บทที่ 2

สอบสวนเอกสาร

ชีววิทยาของเชื้อมาลาเรีย

วงจรชีวิต (Life Cycle)

วงจรชีวิตของเชื้อ Plasmodium ค่อนข้างจะซับซ้อนแบ่งออกได้เป็น 2 ระยะใหญ่ ๆ คือ ระบบสืบพันธุ์แบบไม่มีเพศ (asexual stage) ระยะนี้จะอาศัยอยู่ในโฮสต์ที่เป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังรวมทั้งคนด้วย และระยะสืบพันธุ์แบบมีเพศ (sexual stage) จะเจริญอยู่ในโฮสต์ที่เป็นสัตว์ขาปล้อง (Arthropod) สกุล Anopheles ซึ่งเป็นพาหะ (vector) ของโรคนี้

วงจรชีวิตเริ่มจากยุงก้นปล่องเพศเมียไปกัดคนหรือสัตว์ที่ติดเชื้อยุงจะได้รับเชื้อระยะแกมีโตไซท์เพศเมีย (macrogametocyte) และ แกมมีโตไซท์เพศผู้ (microgametocyte) เข้าสู่กระเพาะอาหาร ระยะสืบพันธุ์ของเชื้อ Plasmodium จะเริ่มขึ้นที่กระเพาะอาหาร (gut) ของยุง แกมีโตไซท์เพศผู้ และ แกมีโตไซท์เพศเมียจะปฏิสนธิ (fertilization) ได้ zygote ซึ่งจะค่อย ๆ เจริญมีรูปร่างยาวขึ้น และเคลื่อนที่ได้ ระยะนี้เรียกว่า ookinete ซึ่งจะเคลื่อนตัวแทรกเข้าไปอยู่ในเยื่อบุกระเพาะอาหารของยุง (basement membrane) แล้วเจริญเป็นระยะโอโอซีสท์ ซึ่งจากการศึกษาของ Ross ในปี 1910 พบว่าในกระเพาะอาหารของยุงเพียง 1 ตัว สามารถพบเชื้อระยะโอโอซีสท์ ได้มากถึง 445 โอโอซีสท์ และ 1 โอโอซีสท์สามารถผลิตสปอโรซอยท์ได้ถึง 1,000 สปอโรซอยท์ ดังนั้น สปอโรซอยท์ที่ได้จากโอโอซีสท์ 445 โอโอซีสท์ จึงมากถึง 445,000 สปอโรซอยท์ (Ross, 1910) หลังจากที่เชื้อเจริญอยู่ในกระเพาะอาหารของยุงได้ 10 ถึง 14 วัน สปอโรซอยท์ก็จะเคลื่อนย้ายไปสู่ต่อมน้ำลาย (salivary gland) ของยุง และจากการศึกษาพบว่าสปอโรซอยท์ เพียง 2 เปอร์เซนต์เท่านั้นที่สามารถเดินทางไปสู่ต่อมน้ำลายยุงได้สำเร็จ (Kalz, 1982) และสปอโรซอยท์ ในต่อมน้ำลายยุงเท่านั้นที่จะทำให้เกิดการติดเชื้อขึ้นกับโฮสต์ที่ถูกยุงกัด เมื่อยุงที่ติดเชื้อนี้ไปกัดโฮสต์ เชื้อระยะสปอโรซอยท์ จากต่อมน้ำลายจะถูกปล่อยเข้าสู่กระแสเลือดและเข้าสู่เซลล์ตับ (parenchymal cell) เริ่มแบ่งตัวแบบไม่มีเพศ (asexual multiplication) เพื่อสร้างระยะโทรโฟซอยท์ ไซซอนท์ และเมอโรซอยท์ สำหรับเชื้อ P. falciparum จะเจริญอยู่ในเซลล์ตับ 10 วัน จากนั้นเซลล์ตับจะแตกและปล่อยเมอโรซอยท์ออกสู่เม็ดเลือดแดง และมีการเจริญเปลี่ยนแปลงเป็นระยะต่าง ๆ คือ ระยะวงแหวน (ring form) ระยะโทรโฟซอยท์ ระยะไซซอนท์ และเมอโรซอยท์ ตามลำดับ การเจริญของเชื้อมาลาเรียในเม็ดเลือดแดงจะใช้

เวลาประมาณ 48 ชั่วโมง และในขณะที่มีการเจริญเพิ่มจำนวนในเม็ดเลือดแดงนั้นเมอโรซอยท์บางตัวจะมีการเปลี่ยนแปลงเป็นระยะมีเพศ คือ มาโครแกมีท และ ไมโครแกมีท การเจริญจากระยะเมอโรซอยท์จนถึงระยะมีเพศที่พร้อมที่จะปฏิสนธิได้นั้นใช้เวลาประมาณ 7-14 วัน

การวินิจฉัยเชื้อมาลาเรีย (malaria diagnosis)

โดยปกติการตรวจหาเชื้อมาลาเรียจากเลือดของผู้ที่สงสัยว่าจะติดเชื้อโดยการทำฟิล์มเลือดชนิดหนา (thick blood smear) และฟิล์มเลือดชนิดบาง (thin blood smear) ย้อมด้วยสีจิมซา (Giemsa) แล้วตรวจดูด้วยกล้องจุลทัศน์ ซึ่งจะทำให้เราทราบถึงรูปร่างลักษณะและจำนวนของเชื้อที่อยู่ในตัวผู้ป่วย วิธีการนี้ยังนิยมใช้ในการศึกษาถึงระบาดวิทยา (epidemiology) ของเชื้อ การตรวจหาเชื้อด้วยกล้องจุลทัศน์สามารถตรวจพบเชื้อมาลาเรียได้ต่ำสุด 0.0001 เปอร์เซนต์ แต่วิธีการนี้มีข้อจำกัดที่ต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญในการวินิจฉัย และต้องอาศัยเวลาในการตรวจหาเชื้อนานพอสมควร และในบางครั้งก็ไม่สามารถที่จะระบุได้แน่ชัดถึงชนิดของเชื้อที่พบ อีกวิธีหนึ่งที่สามารถตรวจได้คือ การทดสอบทางภูมิคุ้มกัน (Immunological test) แต่วิธีการนี้ก็ไม่สามารถจะบอกได้ว่าผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันเชื้ออยู่นี้เป็นภูมิคุ้มกันที่สร้างจากการติดเชื้อในครั้งใด

ในระยะต่อมาในการศึกษาทางระบาดวิทยาของประชากรยุงที่เป็นพาหะสามารถตรวจหาเชื้อระยะสปอร์โรซอยท์จากต่อมน้ำลายของยุง โดยวิธีไฮบริไดเซชัน (hybridization) กับ ดีเอนเอตรวจสอบ วิธีการนี้สามารถตรวจยุงได้ 20 ตัวภายใน 1 วัน และสามารถตรวจพบเชื้อจำนวน 10,000 สปอร์โรซอยท์ ในต่อมน้ำลายยุง 1 ตัว ถ้าบริเวณใดที่มีการระบาดของประชากรยุงพาหะต่ำกว่า 0.1 เปอร์เซนต์ของประชากรยุงทั้งหมดก็ไม่สามารถใช้วิธีการนี้สำรวจได้ (Warren et al., 1975)

ปัจจุบันนี้นักวิทยาศาสตร์ได้พยายาม[illegible] (in vitro) ในปี 1984 Franzen และคณะ สามารถใช้ดีเอนเอตรวจสอบ ตรวจหาเชื้อ P. falciparum จากเลือดผู้ป่วยได้แม้ว่าในเลือดจะมีดีเอนเอของเชื้อเพียง 25 Pg. (Franzen et al., 1984) ต่อมาในปี 1986 Barker และคณะได้พัฒนา ดีเอนเอตรวจสอบ ให้มีความไวมากขึ้น คือสามารถตรวจเชื้อได้ถึงแม้ในเลือดผู้ป่วยจะมีดีเอนเอของเชื้อ P. falciparum อยู่เพียง 10 Pg. (Barker et al., 1986)

อย่างไรก็ดีการพัฒนาเพื่อหาวิธีการที่จะวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียก็ยังมิได้หยุดยั้งเพื่อให้ได้วิธีการที่สะดวก รวดเร็ว ประหยัด และถูกต้องที่สุด

การศึกษาคุณลักษณะของเชื้อมาลาเรีย (malaria characterization)

เชื้อมาลาเรียที่พบอยู่ในธรรมชาติมีคุณลักษณะที่แตกต่างกันไปได้มากมายหลายแบบ เช่น ตัวอย่างของเชื้อ P. falciparum ที่เก็บมาจากผู้ป่วยเพียงคนเดียวนั้นจะมีประชากรของเชื้ออยู่หลายกลุ่ม ซึ่งเชื้อแต่ละกลุ่มก็จะมีพันธุกรรมแตกต่างกันไป (genetic variation) เราเรียกกลุ่มประชากรของเชื้อที่แยกจากผู้ป่วยในแต่ละครั้งเหล่านี้ว่า ไอโซเลต (isolate) สำหรับคำว่า โคลน (clone) หรือสายพันธุ์ หมายถึงเชื้อมาลาเรียที่มีพันธุกรรมเหมือนกัน เนื่องจากเป็นเชื้อที่เจริญมาจากเชื้อเพียงเซลล์เดียว โดยการสืบพันธุ์แบบไม่มีเพศซึ่งแยกออกมาจากไอโซเลตนั่นเอง (Walliker, 1981; 1983) สำหรับวิธีที่ใช้ในการแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ของเชื้อนั้นนิยมใช้กันอยู่มี 2 วิธี คือ วิธี limiting dilution (Rosario, 1981) และอีกวิธีหนึ่งคือ วิธี micromanipulation (Trager et al., 1981) จากการศึกษาของ Thaithong และคณะ ในปี 1984 ได้ทำการแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ของเชื้อ P. falciparum ไอโซเลต T_9 ซึ่งเก็บมาจาก อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก โดยวิธี limitting dilution จากผลการศึกษาพบว่าเชื้อจากไอโซเลต T_9 นี้ประกอบด้วยสายพันธุ์ที่มีความแตกต่างทางพิโนไทพ์ได้ถึง 7 แบบ ดังนั้นเพื่อให้ได้ผลที่ชัดเจนในการศึกษาคุณสมบัติทางชีววิทยาของเชื้อมาลาเรีย ควรจะต้องทำการศึกษาจากสายพันธุ์ (Thaithong et al., 1984)

