บทฟื้นฟูวิชาการ

Pulsed field gel electrophoresis

นวลทิพย์ กมลวารินทร์*

Kamolvarin N. Pulsed field gel electrophoresis. Chula Med J 1987 Aug; 31 (8) : 645-650

Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFG) is a rather new technique that extends the molecular weight separation range so that large DNA molecules can be separated with very high resolution. Thus, this article aims to present the basic principle, main factors effecting the efficiency of PFG and some aspects of applications.

The basic principle of PFG is the application of two electrical fields alternatively, at different angles for defined time periods. Separation is achieved by compelling large DNA molecules to continuously change direction as they proceed through the gel matrix. The advantages of this technique are an increase in the effeciency of the separation of DNA fragments up to 9 million base pairs with good resolution and preservation of the vital integrity of DNA molecules. The whole cells could be embedded in agarose gel "inserts" which provide a natural and safe environment. The chromosomal DNAs are obtained in the inserts by subsequent digestion of all chromosomal proteins and other cell components. The inserts can be directly loaded into the well of the agarose gel to be run.

Reprint requests : Kamolvarin N, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10500, Thailand.

Received for publication. March 2, 1987

* ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์ระดับโมเลกุลทางวิทยาศาสตร์และการวินิจฉัยโรคในปัจจุบัน สามารถที่จะกระทำได้ถึงระดับ gene หรือ chromosome เนื่องจากมีการพัฒนาและคิดค้นเทคนิคใหม่ ๆ ที่มีประสิทธิภาพทั้งความไวและความแม่นยำสำหรับการศึกษาเรื่องนี้โดยเฉพาะ เทคนิคที่สำคัญและกำลังเป็นประโยชน์อย่างมากทั้งทางวิทยาศาสตร์พื้นฐาน วิทยาศาสตร์การเกษตร การอุตสาหกรรมและวิทยาศาสตร์การแพทย์คือ recombinant DNA technology[1-3] ซึ่งรวมไปถึงการใช้ DNA-probe หรือ RNA-probe ในการตรวจหา gene หรือส่วนของ gene ที่ probe นั้นมีความจำเพาะต่อกัน อันเป็นวิธีการที่มีความแม่นยำถูกต้องมากกว่าวิธีอื่น ๆ ที่ต้องอาศัย phenotype ซึ่งบางครั้งไม่สามารถตัดสินได้ในกรณีที่ gene ต่างกันแต่มี phenotype เหมือนกัน แต่ก่อนที่จะถึงขั้นตอนนี้จะต้องผ่านการแยกเอา chromosomal DNA ออกมาจากเซลล์และตัดทอน (restriction cut) ให้มีขนาดพอเหมาะที่จะทำการวิเคราะห์ได้โดยใช้ restriction endonuclease[4-6] ซึ่งเป็นกลุ่มเอนซัยม์ที่ตัด DNA สายคู่ในตำแหน่งที่มีลำดับ base เฉพาะสำหรับแต่ละเอนซัยม์ แล้วจึงแยกชิ้นส่วนที่ต่างขนาดกันของ DNA ด้วย agarose gel electrophoresis แต่เทคนิคนี้มีข้อจำกัดคือ ขนาดของ DNA ที่จะแยกต้องต่ำกว่า 50,000 base pair (50 kilo base pair, 50 Kb) จึงจะเกิด high resolution เนื่องจากในช่วงดังกล่าวอัตราการเคลื่อนที่ของ DNA ในสนามไฟฟ้าขึ้นอยู่กับขนาดโมเลกุลของ DNA แต่สำหรับ DNA โมเลกุลใหญ่ ๆ จะเคลื่อนที่ในอัตราที่เท่ากันทำให้ไม่เกิดการแยกในสนามไฟฟ้าที่ใช้ตามปกติ ดังนั้นขีดจำกัดนี้จึงเป็นอุปสรรคสำคัญในการศึกษา chromosomal DNA ของสัตว์ชั้นสูงรวมทั้งคนซึ่งมีขนาด 50-250 million base pair (Mb) นอกจากนี้การวิเคราะห์ intact chromosomal เปราะแตกหักง่ายจากแรงกระแทก (mechanical force) ในขบวนการวิเคราะห์ตามปกติ จึงได้มีการคิดค้น large DNA technology ขึ้นเพื่อแก้ปัญหาและขจัดขีดจำกัดดังกล่าวให้หมดไป เทคนิคนี้คือ Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFG)

