Polymerase Chain Reaction (PCR) Technique

โดย ดร.ทนพ. เมธี ศรีประพันธ์ (ทน. 8546)
นักวิจัยหน่วยปฏิบัติการวิจัยโรคตับอักเสบและมะเร็งตับ
ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หมวดความเชี่ยวชาญ: ชีววิทยาระดับโมเลกุลและมนุษย์พันธุศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้ทราบถึงหลักการทั่วไปของกระบวนการเพิ่มจำนวนยีนหรือชิ้นส่วน DNA ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)
2. เพื่อให้ทราบถึงประโยชน์ของเทคนิคการเพิ่มจำนวนยีนหรือชิ้นส่วน DNA ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) และการประยุกต์ใช้ในห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสหรือที่รู้จักกันในชื่อ พีซีอาร์ (PCR : Polymerase chain reaction) เป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนาขึ้นโดย แครี มุลลิส (Kary Mullis) ในปี 1983 ปัจจุบันเทคนิค PCR ได้เข้ามามีบทบาทในงานทางด้านเทคนิคการแพทย์ไม่ว่าจะเป็น การใช้ตรวจหาเชื้อก่อโรคต่างๆ เช่น แบคทีเรีย รา หรือไวรัส ใช้ในการเพิ่มจำนวนของยีนดื้อยาเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของลำดับสารพันธุกรรม รวมถึงการวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรมต่างๆ โรคเลือด โรคมะเร็ง เป็นต้น ในเอกสารนี้จะนำเสนอในเรื่อง หลักการและขั้นตอนของเทคนิค PCR องค์ประกอบในการทำ PCR และการประยุกต์ใช้เทคนิค PCR ในงานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์

ความหมายและหลักการของเทคนิค PCR

Polymerase chain reaction หรือ PCR เป็นการเพิ่มจำนวนยีนหรือชิ้นส่วน DNA ที่สนใจในหลอดทดลองแบบซ้ำๆ กันหลายๆ รอบ (repeated cycles) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ polymerase ที่มีคุณสมบัติทนความร้อน (thermostable DNA polymerase) โดยจำนวน DNA ที่เพิ่มขึ้นในแต่ละรอบปฏิกิริยาจะเป็นลักษณะแบบ exponential curve คำนวณได้เท่ากับ 2^n (เมื่อ n คือจำนวนรอบของการทำ PCR) จนถึงระยะหนึ่งที่ปริมาณของ PCR product คงที่และองค์ประกอบในการทำ PCR ลดลง ซึ่งการดำเนินไปของปฏิกิริยาจะไม่ให้ product ตามสูตร 2^n จะเรียกสิ่งที่เกิดขึ้นนี้ว่าปรากฏการณ์ “plateau effect”

องค์ประกอบในการทำ PCR

1. **Template หรือ DNA ตั้งต้น** (ในกรณีที่ template ตั้งต้นเป็น RNA จะต้องเพิ่มอีกขั้นตอนหนึ่งคือ การสร้างสาย complementary DNA (cDNA) โดยใช้ RNA เป็นต้นแบบ หรือการทำอีกสายขึ้นมาคู่กับ RNA นั่นเองเพื่อให้เป็นสายคู่ที่จะเข้าสู่ปฏิกิริยา PCR ได้ จะเรียกขั้นตอนในช่วงนี้ว่า Reverse transcription (RT) โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase เช่น M-MLV reverse transcriptase ที่ได้จาก Moloney Murine Leukemia Virus หรือ AMV reverse transcriptase ที่ได้จาก Avian Myeloblastosis Virus การสร้างสาย cDNA จะใช้ primer ที่เป็น oligo-dT, random hexamer หรือ gene specific primer ก็ได้ จากนั้นจึงนำสาย cDNA ที่สังเคราะห์ได้เข้าสู่ขั้นตอน PCR ต่อไป) ปกติในปฏิกิริยา PCR จะใช้ DNA ตั้งต้นในช่วง 10-50 ng/reaction