จากรายงานขององค์การอนามัยโลกในปี 1981 ได้กล่าวถึงวิธีการศึกษาคุณลักษณะของเชื้อมาลาเรียว่ามีอยู่ด้วยกัน 3 วิธีการใหญ่ ๆ คือ วิธีการทางชีววิทยา วิธีการทางภูมิคุ้มกัน-วิทยา และวิธีการทางชีวเคมี โดยกล่าวถึงรายละเอียดของแต่ละวิธี ดังต่อไปนี้

1. การศึกษาคุณลักษณะของเชื้อมาลาเรียทางชีววิทยา (biological characterization of malaria parasite) สามารถทำการศึกษาได้หลายวิธีดังนี้

1.1 การศึกษาการปรับตัวของเชื้อต่อพาหะ เป็นการศึกษาความสามารถในการติดเชื้อในยุงพาหะของเชื้อมาลาเรีย โดยพบว่าเชื้อในแต่ละไอโซเลตจะมีความสามารถในการเจริญเปลี่ยนแปลง (differentiate) ในยุงได้แตกต่างกัน

1.2 ศึกษาระยะพักตัวของเชื้อมาลาเรีย ในปี 1976 Ungureanu และคณะ ได้ทำการศึกษาระยะพักตัวของเชื้อ P. vivax ซึ่งเก็บมาจากแหล่งต่าง ๆ กันพบว่าเชื้อเหล่านี้มีระยะเวลาในการพักตัวในตับของโฮสต์ที่แตกต่างกันออกไป

1.3 การศึกษาความรุนแรงและพยาธิสภาพที่เกิดในโฮสต์ (virulence and pathogenicity) วิธีการนี้มีผู้ศึกษากันเฉพาะมาลาเรียในสัตว์ฟันแทะ สำหรับเชื้อ P. falciparum ยังไม่มีการศึกษา

1.4 การศึกษาอัตราการเจริญในจานเพาะเลี้ยง (growth rate in vitro) การศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อ P. falciparum ในจานเพาะเลี้ยงสามารถใช้เป็น พารามิเตอร์ในทางชีววิทยาได้ แต่อย่างไรก็ตามอัตราการเจริญของเชื้อในจานเพาะนี้ยังขึ้นอยู่กับสภาวะในการเลี้ยงอื่น ๆ ซึ่งยากที่จะควบคุมให้คงที่ได้ทุกครั้งที่ทำการทดลอง

1.5 การศึกษาการตอบสนองต่อยา (drug susceptibility) การศึกษาด้วยวิธีนี้นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย ยาที่นิยมใช้มีอยู่หลายชนิด เช่น chloroquine, pyrimethamine, mefloquine, amodiaquin และ Quinine

2. การศึกษาคุณลักษณะทางภูมิคุ้มกันวิทยา (immunological characterization) การศึกษาด้านภูมิคุ้มกันวิทยาที่ทำการศึกษาแล้วมีดังนี้ คือ

2.1 การศึกษาโดยใช้ S-antigen แอนติเจนชนิดนี้เป็นสารที่คงตัวในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง ได้มาจากการสกัดเม็ดเลือดแดง และพลาสมาของผู้ป่วยด้วยโรคมาลาเรีย S-antigen สามารถตรวจพบได้โดยการทำ gel diffusion โดยให้ทำปฏิกริยากับซีรัมของผู้ที่อาศัยอยู่บริเวณที่มีมาลาเรียระบาด นิยมใช้ S-antigen ศึกษา serology diversity ของเชื้อมาลาเรียไอโซเลตต่าง ๆ ได้ และใช้ในการทำ serotyping ของเชื้อ P. falciparum ได้อีกด้วย (Wilson, 1980; Hempelmann & Wilson, 1981)

2.2 การศึกษาโดยใช้ monoclonal antibodies (McAb) การศึกษาโดยวิธีนี้ต้องใช้เทคนิคทาง immunofluorescense เข้าช่วย โดยศึกษา antigenic diversity ของเชื้อมาลาเรียไอโซเลตต่าง ๆ McBride และคณะ สามารถเตรียม McAb จากเชื้อ P. falciparum ในประเทศไทย 2 ไอโซเลต คือ K_1 และ PB_1 และนำมาทดสอบกับเชื้อ P. falciparum ที่เก็บมาจาก 8 ประเทศ จำนวน 27 ไอโซเลต จากผลการทดสอบโดยวิธี IFA (indirect immunofluoresence assay) พบว่า McAb บางตัวสามารถบอกความแตกต่างของเชื้อแต่ละไอโซเลตได้ (McBride et al., 1984; 1987) ในทำนองเดียวกัน Schofield และคณะได้เตรียม McAb จากเชื้อ P. falciparum ที่เก็บจากปาปัวนิวกินี 2 ไอโซเลต คือ FCQ-27/PNG และ FCQ-30/PNG ซึ่ง McAb ที่ได้นี้จะสามารถทำปฏิกิริยากับเชื้อ P. falciparum ที่เก็บจากปาปัวนิวกินีทุกไอโซเลต แต่เมื่อนำมาทำปฏิกิริยากับเชื้อ P. falciparum ที่เก็บจากประเทศไทย ไนจีเรีย กานา และเนเธอร์แลนด์ จะให้ผลลบหมดทุกไอโซเลต (Schofield et al., 1982)

3. การศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมี (biochemical characterization)

การศึกษาทางชีวเคมีจะอาศัยการเปรียบเทียบคุณสมบัติของสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ของเชื้อมาลาเรีย เช่น ไอโซเอ็นไซม์ (isoenzyme) สารประกอบโปรตีน กรดนิวคลีอิค เป็นต้น ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

3.1 การศึกษารูปแบบไอโซเอ็นไซม์ (isoenzyme typing)

การศึกษารูปแบบไอโซเอ็นไซม์นิยมศึกษาโดยวิธี starch gel และ cellulose acetate electrophoresis การดูรูปแบบไอโซเอ็นไซม์นี้จะบอกความแตกต่างของเชื้อมาลาเรียได้ในระดับไอโซเลต (Carter, 1973) และไอโซเอ็นไซม์ที่นิยมศึกษามีอยู่ 6 ชนิดคือ

glucose phosphate isomerase (GPI)

6-phosphogluconate dehydrogenase (PGD)

lactate dehydrogenase (LDH)

NADP-dependent glutamate dehydrogenase (GDH)

adenosine deamenase (ADA)

และ peptidase E (PEP-E)

ระยะแรกได้ทำการศึกษาได้ใช้เชื้อมาลาเรียของสัตว์พันแทะในแถบทวีปอาฟริกา ได้แก่ เชื้อ P. berghei, P. yoelii, P. chabaudi และ P. vinkei จากการศึกษาพบว่าเชื้อแต่ละชนิดจะมีรูปแบบของเอ็นไซม์แต่ละชนิดเป็นแบบเฉพาะ และจะไม่เหมือนกับของเชื้อชนิดอื่น ๆ (Carter, 1978)

สำหรับในเชื้อ P. falciparum ก็ได้มีการศึกษา ดังมีรายงานจากหลายประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อเมริกาใต้ และอาฟริกา (Thaithong et al., 1981; Sanderson et al., 1981; Carter and McGregor, 1973; Carter and Voller et al., 1975) ได้ศึกษารูปแบบไอโซไซม์ 4 ชนิดคือ GPI LDH ADA และ PEP-E จากผลการศึกษาพบว่าเอ็นไซม์ GPI และ ADA นี้ประกอบด้วย 2 ไอโซไซม์ จากการเปรียบเทียบรูปแบบเอ็นไซม์ระหว่างเชื้อ P. falciparum ที่เก็บจากประเทศในแถบต่าง ๆ กัน พบว่าเอ็นไซม์ GPI และ ADA จะให้ความแตกต่างของรูปแบบมากกว่า LDH และ PEP-E จากการศึกษาครั้งนี้ยังสรุปได้ว่าเชื้อ P. falciparum ที่ได้จากแหล่งต่าง ๆ มีพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกันไม่ว่าจะกระจายอยู่บริเวณใดในโลก ซึ่งต่างจากเชื้อมาลาเรียของสัตว์พันแทะ ซึ่งมีพันธุกรรมที่แตกต่างกันมากกว่า ดังนั้นการศึกษารูปแบบของเอ็นไซม์ของเชื้อ P. falciparum จึงมีความจำกัดอยู่ที่ไอโซเอ็นไซม์เหล่านี้มีความแตกต่างของรูปแบบเฉียง

เล็กน้อย แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาไอโซเอ็นไซม์ก็มีประโยชน์ เพราะใช้เป็น marker บ่งชี้ความบริสุทธิ์ของเชื้อมาลาเรียหลังจากการแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ (cloning) (Rosario, 1981)

3.2 การศึกษารูปแบบโปรตีนโดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส 2 มิติ (2-dimentional acrylamide gel electrophoresis)