PFG เป็นวิธีที่สามารถใช้แยก DNA ทั้งโมเลกุลใหญ่และเล็กได้อย่างมีประสิทธิภาพ (high resolution) โดยอาศัยหลักการคือ เป็นการแยก DNA ตามขนาดของโมเลกุลภายใต้สนามไฟฟ้า 2 สนามซึ่งทำมุมกันอย่างพอเหมาะและสลับกันด้วยช่วงเวลาซึ่งขึ้นกับขนาดของ DNA ที่ทำการแยก

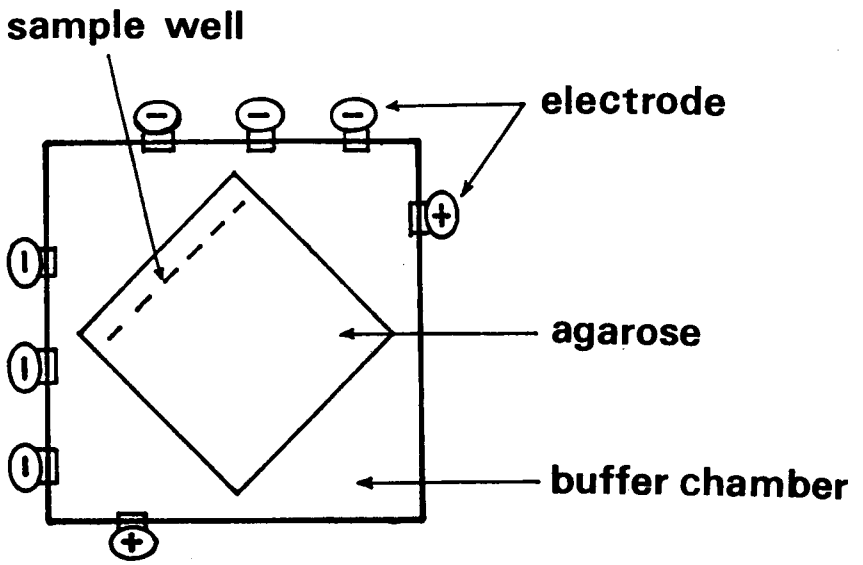

Figure 1 : Diagram of Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFG) apparatus

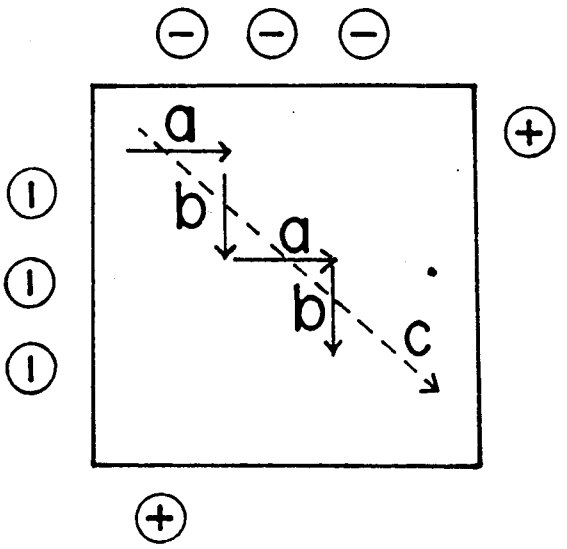

Figure 2 : Direction of alternately applied electrical fields (a and b), and direction of net migration of DNA in agarose gel.

