

คำนำ

การปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์แต่ละครั้ง สิ่งที่ผู้ปฏิบัติงานไม่อยากจะเกิดขึ้น นั่นคือ “ปัญหา” ไม่ว่าจะเป็นปัญหาในระหว่างการทำงาน หรือปัญหาที่ตามมาแล้วผลปฏิบัติงานไม่ดี เมื่อเจอปัญหาเราต้องหาสาเหตุของปัญหานั้นๆ ซึ่งแต่ละคนจะใช้เวลาในการแก้ไขปัญหาช้าหรือเร็ว แตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับประสบการณ์การทำงาน ในระหว่างที่แก้ไขปัญหา ทำให้เราสูญเสียทั้งวัสดุ อุปกรณ์ เวลา รวมถึงแรงงาน และที่แย่ไปกว่านั้น คือ หากเราไม่สามารถแก้ไขปัญหาเหล่านั้นได้ ปัญหาเหล่านั้นก็จะนำมาซึ่งความท้อแท้ สูญเสียกำลังใจ ความมั่นใจในการทำงาน

เทคนิค Gel electrophoresis เป็นเทคนิคหนึ่งที่ผู้ปฏิบัติงานส่วนใหญ่พบเจอปัญหาในรูปแบบที่แตกต่างกันออกไป แม้เทคนิคนี้มีขั้นตอนไม่ยุ่งยากซับซ้อน แต่ในแต่ละขั้นตอนนั้นเมื่อเราลงมือปฏิบัติแล้วจะพบว่า มีหลายๆจุดที่เป็น Critical point ของขั้นตอน ซึ่งเราต้องหาวิธี เพื่อลดหรือแก้ไขปัญหา ที่อาจเกิดขึ้นในแต่ละขั้นตอนออกไป เช่น ในขั้นตอนการเตรียมเจล เจลหลอมละลายดีแล้วหรือไม่ เทเจลอย่างไรให้ผิวหน้าเจลเรียบ ไม่เป็นคลื่น ไม่เป็นฟองอากาศ หรือการดึงหัวขึ้นจากเจลไม่ให้เจลฉีกขาด เป็นต้น นอกจากนี้สารเคมีบางชนิดยังก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงาน ซึ่งผู้ปฏิบัติงานจำเป็นต้องรู้ถึงระดับความอันตรายของสารแต่ละชนิดที่ใช้ รวมถึงข้อควรระวัง เพื่อป้องกันอันตรายแก่ตนเอง และผู้อื่น

คู่มือ “เทคนิคพิชิต Gel electrophoresis” ฉบับเด็กใหม่ เล่มนี้ จัดทำขึ้นเพื่อช่วยชี้แนวทางแก้ไขปัญหาที่จะเกิดขึ้นในแต่ละขั้นตอนของการทำ Gel electrophoresis ซึ่งได้รวบรวมปัญหา และแนวทางการแก้ไขปัญหา จากประสบการณ์ของผู้ปฏิบัติงานจริง ที่ได้ประสบกับปัญหาเหล่านั้น แล้วได้รับคำแนะนำจากพี่นักวิจัยจนสามารถแก้ไขปัญหาที่ต่างๆที่เกิดขึ้นได้

ทางคณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่า คู่มือ “เทคนิคพิชิต Gel electrophoresis” ฉบับเด็กใหม่ เล่มนี้ จะให้ความรู้ และเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่เข้ามาปฏิบัติงานใหม่ หรือผู้ที่ต้องปฏิบัติงานโดยใช้เทคนิค Gel electrophoresis ได้ทำการศึกษาวิธีการ และเมื่อพบเจอปัญหาสามารถใช้คู่มือเล่มนี้แก้ไขปัญหาที่พบได้ เพื่อให้ได้ผลการปฏิบัติงานตรงตามเป้าหมายสูงสุด

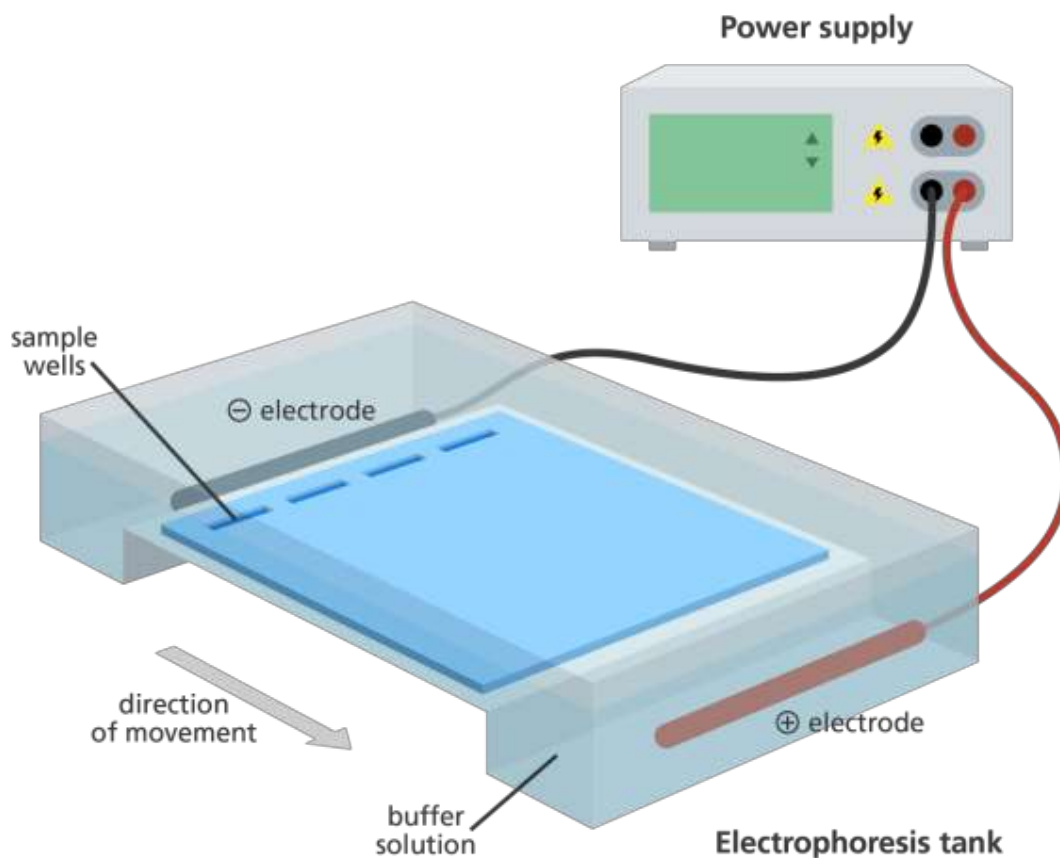
บทนำ

Introduction of Gel Electrophoresis

เมื่อนักวิทยาศาสตร์สามารถโคลนดีเอ็นเอ หรือแยกดีเอ็นเอต่างๆได้แล้ว
มีคำถามที่ตามมา คือ

- DNA ที่ได้นั้นคืออะไร?
- ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์อะไรบ้าง?