2. **Primers** เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (oligonucleotides) สายสั้นๆ นิยมใช้ความยาวประมาณ 20-24 bp และมีองค์ประกอบของ G และ C ระหว่าง 40-60% จะเป็นตัวเริ่มต้นของการสร้าง DNA สายใหม่ในบริเวณช่วง DNA template หรือยีนที่เราต้องการ โดย primers ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ทั่วไปจะมี 2 เส้นคือ forward primer และ reverse primer โดย primers ที่ดีจะต้องมีค่า Tm ของทั้งสองเส้นเท่ากันหรือใกล้เคียงกัน โดยความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยา PCR ของ primer แต่ละเส้นอยู่ในช่วง 0.1-2.0 μM

3. **Thermostable DNA polymerase** เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสร้างสาย DNA เส้นใหม่หรือ PCR product ในตำแหน่งยีนที่ต้องการโดยการนำ deoxynucleotide triphosphate (dNTP) ได้แก่เบส A, T, C G มาต่อในตำแหน่งที่ถัดจาก primers ในแต่ละข้างด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์โดยให้มีความจำเพาะกับ DNA ต้นแบบในทิศทาง 5' → 3' (polymerase activity) รวมถึงเอนไซม์ยังทำหน้าที่ในการตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ในบริเวณที่มีการเติมเบส A, T, C, G ไม่ถูกต้องในทิศทาง 3' → 5' (exonuclease activity) นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ polymerase ที่มีคุณสมบัติอีกประการหนึ่งคือการตรวจสอบความผิดพลาดของการสร้าง DNA สายใหม่ (5'→3' exonuclease) หรือ proofreading activity โดยเอนไซม์ที่ใช้จะต้องมีประสิทธิภาพในการทำงานได้ที่อุณหภูมิสูงโดยเอนไซม์ที่นิยมใช้มากที่สุดในงาน PCR คือ *Taq* DNA polymerase แต่ถ้าต้องการความถูกต้องของการสร้างสาย DNA อาจใช้ *Pfu* DNA polymerase ในปฏิกิริยา PCR ปกติจะใช้ความเข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์ 2.5-5 unit/100μl ของ PCR reaction

4. **Deoxynucleotide triphosphate (dNTPs)** ประกอบด้วย dATP, dTTP, dCTP และ dGTP ซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์ A, T, C, G ที่จะใช้ในการสร้าง PCR product สายใหม่ โดยจะเตรียมเป็นสารผสมที่มีความเข้มข้นในช่วง 20-200 μM

5. **PCR buffer และองค์ประกอบอื่น ๆ ในปฏิกิริยา PCR** โดย PCR buffer จะช่วยให้ปฏิกิริยา PCR เกิดได้อย่างมีประสิทธิภาพโดย buffer จะสอดคล้องกับชนิดของ DNA polymerase ที่ใช้ซึ่งปกติ buffer จะถูกเตรียมเป็นความเข้มข้น 10 เท่าของที่ใช้จริง (10X) ซึ่งผู้ใช้จะต้องใส่ 1 ใน 10 ของปริมาตรรวมในปฏิกิริยา PCR เพื่อให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1X

องค์ประกอบอื่นๆ ที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งคือ $MgCl_2$ ซึ่งทำหน้าที่เป็น co-factor ของเอนไซม์ polymerase และมีผลต่อประสิทธิภาพของการทำปฏิกิริยา โดยทั่วไปความเข้มข้นสุดท้ายของ $MgCl_2$ ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR คือ 1.5 mM แต่ในการทำงานจริงผู้ปฏิบัติการสามารถปรับความเข้มข้นได้โดยให้อยู่ในช่วง 1-5 mM โดยคำนึงถึงลักษณะของ template ที่ใช้ primers ที่ใช้ รวมถึงควรมีการหาสภาวะที่เหมาะสมเมื่อมีการทำ PCR ครั้งใหม่ด้วย

น้ำที่ใช้ในการทำ PCR ก็มีความสำคัญเช่นกัน ควรใช้น้ำที่ปราศจาก DNase หรือ RNase และไม่มีการปนเปื้อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากเชื้อแบคทีเรียที่อาจมี enzyme nuclease ที่ทำลาย DNA template และ primers รวมถึงรบกวนปฏิกิริยา PCR ด้วย

นอกจากนั้นในการทำ PCR อาจมีการเติมสารเร่งปฏิกิริยาต่างๆ ลงไปด้วยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำ PCR โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรณีที่ template มีองค์ประกอบของเบส G และ C มาก (GC-rich template) หรือ ต้องการเพิ่มปริมาณ PCR product ขนาดยาวๆ (long PCR product) เช่น DMSO, DTT, BSA, betaine เป็นต้น โดยใส่ในความเข้มข้นและปริมาณที่เหมาะสมตามคู่มือที่ได้แนะนำไว้ในชุดน้ำยาที่ผู้ปฏิบัติงานได้ใช้อยู่

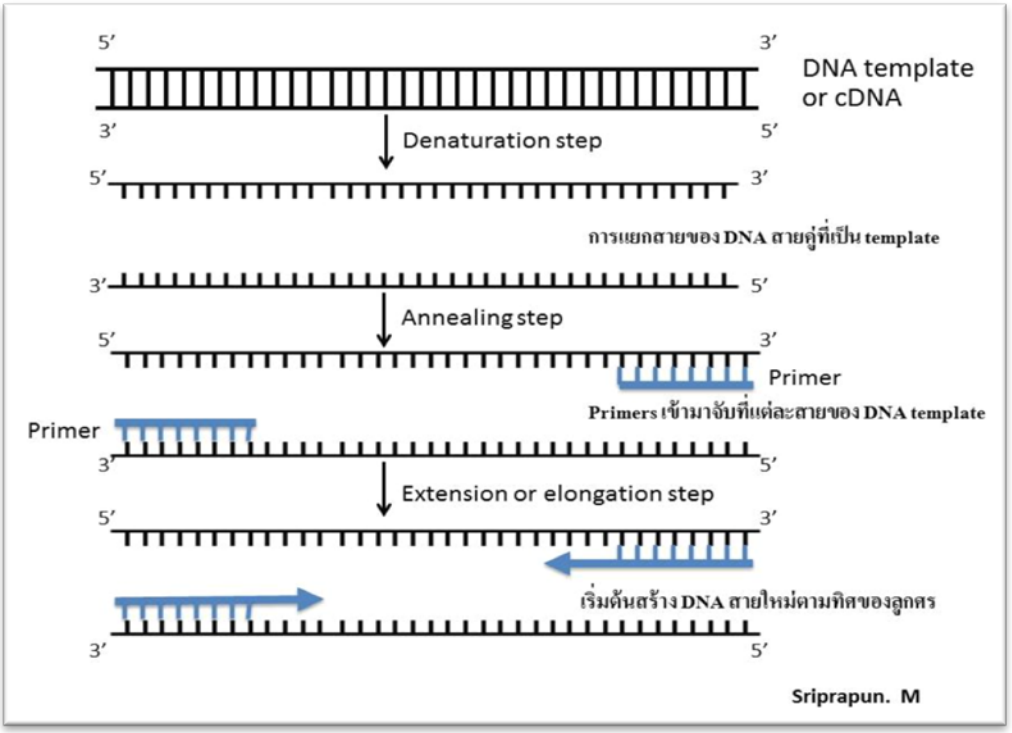
ขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR

โดยทั่วไป ขั้นตอนในการทำ PCR มี 3 ขั้นตอน ดังนี้

1. Denaturation step เป็นขั้นตอนแยกสาย DNA template สายคู่ให้เป็นสายเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูงประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส

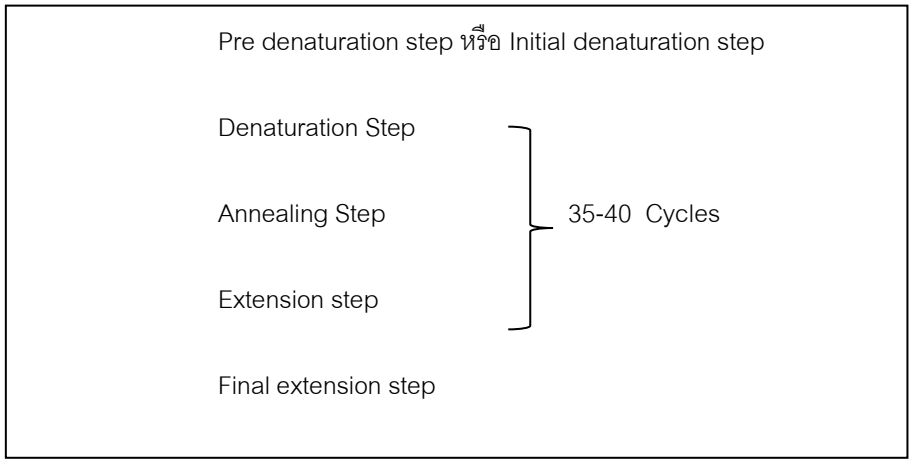
2. Annealing step เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลง เพื่อให้ primers ในปฏิกิริยา PCR เข้าจับกับ DNA template ในตำแหน่งที่จำเพาะ เพื่อเตรียมที่จะสร้าง PCR product ใหม่ ขั้นตอนนี้จะใช้อุณหภูมิในช่วงประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิในช่วงนี้จะขึ้นกับค่า Tm ของ primers ที่ใช้ โดยทั่วไป annealing temperature จะมีค่าต่ำกว่า Tm เฉลี่ยของ primers ทั้งสองประมาณ 3-5 องศาเซลเซียส

3. Extension step เป็นขั้นตอนการสร้าง DNA สายใหม่โดยเริ่มจากจุดต้นของ primers ใน DNA template แต่ละข้างโดยการนำ dNTPs ต่างๆ มาต่อกันในลักษณะที่คู่สมกับ DNA template ซึ่งอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase โดยจะต้องใช้อุณหภูมิให้เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ ยกตัวอย่างเช่นการใช้ *Taq* DNA polymerase จะใช้อุณหภูมิในช่วงที่เหมาะสมคือ 70-75 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่นิยมใช้คือ 72 องศาเซลเซียส



ภาพขั้นตอนของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR)

ในช่วงต้นของปฏิกิริยา PCR (ก่อนจะเข้าสู่ denaturation step) จะมีการเพิ่มอุณหภูมิให้เท่ากับอุณหภูมิของขั้นตอน denaturation หรือสูงกว่าเล็กน้อย (ไม่เกิน 95 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 3-5 นาที (เรียกว่า Pre denaturation step หรือ Initial denaturation step) หรืออาจมากกว่านั้นแต่ไม่เกิน 15 นาที (กรณีที่ต้องการ activation *Taq* DNA polymerase) โดยปฏิบัติตามคู่มือน้ำยาแต่ละบริษัทที่ใช้ โดยการเพิ่มขั้นตอนดังกล่าวมีจุดประสงค์หลายประการ เช่น เพื่อช่วยให้สาย DNA คลายตัวได้ดีขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน DNA template ที่มี GC base มากๆ นอกจากนี้ยังเป็นช่วงที่มีการ activation ของเอนไซม์ DNA polymerase บางชนิดด้วย เช่น Hot Start *Taq* DNA polymerase ก่อนที่จะเข้าสู่ปฏิกิริยา PCR นอกจากนั้นในช่วงท้ายของการทำ PCR เมื่อครบจำนวนรอบ (cycle) ที่ต้องการแล้ว (ปกติจะอยู่ไม่เกิน 45 รอบ)จะมีการตั้งค่าอีกอุณหภูมิหนึ่งที่เรียกว่า final extension หรือ final elongation step ซึ่งจะใช้อุณหภูมิในช่วง extension หรือ elongation step เป็นเวลา 5-15 นาที เพื่อให้มั่นใจว่าปฏิกิริยาในการสร้างสาย DNA ในแต่ละเส้นของทั้ง forward และ reverse primers ทำได้สมบูรณ์ รวมถึงเพื่อเพิ่มความเสถียรของ PCR product ใหม่ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาดังนั้นในการทำ PCR ทั่วไปจะมีการกำหนด Condition ของ PCR ที่เครื่องเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมอัตโนมัติ (PCR machine) ดังต่อไปนี้



ประโยชน์ของการเพิ่มจำนวนยีนด้วยเทคนิค PCR

เทคนิค PCR สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้อย่างแพร่หลายไม่ว่าจะเป็นทางด้านการแพทย์ ด้านการศึกษาวิจัยทางวิทยาศาสตร์ ด้านอุตสาหกรรมและการเกษตร ด้านการศึกษาวิจัยทางด้านวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต ด้านนิติวิทยาศาสตร์ เป็นต้น

การประยุกต์ใช้ในงานทางเทคนิคการแพทย์

มีรายงาน การประยุกต์ใช้เทคนิค PCR เพื่อการวินิจฉัยโรคครั้งแรกในปี ค.ศ. 1987 ในการวินิจฉัยโรค sickle cell anemia ของทารกในครรภ์ โดยมีข้อดีคือช่วยย่นระยะเวลาในการตรวจและการออกผล โดยวัตถุประสงค์ของการใช้เทคนิค PCR ในงานทางห้องปฏิบัติการเพื่อชันสูตรโรค (diagnostic applications) มี 2 ประการคือ

1. ตรวจการคงอยู่หรือการหายไปของ nucleotide รวมถึงการตรวจหาเชื้อก่อโรคต่างๆ การตรวจหาความผิดปกติของยีนที่เกิดจากกระบวนการ translocation หรือ deletion

2. ตรวจหาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม หรือ genetic variation เช่นการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ก่อนคลอด (prenatal diagnosis) การตรวจหาความผิดปกติทางพันธุกรรมต่างๆ ในโรคเลือดหรือ โรคมะเร็ง เป็นต้น

ปัจจุบันมีห้องปฏิบัติการทางการแพทย์หลายๆ แห่งได้นำเทคนิค PCR เข้ามาช่วยในการวินิจฉัยโรคอย่างแพร่หลายทั้งการตรวจหาเชื้อก่อโรค ตรวจหาความผิดปกติของยีนที่ก่อให้เกิดโรคต่างๆ ไม่ว่าจะเป็น โรคทางพันธุกรรมแต่กำเนิด โรคมะเร็ง โรคเลือดต่างๆ เช่น ธาลัสซีเมีย มะเร็งเม็ดเลือดขาว รวมถึงนำมาใช้ในการตรวจหายีนดื้อยาของเชื้อจุลชีพต่างๆ เช่น รา ไวรัส แบคทีเรีย และนำมาใช้ในงานห้องปฏิบัติการนิติวิทยาศาสตร์ในการพิสูจน์ความเป็นพ่อแม่ลูก การตรวจหลักฐานทางคดีความต่างๆ เป็นต้น โดยได้มีการพัฒนาเทคโนโลยีให้มีความทันสมัยขึ้นที่สามารถเพิ่มความไวและความจำเพาะในการตรวจ รวมถึงสามารถบอกปริมาณของยีนที่ต้องการศึกษาได้ด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. วีระพงศ์ ลุลิตานนท์ และ นิภาภรณ์ แสนคุณท้าว. เอกสารประกอบการบรรยายเรื่อง พื้นฐานเทคนิค polymerase chain reaction[Internet]. 2008[cited 2014 Dec 10]. Available from: http://microbio.md.kku.ac.th/site_data/mykku_microbio/17/Basic_PCR_June_08.pdf
2. Wittwer CT, Kusukawa N. Nucleic acid techniques. In: Bruns DE, Ashwood ER, Burtis CA, editors. Fundamentals of molecular diagnostics. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier; 2007.
3. สุมาลี ตั้งประดับกุล. ดีเอ็นเอเทคโนโลยี การประยุกต์: ศึกษาแบคทีเรียก่อโรคเมลิออยโดสิส (DNA technology: An application to study bacterial pathogen (Melioidosis). กรุงเทพฯ:สำนักพิมพ์แมคกรอ-ฮิล; 2010.
4. วัชรี อัตถทิพพหลคุณ. เทคนิค PCR กับมิติใหม่ทางเทคนิคการแพทย์. ใน: วัชรี อัตถทิพพหลคุณ, มนตรี อัตถทิพพหลคุณ, บรรณาธิการ. ทฤษฎี การประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR technology. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: เรือนแก้วการพิมพ์; 2536.

****