จากความรู้พื้นฐานที่ว่าโมเลกุลของ DNA จะเปลี่ยนรูปร่างได้ค่อนข้างช้าและอัตราการเปลี่ยนขึ้นกับขนาดของโมเลกุลโดยตรงแต่สำหรับการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าของ DNA โมเลกุลใหญ่จะไม่แตกต่างกันเนื่องจากภายใต้สนามไฟฟ้า DNA จะคลายเกลียวออกและเคลื่อนที่ในลักษณะเป็นแท่ง (rod shape) ไปพร้อม ๆ กันจึงไม่เกิดการแยก Schwartz et al[7] ได้คิดค้นเทคนิค pulsed field gel electrophoresis (PFG) โดยใช้เครื่องมือซึ่งมีแผนผังดังรูปที่ 1 การแยกขนาดของ DNA เกิดขึ้นเนื่องจาก เมื่อปล่อยกระแสไฟฟ้าในสนามแรกตามทิศทาง a (รูปที่ 2) DNA ทุกโมเลกุลจะเปลี่ยนรูปร่างเป็นแท่งและเคลื่อนที่ไปตามทิศทาง a เมื่อหยุดกระแสในทิศทาง a และปล่อยกระแสไฟฟ้าในทิศทาง b DNA ทุกโมเลกุลจะต้องเปลี่ยนทิศทางไปตามกระแสไฟฟ้า DNA ที่ขนาดโมเลกุลเล็กกว่า (สั้นกว่า) จะเปลี่ยนทิศทางได้เร็วกว่า DNA ขนาดใหญ่ ดังนั้นการเปลี่ยนทิศทางของกระแสไฟฟ้าอย่างสม่ำเสมอจะทำให้ผลรวมของการเคลื่อนที่ตามทิศทาง c ของ DNA ที่โมเลกุลเล็กกว่าเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า จึงเกิดการแยกตามขนาดโมเลกุลของ DNA

สรุปแล้วการแยกของ DNA ใน PFG เกิดเนื่องจากความสามารถในการจัดตัวเปลี่ยนทิศทางการเคลื่อนที่ตามสนามไฟฟ้าที่เปลี่ยนสลับกันโดยอัตราการเปลี่ยนทิศและการเคลื่อนที่ขึ้นกับขนาดของโมเลกุล (Δ direction α number of base pair)

ปัจจัยสำคัญของการใช้เทคนิคนี้คือ การกำหนดขนาดของกระแสไฟฟ้าและระยะเวลาสำหรับผ่านกระแสสลับกัน (pulse time) แต่ละสนามซึ่งมีผลอย่างมากต่อการเคลื่อนที่ของ DNA ทำให้เกิดการแยกขึ้น pulse time ใน PFG อาจเป็นแบบใดแบบหนึ่ง ดังนี้