เราจะตอบคำถามเหล่านี้ได้ ต้องมีการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA analysis) ซึ่งการวิเคราะห์นี้ต้องอาศัยความรู้พื้นฐานการแยกโมเลกุลของดีเอ็นเอที่มีประจุ และรูปร่างแตกต่างกันออกจากกันในสนามไฟฟ้าผ่านตัวกลาง เรียกว่า เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel electrophoresis)



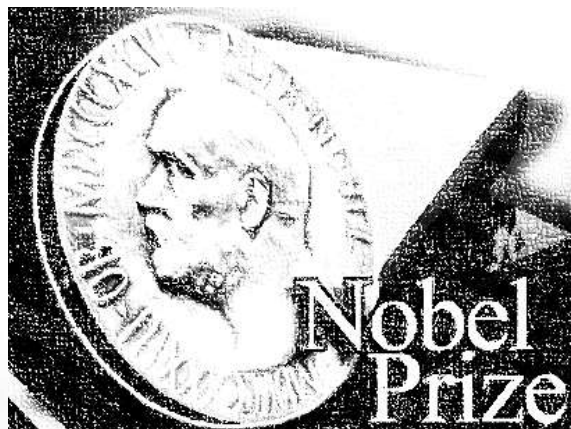
รูปที่ 1. เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Gel electrophoresis)

(ที่มา: <http://www.yourgenome.org/facts/what-is-gel-electrophoresis>)

Arne Tiselius



Arne Wilhelm Kaurin Tiselius หรือ Arne Tiselius นักวิทยาศาสตร์ชาวสวีเดน ผู้คิดค้นเทคนิค electrophoresis ขึ้น ในปี ค.ศ.1930 โดยการแยกโปรตีนจากซีรัม ได้สร้างอุปกรณ์พิเศษซึ่งมีลักษณะเป็นรูปตัวยู (U- shaped cell) ที่สามารถต่อเข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า ทำให้เขาสามารถแยก และวิเคราะห์โปรตีนต่างๆจากซีรัมได้ ทำให้เขาได้รับรางวัลโนเบล ในปี ค.ศ.1948 เทคนิค electrophoresis เป็นที่นิยมกันอย่างแพร่หลายในเวลาต่อมา และได้ดัดแปลงให้มีความเหมาะสม กับคุณสมบัติของสารที่ต้องการแยกและวิเคราะห์



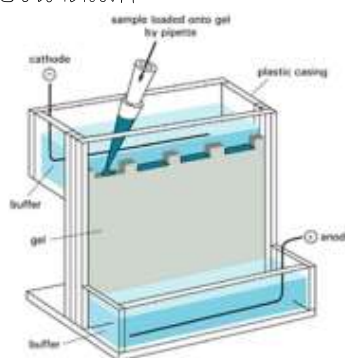
Gel Electrophoresis

คือ เทคนิคที่ใช้แยกสารพวกโปรตีน กรดนิวคลีอิก หรือ macromolecule โดยอาศัยหลักการเคลื่อนที่ของสารบนเจลภายใต้สนามไฟฟ้า

การจำแนกชนิดของอิเล็กโทรโฟรีซิส

1. การรันเจลในแนวตั้ง (Vertical gel electrophoresis)

นิยมใช้แยกโปรตีน และดีเอ็นเอขนาดเล็ก

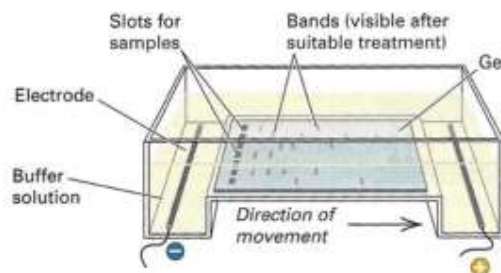


รูปที่ 2. ลักษณะการ run gel ในแนวตั้ง (Vertical gel electrophoresis)

(ที่มา: <http://www.coloss.org/beebook/I/physiology/1/3/2>)

2. การรันเจลในแนวนอน (Horizontal gel electrophoresis)

นิยมใช้ในการแยกดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ



รูปที่ 3. ลักษณะการ run gel ในแนวนอน (Horizontal gel electrophoresis)

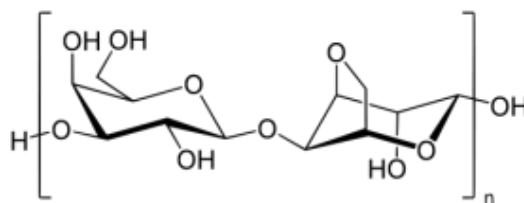
(ที่มา: <http://www.stinciclab.com/gel/>)

“เทคนิค Horizontal Gel Electrophoresis ใช้กันมากในศูนย์ CBMB ซึ่งเราอธิบายเทคนิคนี้ให้เข้าใจมากขึ้นในคู่มือเล่มนี้”

ชนิดของเจล

มี 2 ชนิด คือ

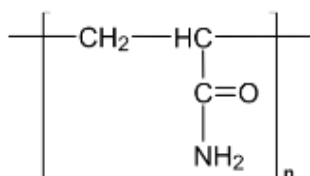
1. Agarose gel โดยทั่วไปการแยกโมเลกุลของดีเอ็นเอจะใช้ Agarose gel เป็นส่วนใหญ่ เพราะมีช่วงที่ใช้ได้มากกว่า การเตรียมทำได้ง่าย และไม่มีอันตรายเมื่อเทียบกับ Polyacrylamide



รูปที่ 4. โครงสร้างของ Agarose

(ที่มา: <https://en.wikipedia.org/wiki/Agarose>)

2. Polyacrylamide gel เป็นโมเลกุลที่สังเคราะห์ขึ้นทางเคมี จึงมีความสม่ำเสมอควบคุมได้ ไม่ทำปฏิกิริยากับสารเคมีใด มีความใส มีความคงตัวของ pH อุณหภูมิ และมี ionic strength กว้าง สามารถปรับขนาดของช่องในโพลีเมอร์ได้ จึงเหมาะสำหรับเป็นตัวกลางในการแยกโมเลกุลของโปรตีน และดีเอ็นเอ



รูปที่ 5. โครงสร้างของ Polyacrylamide

(ที่มา: <https://en.wikipedia.org/wiki/Polyacrylamide>)

อุปกรณ์ป้องกันส่วนบุคคล

(Personal Protective Equipment, PPE)

เป็นสิ่งที่สำคัญสำหรับป้องกันผู้สวมใส่จากอันตรายที่เกิดจากการปฏิบัติการ พึงระลึกเสมอว่าอุปกรณ์เหล่านี้ไม่ได้ช่วยลด หรือกำจัดความเป็นอันตรายของสารเคมีแต่อย่างใดเพียงแค่ทำหน้าที่ป้องกันผู้สวมใส่เท่านั้น

This is the
required P.P.E.
for this laboratory!!!