O' Farrell เป็นผู้คิดค้นเทคนิค 2 dimentional acrylamide gel electrophoresis หรือ 2D PAGE ขึ้นในปี 1975 เป็นการศึกษารูปแบบของโปรตีนโดยอาศัยความแตกต่างของประจุไฟฟ้าที่เป็นองค์ประกอบภายในโมเลกุล และอาศัยขนาดโมเลกุลของโปรตีน Tait ได้นำวิธีการดังกล่าวนี้มาศึกษาในเชื้อ P. falciparum โดยการติดสลากโปรตีนของเชื้อ P. falciparum ที่เลี้ยงในจานเพาะด้วย ^{35}S-methionine แล้วจึงสกัดเอาโปรตีนของเชื้อมาศึกษารูปแบบโดยการทำ 2D PAGE และทำ autoradiograph ตามลำดับ จากผลการทดลอง Tait สามารถตรวจพบโปรตีนของเชื้อ P. falciparum มากกว่า 100 ชนิด และพบว่ามีโปรตีน 7 ชนิดที่ใช้เป็นตัวบ่งบอกความแตกต่างของเชื้อ P. falciparum ได้ ถึงแม้ว่าจะศึกษาในเชื้อเพียงไม่กี่ไอโซเลต ดังนั้นจะเห็นว่าเทคนิคนี้สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อ P. falciparum ได้ดีกว่าการศึกษารูปแบบเอ็นไซม์ (Tait, 1981)

และในปี 1987 Pinswadi และคณะ ได้ทำการศึกษารูปแบบของโปรตีนของเชื้อ P. falciparum ด้วยวิธีนี้ โดยศึกษาในไอโซเลต CH_{iso} ซึ่งเป็นเชื้อที่เก็บจากผู้ป่วยก่อนการรักษาด้วยยาเมโฟลควิน และไอโซเลต CH_{isoR} เป็นไอโซเลตที่ดื้อต่อยาเมโฟลควิน หลังจากแยก CH_{iso} และ CH_{isoR} ให้เป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ได้ 10 และ 7 สายพันธุ์ตามลำดับ แล้วจึงนำมาศึกษารูปแบบโปรตีน จากผลการศึกษา Pinswadi และคณะ สามารถจัดกลุ่มของเชื้อได้ตามความแตกต่างของรูปแบบโปรตีนได้ 7 กลุ่มในไอโซเลต CH_{iso} และ 6 กลุ่มสำหรับ CH_{isoR}

3.3 การวิเคราะห์กรดนิวคลีอิค (nucleic acid analysis)

3.3.1 โครงสร้างของสารพันธุกรรม (genomic structure) การวิเคราะห์หาเบสซึ่งเป็นองค์ประกอบของดีเอนเอของเชื้อมาลาเรียชนิดต่าง ๆ นิยมวิเคราะห์หาค่า G-C content หรือ A-T content จะทำให้เข้าใจรายละเอียดถึงโครงสร้างของสารพันธุกรรมได้ดีขึ้น การวิเคราะห์หาปริมาณเบสทำได้โดยการวัดค่า buoyant density ของดีเอนเอใน isopycnic cesium chloride หรือใน cesium sulphate gradients แล้วคำนวณหาค่า G-C content จากสมการของ De Ley หรืออาจจะคำนวณจากจุดหลอมเหลวของดีเอนเอ (melting temperature, Tm) โดยใช้สมการของ Owen จากการศึกษา

ของ Pollack และคณะ พบว่าเชื้อ P. falciparum มีค่า G-C content เพียง 17 ถึง 19 เปอร์เซนต์ ซึ่งต่ำกว่าสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ (Pollack et al., 1982) McCutchan และคณะ ได้วิเคราะห์หาค่า G-C content ของเชื้อมาลาเรียหลายชนิด จากผลการศึกษาสรุปว่าเชื้อมาลาเรียมีค่า G-C content ต่างกันอยู่ 3 กลุ่ม ได้แก่กลุ่มที่มีค่า G-C content ต่ำ คือ 18 เปอร์เซนต์ กลุ่มที่สองจะมีค่า G-C content สูงกว่าคือ 30 เปอร์เซนต์ และกลุ่มสุดท้ายจะมีค่า G-C content ทั้งสองค่า และเมื่อนำดีเอนเอของเชื้อมาลาเรียซึ่งมีค่า G-C content แตกต่างกันเหล่านี้มาศึกษารูปแบบโดยการทำไฮบริไดเซชันกับดีเอนเอตรวจสอบ 4 ชนิด ซึ่งเตรียมจากดีเอนเอของสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ดีเอนเอ[illegible] ดีเอนเอที่เก็บระหัสสำหรับ dihydrofolate reductase ของหนูถีบจักร และดีเอนเอที่เก็บระหัสสำหรับ thymidylate synthetase ของยีสต์ จากผลการทดลองพบว่าผลการทำ DNA hybridization จะมีความสัมพันธ์กับค่า G-C content ดังในตารางที่ 1 (McCutchan et al., 1984)

ในปี 1980 Dore และคณะได้ศึกษาขนาดของ genome ของเชื้อ P. berghei พบว่ามีเบสเป็นองค์ประกอบอยู่ 2×10^7 คู่เบส ซึ่งมีขนาดเล็กกว่า genome ของ P. falciparum ซึ่งมีเบสเป็นองค์ประกอบอยู่ถึง 3×10^8 คู่เบส (Hough-Evans และ Howard, 1982)

3.3.2 การขยายตัวของยีน (gene amplification) การขยายตัวของยีนเกิดจากการที่ยีนส่วนใดส่วนหนึ่งใน genome เกิดการจำลองตัวเอง (duplicate) ขึ้นมากกว่าปกติ โดยมากจะเกิดขึ้นกับยีนบริเวณที่เก็บระหัสสำหรับเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านยาของสิ่งมีชีวิต จากการศึกษาพบว่าถ้าเป็นการดื้อยาแบบชั่วคราวจะเกิดจากการขยายตัวของยีนซึ่งอยู่นอกนิวเคลียส (extrachromosomal DNA) แต่ถ้าเป็นการดื้อยาแบบถาวรจะเกิดจากการขยายตัวของยีนในนิวเคลียส (chromosomal DNA) (Schimke et al., 1978) Coderre และคณะ ได้ทำการศึกษาการขยายตัวของยีนใน Leishmania tropica พบว่าเมื่อถูกเหนี่ยวนำให้ดื้อต่อยา methotrexate โดยใส่ยาความเข้มข้น 1 มิลลิโมล ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร จะทำให้เกิดการขยายตัวของยีนส่วนที่เก็บระหัสของเอ็นไซม์ 2 ชนิด คือ dihydrofolate reductase และ thymidylate synthase ยีนบริเวณนี้มีเบสเป็น

ตารางที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า G-C content กับผลการไฮบริไดเซชั่นด้วยดีเอนเอตรวจสอบ 4 ชนิด (McCutchan et al., 1984)

ชนิดของเชื้อมาลาเรีย	โฮสต์	G+C content		การเกิดไฮบริไดเซชั่น			
		18%	30%	Action	Tubulin	DHFR	TS
P. falciparum	คน	+	-	-	-	-	+
P. berghei	สัตว์ฟันแทะ	+	-	-	-	-	+
P. lophurae	นก	+	-	-	-	-	+
P. knowlesi	ลิง	-	+	+	+	+	-
P. fragile	ลิง	-	+	+	+	+	-
P. cynomolgi	ลิง	+	+	+	+	+	-
P. vivax	คน	+	-	+	+	ND	ND

\+ = เกิดการไฮบริไดซ์

\- = ไม่เกิดการไฮบริไดซ์

ND = ไม่ได้ทำ

องค์ประกอบอยู่ประมาณ 56000 คู่เบส เมื่อเกิดการขยายตัวแล้วจะมีส่วนที่ซ้ำกันถึง 80 ชุด หรือเพิ่มขึ้นประมาณ 80 เปอร์เซนต์ของยีนทั้งหมด ซึ่งมีผลทำให้ specific activity ของเอ็นไซม์ทั้งสองเพิ่มจากเดิมถึง 40 เท่า แต่เมื่อหยุดการเหนี่ยวนำการขยายตัวของยีนก็จะค่อย ๆ ลดลงจนหมดไปหลังจากรุ่น (generation) ที่ 100 (Coderre et al., 1983)

ในเชื้อมาลาเรียได้มีการศึกษาถึงการเหนี่ยวนำให้เกิดการดื้อยาด้วยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาผสมอยู่ ยาที่ได้ทำการทดลองแล้ว ได้แก่ chloroquine และ quinine (Graves et al., 1984) แต่สำหรับ mefloqiune ได้ทดลองทำในเชื้อมาลาเรียของสัตว์ฟันแทะเท่านั้น (Padua, 1981; Peter, 1965; Peter, 1968; Peter, 1977)

3.3.3 การวิเคราะห์ดีเอนเอโดยใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (restriction endonulease) ซึ่งเป็นกลุ่มของเอ็นไซม์ชนิดที่ตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ (phosphodiester bonds) ตรงตำแหน่งจำเพาะของดีเอนเอเกลียวคู่ จากคุณสมบัตินี้เองจึงถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการสร้างดีเอนเอสายผสม (recombinant DNA) สามารถ

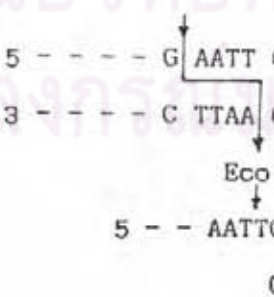
แบ่งชนิดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะได้ 3 ชนิดด้วยกัน คือ

1. ชนิด I (Type I) เป็นเอ็นไซม์พวกแรกที่ค้นพบโดย Linn และ Arber (Linn et al., 1986) ในปี 1986 เอ็นไซม์ชนิดนี้พบใน Escherichia coli (E. coli) สามารถทำหน้าที่ได้ 2 อย่าง คือย่อย (restriction) และเปลี่ยนแปลง (modification restriction) หมายถึงหน้าที่ในการย่อย (endodeoxyribonuclease) ส่วน modification หมายถึงกระบวนการ methylation คือการเพิ่มและลดหมู่ methyl ใน adenosine หรือ cytosine base เพื่อป้องกันมิให้ถูกย่อยด้วย endonuclease ทั้ง 2 หน้าที่นี้ทำให้ E. coli สามารถแยกดีเอนเอของตัวเองออกจากดีเอนเอภายนอกได้โดยการย่อยดีเอนเอภายนอกที่เข้ามาบุกรุกตัวมันได้ เอ็นไซม์จำพวกนี้ต้องอาศัย ATP, S-adenosyl-methionine และ Mg^{++} ในการย่อยดีเอนเอ และจะย่อยสุ่ม (randomly) บนเส้นดีเอนเอ จึงไม่เหมาะที่จะใช้สำหรับการสร้างดีเอนเอสายผสม

