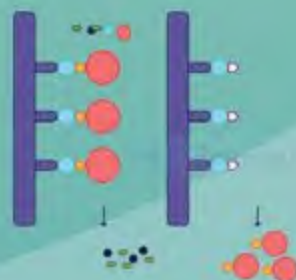
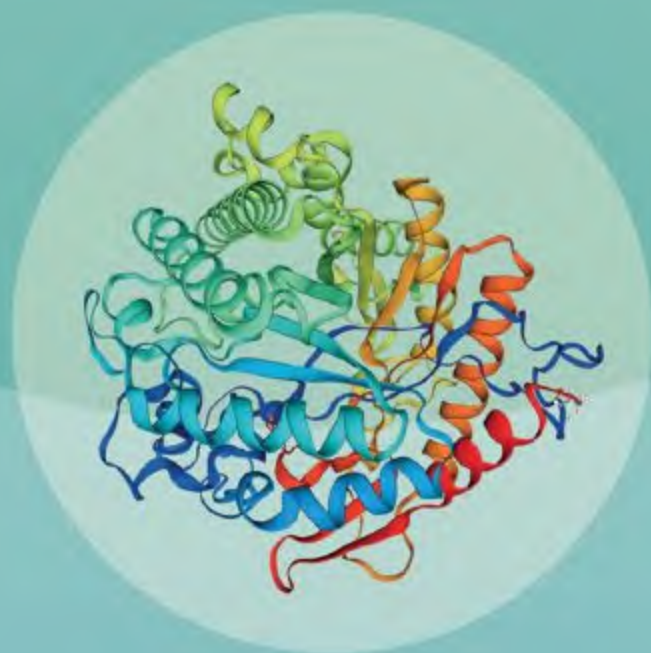
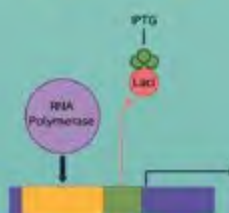




ศูนย์ส่งเสริม
การผลิตตำรา

การผลิตและทำบริสุทธิ์

โปรตีนสายผสมใน *Escherichia coli*



อัชฌา อรรอินทร์

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น



การผลิตและทำบริสุทธิ์โปรตีนสายผสมใน *Escherichia coli*

รองศาสตราจารย์ ดร.อัชฌา อรอินทร์
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ได้รับทุนสนับสนุนการผลิตตำรา มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ลำดับที่ 225

โดยมหาวิทยาลัยขอนแก่น พ.ศ. 2567

ISBN (e-book) 978-616-438-905-2

อัชฌา อรอินทร์.

การผลิตและทำบริสุทธิ์โปรตีนสายผสมใน *Escherichia coli* / อัชฌา อรอินทร์. -- พิมพ์ครั้งที่ 1. -- ขอนแก่น : โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2567.

189 หน้า : ภาพประกอบ

1. โปรตีน -- การทำให้บริสุทธิ์. 2. จุลชีววิทยา. 3. เอสเคอริเคียโคไล. (1) ชื่อเรื่อง.

QR82.E6 อ519 2567

ISBN (e-book) 978-616-438-905-2

จัดทำโดย ศูนย์นวัตกรรมการเรียนการสอน มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ราคา 390 บาท

สงวนลิขสิทธิ์ โดยมหาวิทยาลัยขอนแก่น ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2567

คำนำ

หนังสือเรื่อง “การผลิตและทำบริสุทธิ์โปรตีนสายผสมใน *Escherichia coli*” นี้ ผู้เขียนได้เรียบเรียงจากหนังสือ บทความวิชาการ บทความวิจัย ความรู้และประสบการณ์จากการทำวิจัยด้านการโคลนยีนและการทำบริสุทธิ์โปรตีนสายผสมหลายชนิด รวมทั้งประสบการณ์จากการสอนวิชาพันธุวิศวกรรมและพันธุศาสตร์จุลินทรีย์มากกว่าสิบปี หนังสือแบ่งออกเป็น 5 บท ครอบคลุมเนื้อหาตั้งแต่กระบวนการทางพันธุวิศวกรรม การเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนสายผสมในเซลล์เจ้าบ้านและการทำบริสุทธิ์โปรตีนสายผสม รวมถึงองค์ประกอบสำคัญในการผลิตโปรตีนสายผสม ได้แก่ เซลล์เจ้าบ้าน ดีเอ็นเอพาหะ ชนิดของสลาไกที่ใช้ทำบริสุทธิ์โปรตีนสายผสม และในบทสุดท้ายได้ยกตัวอย่างปัญหาที่อาจพบในขั้นตอนการผลิตและทำบริสุทธิ์โปรตีนสายผสมในแบคทีเรีย รวมทั้งแนวทางแก้ไข

หนังสือเล่มนี้เหมาะสำหรับผู้ที่สนใจงานวิจัยด้านการผลิตและทำบริสุทธิ์โปรตีนในเซลล์โปรคาริโอต และสำหรับผู้สนใจในงานทางด้านพันธุวิศวกรรมเบื้องต้น สามารถอ่านเนื้อหาซึ่งสรุปภาพรวมของงานพันธุวิศวกรรมเฉพาะในบทแรกได้ ผู้เขียนหวังเป็นอย่างยิ่งว่า ผู้อ่านจะสามารถนำความรู้และข้อมูลไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาและพัฒนาองค์ความรู้ต่อไป หากมีข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะประการใดอันจะเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงหนังสือเล่มนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ผู้เขียนขอน้อมรับข้อชี้แนะด้วยความยินดีและขอบพระคุณยิ่ง

อัชฌา อรอินทร์

คำขอบคุณ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณบิดามารดาที่ได้อบรมสั่งสอน เลี้ยงดู ให้ความรัก สนับสนุนลูก ในทุกโอกาสเสมอมา ขอขอบพระคุณครูบาอาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ ถ่ายทอดประสบการณ์ทางการสอนและวิจัย

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.รศนา วงศ์รัตนชีวิน สาขาวิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่มีโอกาสในการร่วมทำวิจัย และมอบแรงบันดาลใจในการเขียนหนังสือเล่มนี้ รวมถึงให้คำแนะนำเพื่อปรับปรุงเนื้อหาในบท ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.ขวัญใจ กนกเมธากุล สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความกรุณา ช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งมาโดยตลอด ขอขอบคุณ รศ.ดร.เมธา รัตนกรพิทักษ์ สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ช่วยตรวจทาน ให้คำแนะนำและแก้ไขภาษาในหนังสือ เล่มนี้ ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.สมปอง คล้ายหนองสรวง คณบดีคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และศูนย์วิจัยโปรตีนและโปรตีโอมิกส์เพื่อการพาณิชย์และอุตสาหกรรม (ศปพ.) ที่สนับสนุน โอกาสทางงานวิจัยอย่างต่อเนื่อง ขอขอบคุณคณาจารย์ในสาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สำหรับความช่วยเหลือในทุกๆ ด้านมาโดยตลอด