Hair net Protection

Eye Protection

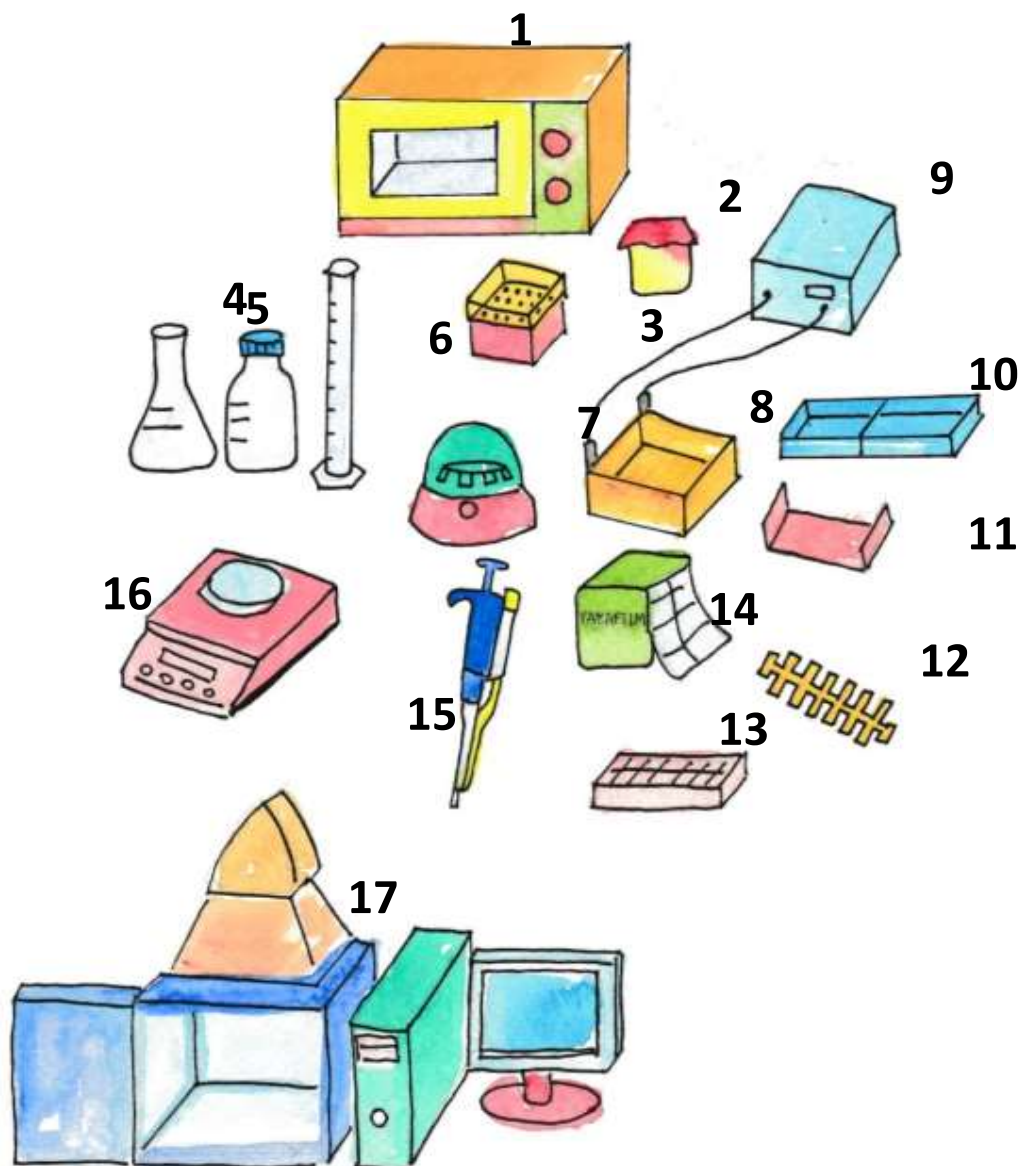
Respiratory Protection

Protective Clothing

Protective Gloves

Foot Protection

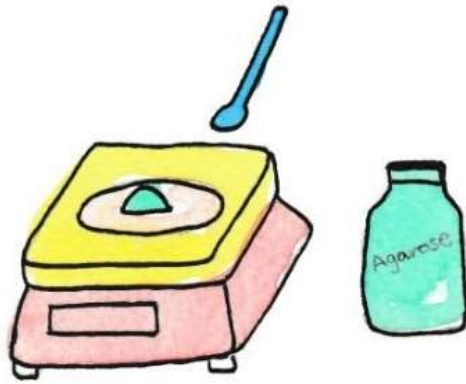
อุปกรณ์ Equipment



- 1 = Microwave
- 2 = Waste tank
- 3 = Pipette tip
- 4 = Flask
- 5 = Bottle
- 6 = Cylinder
- 7 = Centrifuge
- 8 = Gel box

- 9 = Power supply
- 10 = Gel Casting Stand
- 11 = Gel Tray
- 12 = Comb
- 13 = Rack
- 14 = Parafilm
- 15 = Micropipette
- 16 = Precision balance
- 17 = Gel documentation

การเตรียมเจล (Casting of Gel)



ชั่งอะกาโรสบนกระดาษชั่งสาร
ตามปริมาตรที่ต้องการเตรียม เทลงในขวดดูแอรน



แล้วเติมบัฟเฟอร์ลงไป ผสมให้เข้ากัน

Tips&Tricks

- ถ้าชั่งอะกาโรสเกิน???
 - จะทำการคำนวณแล้วเตรียมทั้งหมดที่ชั่งได้ เช่น ต้องการ 2 g. แต่ชั่งจริงได้ 2.2 g. ก็จะเตรียม 2.2 g. เลย
 - หรือตักส่วนเกินนั้นทิ้ง
 - จะไม่ตักคืนในขวดเดิม
 - ดังนั้น ต้องค่อยๆตักออกมาทีละนิดเพื่อไม่ให้ น้ำหนักเกิน
- ถ้าเทบัฟเฟอร์เกิน???
 - เทคืนในขวดเดิมได้

การเตรียมเจล

เจลแผ่นใหญ่ จะใช้ 30 mL/tray
(เตรียมเพื่อเป็น 35 mL)

เจลแผ่นเล็ก จะใช้ 15 mL/tray
(เตรียมเพื่อเป็น 20 mL)

Ex. เตรียมเจลแผ่นใหญ่ 1% agarose
ใน TBE buffer ปริมาตร 35 ml
จะต้องชั่ง agarose = $\frac{35 \text{ ml} \times 1}{100}$
= 0.35 g หรือ 35 mg



นำสารละลายเจลไปต้มในไมโครเวฟ
ที่ไฟปานกลาง (300 วัตต์)

จนสารละลายใส ไม่มีเมล็ดวุ้น

ต้องคลายเกลียวฝาขวดทุกครั้ง

ก่อนนำเข้าไมโครเวฟ

เพื่อปล่อยแรงดันภายในขวดออกมา

มิฉะนั้นขวดอาจจะ.....ระเบิด ได้จ้า...



ระหว่างที่หลอมละลายในไมโครเวฟ

สามารถหยุดเป็นระยะๆ แล้วนำขวดออกมาแกว่ง

เพื่อให้สารละลายเข้ากันได้ดีมากขึ้น จากนั้น

นำกลับเข้าไปละลายต่อจนสารละลายใส

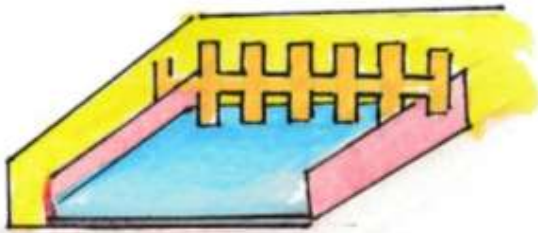
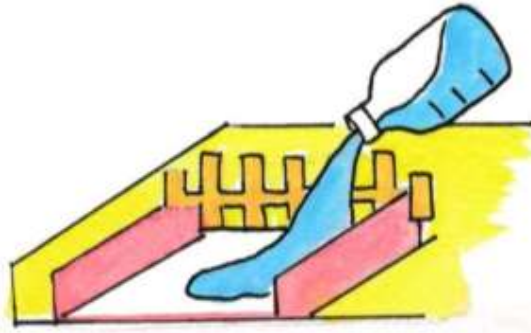
Tips&Tricks

➤ ต้มสารละลายเจลให้ใส
ไม่มีเมล็ดวุ้น

➤ ต้องคลายเกลียวฝาขวด
ก่อนนำเข้าไมโครเวฟ

อุณหภูมิของเจล ก่อนจะเทลงในถาดเจล

ควรอยู่ที่ประมาณ $55-60^{\circ}\text{C}$ หรือพอที่มือเราสามารถจับได้



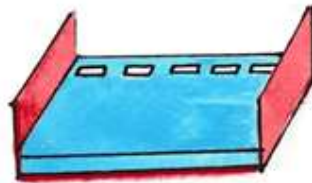
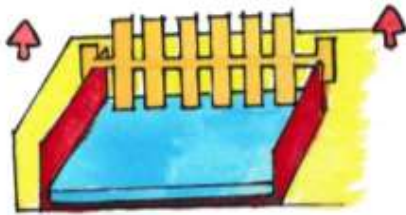
เทเจลที่เตรียมไว้อย่างช้าๆ ลงในถาดเจลที่เตรียมไว้ ค่อยๆ ให้เจลไหลไปทั่วถาด แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นานประมาณ 20-30 นาที หรือจนกว่าเจลจะแข็งตัว

Tips&Tricks

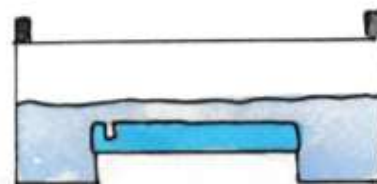
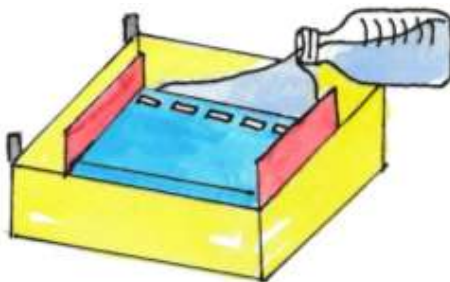
➤ ขณะเทเจลให้สังเกตว่ามีฟองอากาศเกิดขึ้นหรือไม่ ???

