รายงานสรุปเนื้อหาและการนำไปใช้ประโยชน์จากการเข้าอบรม สัมมนา หรือประชุมวิชาการ

ข้าพเจ้า นางวริศรา สุวรรณ ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์ สังกัด หลักสูตรพันธุศาสตร์
ขอนำเสนอรายงานสรุปเนื้อหาและการนำไปใช้ประโยชน์จากการเข้าร่วมอบรมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง 2-D Electrophoresis Principles เมื่อวันที่ 16-17 มกราคม 2556 ณ ห้องประชุมสุขุม อัศเวศน์ ชั้น 3 และห้องปฏิบัติการศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ตามหนังสือขออนุญาตเดินทางไปราชการ เลขที่ศธ.0523.4.9.1/007 ลงวันที่ 16 มกราคม 2556
ซึ่งการเข้าร่วมอบรมเชิงปฏิบัติการ ดังกล่าวข้าพเจ้าได้เลือกใช้งบประมาณการพัฒนาบุคลากรตามกรณีที่ 2 ดังนั้นจึงขอนำเสนอสรุปเนื้อหาและการนำไปใช้ประโยชน์ของการอบรมเชิงปฏิบัติการ ดังต่อไปนี้

รายงานการอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง 2-D Electrophoresis Principles
วันที่ 17-18 มกราคม 2556 ณ ห้องประชุมสุขุม อัศเวศน์ และห้องปฏิบัติการศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร
คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

****

ปัจจุบันเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ได้เข้ามามีบทบาทในงานวิจัยจำนวนมาก โดยใช้ในงานด้าน DNA การจัดเรียงลำดับของเบสต่างๆที่แตกต่างกัน การโคลนนิ่ง การแสดงออกของยีน การศึกษารูปร่างลักษณะของโมเลกุล กลไกการทำงานต่างๆของโปรตีนที่มีในสิ่งมีชีวิต กลไกการทำงานของโปรตีนกับโรค ฯลฯ และเทคนิคที่เป็นที่นิยมในนักวิจัยที่สนใจงานด้านโปรตีน หรือ Proteomics เพื่อตรวจสอบ จำแนก โปรตีนชนิดต่าง ได้แก่ เทคนิคเจลอิเลคโทรโฟริซีส (Gel electrophoresis)

เทคนิคอิเลคโทรโฟริซีสมี 2 แบบ คือ แบบ one-dimension และ two -dimension

1) แบบ one-dimension เป็นการแยกโปรตีนใน 1 มิติ โดยแยกโปรตีนภายใต้สนามไฟฟ้าด้วยวิธี SDS-PAGE มี polyacylamide gel เป็นตัวกลาง สามารถแยกโปรตีนได้ตามขนาดโมเลกุล
2) แบบ two-dimension เป็นการแยกโปรตีนใน 2 มิติ โดยมิติแรกโปรตีนจะถูกแยกด้วยวิธี Isoelectric focusing (IEF) โดยอาศัยความต่างของ pI จากนั้นจึงแยกโปรตีนอีกครั้งในมิติที่สองด้วยวิธี SDS-PAGE ซึ่งอาศัยความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุล

การทำอิเลคโทรโฟริซีสแบบ 2 มิติ (2-D gel electrophoresis)

มิติที่ 1 การแยกโปรตีนด้วยวิธี Isoelectric focusing (IEF)

เป็นวิธีการแยกโปรตีนที่มีประจุแตกต่างกันออกจากกัน ภายใต้สนามไฟฟ้า โดยมีตัวกลางเป็น gel ที่เทบนแผ่นพลาสติกสำเร็จรูป (strip) มี pH เป็นแบบ gradient คือบริเวณขั้วบวกจะมี pH ต่ำกว่าขั้วลบ เมื่อเปิดกระแสไฟฟ้าโปรตีนจะเกิดการเคลื่อนที่บนแผ่นเจล โดยโปรตีนที่มีค่า pH ต่ำกว่าค่า pI จะมีประจุเป็นบวกและ

