marker

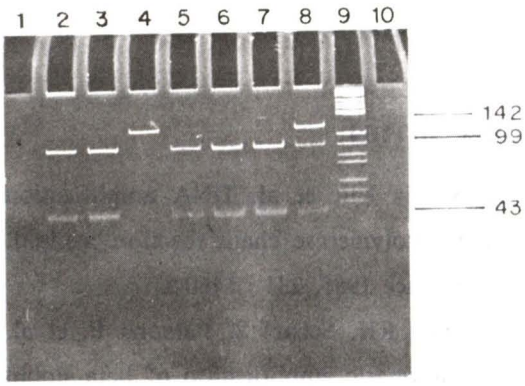
นอกจากนี้ยังสามารถหาลำดับการเรียงตัวของเบสของ DNA ที่ได้จากขบวนการ PCR ที่เรียกว่า Sequencing ในการทำ sequencing ของ genomic DNA ซึ่งมีปริมาณน้อยทำได้ยาก แต่หลังจากทำปฏิกิริยา PCR จะได้ DNA ที่มีปริมาณมากพอที่จะทำ sequencing ได้ ทำให้ทราบลำดับการเรียงตัวของเบสได้ บอกถึงความผิดปรกติของ DNA ได้

วิธี PCR จะมีประโยชน์ในการวินิจฉัยโรคในผู้ป่วยทั้งที่มีอาการและยังไม่ปรากฏอาการ ภาวะที่มีพันธุ์โรคแฝง รวมทั้งการวินิจฉัยโรคทารกในครรภ์ในโรคต่าง ๆ เช่น โรคธาลัสซีเมีย โรคฮีโมฟีเลีย ตัวอย่างในรูปที่ 2 เป็นครอบครัวผู้ป่วยโรคฮีโมฟีเลียเอ ซึ่งได้รับการศึกษาโดยวิธี PCR เพิ่มปริมาณ DNA ในส่วน Intron ที่ 18 ของ F VIII gene ที่อยู่บนโครโมโซม X โดยใช้ primer ชื่อ 8.1 และ 8.2 หลังจากนั้นนำ DNA ที่ได้มาตัดด้วย restriction endonuclease Bcl I ถ้าเอนซัยม์ Bcl I ตัดได้ จะได้ DNA 2 band ที่มีความยาว 99 bp และ 43 bp เรียกว่า "+" และถ้าเอนซัยม์ Bcl I ตัดไม่ได้ จะได้ band เดียว คือ 142 bp เรียกว่า "-" ผลการศึกษาปรากฏว่า

lane ที่ 2 ป้าผู้ป่วย (พี่สาวแม่) มี 2 band
lane ที่ 3 น้าผู้ป่วย (น้องสาวแม่) มี 2 band
lane ที่ 4 ผู้ป่วยโรคฮีโมฟีเลีย เอ มี 1 band
lane ที่ 5 น้องสาวผู้ป่วย มี 2 band
lane ที่ 6 น้องสาวผู้ป่วย มี 2 band
lane ที่ 7 น้องสาวผู้ป่วย มี 2 band
lane ที่ 8 แม่ผู้ป่วย มี 3 band
lane ที่ 9 เป็น DNA marker

คือ 99 & 43 bp	เรียกว่า	+/+
คือ 99 & 43 bp	"	+/+
คือ 142 bp	"	-
คือ 99 & 43 bp	"	+/+
คือ 99 & 43 bp	"	+/+
คือ 99 & 43 bp	"	+/+
คือ 142,99 & 43 bp	"	+/-

ผู้ป่วยเป็นชายมีโครโมโซม X เพียงอันเดียว และ DNA บนโครโมโซมนี้ไม่ถูกตัดโดยเอนซัยม์ Bcl I จึงเห็น DNA band เดียว ความยาว 142 bp แสดงด้วยเครื่องหมาย "-" ส่วนป้า น้า และน้องสาวผู้ป่วยเป็นผู้หญิงมีโครโมโซม X สองอัน โครโมโซม X ทั้ง 2 อันถูกตัดได้ด้วยเอนซัยม์ Bcl I ทั้งคู่ จึงมี 2 band คือ 99 & 43 bp ใช้เครื่องหมาย "+/+" ส่วนมารดาเป็นผู้ที่มีพันธุ์โรคฮีโมฟีเลียแฝงอย่างแน่นอน



รูปที่ 2 ผลการศึกษา DNA ของผู้ป่วยโรคฮีโมฟีเลีย เอ ด้วยวิธี PCR และตัดด้วยเอนไซม์ restuction endonuclease Bcl I

(obligate carrier) จากประวัติครอบครัว โครโมโซม X อันที่หนึ่งถูกเอนซัยม์ตัดได้เป็น band 99 & 43 bp โครโมโซม X อันที่สองไม่ถูกตัดโดยเอนซัยม์ จึงเป็น band 142 bp เขียนเป็นเครื่องหมาย "+/-" แสดงว่าแม่ได้ให้ X chromosome ที่ไม่ถูกตัดด้วยเอนซัยม์ คือ band 142 bp ไปให้แก่ลูกชายจึงเป็นโรคฮีโมฟีเลีย เอ ส่วนป้า น้าและน้องสาวผู้ป่วย ไม่มี band 142 bp จึงไม่มีพันธุ์โรคฮีโมฟีเลียแฝง