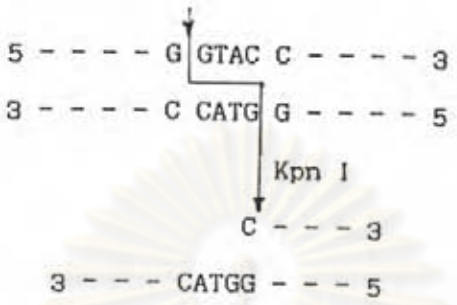
2. ชนิด II (Type II) เป็นเอ็นไซม์ที่ตัดจำเพาะตามลำดับของเบสในดีเอนเอ และอาศัย Mg^{++} เท่านั้นในการตัดดีเอนเอ (Smith et al., 1970) เนื่องจากมีความจำเพาะในการตัดดีเอนเอจึงเป็นประโยชน์มากต่อการศึกษาและการสร้างดีเอนเอสายผสม ปัจจุบันได้ค้นพบเอ็นไซม์จำพวกนี้กว่า 250 ชนิด (Roberts, 1982) ซึ่งสกัดจากแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ เช่น เอ็นไซม์ Eco RI เป็นเอ็นไซม์ Type II ที่สกัดได้จาก E. coli RY13 เป็นต้น

เอ็นไซม์ตัดจำเพาะมีความจำเพาะต่อลำดับของเบส 4 เบส หรือ 6 เบส ขึ้นกับชนิดของเอ็นไซม์นั้น ๆ และลักษณะการตัดแบ่งได้เป็น 3 ลักษณะ คือ

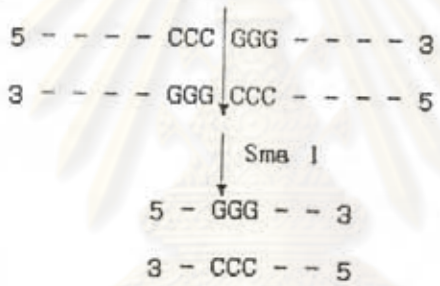
ก. ตัดจากปลาย 5 ทำให้ได้ปลายเหนียวทางปลาย 5 ตัวอย่างเอ็นไซม์พวกนี้ได้แก่ Eco RI, Hind III, Mbo I เป็นต้น



ข. ตัดจากปลาย 3 ทำให้ได้ปลายเหนียวทางด้าน 3 ตัวอย่างเอ็นไซม์พวกนี้ได้แก่ Pst I, Hha I, Kpn I เป็นต้น



ค. ตัดให้ปลายทู่ (blunt end) ตัวอย่างเอ็นไซม์จำพวกนี้ได้แก่ Hae III, Sma I เป็นต้น



3. ชนิด III (Type III) เป็นเอ็นไซม์จำพวกที่มีคุณสมบัติของทั้งชนิด I และชนิด II (Haberman, 1974) กล่าวคือเอ็นไซม์นี้จะจำเพาะต่อลำดับของเบสในดีเอนเอ แต่จะตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์นอกออกไปจากลำดับของเบสนั้น เอ็นไซม์จำพวกนี้พบใน bateriophage เช่น P 1 เป็นต้น

เอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในทางพันธุวิศวกรรมส่วนใหญ่เป็นชนิด II (Type II) ซึ่งจะตัดจำเพาะตามลำดับของเบสในดีเอนเอเส้นคู่ เมื่อนำเอาเอ็นไซม์นี้ไปตัดดีเอนเอที่มียีนที่ต้องการ และนำไปตัดพลาสมิดพาหะ ก็จะได้ปลายเหนียวเหมือนกัน ซึ่งเมื่อนำมาต่อกันปลายเหนียวนี้สามารถจับคู่กันได้ตามกฎเบสคู่สม (complementary base)

ปกติเอ็นไซม์เหล่านี้จะเสถียร (stable) ถ้าเก็บไว้ในที่ที่มีอุณหภูมิต่ำ ๆ ถึง -20 องศาเซลเซียส ในสภาพที่ไม่จับแข็ง (nonfrozen) ดังนั้นจึงมักจะเตรียมเอ็นไซม์เหล่านี้ในสารละลายที่มี 50% glycerol เพื่อช่วยให้สารละลายของเอ็นไซม์ไม่แข็งตัวที่อุณหภูมิต่ำ และยังช่วยรักษาประสิทธิภาพการทำงานของเอ็นไซม์ด้วย ขณะเดียวกันความเข้มข้นของ glycerol

015411

ที่มากกว่า 10% จะยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ได้ นอกจากนี้การทำงานของเอ็นไซม์แต่ละชนิดยังขึ้นกับสภาวะที่เหมาะสม คือ ความเข้มข้นของเกลือ และบัฟเฟอร์ ซึ่งสามารถจำแนกเป็น 4 ชนิดด้วยกัน คือ

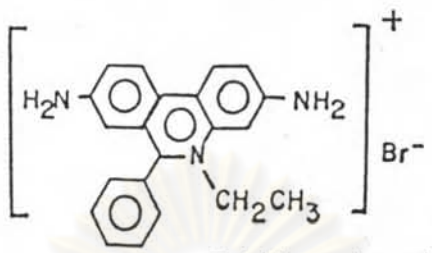
1. ต้องการเกลือมาก (high salt)
2. ต้องการเกลือปานกลาง (medium salt)
3. ต้องการเกลือน้อย (low salt)
4. ต้องการเกลือพิเศษ (specific salt)

ตารางที่ 2 แสดงส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ที่เอ็นไซม์ต้องการ

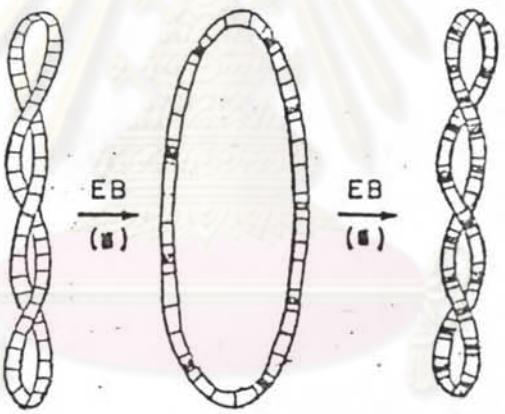
บัฟเฟอร์	NaCl (mM)	KCl (mM)	Tris-HCl pH 7.5 (mM)	$MgCl_2$ (mM)	DTT (mM)
high salt	100	-	50	10	1
medium salt	50	-	10	10	1
low salt	-	-	10	10	1
specific salt	-	20	10 (pH 8)	10	1

เอ็นไซม์ตัดจำเพาะจะตัดเส้นดีเอนเอให้เป็นชิ้นส่วนย่อย ๆ (DNA fragments) เมื่อเรานำชิ้นส่วนย่อย ๆ ของดีเอนเอเหล่านี้ไปวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis จะทำให้ได้รูปแบบของดีเอนเอ (DNA pattern) ที่มีลักษณะแตกต่างกันไป

การวิเคราะห์ดีเอนเอโดย agarose gel electrophoresis เป็นวิธีที่เหมาะและสะดวกที่สุดวิธีหนึ่ง เนื่องจากทำได้ง่าย สะดวก และกินเวลาไม่นานนัก นอกจากนี้ตำแหน่งของดีเอนเอ (DNA fragments) บน เจล จะวิเคราะห์ได้โดยการย้อมด้วยอีธีเดียมโบรไมด์ (Ethidium Bromide) ซึ่งจะสอดชั้น (intercalate DNA) เข้าไประหว่างเกลียวคู่ของดีเอนเอและเรืองแสงในช่วงคลื่นของอุลตราไวโอเลต (λ = 295 nm) ซึ่งสามารถอธิบายหลักการทำงานของอีธีเดียมโบรไมด์ได้ ดังรูปที่ 1



Ethidium bromide
(EB)



■ แทนโมเลกุลของอีธีเดียมโบรไมด์

รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างของอีธีเดียมโบรไมด์ และการเข้าสอดชั้นในดีเอนเอของอีธีเดียมโบรไมด์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อีธีเดียมโบรไมด์ (EB) เป็นสารประจุบวกที่สามารถสอดขั้นระหว่างชั้นของเบสที่อยู่เรียงกันเป็นชั้น ๆ คล้ายกับราวบันไดในโครงสร้างของดีเอนเอ และอาร์เอนเอ ในภาพ ก ดีเอนเอเกลียวซ้อนนี้มีเกลียวซ้อนที่เวียนขวา เมื่ออีธีเดียมโบรไมด์ มาสอดขั้นระหว่างชั้นของคู่เบสจะทำให้เกลียวซ้อนคลายออกกลายเป็นดีเอนเอเกลียวคู่ธรรมดา (ข) และหากยังมีอีธีเดียม-โบรไมด์ สอดขั้นเข้าในดีเอนเอเกลียวคู่ธรรมดานี้จะเกิดเกลียวซ้อนขึ้นมาอีก แต่จะเป็นเกลียวซ้อนเวียนซ้าย (ค)

การวิเคราะห์ดีเอนเอโดยอากาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส จะอาศัยคุณสมบัติของดีเอนเอที่เคลื่อนที่ในอากาโรสเจลเช่นเดียวกับการเคลื่อนที่ของโปรตีนใน polyacrylamide gel โดยขึ้นกับ

1. ขนาดของดีเอนเอ ดีเอนเอที่มีขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าขนาดเล็ก