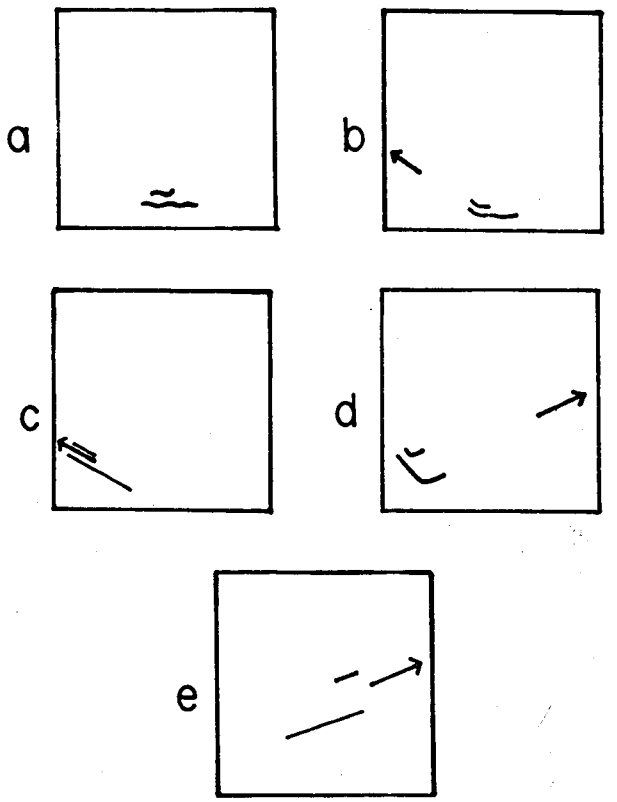

Figure 3 : Illustration of DNA separation based on molecular size; a : origin of DNA mixture; b : application of first electrical field ; c : DNA molecules are forced to strech out and migrate in the direction of the field; d : the field is switched off and a second field is applied in a perpendicular direction, the molecules are forced to reorientate before starting migration in the new field. Reorientation time of molecule is a function of the length of the molecule, thus, e : separation is achieved.

1. กรณีที่ pulse time สั้นเกินไป หมายถึงการผ่านกระแสในแต่ละทิศทาง ใช้เวลาสั้นเกินไปจะทำให้ผลรวมคล้ายกับการผ่านกระแสในทิศทางเดียวเนื่องจาก DNA ทั้งหมดยังไม่ทันเปลี่ยนทิศทางได้สมบูรณ์จึงไม่เกิดการแยกสำหรับ DNA โมเลกุลใหญ่เลย

2. กรณีที่ pulse time นานเกินไป หมายถึง การผ่านกระแสในแต่ละทิศทางใช้เวลานาน ทำให้หลังจากการเปลี่ยนทิศทางแล้วยังมีเวลาสำหรับการเคลื่อนที่อีกมาก ซึ่งการเคลื่อนที่นี้จะไม่ช่วยให้เกิดการแยกตามขนาดของโมเลกุล ดังได้กล่าวมาแล้วข้างต้น เป็นผลให้การแยกไม่ดีเท่าที่ควร

3. pulse time ที่ถูกต้องจะทำให้เกิดการแยกที่ดีที่สุด หมายถึง pulse time ที่ประมาณ 90% ของ pulse time จะถูกใช้ไปในการเปลี่ยนทิศทางของโมเลกุลทั้งหมด คือเป็นเวลาที่โมเลกุลขนาดใหญ่ที่สุดเปลี่ยนทิศทางเสร็จซึ่งในช่วงนี้โมเลกุลที่เล็กกว่าเปลี่ยนทิศทางเสร็จและเคลื่อนที่ล่วงหน้าไปแล้ว ส่วนอีก 10% pulse time จะเป็นเวลาการเคลื่อนที่ของ DNA ทั้งหมดด้วยอัตราเร็วที่เท่ากัน แต่เริ่มต้นจากจุดต่างกัน ดังรูปที่ 3 จึงเกิดการแยกขึ้น

เนื่องจากเมื่อทุกอย่างอยู่ในสภาพเหมาะสมแล้ว pulse time จะเป็นตัวกำหนดการแยกของ DNA ที่มีช่วงของขนาดโมเลกุลต่าง ๆ ได้ ดังนั้นเราจึงสามารถบอกช่วงของขนาดโมเลกุลของ DNA ที่แยกได้เมื่อเรากำหนด pulse time โดยการคูณ pulse time ด้วยค่าคงที่ก็จะทราบขนาดโมเลกุลของ DNA ที่แยกได้

ปัจจัยสำคัญอีกประการหนึ่งของเทคนิคนี้คือ การทำมุมกันระหว่างสนามไฟฟ้าทั้ง 2 ซึ่งมีผล 2 ประการคือ ประการแรกเป็นตัวกำหนดมุมสำหรับโมเลกุลที่จะเปลี่ยนทิศทางและยังทำให้การแยกของแต่ละแถบมีความคมชัดยิ่งขึ้น มุมที่เกิดขึ้นระหว่างสนามไฟฟ้าทั้ง 2 นี้จะต้องมากกว่า 90° จึงจะเกิดการแยกของโมเลกุล ถ้ามุมนี้แคบกว่า 90° จะไม่เกิดการแยกของโมเลกุลที่มีขนาดต่างกันเลย นอกจากนี้อุณหภูมิที่พอเหมาะและคงที่ตลอดก็เป็นปัจจัยที่จำเป็นสำหรับ PFG ด้วย

นอกจากนี้ PFG ยังสามารถแก้ปัญหาที่สำคัญอีกประการหนึ่งที่ได้กล่าวถึงในตอนแรกได้คือ การขาดหรือหักของ chromosomal DNA โมเลกุลใหญ่ในระหว่างที่ทำการแยกและวิเคราะห์โดยที่ขั้นตอนของการแยก ย่อย และใส่ใน agarose gel สำหรับ PFG นั้นเริ่มจากการนำเอาเซลล์ทั้งเซลล์มาหล่ออยู่ใน agarose block ที่เรียกว่า Insert[8,9]

แล้วจึงทำการย่อยเยื่อหุ้มเซลล์ โปรตีนภายในเซลล์ รวมทั้ง chromosomal protein ซึ่งจะแพร่ผ่าน Insert ออกมาเหลือไว้แต่ chromosomal DNA บริสุทธิ์ที่อยู่ในสภาพธรรมชาติและถูกป้องกันการหักและขาดโดย agarose ซึ่งเราสามารถนำ Insert นี้มาย่อยตัด DNA เป็นชิ้นเฉพาะด้วย restriction endonuclease เนื่องจากเอนซัยม์แพร่เข้าไปใน Insert นี้ได้[9-14] แล้วจึงนำ Insert นี้ไปใส่ในแผ่น agarose สำหรับทำ PFG ได้เลย ซึ่งขบวนการทั้งหมดนี้จะช่วยลดเวลา ขั้นตอน และแรงงานลงอย่างมาก

การประยุกต์

ถึงแม้ว่า PFG จะเป็นเทคนิคที่ค่อนข้างใหม่ แต่จนถึงปัจจุบันนี้ได้มีผู้นำไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง แม้จะดัดแปลงจากต้นแบบเดิมไปบ้าง แต่ก็ยังยึดหลักพื้นฐานในการสลับสนามไฟฟ้าใน 2 ทิศทางเหมือนเดิม[15-22] จากการที่เทคนิค PFG เปิดโอกาสให้สามารถทำการศึกษาชิ้นส่วนของ DNA ที่มีขนาดใหญ่กว่าเดิมถึง 100 เท่าได้ ย่อมช่วยลดเวลา แรงงานและขบวนการต่าง ๆ ในการวิเคราะห์ DNA ขนาดเดียวกันลงได้ถึง 100 เท่า นอกจากนี้ยังเป็นครั้งแรกที่การแยก chromosome จากสิ่งมีชีวิตอย่างมีประสิทธิภาพ ไม่จำเป็นต้องอาศัย metaphase condensation ประโยชน์ที่ได้รับจาก PFG อาจสรุปได้ดังนี้

1) สามารถทำแผนผังของ genome ทั้งหมดของ simple organisms เช่น ยีสต์ แบคทีเรีย โปรโตซัว และปาราสิต[8,23-26] ได้โดยใช้ agarose gel เพียงแผ่นเดียว

2) เมื่อใช้ PFG ตามด้วย Southern blot[27] (ย้าย DNA ที่แยกแล้วจาก agarose ลงสู่แผ่น nitrocellulose membrane) และ hybridization techniques[28] (การใช้ DNA-probe หรือ RNA-probe เพื่อตรวจหาตำแหน่งของ gene) จะทำให้ทราบถึงตำแหน่งของ gene (gene location) บน chromosome, ความผิดปกติของ chromosome หรือ oncogenes รวมถึงการทำ chromosome mapping ในคน[29,30]

3) ใช้ในการทำแผนผังของ gene (gene mapping) ที่เกี่ยวข้องกับ human major histocompatibility complex[14,31]

ในทางการแพทย์นั้นจะเห็นได้ว่านำเทคนิคนี้เข้ามาช่วยในการแก้ไขปัญหาที่เกี่ยวข้องกับการวินิจฉัยโรคตลอดจนการทำ prenatal diagnosis อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นแต่ลดขั้นตอนลง เนื่องจากศักยภาพในการแยก DNA ที่มีขนาดตั้งแต่ 5 Mb ขึ้นไปได้นี้ย่อมหมายถึงว่าสามารถที่จะวิเคราะห์ได้ 10% ของ genome ของคนบน agarose เพียงแผ่นเดียวและสามารถเลือกเอาส่วนของ genome ที่สนใจได้โดยใช้ probe ที่เหมาะสม ดังนั้นจึงสามารถจะบอกความแตกต่างของโครงสร้าง DNA ใน genome ที่ปกติและผิดปกติได้ง่ายและแม่นยำขึ้นกว่าเทคนิคเดิมที่ใช้ ๆ กันอยู่มาก

จากที่กล่าวมาแล้วทั้งหมดนี้จะเห็นว่า PFG สามารถอำนวยประโยชน์แก่การศึกษาวิจัยทางด้าน gene อย่างมาก โดยเฉพาะการศึกษาที่มีความซับซ้อนเกี่ยวกับโครงสร้างของ gene อันจะนำไปสู่ความรู้ ความเข้าใจซึ่งสามารถนำมาพัฒนาให้เกิดประโยชน์ในด้านการแพทย์ยิ่งขึ้น ผู้เขียนหวังเป็นอย่างยิ่งว่าเมื่อสามารถนำเทคนิคนี้เข้ามาใช้แล้วจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการทำ gene diagnosis ได้เป็นอย่างมาก

อ้างอิง

1. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York : Cold Spring Harbor Laboratory, New York : 1982.
2. Old RW, Primrose SB. Principles of Gene Manipulation : An Introduction to Genetic Engineering. Oxford : Blackwell, 1981.
3. Williams JG. The preparation and screening of cDNA clone bank : In : Williamson R, ed. Genetic Engineering 1. vol. 1, London : Academic Press, 1981. 1-59
4. Linn S, Arber W. Host specificity of DNA produced by Escherichia Coli $\underline{X}$. In vitro restriction of phage fd replicative form. Proc Natl Acad Sci USA 1968 Apr; 59: 1300-1306
5. Smith HO, Wilcox KW. A restriction enzyme from Haemophilus influenzae, I. Purification and general properties. J Mol Biol 1970 Jul 28; 51 : 379-391
6. Haberman A. The bacteriophage Pl restriction endonucliease. J Mol Biol 1974 Nov 15; 89 (4) : 545-563
7. Schwartz DC, Saffran W, Welsh J, Haas R, Goldenberg M, Cantor CR. New techniques for purifying large DNAs and studying their properties and packaging. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 1982 ; 47 (pt 1): 189-195
8. Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient electrophoresis. Cell 1984 May; 37 (1) : 67-75
9. Smith CL, Cantor CR. Pulsed field gel electrophoresis. In : Wu R, Grossman L, eds. Methods in Enzymology. Orlando : Academic Press, in press.
10. Smith CL, Warburton PW, Gaal A, Cantor CR. Pulsed field gel electrophoresis. In: Setlow J, Hollaender A, eds. Genetic Engineering. New York : Plenum; 1986 ; 8 : 45-70
11. Smith CL, Lawrance SK, Gillespie GA, Cantor CR, Weissman SM, Collins FS. Pulsed field gel electrophoresis. In : Gotteman M, ed. Methods in Enzymology. Orlando : Academic Press, in press.
12. Bernards A, Kooter J M, Michels P A M, Moberts R M P, Borst, P. Pulsed field gradient electrophoresis of DNA digested in agarose allows the sizing of the large duplication unit of a surface antigen gene in trypanosomes. Gene 1986 Mar, 42 (3) : 313-322
13. Brown W R A, Bird A P. Long-range restriction site mapping of mammalian genomic DNA. Nature 1986 Jul 31;322 (6078) : 477-481
14. Hardy D A, Bell J I, Long E O, Lindsten T, McDevitt H O. Mapping of the class II region of the human major histocompatibility complex by pulsed-field gel electrophoresis. Nature 1986 Oct 2;323 (0687) : 453-455
15. Carle G F, Frank M, Olson M V, Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. Science 1986 Apr 4 ; 232 (4746) : 65-68
16. Carle G F, Olson M V. Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field alternation gel electrophoresis. Nucleic Acids Res 1984 Jul; 12 (4) : 5647-5664
17. Smith C L, Cantor C R. Pulsed-field gel electrophoresis of large DNA molecules. Nature 1986 Feb 20;319 (6055) : 701-702
18. Burmeister M, Lehrach M. Long-range restriction map around the Duchenne muscular dystrophy gene. Nature 1986 Dec 11-17; 324 (6097) : 582-585
19. McPeek FD, Jr, Coyle-Morris J F, Gemmill R M. Separation of large DNA molecules by modified pulsed field grdient gel electrophroesis. Anal Biochem 1986 Aug 1; 156 (2): 274-285
20. Snell R G, Wilkins R J. Separation of chromosomal DNA molecules from C.albicans by pulsed field gel electrophoresis. Nucleic Acids Res 1986 Jun 11 ; 14 (11) : 4401-4406

21. Gardiner K Laas W, Patterson D. Fractionation of large mammalian DNA restriction fragments using vertical pulsed-field gradient gel electrophoresis. Somatic Cell Mol genet. 1986 Mar; 12 (2) : 185-195
22. Anand R. Pulsed field gel electrophoresis : a technique for fractionating large DNA molecules. Trends in Genetics 1986;2 (11) : 278-283
23. Olson M V, Dutchik J E, Graham M Y, Brodeur G M, Helms C, Frank M, MacCollin M, Scheinman R, Frank T. Randomclone strategy for genomic restriction mapping in yeast. Proc Natl Acad Sci USA. 1986 Oct ; 83 (20) : 7826-7830
24. Coulson A, Sulston J, Brenner S, Karn J. Toward a physical map of the genome of the nematode Caenorhabditis **elegans.** Proc Natl Acad Sci USA 1986 Oct; 83 (20) : 7821-7825
25. Van der Ploeg L H T, Schwartz D C, Cantor C R, Borst P. Antigenic variation in Trypanosoma brucei analyzed by electrophoretic separation of chromosome-sized DNA molecules. Cell 1984 May; 37) : 77-84
26. Smith CL, Warburton PW, Gaal A, Cantor CR. Analysis of genome organization and rearrangements by pulsed field gradient gel electrophoresis. In: Setlow JK, Hollaender A, eds. Genetic Engineering. New York : Plenum, 1986. 45-70
27. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 1975 Nov 5; 98 (3) : 503-517
28. Benton W D, Davis R W. Screening lambdagt recombinant clones by hybridization to plaques in situ. Science 1977 Apr 8 ; 196 (4286) : 180-182
29. Pritchard, C, Goodfellow P N. Development of new methods in human gene mapping : selection for fragments of the human Y chromosome after chromosome-mediated gene transfer. EMBO J 1986 May ; 5 (5) : 979-985
30. Smith C L, Cantor C R. Approaches to physical mapping of the human genome. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 1987 ; 51. in press
31. Lawrance S K, Srivasta R, Rigas B, Chorney M J, Gillespie G A, Smith C L, Cantor C R, Collins F S, Weissman S M. Molecular approaches to the characterization of megabase regions of the DNA: applications to the human major histocompatibility complex. Cold Spring Harbor Symp Suant Biol 1987 ; 51. in press.