- ถ้ามีฟองอากาศให้รีบใช้ปลายทึบจิ้มฟองให้แตกขณะเจลยังร้อนอยู่

ขั้นตอนการโหลดตัวอย่าง (Loading of sample)



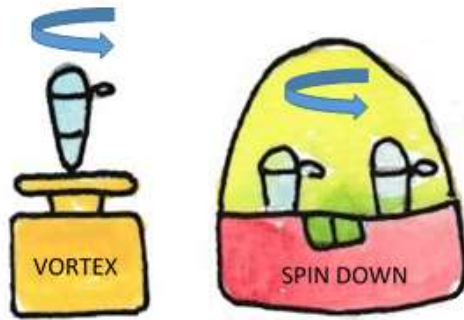
ดึงหรือออกจากเจลขึ้นตรงๆ ค่อยๆ ไม่ให้เจลขาด



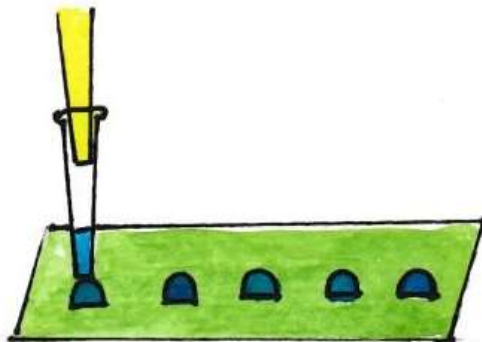
นำเจลวางลงบนบล็อกรันเจล โดยให้ส่วนที่ใส่ตัวอย่าง
อยู่ทางซ้ายลบบจากนั้นเทบัฟเฟอร์ให้ท่วมเจลขึ้นมาเล็กน้อย

Tips&Tricks

- หากดึงหรือออกแล้วเจลขาด ??
 - นำเจลไปต้มแล้วนำกลับมาใช้ใหม่ได้
- ในขณะที่ดึงหรือออกแล้วรู้สึกว่าแน่น กลัวเจลขาด??
 - สามารถเทบัฟเฟอร์ลงไปบนเจล เพื่อให้ดึงหรือวางขึ้น



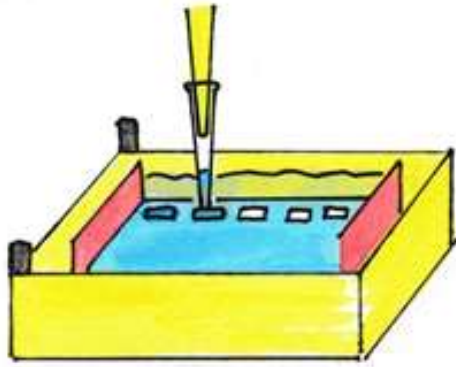
นำตัวอย่างที่ต้องการรีนเจล
มาปั่นผสมเพื่อให้ตัวอย่างผสมเข้ากันดี และนำไป
ปั่นตกอีกครั้ง เพื่อไม่ให้มีตัวอย่างเหลือติดข้างหลอด



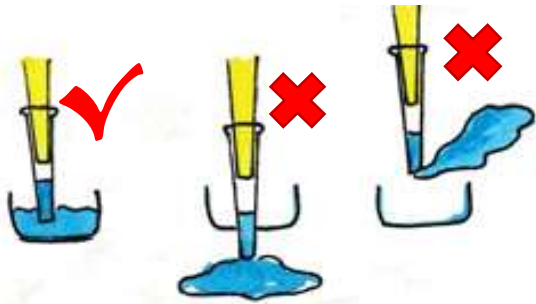
ผสม loading dye ที่หยดไว้บนพาราฟิล์มกับตัวอย่างให้เข้ากัน

Tips&Tricks

- ควรหยด loading dye ให้มีระยะห่าง เพื่อไม่ให้มีพื้นที่ในการผสมกับตัวอย่าง
- ขณะดูดผสม loading dye กับตัวอย่าง ให้ปิเปตขึ้นลงอย่างช้าๆ ระวังไม่ให้เกิดฟอง



ปล่อยตัวอย่างลงในหลุมเจลแต่ละหลุมที่เตรียมไว้



การโหลดตัวอย่าง

ค่อยๆ ปล่อยตัวอย่าง ลงในหลุมอย่างช้าๆ

เพื่อไม่ให้มีการฟุ้งกระจายของตัวอย่าง

จะทำให้เสียตัวอย่างนั้นไป ไม่มีผลของตัวอย่างนั้น

หรือผลที่ได้ไม่สมบูรณ์

Tips&Tricks

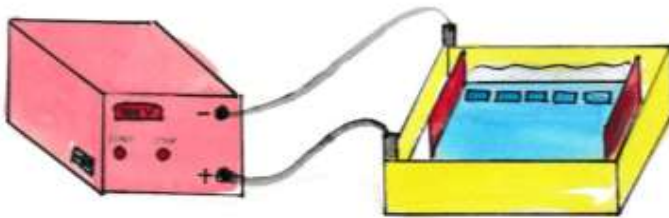
➤ มือสั่นอาจทำให้ตัวอย่างไม่
ลงหลุมเกิดการฟุ้งกระจาย
ของตัวอย่าง

- สามารถใช้มืออีกข้าง
ประคองปิเปตให้หนึ่ง
และไม่ควรใส่ปลายทิว
ลงในหลุมลึกจนเกินไป
เพราะจะทำให้เจลขาด
- ห้ามปล่อยตัวอย่าง
ถ้าปลายทิวยังไม่เข้าไปใน
หลุม เพราะจะทำให้
ตัวอย่างฟุ้งกระจายไปใน
บัฟเฟอร์

การรันเจล (Gel Electrophoresis)

เมื่อใส่ตัวอย่างครบทุกหลุมแล้วก็กดปุ่มสตาร์ทได้!

Let's go!!

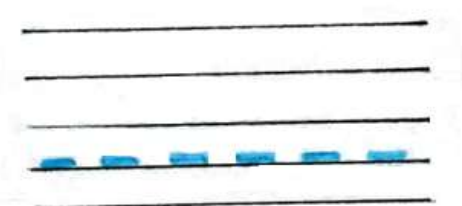
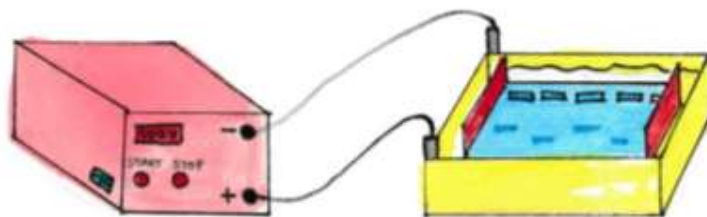


ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้แยกขนาดดีเอ็นเอคือ 100 V
เวลาที่ใช้ในการเคลื่อนตัวของดีเอ็นเอขึ้นอยู่กับ
เปอร์เซ็นต์เจล แต่จะใช้เวลาโดยประมาณ 40-45 นาที

ติ๊กตอก ติ๊กตอก ติ๊กตอก !!



สังเกตว่ามีการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอหรือไม่!!
โดยดูจากสีของ loading dye ว่ามีการเคลื่อนที่หรือไม่!!



เมื่อดีเอ็นเอเคลื่อนที่
มาถึงบริเวณที่ต้องการแล้ว
ให้กด “หยุด” ที่เพาเวอร์ซัพพลาย

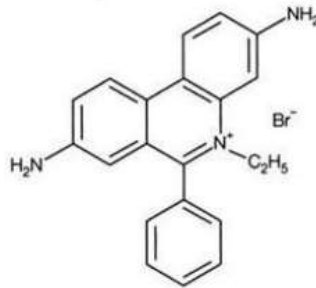
ระวัง อย่าให้ดีเอ็นเอตากเจลนะจ๊ะ!!