2. รูปร่างของดีเอนเอ ดีเอนเอที่มีรูปร่างขดเป็นวงจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอนเอที่มีรูปร่างคล้ายเส้น

3. ความเข้มข้นของเจล ดีเอนเอจะเคลื่อนที่ในเจลที่มีความเข้มข้นสูง ๆ ได้ช้ากว่าในเจลที่มีความเข้มข้นต่ำ

4. กระแสไฟฟ้า และแรงเคลื่อนไฟฟ้า

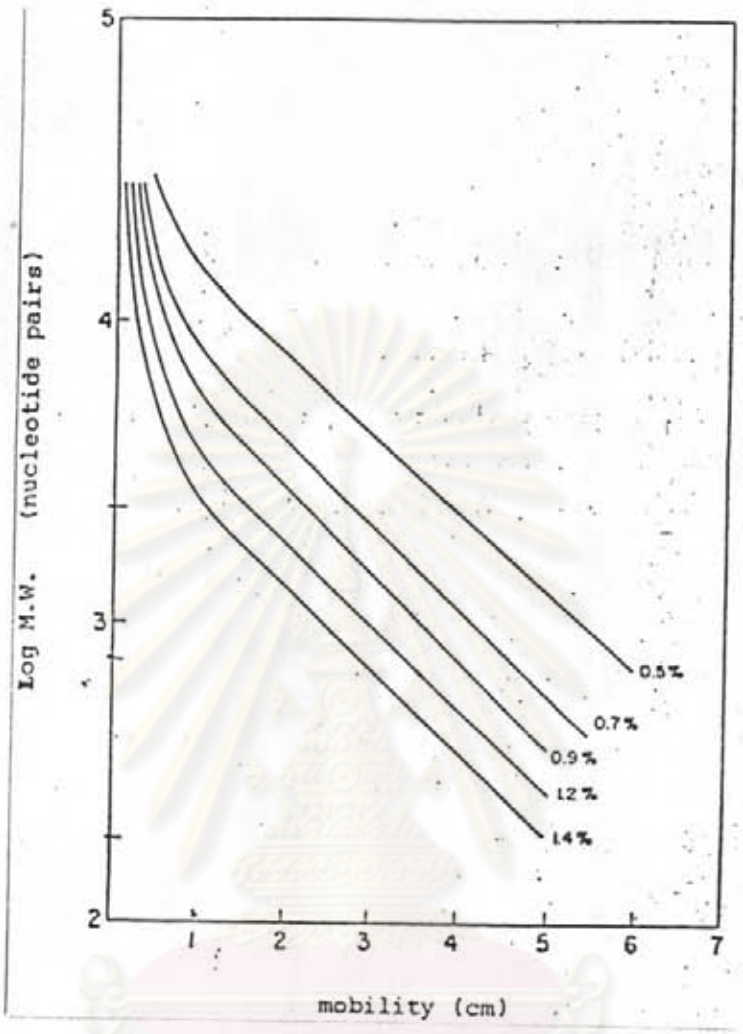
การเคลื่อนที่ของดีเอนเอในอากาโรสเจล (μ) และความเข้มข้นของอากาโรส (C) มีความสัมพันธ์ดังสมการ

$$\log u = \log \mu_o - K_r C$$

เมื่อ μ_o คือ การเคลื่อนที่ของดีเอนเอในสารละลายอิสระ

K_r คือ ค่าสัมประสิทธิต้านการเคลื่อนที่ ซึ่งเป็นค่าคงที่ของความสัมพันธ์

ในกรณีที่ agarose มีความเข้มข้นคงที่ จะพบว่า $\log_{10}$ ของน้ำหนักโมเลกุล หรือขนาดของดีเอนเอมีความสัมพันธ์ในลักษณะผกผันกับการเคลื่อนที่ (Helling et al., 1974) ดังแสดงในกราฟ



รูปที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของดีเอนเอ (log_{10} M.W.) กับการเคลื่อนที่ของดีเอนเอในอากาโรสเจล

จากกราฟนี้พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของดีเอนเอกับการเคลื่อนที่ในอากาโรสเจลจะเป็นเส้นตรง ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของอากาโรส เช่น ถ้าใช้อากาโรส 0.5 เปอร์เซนต์ ความสัมพันธ์ที่ได้จะเป็นเส้นตรงที่ขนาดของดีเอนเอ 2 ถึง 10 kb. ในขณะที่อากาโรสเข้มข้น 1.4 เปอร์เซนต์ จะให้ความสัมพันธ์เส้นตรงที่ 0.5 ถึง 3 kb. เป็นต้น

ตารางที่ 3 แสดงช่วงความสัมพันธ์เส้นตรงที่ความเข้มข้นของอากาโรสเจลต่าง ๆ กัน

เปอร์เซนต์ agarose gel	ช่วงความสัมพันธ์เส้นตรงของดีเอนเอ (kb)
0.3	60-5
0.6	20-1
0.7	10-0.8
0.9	7-0.5
1.2	6-0.4
1.5	4-0.2
2.0	3-0.1

ความสัมพันธ์ของดีเอนเอที่เคลื่อนที่ในอากาโรสที่กล่าวข้างต้นนี้เป็นความสัมพันธ์เมื่อดีเอนเอมีลักษณะคลายเป็นเส้น (linear DNA) ดังนั้น ค่า K_r จะขึ้นกับขนาดของดีเอนเอเท่านั้น

โดยปกติแล้วพลาสมิดดีเอนเอที่พบจะมีรูปร่างแตกต่างกัน 3 แบบ คือ

ขดเป็นวง (supercoiled DNA)

คลายเป็นวง (relaxed DNA)

คลายเป็นเส้น (linear DNA)

ความสัมพันธ์ของดีเอนเอที่เคลื่อนที่ในอากาโรสดังกล่าวจะใช้ได้เฉพาะรูปร่างที่คลายเป็นเส้นเท่านั้น

สำหรับบัฟเฟอร์ (buffer) ที่ใช้ในการทำอิเลคโตรโฟริซิสของดีเอนเอ จะใช้บัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 เช่น Tris-acetate buffer, Tris-phosphate และ Tris-borate บัฟเฟอร์ทั้ง 3 ชนิดนี้มีความแตกต่างกัน คือ

Tris-acetate buffer เป็นบัฟเฟอร์ที่มีความจุของบัฟเฟอร์ (buffer capacity) ต่ำที่สุด จึงต้องอาศัยการถ่ายเทหมุนเวียน (recirculation) ระหว่าง 2 ขั้วอยู่ตลอดเวลาในการวิเคราะห์ที่ใช้เวลานาน ๆ

Tris-borate buffer เป็นบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้กันมาก เนื่องจากกรด boric เป็นตัวที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของพวกจุลินทรีย์ จึงสามารถทำให้ใช้บัฟเฟอร์นี้ได้นาน ๆ

Tris-phosphate buffer จะใช้บัฟเฟอร์นี้ในกรณีที่จะนำเจลไปละลายโดยใช้ potassium iodide หรือ sodiumperchlorate

เมื่อแยกดีเอนเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยอากาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส แล้ว ดีเอนเอเหล่านี้จะถูกถ่ายเข้าสู่แผ่น nitrocellulose ด้วยวิธี Southern blot (Southern, 1975) แล้วจึงนำไปทำไฮบริไดเซชันกับดีเอนเอตรวจสอบ โดยปกติแล้วดีเอนเอตรวจสอบที่จะนำมาใช้ควรมีคุณสมบัติ ดังนี้ คือ

1. มีความจำเพาะสูง

2. มีขนาดเล็ก โดยเฉพาะโอลิโดนิวคลีโอไทด์ จะช่วยให้อัตราการเกิดไฮบริไดซ์เร็วขึ้น และมีความจำเพาะสูงขึ้น

3. มีความซ้ำ หรือมีจำนวนชุด (copies) มาก ๆ จะช่วยให้มีความไวในการตรวจตามได้ดี

4. มีความไวสูง จะทำให้ผลการวิเคราะห์ชัดเจน และรวดเร็ว ซึ่งอาจเพิ่มความไวได้โดยการติดฉลากดีเอนเอตรวจสอบให้ได้ประสิทธิภาพสูงมาก ๆ

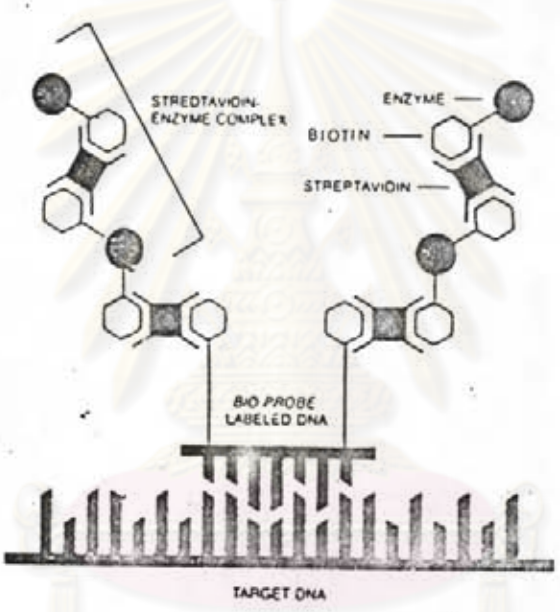
การติดฉลากดีเอนเอตรวจสอบเป็นขบวนการที่ใช้เพื่อให้สามารถติดตามวิเคราะห์ดีเอนเอเป้าหมายได้ ในปัจจุบันการติดฉลากสามารถใช้ได้ทั้งสารกัมมันตรังสี และสารเคมีที่ไม่ใช่สารรังสี อาทิเช่น biotin