ขอบคุณนางสาวนิตติยาภรณ์ โสตะพงศ์ และนางสาวขวัญชนก ลิพธธำ สำหรับภาพ ประกอบจากห้องปฏิบัติการและภาพประกอบปก รวมถึงขอบคุณสมาชิกกลุ่มวิจัยห้องปฏิบัติการวิจัย จุลชีววิทยาโมเลกุล สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ซึ่งประกอบไปด้วย ศิษย์เก่าและศิษย์ปัจจุบันระดับปริญญาตรีและปริญญาโท ที่มีความมุ่งมั่น ตั้งใจทำงานมีความใฝ่รู้ สร้างงานวิจัยที่มีคุณภาพ ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้หนังสือเล่มนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

อัชฌา อรอินทร์

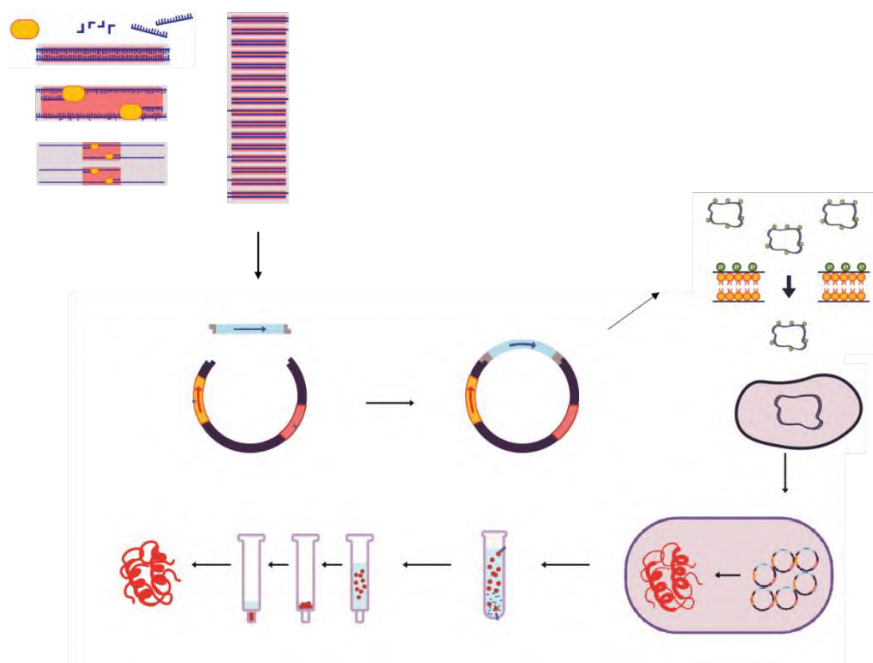
สารบัญ

บทที่ 1	ขั้นตอนการผลิตโปรตีนสายผสมใน <i>E. coli</i>	1
1.1	การเตรียมยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์	6
1.2	ดีเอ็นเอพาหะ	16
1.3	เอนไซม์ที่ใช้ในการเชื่อมต่อยีนเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ	19
1.4	การนำดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกันเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน	25
1.5	การตรวจหาเซลล์เจ้าบ้านที่มีพลาสมิดซึ่งบรรจุยีนเป้าหมาย	31
1.6	การเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนเป้าหมาย	40
1.7	การทำบริสุทธิ์โปรตีนสายผสมที่แสดงออกในเซลล์เจ้าบ้าน	46
บทที่ 2	เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านที่นิยมใช้ในการผลิตโปรตีนสายผสมและการพัฒนาสายพันธุ์	55
2.1	<i>Escherichia coli</i> สายพันธุ์ BL21(DE3): ราชาแห่งเซลล์เจ้าบ้านในการผลิตโปรตีนสายผสม	57
2.2	การพัฒนาสายพันธุ์ <i>E. coli</i> ในแนวทางที่อ้างอิงจากสมมติฐาน	62
2.3	การค้นพบสายพันธุ์ <i>E. coli</i> ใหม่ด้วยวิธี screening และ selection	76
บทที่ 3	ดีเอ็นเอพาหะที่ใช้ในการแสดงออกโปรตีนสายผสมและการพัฒนาดีเอ็นเอพาหะ	81
3.1	องค์ประกอบในดีเอ็นเอพาหะแสดงออก	84
3.2	ดีเอ็นเอพาหะแสดงออกที่มีการใช้งานในปัจจุบัน	86
3.3	ความก้าวหน้าในการพัฒนาดีเอ็นเอพาหะ	90
บทที่ 4	ชนิดของสลากและการนำไปใช้ประโยชน์	117
4.1	สลากเพปไทด์ (peptide tag)	121
4.2	สลากโปรตีน (protein tag)	134
4.3	สลากผสมผสาน (multimodal tag)	140
4.4	การทำบริสุทธิ์ด้วยเม็ดบีตส์แม่เหล็ก (magnetic beads)	147
4.5	การนำสลากออกจากโปรตีนสายผสม	150

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ 5 ปัญหาและการปรับสภาวะการผลิตโปรตีนสายผสมใน <i>E. coli</i>	157
5.1 ไม่พบการแสดงออกของโปรตีนสายผสมหรือโปรตีนแสดงออกได้น้อย	162
5.2 การเกิดอินคลูชันบอดี	169
5.3 โปรตีนไม่มีกิจกรรม.....	184
5.4 ปัจจัยอื่นที่ควรคำนึงถึง	185

บทที่ 1



ขั้นตอนการผลิต

โปรตีนสายผสมใน *E. coli*

บทที่ 1 ขั้นตอนการผลิตโปรตีนสายผสมใน *E. coli*

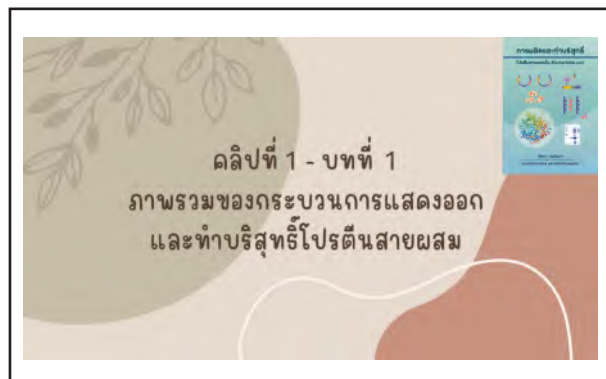
- 1.1 การเตรียมยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์
- 1.2 ดีเอ็นเอพาหะ
- 1.3 เอนไซม์ที่ใช้ในการเชื่อมต่อยีนเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ
- 1.4 การนำดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกันเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน
- 1.5 การตรวจหาเซลล์เจ้าบ้านที่มีพลาสมิดซึ่งบรรจุยีนเป้าหมาย
- 1.6 การเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนเป้าหมาย
- 1.7 การทำบริสุทธิ์โปรตีนสายผสมที่แสดงออกในเซลล์เจ้าบ้าน