Tips&Tricks

- เลียบขั้วไฟฟ้าให้ตรงตามขั้ว
ขั้วสีดำต่อเข้ากับช่องสีดำ
ขั้วสีแดงต่อเข้ากับขั้วสีแดง
- ดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่จากขั้ว
ลบไปยังขั้วบวก (บนลงล่าง)
หากเลียบขั้วไฟฟ้าสลับกัน
จะทำให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ไป
ด้านบนจนตกเจล
ทำให้ไม่สามารถอ่านผลได้

การย้อมและการถ่ายภาพเจล (Staining and visualization)

การย้อมเจลส่วนใหญ่จะใช้สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide, EtBr) ซึ่งเมื่อนำเจลไปแช่ในสารละลาย EtBr แล้วนำไปส่องด้วยแสง UV จะเห็นแถบ DNA ขนาดต่างๆ เพราะ EtBr ที่จับกับ DNA จะเรืองแสง ทำให้มองเห็นได้ชัดเจน



รูปโครงสร้างของเอธิเดียมโบรไมด์

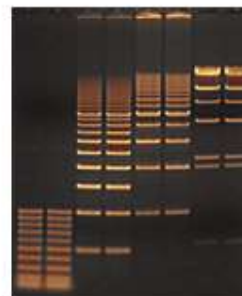
(ที่มา: <https://www.slideshare.net/MetheeSri/mutation-and-dna-repair>)

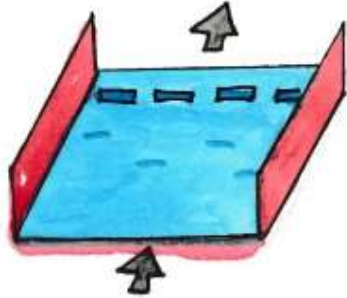
EtBr มีผลกระทบต่อสุขภาพ

ในระยะสั้น คือ สามารถซึมเข้าทางผิวหนัง และเกิดการระคายเคืองต่อผิวหนัง ตา ปาก รวมถึงระบบทางเดินหายใจส่วนบน

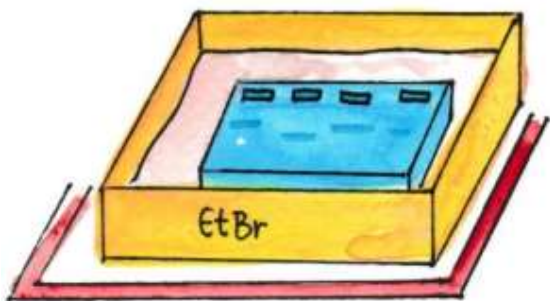
ในระยะยาว เป็นสารที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutagen) ที่รุนแรง และเป็นสารก่อมะเร็ง

ดังนั้นต้องระมัดระวังการสัมผัสกับ EtBr โดยตรง ต้องสวมใส่อุปกรณ์ป้องกันอันตรายส่วนบุคคล ได้แก่ เสื้อกาวน์ รองเท้าปิดเท้า แวนตานิรภัย ถุงมือ nitrile หรือถุงมือพลาสติก ไม่ควรใช้ถุงมือยางธรรมดา ถ้าสัมผัส EtBr ความเข้มข้นสูงนานๆ จะต้องสวมถุงมือสองชั้น เมื่อปฏิบัติงานเสร็จแล้วให้ถอดถุงมือออกก่อนจากนั้นจึงล้างมือให้สะอาด





ดันเจลออกจากถาดรองเจล



แช่เจลลงในสารละลาย EtBr นาน 2 นาที

Tips & Tricks

- ขณะเทแผ่นเจลลง
ถาดรองเจล
ต้องระวังไม่ให้
ถาดรองเจล สัมผัส
กับสารละลาย EtBr
- ขณะที่กำลังย้อมเจล
สามารถเอียงถาด
สารละลาย EtBr ไปมา
เพื่อให้ EtBr ติดกับ
ดีเอ็นเอที่อยู่ภายในเจลได้
อย่างทั่วถึง

การเตรียม Working Ethidium bromide

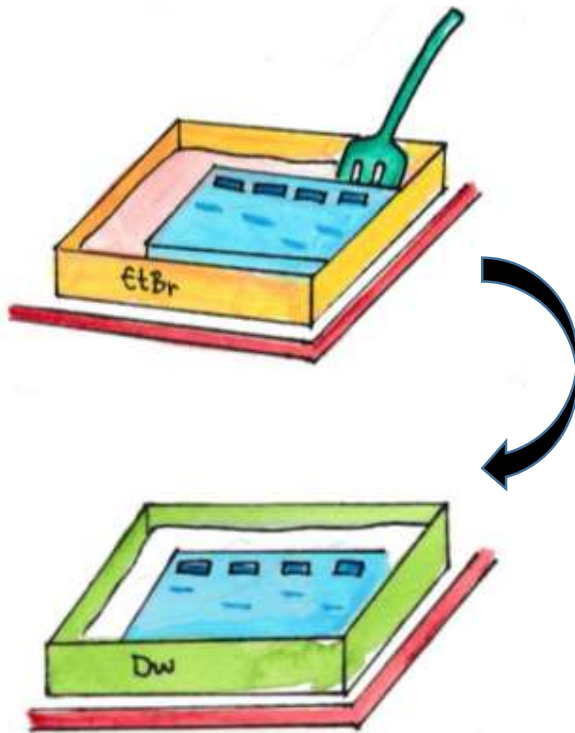
ปิเปต EtBr ปริมาตร 30 ไมโครลิตร

ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ที่อยู่ในกล่องพลาสติกซึ่งห่อด้วยอลูมิเนียมฟอยล์อย่างมิดชิด เพื่อป้องกันแสง

**** ระวังอย่าให้มีการปนเปื้อนของ EtBr ในบริเวณที่เตรียม ****

เมื่อครบเวลาแล้ว!!...



ใช้ทัพพีตักเจลแช่ลงในกล่องน้ำกลั่น
เพื่อล้าง EtBr ส่วนเกินที่อยู่ในเจลออก
และทำให้แถบดีเอ็นเอมีความคมชัดมากขึ้น

Tips&Tricks

- EtBr เป็นสารก่อมะเร็ง
ต้องมีความระมัดระวังเป็น
อย่างสูง
ดังนั้นอุปกรณ์ที่ใช้กับ
EtBr ต้องวางในพื้นที่
สีแดงเท่านั้น!!!!

การกำจัดสารละลาย EtBr ที่ใช้แล้ว!!!

เทสารละลาย EtBr ที่ใช้แล้ว

ใส่ในพลาสติกขนาด 2 ลิตร ที่มีถุงถ่านชาโคลจำนวน 2 ถุง

ทิ้งไว้อย่างน้อย 1 คืน

แล้วนำไปกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 3

จากนั้นเทส่วนที่ผ่านกระดาษกรองทิ้ง

โดยเปิดน้ำตามปริมาณมากๆ

เมื่อล้างเจลเสร็จแล้ว.....

นำเจลไปถ่ายรูปโดยใช้เครื่อง Gel Doc (รูปที่ 6)

และใช้โปรแกรม Gene snap (รูปที่ 7)

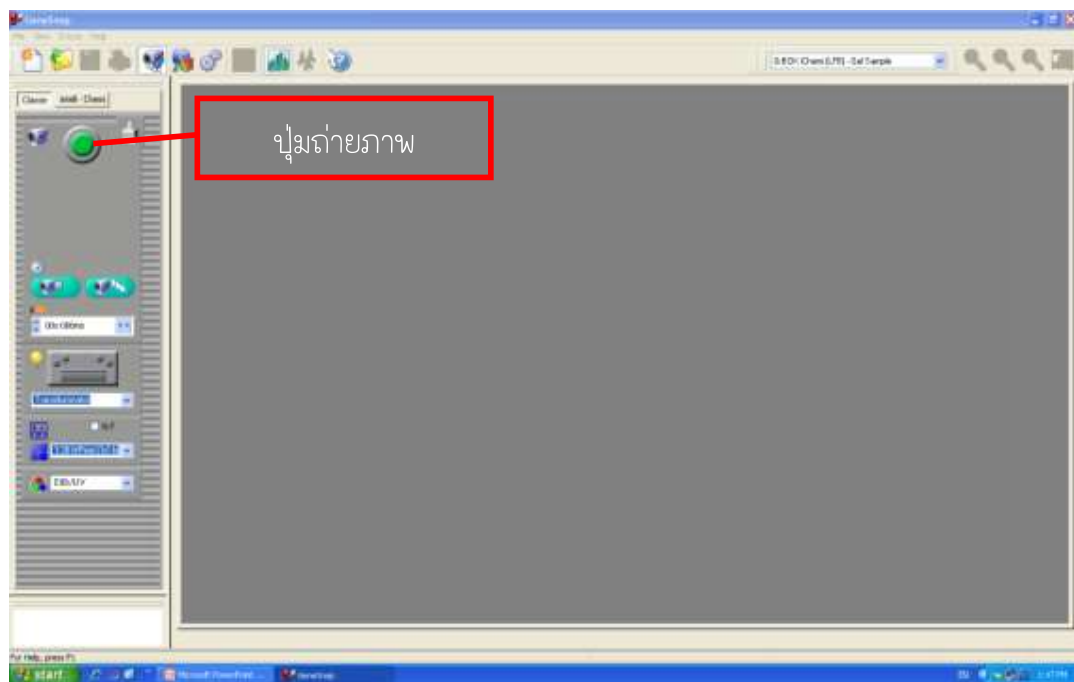


รูปที่ 6 เครื่อง Gel Doc

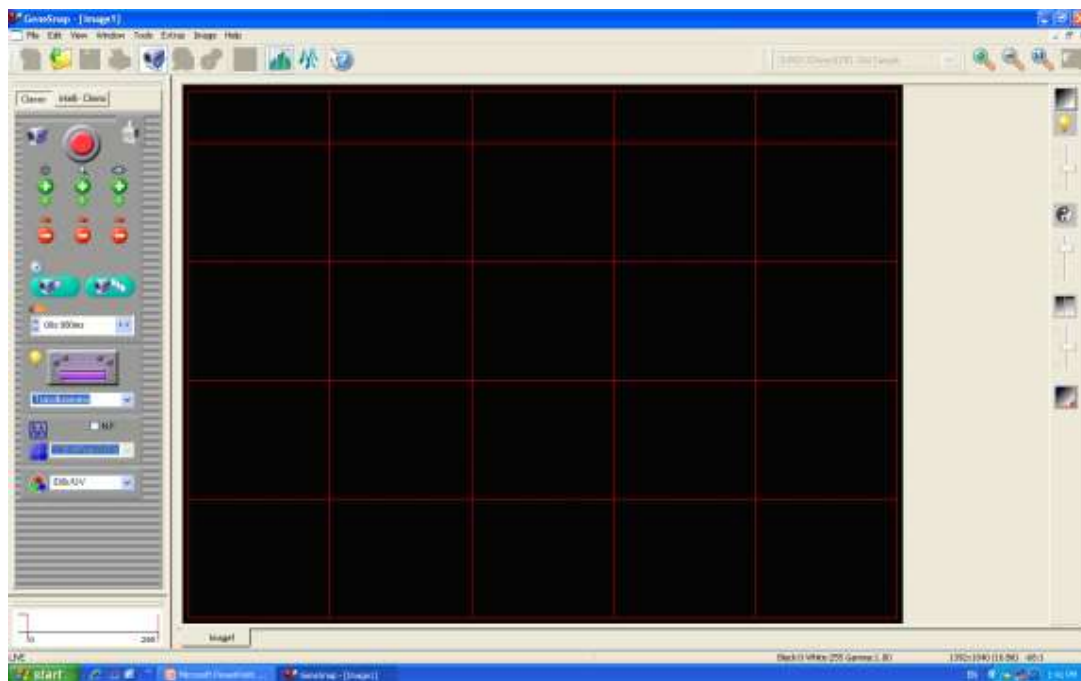


รูปที่ 7 โปรแกรม Gene snap

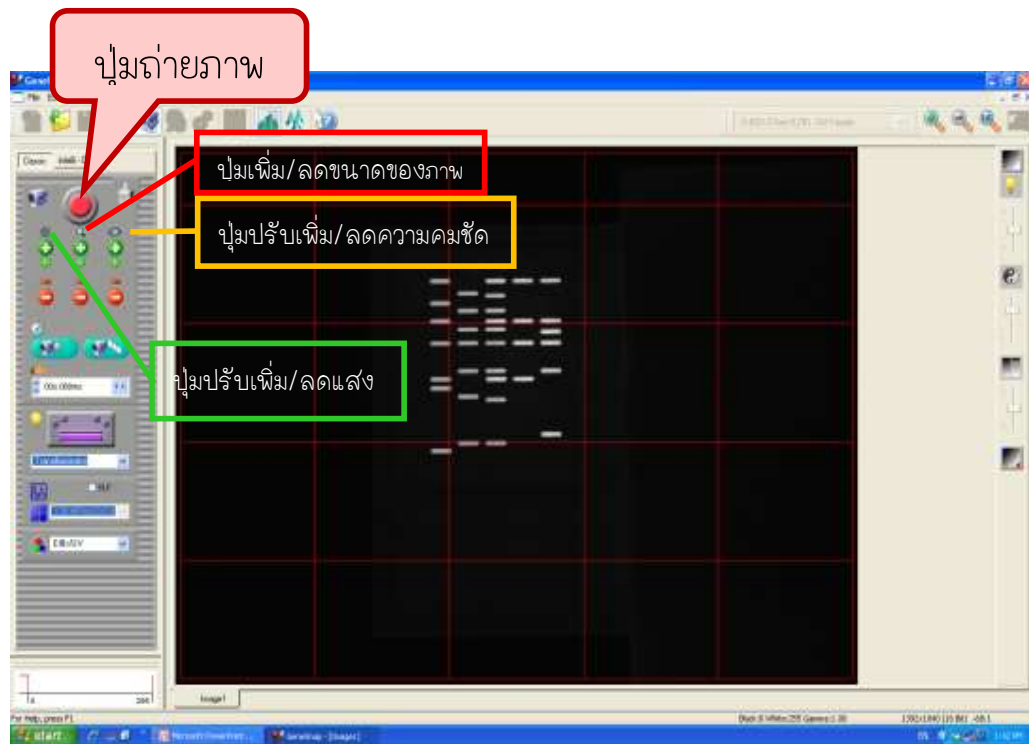
ขั้นตอนการใช้โปรแกรม Gene snap



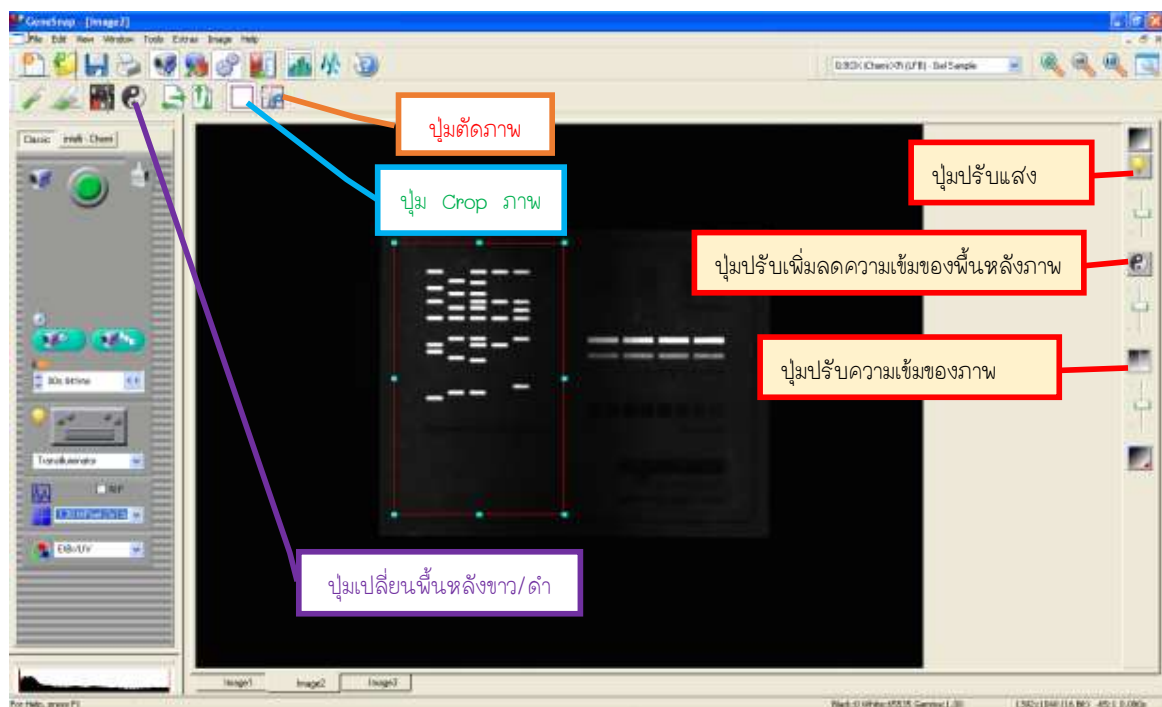
1. เปิดโปรแกรม Gene snap จากนั้นกดปุ่มสีเขียวเพื่อเริ่มการถ่ายภาพ