สารรังสีที่สามารถใช้ติดฉลากดีเอนเอ ได้แก่ ^{32}P, ^{125}I, ^{3}H และ ^{35}S แต่ที่นิยมกันมากคือ ^{32}P เพราะเป็นรังสีที่มีพลังงานสูง ทำให้มีความไวในการตรวจตามสูง ^{32}P จะอยู่ในรูป dATP หรือ dCTP ในการเลือกใช้ deoxy ตัวใดขึ้นอยู่กับลำดับของเบสในดีเอนเอตรวจสอบนั้นว่ามี A/T มาก หรือ G/C มาก ทั้งนี้เพื่อเพิ่มความไวของดีเอนเอตรวจสอบนั้น ๆ แต่อย่างไรก็ตามจะต้องคำนึงถึงปฏิกิริยาที่จะใช้ในการติดฉลากด้วย เนื่องจาก dATP และ dCTP มีค่า K (อัตราการเกิดปฏิกิริยา) ที่แตกต่างกัน (Bryant et al., 1983)

เนื่องจากสารรังสีมีอันตรายสูง และต้องมีความระมัดระวังในขณะใช้เป็นพิเศษ ทำให้ไม่สะดวกในการปฏิบัติการ ปัจจุบันจึงหันมาใช้สารเคมีที่ไม่ใช่สารรังสีแทน เช่น การใช้อนุพันธ์ของ biotin จับต่อเข้ากับ dUTP ซึ่งการต่อสาร biotin เข้ากับ dUTP นั้น ความยาวของแขนต่อจะมีผลต่อความไว และเสถียรภาพในการตรวจตามด้วย

อนุพันธ์ที่นิยมกันมากในปัจจุบันคือ biotin-11-dUTP (Langer et al., 1981) ซึ่งมีความยาวของแขนต่อเป็นคาร์บอน 11 ตัว มีความไว และเสถียรภาพในการวิเคราะห์ดี หลักการของวิธีการนี้คือ biotin-11-dUTP จะถูกจับใส่แทนที่ไธมีนในดีเอนเอในปฏิกิริยาการ

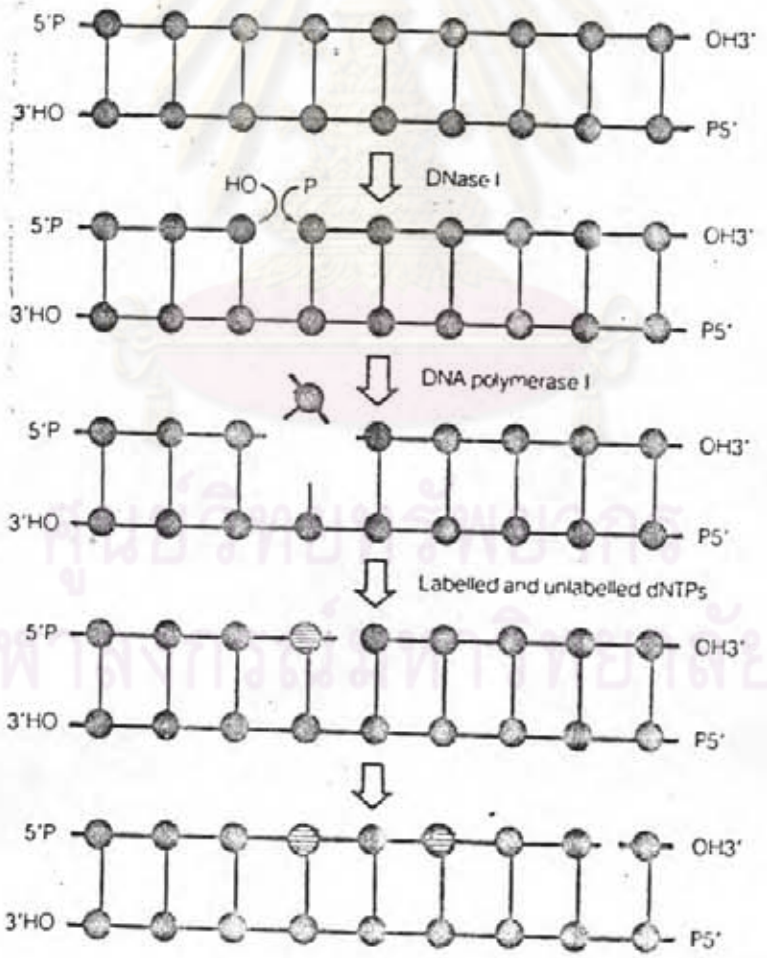
ติดฉลาก จากนั้นสามารถตรวจหาตัวฉลากที่เป็นสาร biotin ได้ โดยใช้ streptavidin ซึ่งต่ออยู่กับเอ็นไซม์ alkaline phosphatase หรือ peroxidase เมื่อเติมสับสเตรทที่เหมาะสมลงไปเอ็นไซม์จะย่อยโมเลกุลของสับสเตรทให้ผลผลิตที่มีสีสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ดังรูป



รูปที่ 3 แสดงปฏิกิริยาการตรวจพบ biotin โดย streptavidin เชื่อมกับเอ็นไซม์ที่เหมาะสม (Langer et al., 1981)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีติดฉลากดีเอนเอตรวจสอบ มีอยู่หลายวิธีที่นิยมใช้กันมาก คือ Nick translation และเป็นวิธีที่ใช้ในการทดลองนี้ ซึ่งเป็นการติดฉลากสายดีเอนเอโดยอาศัยการทำงานของเอ็นไซม์ 2 ชนิด คือ DNase I และ E. coli DNA polymerase I โดยที่เอ็นไซม์ DNase I จะทำลายพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ (phosphodiester bond) ที่เชื่อมระหว่างนิวคลีโอไทด์ในสายดีเอนเอทำให้สายดีเอนเอขาดเป็นจุด ๆ (nick point) กระจายไปตามบริเวณต่าง ๆ จากนั้นเอ็นไซม์ E. coli DNA polymerase I จะย่อยนิวคลีโอไทด์จากจุดที่ขาดไปในทิศทางจาก 5 ไปยัง 3 (5 -3 exonuclease activity) ติดตามด้วยการสร้างดีเอนเอสายใหม่ โดยการเติมนิวคลีโอไทด์เข้าไปในสายที่ถูกย่อยในทิศทาง 5 ไปยัง 3 เช่นกัน (5 -3 polymerase activity) การติดฉลากทำได้โดยใช้นิวคลีโอไทด์ตัวใดตัวหนึ่งติดฉลากสารกัมมันตรังสีที่ตำแหน่งแอลฟาของหมู่ฟอสเฟต [(α-^{32}P)-NTP] เติมเข้าไป วิธีนี้ดีเอนเอตั้งต้นจะเป็นดีเอนเอสายคู่ที่อยู่ในรูปวงกลม หรือเส้นตรงก็ได้ แผนผังขบวนการติดฉลากด้วยวิธีนี้ได้แสดงดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 แสดงขบวนการ Nick translation (Rigby et al., 1977)

การติดฉลากด้วยวิธี Nick translation นั้นเราสามารถติดตามการติดฉลากของดีเอนเอที่ใช้สารรังสีไอโซโทปเป็นเปอร์เซนต์ incorporate ในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาได้ โดยดูดสารละลายในปฏิกิริยามา 1 µl. วัดค่า count per minute (cpm) ของสารละลายนั้น ซึ่งจะถือค่านี้เป็น 100% incorporate จากนั้นที่เวลาต่าง ๆ กัน นำสารละลายในปฏิกิริยา 1 µl. หยดบนกระดาษกรองที่ชุ่มด้วย 10% TCA ซึ่งจะทำให้ดีเอนเอตกตะกอน เมื่อกรองส่วนที่เป็นสารรังสีไอโซโทปที่ไม่ได้เข้าไปติดฉลากในดีเอนเอออกด้วย 5% TCA และ 95% ethanol แล้วนำไปวัดค่า CPM ก็สามารถที่จะคำนวณเปอร์เซนต์ incorporate ได้

หลังจากที่ดีเอนเอถูกติดฉลากแล้วส่วนของรังสีที่ไม่ได้เข้าไปในเส้นดีเอนเอ จะถูกแยกออกจากเส้นดีเอนเอด้วยวิธี gel filtration column chromatography ซึ่งจะใช้ sephadex G-50 column ขนาด 5 ml. หรือ 1 ml. หรือจะใช้วิธี spun column ก็ได้ ซึ่งนิยมใช้กันมาก เพราะสะดวกรวดเร็ว ดีเอนเอซึ่งมีขนาดใหญ่จะผ่าน sephadex G-50 ออกมาที่ Void volume ส่วน free deoxynucleotide จะติดอยู่ใน column ดีเอนเอตรวจสอบที่ได้นี้พร้อมที่จะนำไปใช้ในการทำไฮบริไดเซชัน (hybridization)

nucleic acid hybridization เป็นขบวนการสำคัญที่ใช้ในการตรวจสอบสารพันธุกรรมด้วยตัวตรวจสอบ การไฮบริไดเซชั่นสามารถเกิดได้ทั้งในสภาวะที่ตัวตรวจสอบกับสารพันธุกรรมที่จะตรวจสอบต่างอยู่ในรูปของสารละลาย (solution hybridization) หรือตัวตรวจสอบละลายอยู่ในตัวทำละลาย แต่สารพันธุกรรมที่จะตรวจสอบตรึงติดกับแผ่นตัวค้ำจุนที่เป็นของแข็ง (filter hybridization) ขบวนการนี้เริ่มต้นจากการทำให้ทั้งตัวตรวจสอบและตัวที่ถูกตรวจสอบเสียสภาพธรรมชาติ (denature) กลายเป็นดีเอนเอ หรืออาร์เอนเอสายเดี่ยว แล้วนำมาผสมกันปล่อยให้มีการรวมตัวเป็นสายคู่ (reassociation) การไฮบริไดเซชันสามารถเกิดได้ระหว่างดีเอนเอกับดีเอนเอ ดีเอนเอกับอาร์เอนเอ และอาร์เอนเอกับอาร์เอนเอ

ปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลเกี่ยวข้องกับอัตราการรวมตัวของกรดนิวคลีอิค