โปรตีนเป็นชีวโมเลกุลที่มีความสำคัญอย่างยิ่งในสิ่งมีชีวิต มีหน้าที่หลักในการทำให้เกิดกระบวนการทางชีวภาพต่างๆ ภายในเซลล์ ตั้งแต่การแสดงออกของยีน การเจริญและเพิ่มจำนวนของเซลล์ การดูดซึมและนำเข้าสารอาหาร การสื่อสารระหว่างเซลล์ และกระบวนการตายของเซลล์ (apoptosis) โดยมีการเก็บข้อมูลเพื่อสังเคราะห์โปรตีนไว้ใน ดีเอ็นเอ ซึ่งดีเอ็นเอทำหน้าที่เป็นต้นแบบในกระบวนการถอดรหัสเพื่อผลิตอาร์เอ็นเอ นำรหัสหรือเอ็มอาร์เอ็นเอ (messenger RNA; mRNA) โดยข้อมูลรหัสบนสายเอ็มอาร์เอ็นเอจะมีการแปลให้เป็นกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ เรียงกันเป็นลำดับ เกิดเป็นสายพอลิเพปไทด์และม้วนพับตัวเป็นโปรตีน สรุปได้ว่าในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด มีการสังเคราะห์โปรตีนด้วยกระบวนการ 2 ขั้นตอนตามลำดับคือ 1) กระบวนการถอดรหัสดีเอ็นเอ (transcription) เกิดการสังเคราะห์เอ็มอาร์เอ็นเอ 2) กระบวนการแปลรหัสเอ็มอาร์เอ็นเอ (translation) ให้เป็นสายพอลิเพปไทด์และม้วนพับตัวเป็นโปรตีนต่อไป

มนุษย์ได้นำโปรตีนที่พบในธรรมชาติมาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ มากมายทั้งทางด้านการแพทย์ อุตสาหกรรมหรือการเกษตร เช่น การใช้อินซูลินในการรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวาน การนำปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด (blot clotting factor) ไปใช้เพื่อรักษาผู้ป่วยโรคฮีโมฟีเลีย การใช้เอนไซม์ไลเปสที่ผสมในสารชะล้างเพื่อสลายคราบมัน การผลิตชีวพิษ (toxin) เพื่อใช้เป็นสารฆ่าศัตรูพืช เป็นต้น นอกจากการนำไปใช้ในเชิงประยุกต์แล้ว ยังมีการนำโปรตีนมาใช้ประโยชน์ด้านการวิจัยด้วย เช่น การศึกษาโครงสร้างโปรตีนแบบสามมิติ การศึกษากลไกทางชีวโมเลกุลของโรค การศึกษาระบบการส่งยา (drug delivery) เป็นต้น

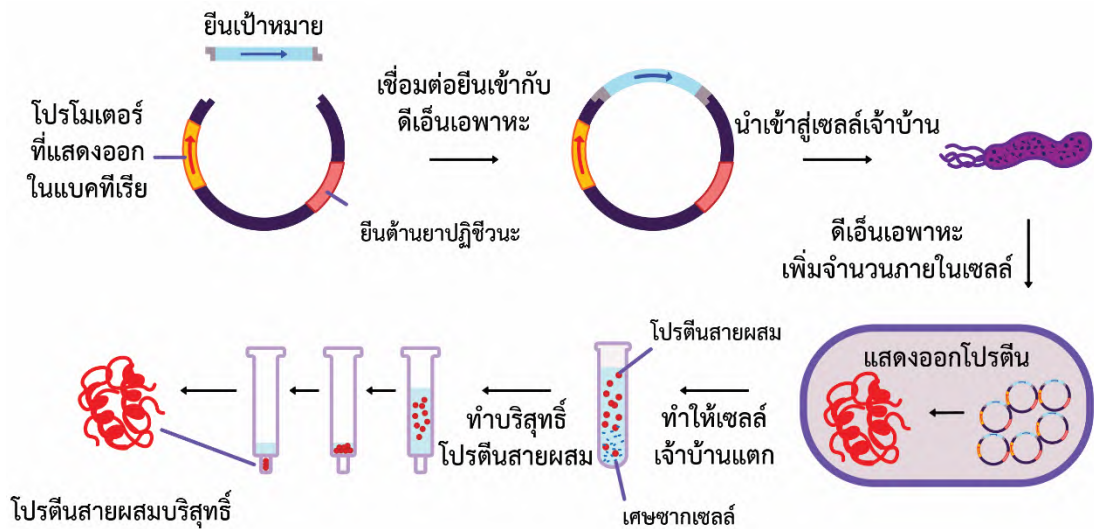
อย่างไรก็ดีโปรตีนที่ผลิตในธรรมชาติส่วนใหญ่มีปริมาณที่น้อย ไม่เพียงพอต่อการนำไปใช้ศึกษาหรือใช้ประโยชน์ ดังนั้นเพื่อให้สามารถผลิตโปรตีนในปริมาณที่มากขึ้น จึงได้เริ่มมีงานวิจัยเพื่อผลิตโปรตีนสายผสม (recombinant protein) ขึ้น โดยโปรตีนสายผสมคือโปรตีนที่ถอดรหัสจากดีเอ็นเอของยีนที่นำเข้าไปในดีเอ็นเอพาหะ ซึ่งดีเอ็นเอพาหะช่วยให้เกิดการแสดงออกของยีน เกิดการสังเคราะห์เอ็มอาร์เอ็นเอและนำไปสู่การแปลรหัสของเอ็มอาร์เอ็นเอเป็นโปรตีนในที่สุด โปรตีนสายผสมจัดเป็นรูปแบบของโปรตีนตามธรรมชาติที่ดัดแปลงด้วยวิธีทางอณูชีววิทยาเพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตโปรตีน ซึ่งอาจมีการดัดแปลงลำดับเบสในยีนร่วมด้วย การผลิตโปรตีนสายผสมสามารถทำให้เกิดการสร้างผลิตภัณฑ์โปรตีนเชิงพาณิชย์ โดยกระบวนการที่นำไปสู่การผลิตโปรตีนสายผสมและการทำบริสุทธิ์โปรตีนสายผสม ต้องอาศัยความรู้ทั้งทางด้านอณูชีววิทยา พันธุวิศวกรรมและชีวเคมีควบคู่กัน

ตัวอย่างงานผลิตโปรตีนสายผสมที่เป็นที่รู้จักคือ อินซูลิน ซึ่งเป็นโปรตีนที่สร้างจากเซลล์บีตาของตับอ่อน ทำหน้าที่ควบคุมระดับคาร์โบไฮเดรตและไขมันในเลือด โดยในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 1 (Diabetes Mellitus Type 1; Type I DM) ตับอ่อนไม่สามารถผลิตอินซูลินและต้องรับอินซูลินจากภายนอกเพื่อการอยู่รอด เดิมทีอินซูลินที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยได้จากการสกัดจากเซลล์เนื้อเยื่อตับอ่อนของสุกร ซึ่งเป็นวิธีที่ราคาสูงและอินซูลินที่ได้ไม่มีประสิทธิภาพ เนื่องจากเป็นอินซูลินที่ไม่ได้มาจากมนุษย์ แต่ด้วยการพัฒนาทางด้านอณูชีววิทยาทำให้สามารถผลิตอินซูลินมนุษย์ในเซลล์แบคทีเรียโดยใช้แบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*) เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการผลิต ทำให้สามารถผลิตอินซูลินมนุษย์ในราคาที่ถูกลงมากและปลอดภัยมากกว่าการผลิตจากสัตว์ และทำให้สามารถผลิตในเชิงอุตสาหกรรมได้ จากตัวอย่างจะเห็นว่า การผลิตโปรตีนสายผสมจะช่วยพัฒนาแนวทางการได้มาซึ่งโปรตีนแทนการสกัดออกมาจากเซลล์ที่ผลิตตามธรรมชาติ อีกทั้งงานผลิตโปรตีนสายผสมสามารถปรับเปลี่ยนหรือดัดแปลงโปรตีนให้มีคุณสมบัติที่ดีขึ้นเช่น มีกิจกรรมที่สูงขึ้น มีความเสถียรมากขึ้น มีความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้น เป็นต้น อีกทั้งสามารถเพิ่มส่วนของสายเพปไทด์หรือที่เรียกว่าติดสลาก (tag) เพื่อให้ง่ายต่อการทำบริสุทธิ์โปรตีนสายผสมและเพื่อวัตถุประสงค์อื่นเช่น การระบุตำแหน่งของโปรตีนสายผสมภายในเซลล์ เป็นต้น



วิดีโอ – ภาพรวมของกระบวนการแสดงออก และทำบริสุทธิ์โปรตีนสายผสม

ภาพที่ 1.1 แสดงขั้นตอนโดยสังเขปของการผลิตโปรตีนสายผสม เริ่มจากการเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมายที่แสดงออกของโปรตีนที่ต้องการศึกษา จากนั้นนำยีนเชื่อมต่อไปกับดีเอ็นเอพาหะและนำดีเอ็นเอพาหะสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน หลังจากมีการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน จะนำเซลล์เจ้าบ้านมาทำให้แตกและนำของเหลวภายใน เซลล์มาทำบริสุทธิ์โปรตีนด้วยวิธีต่างๆ เช่น แอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี (affinity chromatography) เป็นต้น โดยอาจแบ่งกระบวนการทั้งหมดออกเป็นสองส่วนใหญ่ๆคือ ส่วนของการโคลนยีนเป้าหมายและส่วนของการแสดงออกและทำบริสุทธิ์โปรตีน

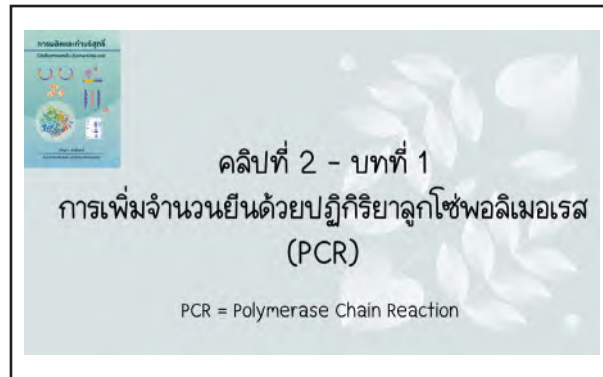


ภาพที่ 1.1 ภาพรวมของกระบวนการแสดงออกและทำบริสุทธิ์โปรตีนสายผสมในเซลล์เจ้าบ้านที่เป็นแบคทีเรีย ตัวอย่างในรูปภาพคือเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli*

ที่มา: ดัดแปลงจาก Abgenex (2021)

ในการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนจากยีนหรือการศึกษาการแสดงออกของยีนนั้นจำเป็นต้องนำดีเอ็นเอหรือชิ้นยีนมาเชื่อมต่อเข้ากับดีเอ็นเอพาหะเสียก่อน ซึ่งหากดีเอ็นเอมาจากแหล่งที่ไม่มี ความซับซ้อนมากหรือขนาดไม่ใหญ่มาก เช่น อยู่ในดีเอ็นเอพาหะอื่นมาก่อน อาจใช้วิธีการแยกชิ้น ดีเอ็นเอที่ต้องการออกมาโดยการย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วแยกด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) แล้วตัดชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการออกมา ทำให้บริสุทธิ์ และบรรจุเข้าในดีเอ็นเอพาหะ แต่หากดีเอ็นเอตั้งต้นมีความซับซ้อนมากหรือมีขนาดใหญ่มากเช่น นำมาจากโครโมโซมของเซลล์โปรคาริโอต สามารถแยกชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการโดยวิธีการสังเคราะห์ทางเคมีโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส หรือพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางและมักเป็นวิธีที่นักวิจัยนิยมเลือกใช้เป็นอย่างแรกเมื่อทำการโคลนยีน ส่วนยีนจากโครโมโซมเซลล์ยูคาริโอตมีกระบวนการที่ซับซ้อนมากกว่าเซลล์โปรคาริโอต เนื่องจากยีนเซลล์ยูคาริโอตมีทั้งส่วนที่แปลรหัสโปรตีน (exon) และส่วนที่ไม่แปลรหัสเป็นโปรตีน (intron) จึงไม่สามารถใช้ดีเอ็นเอจากเซลล์ยูคาริโอตมาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้โดยตรง จึงจำเป็นต้องสกัดเอ็มอาร์เอ็นเอจากเซลล์ยูคาริโอต และทำการแปลงให้เป็นสายดีเอ็นเอคู่สม (complementary DNA; cDNA) ด้วยเอนไซม์รีเวิร์สทรานสคริปเทส (reverse transcriptase) แล้วจึงเข้าสู่ปฏิกิริยาพีซีอาร์ต่อไป ซึ่งในหนังสือเล่มนี้กล่าวถึงเพียงการเพิ่มจำนวนยีนจากเซลล์โปรคาริโอตเท่านั้น

1.1 การเตรียมยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์



วิดีโอ - การเพิ่มจำนวนยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (PCR)

ผู้คิดค้นปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์หรือพีซีอาร์คือ Kary Banks Mullis นักชีวเคมีชาวอเมริกัน ซึ่งรับรางวัลโนเบลสาขาเคมีใน ค.ศ. 1993 หลักการของปฏิกิริยาพีซีอาร์เป็นหลักการที่เข้าใจง่าย ไม่ซับซ้อน ปฏิกิริยาพีซีอาร์เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นบริเวณใดบริเวณหนึ่งบนโครโมโซมหรือโมเลกุล ดีเอ็นเอ เช่น ยีนใดยีนหนึ่งเท่านั้น โดยมีการทำสำเนาโมเลกุลของดีเอ็นเอบริเวณนั้นหลายครั้ง จากเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์ (DNA polymerase) เทคนิคพีซีอาร์นี้ได้ช่วยขยายขีดความสามารถของนักวิทยาศาสตร์ในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ อีกทั้งยังเป็นแนวทางให้นักชีววิทยาสามารถคิดค้นวิธีการปรับใช้ใหม่ ๆ เพื่อศึกษาวิจัยในวงการแพทย์ เกษตรกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ ก่อให้เกิดการนำไปใช้งานประยุกต์ที่หลากหลายทั้งงานวิจัยทางพันธุศาสตร์และงานทางชีววิทยาในสาขาต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง ปัจจุบันพีซีอาร์เป็นวิธีที่ใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการและเป็นเทคนิคที่จำเป็นในงานวิจัยทางการแพทย์และชีววิทยาซึ่งมีการประยุกต์ใช้อย่างหลากหลายเช่น การโคลนยีน การผลิตโปรตีนสายผสม การวิเคราะห์ลำดับเบสในสายดีเอ็นเอ การศึกษาวิวัฒนาการชาติพันธุ์ (phylogeny) การศึกษาหน้าที่ของยีน การวินิจฉัยโรคทางกรรมพันธุ์ การบ่งชี้ลายมือทางพันธุกรรม (genetic fingerprint) และการตรวจหาและวินิจฉัยโรคติดต่อ เป็นต้น ผลจากการคิดค้นเทคนิคพีซีอาร์ทำให้เกิดสาขาวิชาใหม่ ๆ ที่สามารถใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการศึกษาเช่น พันธุศาสตร์โบราณคดี (archaeogenetics) นิเวศวิทยาเชิงโมเลกุล (molecular ecology) และนิติวิทยาศาสตร์ (DNA forensics) เป็นต้น

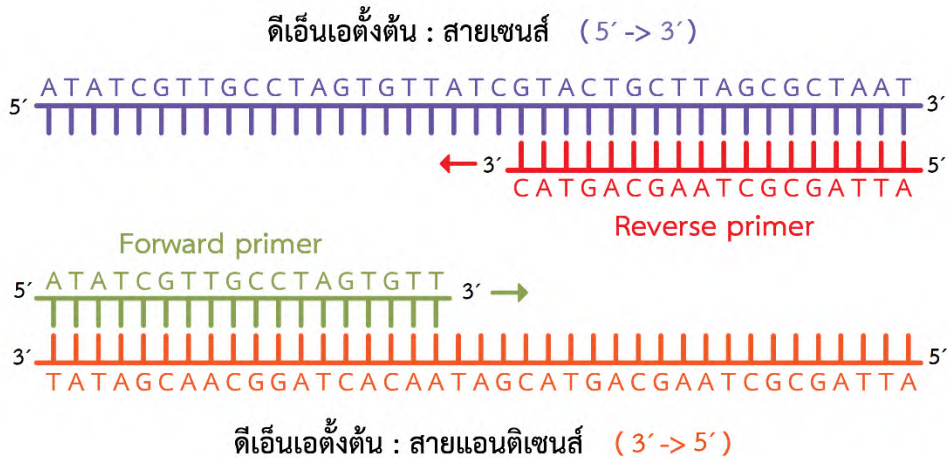
วัตถุประสงค์หลักของปฏิกิริยาพีซีอาร์คือการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในบริเวณจำเพาะ โดยสามารถเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอได้ยาวถึง 5-6 กิโลคู่เบส เทคนิคที่มีการดัดแปลงจากพีซีอาร์บางเทคนิคอาจเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ยาวถึง 40 กิโลคู่เบส โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ต้องใช้ส่วนประกอบและสารเคมีต่าง ๆ ในปฏิกิริยาดังนี้

1. ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ที่มีบริเวณของดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มจำนวน
2. ไพรเมอร์ 1 คู่ (รายละเอียดในบท)
3. เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสทนร้อน เช่น แทคพอลิเมอเรส (รายละเอียดในบท)
4. ไดออกซินิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตหรือดีเอ็นทีพี (deoxynucleotide triphosphate; dNTP) เป็นนิวคลีโอไทด์ที่มาเติมให้เป็นสายดีเอ็นเอที่สร้างใหม่
5. สารละลายบัฟเฟอร์ เพื่อช่วยในการเตรียมสภาวะทางเคมีที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสซึ่งควรมีประจุของแมกนีเซียม (Mg^{2+}) หรือโพแทสเซียม (K^+)

ไพรเมอร์คือ นิวคลีโอไทด์สายเดี่ยวขนาดสั้น ๆ (Single-stranded oligo- nucleotides) ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สม (complementary) กับดีเอ็นเอต้นแบบ โดยไพรเมอร์ทำหน้าที่เป็นจุดเริ่มต้นในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ ในการทำพีซีอาร์จำเป็นต้องมีไพรเมอร์อย่างน้อย 1 คู่ ที่มีทิศทางสวนทางกัน โดยคู่ของไพรเมอร์นี้เมื่อเข้าไปจับกับสายดีเอ็นเอตัวอย่าง จะครอบคลุมส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษา โดยรายละเอียดมีดังนี้:

- ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากบริเวณปลายฟอสเฟตหรือปลาย 5' (5'-phosphate; 5' end) ของยีน เรียกว่า**ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ (forward primer; fw)** โดยฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์จะจับกับ ดีเอ็นเอต้นแบบส่วนที่เป็นสายแอนติเซนส์ (anti-sense strand) หรือสายดีเอ็นเอเส้นที่ใช้เป็นต้นแบบในกระบวนการถอดรหัสและสังเคราะห์เอ็มอาร์เอ็นเอ โดยไพรเมอร์จับที่บริเวณปลายไฮดรอกซิลหรือปลาย 3' (3'-hydroxyl; 3' end) ของสายแอนติเซนส์

- ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากบริเวณปลาย 3' ของยีน เรียกว่า**รีเวิร์สไพรเมอร์ (reverse primer; rv)** โดยรีเวิร์สไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอต้นแบบส่วนที่เป็นสายเซนส์ (sense strand) หรือสายดีเอ็นเอที่ไม่ใช่แม่แบบในกระบวนการถอดรหัส โดยลำดับเบสบนสายของเอ็มอาร์เอ็นเอที่ได้จากการถอดรหัสเหมือนกับลำดับเบสบนสายเซนส์ทุกประการยกเว้นการมีเบสยูราซิล (uracil; U) แทนที่จะเป็นเบสไทมีน (thymine; T) โดยไพรเมอร์จับที่บริเวณปลาย 3' ของสายเซนส์ สำหรับการสังเคราะห์ไพรเมอร์เส้นรีเวิร์สทั่วไปมักเขียนในทิศทาง 5' -> 3' เช่นเดียวกันกับฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ (ภาพที่ 1.2)



ลำดับนิวคลีโอไทด์ สำหรับสังเคราะห์ไพรเมอร์

Forward primer : 5' - ATATCGTTGCCTAGTGTT - 3'

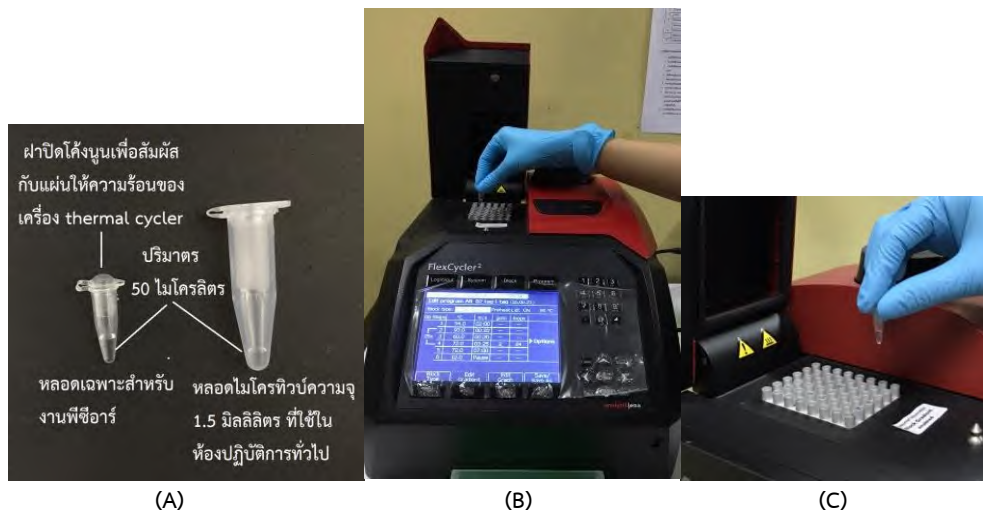
Reverse primer : 5' - ATTAGCGCTAAGCAGTAC - 3'

ภาพที่ 1.2 พอร์เวิร์ดไพรเมอร์และรีเวิร์สไพรเมอร์สำหรับการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

ที่มา: ดัดแปลงจาก อาร์ริตัน (2560)

ภาพรวมของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมีความสำคัญกับการพัฒนางานโคลนยีนอย่างเห็นชัด อาจกล่าวได้ว่าพีซีอาร์ช่วยให้งานโคลนยีนดำเนินไปอย่างสะดวกและรวดเร็วขึ้นมาก ปฏิกิริยาพีซีอาร์นี้เกิดภายในหลอดทดลองขนาดเล็ก (ภาพที่ 1.3 A) โดยการผสมดีเอ็นเอเข้ากับสารต่างๆ ที่ใช้เป็นตัวทำปฏิกิริยา (reagents) โดยปริมาตรของส่วนผสมในปฏิกิริยามีประมาณ 20-200 ไมโครลิตร จากนั้นนำหลอดทดลองเข้าสู่เครื่อง thermal cycler (ภาพที่ 1.3 B) ซึ่งมีช่องว่างหลอดทดลองที่สามารถเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิได้อย่างรวดเร็วและต่อเนื่อง (ภาพที่ 1.3 C) ช่วยให้ผู้ใช้สามารถบ่มส่วนผสมปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้สะดวกมากขึ้น โดยทั่วไปในวงจรของปฏิกิริยาพีซีอาร์มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในช่วง 95-50 องศาเซลเซียสสลับไปมาวนเวียนกัน 20-40 รอบ (เรียกว่า cycle) ซึ่งผู้ใช้เครื่องสามารถตั้งค่าการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิแบบต่อเนื่องได้



ภาพที่ 1.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ (A) หลอดที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (B) เครื่อง thermal cycler ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ หน้าจอแสดงการตั้งอุณหภูมิให้เปลี่ยนตามลำดับขั้นตอนต่างๆ (C) ลักษณะของแท่นที่วางหลอดพีซีอาร์ เมื่อวางลงบนแท่นหลอดจะแนบไปกับขอบของแท่นเพื่อการถ่ายเทอุณหภูมิอย่างทั่วถึงภายในหลอด

ที่มา: ภาพโดย อชมา อรอินทร์ นิตติภาภรณ์ โสตะพงษ์ และขวัญชนก ลิขิตลา ห้องปฏิบัติการวิจัยจุลชีววิทยาโมเลกุล สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ขั้นตอนที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (ภาพที่ 1.4)

1) การทำให้สายดีเอ็นเอเสียสภาพหรือดีเนเจอร์ชัน (denaturation) เป็นขั้นตอนแรกของรอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ปกติ ในขั้นตอนนี้ช่องใส่หลอดพีซีอาร์มีอุณหภูมิประมาณ 94-98 องศาเซลเซียส และใช้เวลา 20-30 วินาที อุณหภูมิดังกล่าวจะทำให้สายดีเอ็นเอไฮโดรเจนระหว่างเบสคู่สมในดีเอ็นเอสายคู่ของดีเอ็นเอแตั้งต้น ทำให้สายดีเอ็นเอเสียสภาพ (denaturation หรือ DNA melting) และแยกออกเป็นโมเลกุลดีเอ็นเอสายเดี่ยวจำนวน 2 สาย

2) การเข้าจับของไพรเมอร์หรือแอนนิลลิง (annealing) ในขั้นตอนนี้อุณหภูมิของปฏิกิริยาปรับลดลงเหลือ 50-65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-40 วินาที ที่อุณหภูมินี้โมเลกุลดีเอ็นเอทั้ง 2 สายที่แยกออกจากกันในขั้นตอนแรกสามารถกลับมาจับกันอีก แต่เหตุการณ์นี้มักไม่เกิดขึ้นเนื่องจากในส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์จะมีโมเลกุลดีเอ็นเอสายสั้นๆ ในปริมาณมาก ซึ่งโมเลกุลเหล่านี้เรียกว่า โอลิโกนิวคลีโอไทด์ (oligonucleotide) หรือไพรเมอร์ (primer) ในสภาวะนี้ไพรเมอร์ที่มีอยู่จำนวนมากในส่วนผสมปฏิกิริยาสามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ตำแหน่งจำเพาะซึ่งมีเบสคู่สมกันอย่างรวดเร็วเนื่องจากมีโมเลกุลที่มีความยาวนิวคลีโอไทด์สั้นและมีจำนวนมาก โดยการออกแบบให้เข้าไปจับที่ปลายของบริเวณดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มจำนวน (ภาพที่ 1.2) ทำให้ไพรเมอร์เข้าไปจับกับ

สายดีเอ็นเอต้นแบบได้อย่างรวดเร็ว และทำให้สายดีเอ็นเอต้นแบบที่แยกสายออกจากกันไม่สามารถกลับเข้ามาจับกันอีก

อุณหภูมิที่เลือกใช้ในขั้นตอนนี้มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อผลของปฏิกิริยา เนื่องจากอุณหภูมิในขั้นตอนแอนนิลิ่งส่งผลโดยตรงกับประสิทธิภาพและความจำเพาะในการจับของไพรเมอร์บนสายดีเอ็นเอตั้งต้น กล่าวคืออุณหภูมิต้องต่ำมากพอที่จะทำให้ไพรเมอร์สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับเบสที่เป็นคู่สมบนสายดีเอ็นเอตั้งต้น แต่ต้องสูงมากพอที่จะทำให้การจับคู่เบสมีความจำเพาะเช่น ให้จับกับบริเวณที่ต้องการเท่านั้นและไม่ไปจับที่อื่น หากอุณหภูมิในขั้นตอนนี้ต่ำเกินไป ไพรเมอร์อาจจับกับดีเอ็นเอในตำแหน่งที่ไม่จำเพาะได้

โดยทั่วไปอุณหภูมิในขั้นตอนแอนนิลิ่งจะต่ำกว่าค่าหลอมละลาย (melting temperature; T_m) ของไพรเมอร์ที่ใช้ประมาณ 3 - 5 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิหลอมละลายของดีเอ็นเอหมายถึงอุณหภูมิที่ทำให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกออกจากกัน โดยที่อุณหภูมิแอนนิลิ่งนี้ เมื่อไพรเมอร์มีลำดับเบสที่เหมือนหรือใกล้เคียงมาก ๆ กับดีเอ็นเอต้นแบบ จะสามารถจับกับสายดีเอ็นเอต้นแบบและจะสามารถสร้างพันธะขึ้นระหว่างเบสคู่สมของไพรเมอร์และดีเอ็นเอต้นแบบได้ จากนั้นเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสจึงเกิดการจับที่คู่สายผสมระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอตั้งต้น แล้วจึงเริ่มต้นสังเคราะห์สายดีเอ็นเอใหม่ ซึ่งหากอุณหภูมิสูงเกินไปอาจทำให้ไพรเมอร์ไม่จับกับสายดีเอ็นเอได้เลย

3) การเพิ่มความยาวของสายดีเอ็นเอหรืออีลองเกชันหรือเอ็กซ์เทนชัน (Elongation/extension) อุณหภูมิในขั้นตอนนี้จะขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสที่ใช้ในปฏิกิริยา ซึ่งอุณหภูมิที่นิยมใช้โดยทั่วไปคือ 72 องศาเซลเซียส การทำงานโดยสังเขปของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสมีรายละเอียดดังนี้ เอนไซม์จับกับปลายของไพรเมอร์และจะเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ที่เป็นคู่สมกับโมเลกุลของดีเอ็นเอต้นแบบโดยการเอื้อให้ดีเอ็นเอทีพี (dNTPs) อิสระที่อยู่ในส่วนผสมของปฏิกิริยาเข้ามาสร้างพันธะไฮโดรเจนกับเบสที่เป็นคู่สมบนสายดีเอ็นเอต้นแบบ ซึ่งเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสจะสังเคราะห์ดีเอ็นเอในทิศทาง 5' ไป 3' เสมอ โดยจะเร่งให้เกิดพันธะไดเอสเทอร์ระหว่างหมู่ฟอสเฟตของดีเอ็นเอทีพีกับหมู่ไฮดรอกซิลที่ปลาย 3' ของดีเอ็นเอสายที่สังเคราะห์ใหม่ และทำให้เกิดเป็นสายดีเอ็นเอใหม่ที่ยาวต่อเนื่องกันไป

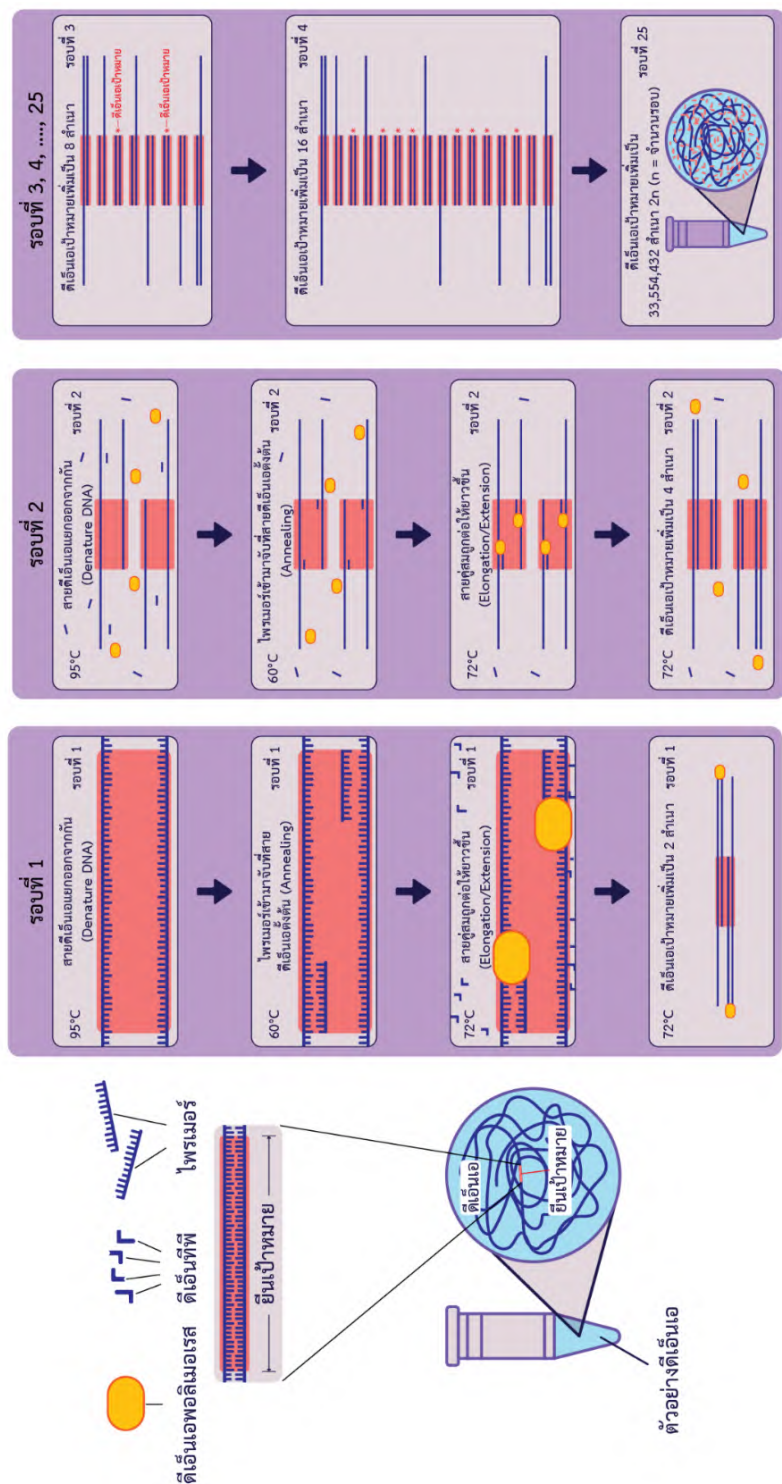
ระยะเวลาที่ใช้ในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอใหม่ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสที่ใช้และความยาวของบริเวณดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการเพิ่มจำนวน โดยทั่วไปเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสสามารถสังเคราะห์สายดีเอ็นเอได้ประมาณหนึ่งพันคู่เบสต่อนาที ในขณะที่เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสชนิดพรูฟรีดดิ้ง (proofreading) (อธิบายในหน้าถัดไป) อาจใช้เวลาถึง 2 นาทีต่อหนึ่งพันคู่เบส อย่างไรก็ตามเมื่อเสร็จสิ้นขั้นตอนนี้จำนวนของดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า โดยในโมเลกุล

ดีเอ็นเอสายคู่นี้ สายด้านหนึ่งจะเป็นสายดีเอ็นเอดั้งเดิม ส่วนสายอีกด้านหนึ่งจะเป็นสายที่สังเคราะห์ใหม่หรือที่เรียกว่า เซมิคอนเซอเวทิฟ (semi-conservative) และสายดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ใหม่นี้จะเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาฟิซาร์ในรอบถัดไป

4) การวนรอบใหม่ของปฏิกิริยาทั้งหมด เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยาในข้อ 3) แล้วอุณหภูมิของสารผสมจะกลับไปอยู่ที่ 94 องศาเซลเซียสอีกครั้ง โมเลกุลดีเอ็นเอสายคู่ที่เกิดขึ้นจะเสถียรภาพและกลายเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว จากนั้นจะเป็นการเข้าจับของไพรเมอร์และเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้นอีกครั้ง ซึ่งท้ายสุดของวงจรปฏิกิริยาในครั้งที่สองนี้จะเกิดสายดีเอ็นเอทั้งหมด 8 สาย (เป็นดีเอ็นเอสายคู่ 4 สาย) และหากทำปฏิกิริยานี้วนซ้ำ 30 รอบ จะได้โมเลกุลดีเอ็นเอสายคู่มากถึง 130 ล้านโมเลกุล จากการเริ่มต้นปฏิกิริยาโดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบเพียงโมเลกุลเดียวเท่านั้น ซึ่งโมเลกุลของดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ใหม่นี้จะเป็นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างไพรเมอร์ที่จับอยู่ทั้ง 2 ด้านของโมเลกุลดีเอ็นเอต้นแบบ

5) การเพิ่มความยาวของสายดีเอ็นเอเป็นรอบสุดท้าย (Final elongation) หลังจากการเกิดปฏิกิริยาฟิซาร์ผ่านวงจรครบ 20-30 รอบ ในขั้นตอนสุดท้ายอุณหภูมิของปฏิกิริยาจะอยู่ที่ 70-74 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 5-15 นาที เพื่อปล่อยให้เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสทำหน้าที่สังเคราะห์สายดีเอ็นเอให้ครบหลังจากผ่านวงจรฟิซาร์รอบสุดท้าย เพื่อให้มั่นใจว่าดีเอ็นเอสายเดี่ยวทั้งหมดในปฏิกิริยาได้สังเคราะห์ให้เป็นสายคู่ทั้งหมด

ปฏิกิริยาฟิซาร์สามารถเพิ่มจำนวนโมเลกุลดีเอ็นเอในบริเวณที่ต้องการ หากทราบลำดับเบสในส่วนขอบของบริเวณสายดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มจำนวนซึ่งเป็นเงื่อนไขสำคัญในการทำปฏิกิริยาฟิซาร์ ทั้งนี้เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาฟิซาร์จำเป็นต้องมีโอลิโกนิวคลีโอไทด์เข้าไปจับบริเวณโมเลกุลของสายดีเอ็นเอต้นแบบแต่ละสาย (ซึ่งโอลิโกนิวคลีโอไทด์เหล่านี้จะทำหน้าที่เป็นไพรเมอร์เพื่อเป็นจุดกำหนดการเริ่มต้นปฏิกิริยาการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอและเป็นตัวกำหนดบริเวณของสายดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มจำนวนอีกด้วย)



ภาพที่ 1.4 ภาพรวมของขั้นตอนที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ที่มา: ดัดแปลงจาก Shomu's Biology (2016)