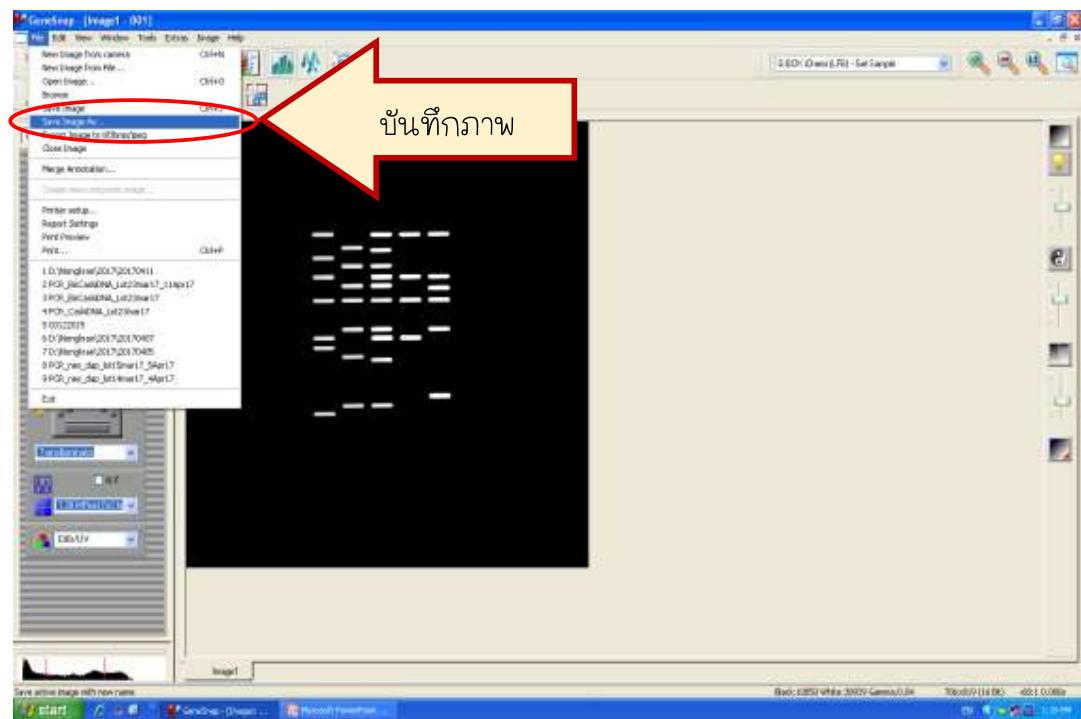
2. เมื่อกดปุ่มสีเขียวจะปรากฏหน้าจอ ดังภาพ จากนั้นนำอะกาโรสเจลที่แช่ EtBr เสร็จแล้วไปวางในเครื่อง Gel doc



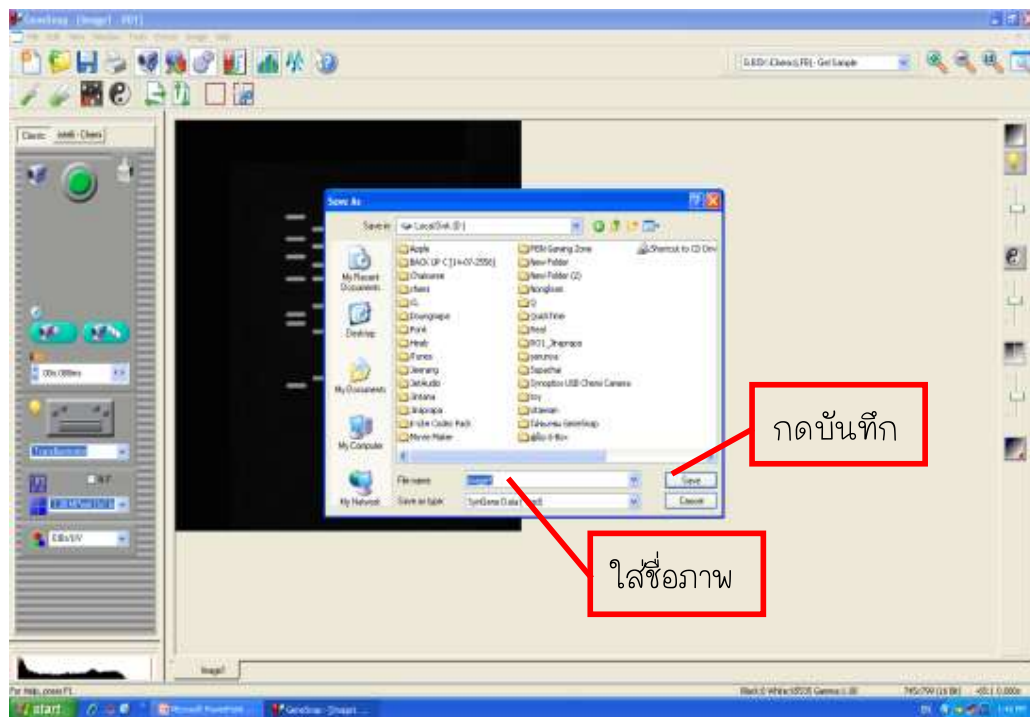
3. หลังจากนั้นหน้าจอจะปรากฏ band ของ DNA ขึ้น สามารถปรับความคมชัด ขนาด และความสว่างของภาพได้ตามความเหมาะสม >>> กดปุ่มถ่ายภาพ



4. เมื่อถ่ายภาพแล้ว สามารถตัดภาพ ปรับเปลี่ยนสีพื้นหลังให้เป็นขาว/ดำ ความเข้มของพื้นหลังภาพได้ตามที่ต้องการ

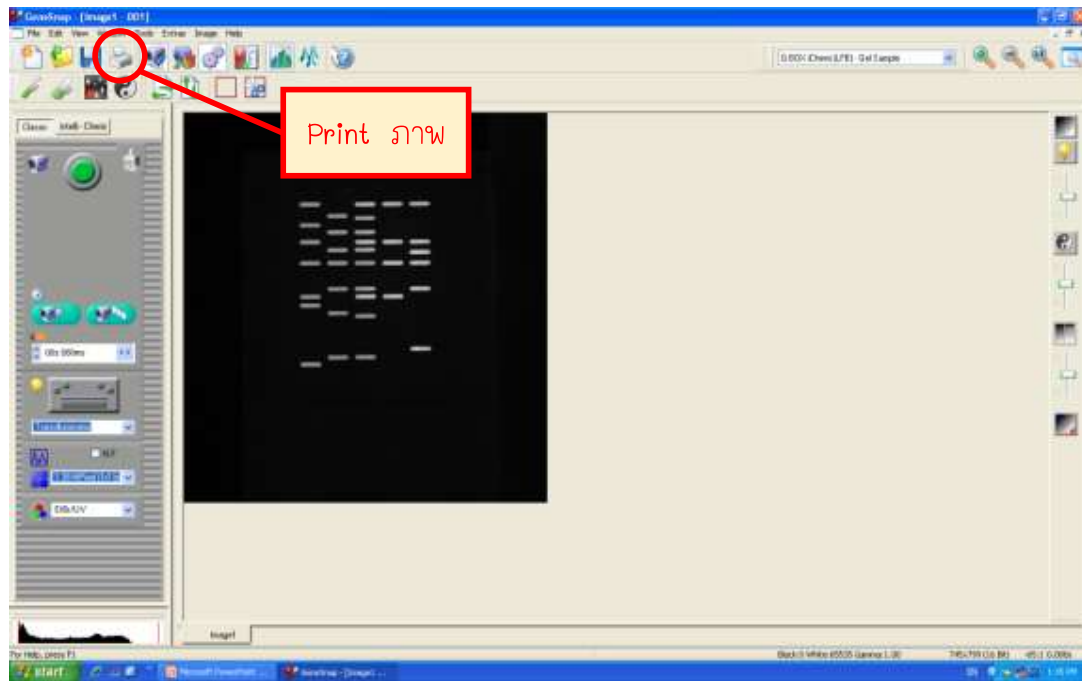


5. ทำการบันทึกภาพที่ถ่าย เลือก File >>>> Save Image As...