1. อุณหภูมิ การรวมตัวของดีเอนเอสายเดี่ยวทั้งสองสายจะเกิดได้ดีที่อุณภูมิต่ำกว่าจุดแตกตัวของดีเอนเอสายคู่ (melting temperature, Tm) ประมาณ 25 องศาเซลเซียส

2. ความเข้มข้นของเกลือ เกลือจำพวกโมโนวาเลนท์แคทไอออน (monovalent cation) เช่น NaCl จะไปจับกับหมู่ฟอสเฟตของดีเอนเอสายเดี่ยว ทำให้มีสภาพเป็นกลางจะช่วยลดแรงผลักดันของดีเอนเอทั้งสองสายอันเนื่องมาจากประจุไฟฟ้า (electrostatic repulsion) มีผลทำให้อัตราการรวมตัวเป็นสายคู่ของดีเอนเอสายเดี่ยวเกิดได้ดีขึ้น

3. การเรียงลำดับเบสที่ผิดคู่กัน (base mismatch) การรวมตัวของดีเอนเอสายเดี่ยวเป็นสายคู่นั้นจะเกิดขึ้นดีหรือไม่ ขึ้นกับการเรียงลำดับเบสของดีเอนเอแต่ละสาย โดยจะต้องเข้าคู่แบบตรงกันข้ามกัน กล่าวคือ อะดีนีนจะจับกับไธมีน ขณะที่กัวอานีนจะจับกับไซโต

ซึน ถ้าดีเอนเอของทั้งสองสายมีการเรียงลำดับเบสที่ผิดคู่กันบางส่วน จะมีผลต่อการรวมตัวเป็นสายคู่ กล่าวคือทุก ๆ จำนวน 10 เปอร์เซนต์ของเบสที่ผิดคู่ จะมีผลให้อัตราคงที่การรวมตัวลดลง เท่ากับ 2

4. ความยาวของเส้นดีเอนเอ

4.1 ดีเอนเอกับดีเอนเอ ถ้าดีเอนเอสายเดี่ยวทั้งสองสายมีขนาดเท่ากัน อัตราการรวมตัวจะเป็นปฏิภาคตรงกับรากที่สอง (square root) ของความยาวของดีเอนเอภายใต้สภาวะมาตรฐาน แต่ถ้าดีเอนเอสายเดี่ยวทั้งสองสายนั้นมีขนาดต่างกัน อัตราเร็วของการรวมตัวขึ้นอยู่กับความยาวของดีเอนเอสายที่ยาวที่สุด อย่างไรก็ตามปรากฏการณ์นี้จะนำมาอธิบายได้ในกรณีที่การรวมตัวของดีเอนเอทั้งสองสายนั้นอยู่ในสารละลายทั้งคู่เท่านั้น ถ้าการรวมตัวเกิดขึ้นโดยดีเอนเอสายใดสายหนึ่งตรึงอยู่กับตัวค้ำจุนที่เป็นของแข็งแล้ว ยังไม่สามารถอธิบายผลของความยาวของดีเอนเอที่มีต่ออัตราการรวมตัวได้

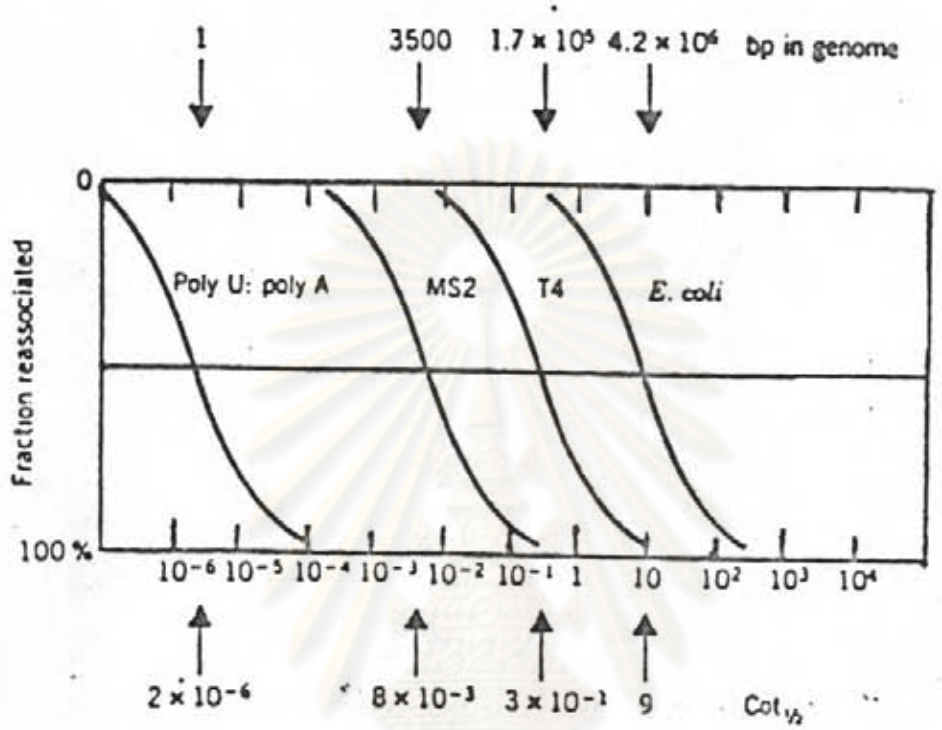
4.2 อาร์เอนเอกับดีเอนเอ อัตราเร็วของการรวมตัวของอาร์เอนเอสายเดี่ยวกับดีเอนเอสายเดี่ยวแตกต่างไปจากการรวมตัวระหว่างดีเอนเอกับดีเอนเอ ทั้งนี้เนื่องจากโครงสร้างของสายอาร์เอนเอมีบริเวณ random coil ที่เกิดจากการจับตัวกันเองภายในโมเลกุลมากกว่าสายดีเอนเอ ในสภาวะมาตรฐาน (0.18 M NaCl) ถ้าอาร์เอนเอเข้มข้นมากกว่าดีเอนเออัตราเร็วของการรวมตัวจะเหมือนดีเอนเอกับดีเอนเอ แต่ถ้าปริมาณของดีเอนเอมากกว่าอาร์เอนเอ จะมีผลให้อัตราการรวมตัวช้ากว่าดีเอนเอกับดีเอนเอ 4 ถึง 5 เท่า

[illegible] (complexity) [illegible] ทั้งหมด ในกรดนิวคลีอิคแต่ละชนิด ซึ่งจะมีค่าเท่ากับขนาดของจีโนม (genome size) ในกรณีที่กรดนิวคลีอิคสายนั้นไม่มีลำดับเบสที่เรียงตัวซ้ำกัน (sequence repetition) อัตราเร็วของการรวมตัวของดีเอนเอสายเดี่ยวให้เป็นสายคู่เป็นปฏิภาคกลับกับความซับซ้อนของกรดนิวคลีอิค ดังแสดงในรูปที่ 5

เสถียรภาพของกรดนิวคลีอิคสายคู่ (duplex)

หลังจากการรวมตัวเป็นสายคู่แล้ว เสถียรภาพของดีเอนเอสายคู่ หรือดีเอนเอ-อาร์เอนเอ หรือ อาร์เอนเอ-อาร์เอนเอ จะขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้คือ

1. base-pairing mismatch ดีเอนเอสายคู่ที่เกิดจากการรวมตัวของดีเอนเอ 2 สาย ที่มีลำดับเบสผิดคู่กัน จะมีเสถียรภาพต่ำกว่าดีเอนเอสายคู่ที่มีลำดับเบสเข้าคู่ถูกต้องทุกเบส โดยทั่วไปพบว่าดีเอนเอสายคู่ที่มีลำดับเบสผิดคู่กันทุก 1 เปอร์เซนต์ จะมีผลทำให้อุณหภูมิของจุดแตกตัว (Tm) ของสายคู่นั้นลดลง 1 องศาเซลเซียส



รูปที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราเร็วการรวมตัวของดีเอนเอสกุลต่าง ๆ กัน ที่มีความซับซ้อนแตกต่างกัน

2. ความยาวของสายดีเอนเอ มีผลต่อเสถียรภาพของดีเอนเอสายคู่ กล่าวคือ อุณหภูมิของจุดแตกตัวของดีเอนเอสายคู่จะลดลง เมื่อดีเอนเอสายคู่มีขนาดสั้นลง ดังสมการ

$$D = \frac{500}{L}$$

เมื่อให้ D = อุณหภูมิที่ลดลงของจุดแตกตัว

L = ความยาวของดีเอนเอสายคู่

3. ความเข้มข้นของเกลือ ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือต่ำ 0.01-0.1 โมลาร์ การเปลี่ยนความเข้มข้นของเกลือจะมีผลต่ออุณหภูมิของจุดแตกตัวของดีเอนเอสายคู่อย่างมาก โดยที่อุณหภูมิของจุดแตกตัวจะเปลี่ยนไปเท่ากับค่า 16.6 $\log_{10}$ เมื่อ M คือ ความเข้มข้นของเกลือโมโนวาเลนท์ (monovalent cation) แต่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงประมาณ 1 M ผลของความเข้มข้นของเกลือที่มีต่ออุณหภูมิของจุดแตกตัวจะลดน้อยลง เกลือจำพวกไดวาเลนท์ (divalent cation) เพียงเล็กน้อยจะมีผลต่ออุณหภูมิของจุดแตกตัวมากกว่าเกลือจำพวกโมโนวาเลนท์ ในทางปฏิบัติจึงต้องระมัดระวังในเรื่องการปนเปื้อนเกลือไดวาเลนท์ในสารละลายเป็นอย่างมาก