เคลื่อนที่เข้าหาขั้วลบ เมื่อโปรตีนเคลื่อนที่ไปจะทำให้ค่า pH ลดลงจนกระทั่งค่า pH เท่ากับค่า pI ทำให้ประจุสุทธิเป็นศูนย์ โปรตีนจะหยุดเคลื่อนที่ ในทางกลับกันเมื่อโปรตีนมีค่า pH สูงกว่าค่า pI โปรตีนจะมีประจุเป็นลบและเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวก ดังนั้นโปรตีนแต่ละชนิดจะเคลื่อนที่เป็นแถบ (band)บนแผ่นเจลเข้าขั้วไฟฟ้าและไปหยุดที่ค่า pH เท่ากับค่า pI

มิติที่ 2 การแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

เป็นวิธีการแยกโปรตีนโดยอาศัยความแตกต่างกันของขนาดโมเลกุล ภายใต้กระแสไฟฟ้า โดยมี polyacrylamide gel เป็นตัวกลาง เมื่อนำแผ่นเจล (strip) ที่ทำการแยกโปรตีนด้วยวิธี IEF มา equilibrate ด้วย SDS buffer เพื่อทำให้โปรตีนทั้งหมดมีประจุเป็นลบแล้ว นำแผ่นเจลดังกล่าววางบน polyacrylamide gel เปิดกระแสไฟฟ้า โปรตีนจะเคลื่อนที่จากขั้วบวกเข้าสู่ขั้วลบ โดยโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก

ขั้นตอนการทำอิเลคโทรโฟริซีสแบบ 2 มิติ

1. เตรียมเจล (strip) ที่เทบนแผ่นพลาสติกสำเร็จรูป และมี pH เป็นแบบ gradient ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-3 มิลลิเมตร
2. ใส่โปรตีนตัวอย่างลงในหลุมบนแผ่นเจล (strip) เปิดกระแสไฟฟ้า โปรตีนจะเคลื่อนที่ตามประจุและจะหยุดเคลื่อนที่เมื่อ pH ของโปรตีน เท่ากับค่า pI
3. นำแผ่นเจล (Strip) มา equilibrate ด้วย SDS buffer เพื่อทำให้โปตีนทั้งหมดมีประจุเป็นลบ
4. วางแผ่นเจล (Strip) บน polyacrylamide gel เปิดกระแสไฟฟ้า โปรตีนจะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปขั้วบวกตามแนวตั้ง
5. ย้อมสี polyacrylamide gel ซึ่งทำได้หลายวิธี เช่น การย้อมด้วย coomassie blue staining, colloidal coomassie staining, silver staining, fluorescent staining, fluorescent labeling ควรเลือกวิธีที่เหมาะกับตัวอย่าง เนื่องจากแต่ละวิธีมี sensitivity limit ที่แตกต่างกัน
6. ถ่ายรูป และ scan รูปเจลซึ่งจะมีลักษณะโปรตีนเป็นจุดๆ หรือ spot บนแผ่นเจล ทำการวิเคราะห์จุดของโปรตีนที่ได้โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์
7. ตัดโปรตีนที่สนใจบนแผ่นเจลโดยใช้ปลาย tip จิ้มบนแผ่นเจลใส่หลอด เพื่อนำไปวิเคราะห์โดยใช้ Mass spectrophotometry (MS)
8. ทำการย่อยตัวอย่างโปรตีนให้เป็น peptide ก่อน แล้วจึงนำเข้าเครื่อง MS เพื่อวิเคราะห์ peptide mass spectrum
9. เปรียบเทียบ peptide mass spectrum กับ database เพื่อดูว่าเป็นโปรตีนชนิดใด

.....

(นางวริศรา สุวรรณ)

...../...../.....

ความคิดเห็นของผู้บังคับบัญชาชั้นต้น (ประธานหลักสูตร/เลขานุการคณะ/หัวหน้างาน)

.....

.....

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. แสงทอง พงษ์เจริญกิต)

...../...../.....

ความคิดเห็นของคณบดีคณะวิทยาศาสตร์หรือผู้แทน

.....

.....

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พึ่งพร เนียมทรัพย์)

...../...../.....