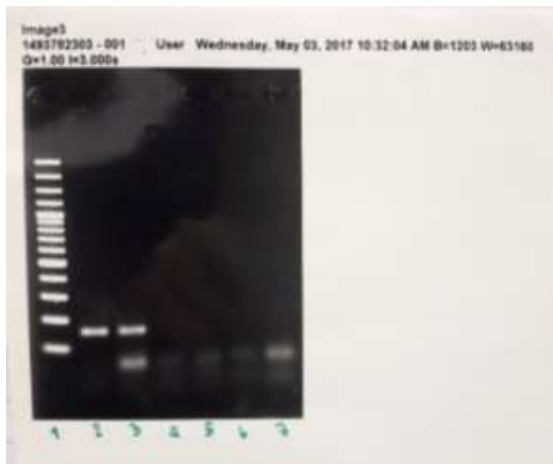


6. เลือก Folder ที่ต้องการจัดเก็บไฟล์ภาพ >>> ใส่ชื่อที่บันทึกตามต้องการ

>>> กด Save



7. กดปรี้นรูปภาพ



ตัวอย่าง รูป gel ที่ปรี้นออกมาในกระดาษ



Do You Know?



รู้หรือไม่ว่ !!

ปัจจัยที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของ DNA

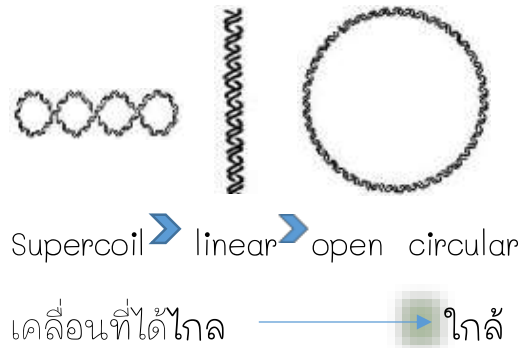
1. ขนาดของโมเลกุล

DNA ขนาดเล็กเคลื่อนที่ได้

เร็วกว่า

DNA ที่มีขนาดใหญ่

2. รูปแบบของ DNA



3. Buffer

TBE	TAE	TPE
(Tris borate-EDTA)	(Tris acetate-EDTA)	(Tris phosphate-EDTA)
-แยก DNA ขนาดเล็ก	-ไม่เกิดปฏิกิริยากับ	-แยก DNA เร็ว
-แบนเล็ก คมชัด	agarose gel	
-ยับยั้งจุลินทรีย์	-เกิดความร้อนสะสม	
	น้อย	
ข้อเสีย		
-เกิดปฏิกิริยากับ	-ใช้ซ้ำแค่ 1-2 ครั้ง	-ตกตะกอนกับ Ethanol
agarose gel	-contaminate ง่าย	
-ความเข้มข้นสูงจะตก		
ผลึก		

4. ความต่างศักย์

(Voltage)

ถ้าเพิ่มความต่างศักย์ไฟฟ้า DNA จะเคลื่อนที่ได้เร็ว

ความต่างศักย์ไฟฟ้า

สูง DNA เคลื่อนที่เร็ว แต่จะแยกขนาดได้ไม่ดี

ต่ำ DNA เคลื่อนที่ช้า แยก

ขนาดดี แต่แถบ DNA ไม่คมชัด เพราะเกิดการแพร่ของ DNA

ทั่วไปใช้ความต่างศักย์ 1-5 โวลต์/เซนติเมตร

5. PERCENTAGE OF AGAROSE GEL

Percentage of agarose gel	Efficient range of separation
0.3%	5 kb – 60 kb
0.6%	1 kb – 20 kb
0.7%	800 bp – 10 kb
0.9%	500 bp – 7 kb
1.2%	400 bp – 6 kb
1.5%	200 bp – 3 kb
2.0%	100 bp – 1.2 kb

แบบทดสอบ

1. ต้องการเตรียม 2%อะกาโรสเจล ปริมาตร 50 ml. เมื่อหลอมละลายในไมโครเวฟแล้วเทลง cylinder พบว่าปริมาตรไม่ถึง 50 ml เราควรป้องกันการเกิดปัญหานี้อย่างไรจึงจะถูกต้องที่สุด
 - ก. ใช้เจลเท่าปริมาตรที่มีอยู่ แล้วเทลงใน tray
 - ข. เติม buffer ลงไปให้ถึง 50 ml. แล้วเทลงใน tray
 - ค. เททิ้ง แล้วเตรียมใหม่
 - ง. ควรเตรียมเผื่อเป็น 55-60 ml. เมื่อหลอมละลายแล้ว เทลงใน cylinder 50 ml แล้วเทลงใน tray
2. TAE Buffer สามารถใช้ซ้ำได้กี่ครั้ง
 - ก. 1 ครั้ง
 - ข. 10 ครั้ง
 - ค. ใช้ซ้ำไม่ได้
 - ง. ใช้จนกว่าบัฟเฟอร์เปลี่ยนเป็นสี
3. หากดึงหัวออกจากเจลแล้วเจลเกิดฉีกขาด ควรแก้ไขอย่างไร
 - ก. เอาเจลทิ้ง
 - ข. นำเจลไปหลอมละลาย แล้วนำมาเตรียมใหม่
 - ค. ใช้เจลเดิมในการ run gel ได้ไม่มีปัญหา
 - ง. ผิดทุกข้อ
4. ข้อใดถูกต้อง
 - ก. ดีเอ็นเอขนาดเล็กเคลื่อนที่เร็วกว่าดีเอ็นเอขนาดใหญ่
 - ข. ดีเอ็นเอขนาดใหญ่เคลื่อนที่เร็วกว่าดีเอ็นเอขนาดเล็ก
 - ค. ดีเอ็นเอทุกขนาดใช้เวลาในการเคลื่อนที่เท่ากัน
 - ง. ผิดทุกข้อ
5. ข้อใดไม่ใช่โมเลกุลที่ใช้แยกด้วยวิธี Gel Electrophoresis
 - ก. กรดอะมิโน
 - ข. กรอนิวคลีอิก
 - ค. ดีเอ็นเอ
 - ง. ผิดทุกข้อ

6. เมื่อนำเจลไปถ่ายรูปแล้ว band ไม่คมชัด ควรทำอย่างไร

.....

.....

.....

7. จงอธิบาย วิธีการเตรียม Working ethidium bromide

.....

.....

.....

.....

.....

8. ถ้าขณะ run gel แล้วเกิดไฟดับ ควรแก้ไขอย่างไร

.....

.....

.....

9. จงแสดงวิธีคำนวณการเตรียม 2% agarose gel ใน TAE buffer ปริมาตร 30 ml
จะต้องชั่ง agarose gel มาเท่าใด

.....

.....

.....

.....

.....

10. จงอธิบายวิธีการกำจัด Ethidium bromide แบบสังเขป

.....

.....

.....

.....

.....

เฉลยแบบฝึกหัด

1. ตอบ ง.
2. ตอบ ก.
3. ตอบ ข.
4. ตอบ ก.
5. ตอบ ง.
6. ตอบ นำกลับไปแช่ EtBr อีกครั้ง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น
7. ตอบ น้ำกลั่น 100 ml EtBr 30 μ l
8. ตอบ นำเจลพร้อมภาดรองเจลใส่ถุง แล้วนำไปแช่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C ไว้ก่อน
9. ตอบ TAE buffer 100 ml ใช้อะกาโรส 2 g
ถ้า TAE buffer 30 ml จะต้องชั่งอะกาโรส $\frac{30 \times 2}{100} = 0.6$ g
10. ตอบ เท EtBr ที่ใช้แล้วใส่ในพลาสติก ขนาด 2 ลิตร ที่มีถุงถ่านชาโคลจำนวน 2 ถุง
ทิ้งไว้อย่างน้อย 1 คืน แล้วนำไปกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 3 จากนั้นเทส่วนที่ผ่าน
กระดาษกรองทิ้งโดยเปิดน้ำตามปริมาณมากๆ