2. การวินิจฉัยโรคอื่น ๆ ที่ไม่ใช่โรคทางพันธุกรรม

การนำ PCR มาใช้ในวงการแพทย์ มีประโยชน์อย่างมากต่อการวินิจฉัยโรคติดเชื้อ เช่น วัณโรค hepatitis B, hepatitis C, HIV, Herpes simplex สามารถให้การวินิจฉัยจากเลือด น้ำไขสันหลัง และอื่น ๆ PCR เป็นวิธีการที่มีความแม่นยำ, รวดเร็ว และประสิทธิภาพสูงกว่าวิธี serology หรือ การเพาะเชื้อ ดังตัวอย่างรูปที่ 3

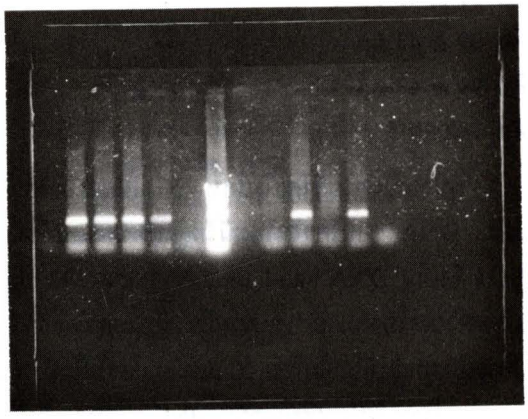
การหา marker ในมะเร็งบางชนิด เช่น CML, lymphoma และ hepatoma ในปัจจุบันสามารถตรวจสอบได้รวดเร็วโดยวิธี PCR

นอกจากนี้ยังใช้วิธี PCR สำหรับการศึกษา HLA ของประชากร และเพื่อการวินิจฉัยโรคทางการแพทย์ จะให้ข้อมูลเพิ่มเติมจากการศึกษา serology เพียงอย่างเดียว

3. การรักษาโรค

ก่อนหน้านี้มีการสกัด growth hormone จากต่อม pituitary ของคนและสัตว์ หรือการสกัดอินซูลินจากตับอ่อนของหมู ทำให้ฮอร์โมนที่ได้มามีความไม่บริสุทธิ์ปนอยู่เกิดผลแทรกซ้อนจากการรักษา ในปัจจุบันเมื่อมี DNA recombinant technique เข้ามาการสังเคราะห์สารต่าง ๆ เหล่านี้เป็นไปได้ง่ายขึ้น แต่ก็ต้องใช้ต้นทุนสูง แต่ในปัจจุบันเราสามารถเพิ่มปริมาณของสารที่สังเคราะห์ขึ้นนี้โดยหลักการของ PCR ทำให้ค่าใช้จ่ายในการสังเคราะห์ถูกลงอย่างมาก นอกจากนี้ยังสังเคราะห์ยา เช่น Interferon ที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อไวรัสบางชนิด และการสังเคราะห์วัคซีน เช่น วัคซีนป้องกันโรคตับอักเสบ บี เป็นต้น

จากที่กล่าวมาข้างต้นคงจะพอเห็นศักยภาพของเทคนิค DNA amplification ในวงการแพทย์ ทั้งต่อด้านการศึกษาโรค การวินิจฉัยโรคและการรักษาโรค อย่างไรก็ตามเทคนิคอันนี้เป็นเพียงเครื่องมืออันหนึ่งที่จะช่วยแพทย์ หาใช่เป็นสิ่งที่จะให้ทุกสิ่งทุกอย่างแก่แพทย์ไม่ ประสบการณ์เกี่ยวกับการดูแลผู้ป่วยยังเป็นสิ่งจำเป็นและเป็นพื้นฐานสำคัญในการตรวจรักษาผู้ป่วย



รูปที่ 3 แสดงส่วนหนึ่งของ DNA ของ Mycobacterium tuberculosis จากวิธี PCR

เอกสารอ้างอิง

1. Mullis KB, et al. DNA amplification by Polymerase chain reaction method. Science 1985, 231 : 1460-5.
2. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 1985 ; 230 : 1350-4.

3. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 1988 ; 239 : 487-91.
4. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, et al. PCR protocols. London : Academic Press, INC., Harcourt Brace Jovanovish, Publishers, 1990.
5. Bowen DJ, Thomas P, Webb CE, et al. Facile and rapid analysis of three DNA polymorphisms within the human factor IX gene using the polymerase chain reaction. Br J of Haematol 1991, 77 : 559-60.
6. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning. A laboratory manual. 2nd ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
7. Eisenstein BI. The polymerase chain reaction : A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. N Engl J Med 1990, 323 : 178-83.
8. Eisenstein BI, Englebery NG. Applied molecular genetics : New look for microbiologists and clincians. J infect Dis. 1986, 153 : 146-30.
9. Emery AEH, Mueller RF. Recombinant DNA principles and applications. In : Emery AEH, Mueller RF, eds. Elements of Medical Genetics 7th ed. London : Churchill Livingstone Edisbury 1988, 33-50.