4. ชนิดของเบสที่เป็นองค์ประกอบของสายดีเอนเอ ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือปกติ (0.18 M NaCl) เบสคู่ที่เกิดจากการจับตัวของก้วอานีน (G) กับไซโตซีน (C) จะมีเสถียรภาพมากกว่าเบสคู่ที่เกิดจากการจับตัวของอะดีนีน (A) กับไธมีน (T) ดังนั้นอุณหภูมิของจุดแตกตัวของดีเอนเอสายคู่จึงขึ้นอยู่กับเปอร์เซนต์ของเบส G และ T ดังสมการ

$$Tm = 0.41\ (\%GC) + 69.3$$

5. ชนิดของกรดนิวคลีอิค เสถียรภาพของกรดนิวคลีอิคสายคู่นั้นต่างกัน ตามแต่ชนิดของกรดนิวคลีอิคสายเดี่ยวที่มารวมตัวกัน กล่าวคือ อาร์เอนเอกับอาร์เอนเอจะมีเสถียรภาพมากที่สุด อาร์เอนเอกับดีเอนเอจะมีเสถียรภาพรองลงมา ขณะที่ดีเอนเอกับดีเอนเอมีเสถียรภาพน้อยที่สุด (Britten และ Davison, 1985; Anderson และ Young, 1985)

filter hybridization

วิธีการทำ nucleic acid hybridization ที่นิยมใช้ในการปฏิบัติงานทางด้านพันธุวิศวกรรม โดยเฉพาะการตรวจสอบสารพันธุกรรม ได้แก่ filter hybridization โดยวิธีนี้สารพันธุกรรมที่ต้องการจะตรวจสอบจะถูกทำให้เสียสภาพแตกตัวเป็นสายเดี่ยวแล้วนำมาตรึงบนแผ่นตัวค้ำจุน ได้แก่ แผ่นไนโตรเซลลูโลส หรือแผ่นไนลอน แล้วนำมาแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีตัวตรวจสอบที่ทำให้เสียสภาพธรรมชาติเป็นสายเดี่ยวแล้วเช่นกันละลายอยู่ เก็บไว้ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม อันได้แก่ อุณหภูมิ และเวลาที่พอเหมาะ ตัวตรวจสอบสายเดี่ยวจะไฮบริไดซ์กับกรดนิวคลีอิคที่ต้องการตรวจสอบเกิดเป็นกรดนิวคลีอิคสายคู่

ปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับอัตราการเกิด filter hybridization

1. ความเข้มข้นของตัวตรวจสอบ

1.1 กรณีที่ตัวตครวจสอบเป็นดีเอนเอสายคู่ และมีความเข้มข้นมากเกินไปจะมีการรวมตัวระหว่างตัวตรวจสอบด้วยกันเองหลังจากทำให้เสียสภาพเป็นสายเดี่ยวแล้วเกิดขึ้น

มากกว่าที่จะไปรวมตัวกับดีเอนเอสายเดี่ยวที่ตรึงอยู่กับแผ่นตัวค้ำจุน

1.2 ตัวตรวจสอบเป็นสายเดี่ยวอยู่แล้วจะไม่มีปัญหาเกี่ยวกับการรวมตัวกันเองในสารละลาย ดังนั้นอัตราเร็วของการรวมตัวระหว่างตัวตรวจสอบกับดีเอนเอที่ตรึงบนแผ่นตัวค้ำจุนขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของตัวตรวจสอบ แต่ถ้าความเข้มข้นของตัวตรวจสอบมากเกินกำหนด (มากกว่า 100 ng/ml) จะเกิดการรวมตัวไม่จำเพาะระหว่างตัวตรวจสอบกับแผ่นตัวค้ำจุน

2. ความเข้มข้นของดีเอนเอตรวจสอบ ถ้าดีเอนเอที่ตรึงอยู่บนแผ่นตัวค้ำจุนมีความเข้มข้นต่ำ อัตราเร็วของการรวมตัวกับตัวตรวจสอบจะเป็นปฏิกิริยากลับกับความซับซ้อนของตัวตรวจสอบประมาณ 400 เท่า แต่ถ้าปริมาณของดีเอนเอที่ตรึงบนแผ่นตัวค้ำจุนมีความเข้มข้นสูง ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราเร็วของการรวมตัวจะขึ้นอยู่กับอัตราการแพร่ของตัวตรวจสอบไปยังแผ่นตัวค้ำจุน

3. น้ำหนักโมเลกุลของตัวตรวจสอบ ผลของน้ำหนักโมเลกุลของตัวตรวจสอบที่มีต่ออัตราการรวมตัว แบ่งได้เป็น 2 แบบ เช่นกัน คือ ในสภาวะที่กรดนิวคลีอิคตรึงบนแผ่นตัวค้ำจุนที่มีความเข้มข้นน้อย อัตราการไฮบริไดเซชันจะไม่ขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลของตัวตรวจสอบ ในสภาวะที่กรดนิวคลีอิคที่ตรึงบนแผ่นตัวค้ำจุนมีความเข้มข้นมาก อัตราการไฮบริไดเซชันจะเป็นปฏิภาคกลับกับน้ำหนักโมเลกุลของตัวตรวจสอบ

4. เบสที่เป็นองค์ประกอบ (base composition) อัตราเร็วของการรวมตัวเป็นกรดนิวคลีอิคสายคู่บนแผ่นตัวค้ำจุนขึ้นอยู่กับเปอร์เซนต์ GC เช่นเดียวกับใน solution ปฏิกิริยาการไฮบริไดเซชันในสภาพสารละลาย (solution hybridization)

5. อุณหภูมิ เช่นเดียวกับในกรณีของ solution hybridization อัตรการรวมตัวเป็นดีเอนเอสายคู่จะเกิดได้ดีที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดแตกตัวประมาณ 20-25 องศาเซลเซียส และดีเอนเอสายคู่ที่ตรึงกับแผ่นตัวค้ำจุนนี้จะแตกตัวออกจากกันที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดแตกตัวประมาณ 5 องศาเซลเซียส ส่วนการรวมตัวระหว่างอาร์เอนเอกับดีเอนเอจะเกิดได้ดีที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดแตกตัวประมาณ 10-15 องศาเซลเซียส

6. formamide formamide ทำหน้าที่เป็นตัวลดอุณหภูมิของจุดแตกตัวของกรดนิวคลีอิค โดยทั่วไปความเข้มข้นของ formamide ที่เพิ่มขึ้นทุก ๆ 1 เปอร์เซนต์ มีผลทำให้อุณหภูมิลดลง 0.65 องศาเซลเซียส ดังนั้นใน hybridization buffer จะมี formamide เป็นองค์ประกอบประมาณ 30-50 เปอร์เซนต์ จะมีผลให้อุณหภูมิที่ใช้ในการรวมตัวมีค่าลดลง 30-42 องศาเซลเซียส จากอุณหภูมิที่เป็นจุดแตกตัว ซึ่งจะทำให้เสถียรภาพของตัวตรวจสอบดีขึ้นกว่าเมื่ออยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีอุณหภูมิสูง

7. ความแรงของอิออน (ionic strength) ใน hybridization buffer ที่มีค่าความแรงของอิออน ต่ำจะมีผลให้อัตราการรวมตัวเป็นกรดนิวคลีอิคสายคู่ช้าลงด้วย ใน

ทำนองกลับกันการรวมตัวของกรดนิวคลีอิคจะเกิดเร็วขึ้นเมื่อเพิ่มความแรงของอิออน

ในสภาวะที่สารละลายบัฟเฟอร์มีโซเดียมคลอไรด์เป็นองค์ประกอบน้อยกว่า 0.1 M Na ถ้าเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 2 เท่า จะมีผลให้อัตราการรวมตัวเกิดเร็วกว่าเดิม 10 เท่า ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงมากตั้งแต่ 1.5 M ขึ้นไป แต่เกลือที่มีความเข้มข้นสูงจะมีผลทำให้กรดนิวคลีอิคสายคู่ที่มีการจับกันระหว่างเบสที่ผิดคู่กันนั้นมีเสถียรภาพมากขึ้น

8. dextran sulfate dextran sulfate เป็นสารประกอบจำพวกโพลีเมอร์ที่มีคุณสมบัติทำให้อัตราการรวมตัวของกรดนิวคลีอิคเกิดได้เร็วขึ้น เช่น ในสภาวะที่มี dextran sulfate 10 เปอร์เซนต์ จะเพิ่มอัตราการรวมตัวได้ 10 เท่า

9. base mismatch ผลของการจับคู่ที่ผิดคู่กันจะมีผลให้อัตราการรวมตัวของกรดนิวคลีอิคเกิดได้ช้าลง และทำให้อุณหภูมิที่จุดแตกตัวต่ำลงด้วย โดยอัตราการรวมตัวจะลดลง 2 ส่วน ต่อทุก ๆ 10 เปอร์เซนต์ของจำนวนเบสที่ผิดคู่ในระหว่างตัวตรวจสอบกับกรดนิวคลีอิคที่ตรึงบนแผ่นตัวค้ำจุน ที่อุณหภูมิ Tm -25 องศาเซลเซียส

10. ความหนืด (viscosity) ความหนืดของสารละลายบัฟเฟอร์มีผลต่ออัตราการรวมตัวของกรดนิวคลีอิค กล่าวคือ ถ้าความหนืดของสารละลายเพิ่มขึ้นจะมีผลให้อัตราการรวมตัวของกรดนิวคลีอิคสายคู่ลดลง

11. สภาพความเป็นกรด-ด่างของบัฟเฟอร์ ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานผลของสภาพความเป็นกรด-ด่างของสารละลายว่ามีผลต่ออัตราการรวมตัวของกรดนิวคลีอิค พบว่าสารละลายที่มีความเข้มข้นของเกลือ 0.4 M สภาพความเป็นกรด-ด่างของสารละลายไม่มีผลกระทบใด ๆ ทั้งสิ้นต่ออัตราเร็วของการรวมตัวของกรดนิวคลีอิคสายคู่บนแผ่นตัวค้ำจุน ในทางปฏิบัติการรวมตัวของกรดนิวคลีอิคสายคู่มักจะทำในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีสภาพความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 6.8-7.4 (Flavell et al., 1974)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย