

การทดสอบประสิทธิภาพสารเคมีทางเลือกสำหรับการย้อมแถบดีเอ็นเอทดแทนเอธิเดียมโบรไมด์ เพื่อยกระดับความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการชีววิทยา

วาสนา สวงศิลป์* และ ดวงพร เผือกหอม

ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ จังหวัดนครศรีธรรมราช 80160

*อีเมลของผู้ประพันธ์บทความ: wassana.co@mail.wu.ac.th

บทคัดย่อ

เอธิเดียมโบรไมด์เป็นสารเคมีที่นิยมนำมาใช้อย่างกว้างขวางทั้งในด้านการเรียนการสอนและงานวิจัยทางด้านชีวโมเลกุล เพื่อย้อมแถบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในแผ่นอะกาโรสเจล เนื่องจากสารนี้สามารถเข้าจับกับกรดนิวคลีอิกสายคู่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่เอธิเดียมโบรไมด์เป็นสารก่อมะเร็ง และมีอันตรายต่อสุขภาพของผู้ปฏิบัติงาน ปัจจุบันจึงได้มีการพัฒนาสารเคมีทางเลือกเพื่อใช้ทดแทนเอธิเดียมโบรไมด์จำนวนมาก ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีทางเลือกเปรียบเทียบกับเอธิเดียมโบรไมด์ ในการศึกษาที่ใช้สารเคมีทางเลือก 2 ชนิด คือ GelRed® และ SYBR® Safe เปรียบเทียบกับเอธิเดียมโบรไมด์ โดยย้อมแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส และแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส จำนวน 3 ชุด การทดลอง ชุดการทดลองละ 15 หลุม แล้วเปรียบเทียบความสว่างของแถบดีเอ็นเอในภาพถ่ายที่ได้จากสารย้อมทั้งสามชนิดโดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเฉดสีเทาซึ่งวิเคราะห์ได้โดยใช้โปรแกรมโฟโต้ช็อป ผลการศึกษาพบว่าเอธิเดียมโบรไมด์ GelRed® และ SYBR® Safe ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีความสว่างแตกต่างกัน ($p < 0.0001$) โดยแถบดีเอ็นเอที่ใช้สารย้อม GelRed® และ SYBR® Safe มีความสว่างมากกว่าแถบที่ดีเอ็นเอที่ใช้สารย้อม เอธิเดียมโบรไมด์ ($p < 0.0001$ ทั้งสองคู่) แต่สารย้อม GelRed® และ SYBR® Safe ให้ผลความสว่างของแถบดีเอ็นเอไม่แตกต่างกัน ($p = 0.5570$) ดังนั้นสารย้อมทั้งสองนี้สามารถใช้ทดแทนเอธิเดียมโบรไมด์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งการใช้สารทดแทนนี้จะเป็นการลดขยะอันตรายและทำให้ห้องปฏิบัติการมีความปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติงานตามมาตรฐานของโครงการยกระดับมาตรฐานความปลอดภัยห้องปฏิบัติการวิจัยในประเทศไทย (Enhancement of safety Practice of Research Laboratory in Thailand: ESPReL)

คำสำคัญ: GelRed® SYBR® Safe ความสว่าง ค่าเฉลี่ยเฉดสีเทา

Analysis of Laboratory skills and Chemical Preparation of Student of Packaging and Material Technology Program, Faculty of Agro-Industry

Wassana Sanguansil* and Tuangporn Peakhom

*The Center for Scientific and Technological Equipment, Walailak University,
Nakhon Si Thammarat, 80160, Thailand*

*Corresponding author's e-mail: wassana.co@mail.wu.ac.th

Abstract

Ethidium bromide is commonly used to stain DNA in molecular biology laboratories. Because this chemical can efficiently intercalate with nucleic but ethidium bromide is a mutagenic compound. Despite its advantages, its reputation as a mutagen activated the development of many alternative agents for safety reasons. Prior to use these alternative chemicals, however, the comparative study of DNA staining effectiveness between the alternatives and Ethidium bromide is needed to be quantified. In this study there were two commercial alternatives, GelRed® and SYBR® Safe, used to compare the effectiveness of DNA staining with Ethidium bromide. The brightness of DNA bands that appeared in agarose gel after electrophoresis were compared between the treatments of different staining agents, 15 wells each. The gels were then taken photos under UV light, and the mean gray value of each DNA band was using Adobe Photoshop software to represent the brightness of each band. The result indicated that the DNA staining effectiveness of the agents was different ($p < 0.0001$). Both alternative agents showed brighter DNA band under UV light rather than Ethidium bromide ($p < 0.0001$ for both pairs) but they show no difference from each other ($p = 0.5570$). This study suggested that GelRed® and SYBR® Safe can be effectively used instead of ethidium bromide to reduce toxic waste, as well as to promote safety standards in the laboratory according to the standard of the Enhancement of safety Practice of Research Laboratory in Thailand (ESPReL).

Keywords: GelRed®, SYBR® Safe, brightness, mean gray value

บทนำ

ห้องปฏิบัติการชีววิทยา ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ เป็นห้องปฏิบัติการที่ให้บริการการเรียนการสอนรายวิชาปฏิบัติการต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับสิ่งมีชีวิต ทั้งพืช สัตว์ รวมทั้ง สารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ แต่ละปฏิบัติการมีการใช้สารเคมีที่จำเพาะแตกต่างกัน โดยเฉพาะปฏิบัติการพันธุศาสตร์ ระดับโมเลกุล ซึ่งเป็นปฏิบัติการที่ศึกษาในระดับโมเลกุลของสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ ที่มีความสัมพันธ์กันภายในเซลล์ของ สิ่งมีชีวิต เน้นการศึกษาโครงสร้างของยีน ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และโปรตีน (Breaker and Joyce, 2014) ดังนั้นในการ ทำปฏิบัติการจึงจำเป็นต้องใช้สารเคมีที่เกี่ยวข้องจำนวนมาก โดยเฉพาะเอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) ซึ่งเป็น สารเคมีที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจสอบชิ้นส่วนและขนาดของดีเอ็นเอที่สนใจ

เอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) เป็นสารเคมีประเภทของแข็ง มีลักษณะเป็นผลึกสีแดง ไม่ระเหย ละลายน้ำได้ปานกลาง (Behzad *et al.*, 2016) ปัจจุบันมีการนำเอธิเดียมโบรไมด์มาใช้อย่างกว้างขวางในห้องปฏิบัติการสำหรับการเรียนการสอนและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารชีวโมเลกุล โดยเฉพาะการศึกษาด้านชีวเคมี ในงานเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis) ทั้งวิธีการเติมเอธิเดียมโบรไมด์ลงในตัวอย่างดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ การผสม กับอะกาโรสเจล (agarose gel) และการแช่แผ่นอะกาโรสเจลในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์หลังจากเสร็จสิ้นการทำ เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ทั้งนี้เอธิเดียมโบรไมด์มีคุณสมบัติในการเข้าจับและแทรกระหว่างเกลียวของดีเอ็นเอและเรืองแสง ภายใต้แสงยูวี (Pinar and Oguz, 2013) ทำให้สามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอและสามารถแยกขนาดและจำแนกแถบ ดีเอ็นเอได้ แม้ว่าเอธิเดียมโบรไมด์เป็นสารที่มีประสิทธิภาพสูงในการย้อมจับกับดีเอ็นเอ แต่จัดเป็นสารเคมีที่มีความเป็น อันตรายต่อสุขภาพทั้งในระยะสั้นและระยะยาว โดยสามารถซึมผ่านผิวหนังเข้าสู่ร่างกายได้ง่าย เกิดการระคายเคือง ตา ปาก ระบบทางเดินหายใจส่วนบน และที่สำคัญยังเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) สามารถชักนำให้ยีนในร่างกาย เกิดการสร้างโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไป ก่อให้เกิดโรคมะเร็งได้ (Gherghi *et al.*, 2004) ในการใช้งานผู้ปฏิบัติงานจึง ต้องมีการจัดการอย่างเป็นระบบ มีมาตรการป้องกันตั้งแต่การป้องกันส่วนบุคคล แยกพื้นที่ปฏิบัติงานออกจากพื้นที่ อื่น ๆ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนสู่บุคคลและสิ่งแวดล้อม และการจัดการของเสียที่ปนเปื้อนอย่างเหมาะสม โดยขยะ ปนเปื้อนเอธิเดียมโบรไมด์ เช่น ถุงมือ กระดาษทิชชู ปลายปิเปตทิป และเจล เป็นต้น ให้เก็บแยกจากขยะและของเสีย อื่น ๆ ในส่วนของของเหลวหรือสารละลายที่ปนเปื้อนเอธิเดียมโบรไมด์ห้ามเททิ้งในอ่างน้ำโดยเด็ดขาด และส่งกำจัด โดยวิธีการเผาเท่านั้น

จากความเป็นอันตรายและผลกระทบดังกล่าว ปัจจุบันบริษัทและหน่วยงานต่าง ๆ จึงได้คิดค้น และผลิต สารเคมีทางเลือกเพื่อใช้ทดแทนเอธิเดียมโบรไมด์เป็นจำนวนมาก โดยได้พัฒนาประสิทธิภาพให้เทียบเท่าเอธิเดียมโบร ไมด์ และทดสอบความเป็นพิษว่ามีความปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติงานและสิ่งแวดล้อม เช่น SYBR® Safe, GelRed®, Gelgreen เป็นต้น ซึ่งการนำสารเหล่านี้มาใช้ทดแทนก็ควรมีการนำมาทดสอบประสิทธิภาพด้วยตนเองก่อนเพื่อความ มั่นใจว่าสารทดแทนดังกล่าวมีประสิทธิภาพเทียบเท่าหรือมากกว่าเอธิเดียมโบรไมด์

ด้วยความตระหนักถึงความปลอดภัยของผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ เพื่อลดการสัมผัสสารเคมีอันตราย ประกอบกับได้มีการยกระดับพัฒนาห้องปฏิบัติการชีววิทยาสู่ห้องปฏิบัติการปลอดภัยตามโครงการยกระดับมาตรฐาน ความปลอดภัยห้องปฏิบัติการวิจัยในประเทศไทย (ESPreL) โดยการประเมินความปลอดภัยด้วยตนเองตามระบบ ESPReL Checklist ในส่วนขององค์ประกอบที่ 3 การจัดการของเสีย ให้มีการลดการเกิดของเสียหรือขยะปนเปื้อน (โครงการยกระดับมาตรฐานความปลอดภัยห้องปฏิบัติการวิจัยในประเทศไทย, 2557) ด้วยการใช้สารทดแทนที่มีความ ปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติงาน และไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม และเนื่องจากความเป็นพิษของเอธิเดียมโบรไมด์ในด้านต่าง ๆ ดังที่กล่าวมาข้างต้น รวมถึงข้อจำกัดเรื่องงบประมาณในการจัดการของเสียปนเปื้อนที่เกิดขึ้น ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดว่าสาร ทดแทน หรือใช้สารเคมีทางเลือกชนิดอื่นที่มีประสิทธิภาพเทียบเท่า แต่มีความปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติงานแทนการใช้เอธิ เดียมโบรไมด์ โดยการนำตัวอย่างดีเอ็นเอมาทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และนำแผ่นอะกาโรสเจลมาศึกษาเปรียบเทียบ

ประสิทธิภาพ ระหว่างการใช้สารเคมีทางเลือกกับเอธิเดียมโบรไมด์ในห้องปฏิบัติการชีววิทยา รวมทั้งวิเคราะห์ข้อดี ข้อเสีย ความปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติงาน และการจัดการของเสีย ทั้งนี้เพื่อความปลอดภัยของผู้ปฏิบัติงาน นักเรียน นักศึกษา คณาจารย์ และผู้ที่เกี่ยวข้อง ส่งผลให้เกิดประโยชน์ในด้านการพัฒนา ปรับปรุงการปฏิบัติงานต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพสารเคมีทางเลือกทดแทนเอธิเดียมโบรไมด์สำหรับการเรียนการสอน ปฏิบัติการในห้องปฏิบัติการชีววิทยา
2. เพื่อลดปริมาณของเสียปนเปื้อนเอธิเดียมโบรไมด์ในห้องปฏิบัติการชีววิทยา
3. เพื่อพัฒนาห้องปฏิบัติการชีววิทยาให้มีความปลอดภัยตามโครงการยกระดับมาตรฐานความปลอดภัย ห้องปฏิบัติการวิจัยในประเทศไทย (ESPreL)

ระเบียบวิธีวิจัย

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

สกัดดีเอ็นเอจากใบต้นแก้ว *Murraya paniculata* ด้วยวิธี CTAB (Doyle and Doyle, 1990) เพิ่มปริมาณ ชิ้นส่วนยีนที่สนใจด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) หรือ พีซีอาร์ (PCR) ในหลอดทดลอง โดยใช้ไพรเมอร์ Forward; ITS 5p (5'-GGAGG AGA AGT CGT AAC AAG G-3') และไพรเมอร์ Reverse; ITS 8p (5'-CAC GCT TCT CCA GAC TAC A-3') (Moller and Cronk, 1997a) ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร โดยประกอบด้วย 10 เท่าของบัฟเฟอร์ 5 ไมโครลิตร 2.5 มิลลิโมลของ dNTPs 1 ไมโครลิตร 10 ไมโครโมลาร์ของไพรเมอร์ Forward 1 ไมโครลิตร 10 ไมโครโมลาร์ของไพรเมอร์ Reverse 1 ไมโครลิตร 5 หน่วย ของ Taq DNA polymerase 0.4 ไมโครลิตร 500 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรของดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 40.6 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร แล้วนำไปใส่ในเครื่อง PCR: T100TM Thermal Cycler (BIO-RAD, USA) โดยให้เครื่องทำการปรับอุณหภูมิอัตโนมัติ ดังนี้ ขั้นที่ 1 เริ่มต้น ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ขั้นที่ 2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 30 รอบ ประกอบด้วย อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และขั้นที่ 3 เป็นขั้นตอนสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

การเตรียมอะกาโรสเจล

อะกาโรส (agarose) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายสีแดง (Zarrintaj *et al.*, 2018) ซึ่งเป็นสาร ตัวกลางที่นิยมนำมาใช้แยกสารโมเลกุลด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (Jeppson *et al.*, 1979) การศึกษาครั้งนี้ เตรียมอะกาโรสเจลที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร จำนวน 3 ชุดการ ทดลอง โดยชั่งผงอะกาโรส 0.45 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำ 1 เท่า ของบัฟเฟอร์ TBE 30 มิลลิลิตรลงไป เขย่าให้ให้เข้ากัน จากนั้นนำทั้งสามชุดการทดลองเข้าไมโครเวฟที่ความร้อนสูงสุด (900 วัตต์; SHARP R-3A88) เป็นเวลา 2 นาที เพื่อละลายผงอะกาโรส โดยนำออกมาเขย่าเป็นระยะ ๆ จนผงอะกาโรสละลายหมด ตั้งพัก ให้อุณหภูมิลดลง 55-60 องศาเซลเซียส ระหว่างรออะกาโรสเจลงเย็นตัว ให้เตรียมถาด (tray) ขนาด 7 ซม. X 10 ซม. สำหรับสร้างแผ่นเจล และหวี (comb) สำหรับสร้างหลุมในแผ่นเจล เมื่ออะกาโรสเจลงเย็นให้เทอะกาโรสเจลงในถาด เตรียมเจลชุดที่หนึ่ง เทอะกาโรสเจที่ผสม GelRed® 3 ไมโครลิตรลงในถาดเตรียมเจลชุดที่สอง และเทอะกาโรสเจ ที่ผสม SYBR® safe 3 ไมโครลิตรลงในถาดเตรียมเจลชุดที่สาม โดยเตรียมทั้งหมด 3 ชุดต่อชุดการทดลอง ตั้งทิ้งไว้จน เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง 15-20 นาที แล้วจึงค่อย ๆ ดึงหวีออก จากนั้นนำถาดเจลทั้งสามชุดวางในอ่างบัฟเฟอร์ แล้ว

เท 1 เท้า ของบัฟเฟอร์ TBE ลงในอ่างบัฟเฟอร์ให้ท่วมแผ่นเจล รอโหลด (load) ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เอ็นเอ (PCR product) ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสลงในหลุม (well) ของอะกาโรสเจล

การโหลดตัวอย่าง และการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

ผสมตัวอย่างดีเอ็นเอกับ loading dye ในอัตราส่วน 5:1 จากนั้นโหลดตัวอย่างลงในหลุมบนแผ่นอะกาโรสเจล ด้วยไมโครปิเปต ใช้ตัวอย่าง 10 ไมโครลิตรต่อหลุม โดยแต่ละแผ่นเจลโหลดตัวอย่างจำนวน 5 ตัวอย่าง (จำนวน 15 หลุมต่อการทดลอง) และโหลดดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp DNA ladder (biotechrabbit GmbH, Germany) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงในหลุมอะกาโรสเจลช่องแรกของแต่ละชุดการทดลอง เพื่อเป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน เปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอ จากนั้นต่อขั้วไฟฟ้าทั้งสองของอ่างบัฟเฟอร์เข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า (power supply) โดยตั้งค่าให้กระแสไฟฟ้าวิ่งจากขั้วลบไปขั้วบวก ใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที ทำอิเล็กโตรโฟรีซิส จนสีย้อมตัวอย่างอยู่ห่างจากปลายแผ่นเจลทางด้านล่างประมาณ 1 เซนติเมตร ปิดเครื่อง จากนั้นนำแผ่นเจลชุดที่หนึ่ง ไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ก่อนส่องดูแถบดีเอ็นเอ ส่วนแผ่นเจลชุดที่สองและชุดที่สามสามารถนำไปส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวีได้ทันที

การย้อมเจลและการเปรียบเทียบความสว่างของแถบดีเอ็นเอ

นำแผ่นอะกาโรสเจลชุดที่หนึ่ง ไปย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที และล้างแผ่นอะกาโรสเจลด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำแผ่นอะกาโรสเจลไปส่องดูภายใต้แสงยูวี ด้วยเครื่อง UV-transilluminator ที่ความเข้มแสงยูวี 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแผ่นอะกาโรสเจลชุดที่สอง และชุดที่สาม สามารถนำไปส่องดูภายใต้แสงยูวีได้ทันที ด้วยเครื่อง UV-transilluminator ที่ความเข้มแสงยูวี 100 เปอร์เซ็นต์เช่นกัน จากนั้นถ่ายภาพ และวิเคราะห์ความสว่างของแถบดีเอ็นเอแต่ละแถบโดยใช้ฟังก์ชัน Image Analysis ของโปรแกรม Adobe Photoshop version 21.0.3 เพื่อหาค่าเฉลี่ยเกรดสีเทา (mean gray value) ของพิกเซลในพื้นที่แถบดีเอ็นเอเป้าหมาย (800 คู่เบส) ของแต่ละชุดการทดลอง โดยค่าดังกล่าวจะอยู่ระหว่าง 0 (สีดำ) ถึง 255 (สีขาว) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเกรดสีเทาระหว่างชุดการทดลองทั้งสามชุด

การวิเคราะห์ผลการศึกษา

ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเกรดสีเทาระหว่างชุดการทดลองโดยใช้ One-way ANOVA และเปรียบเทียบพหุคูณโดยใช้ Bonferroni test โดยใช้ฟังก์ชัน Analysis Toolpak ของโปรแกรม Microsoft Excel version Home and Student 2021

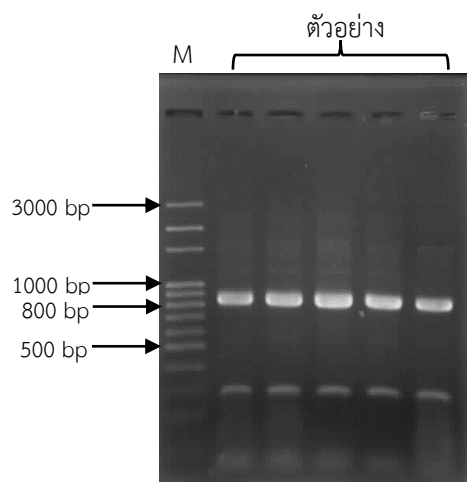
การวิเคราะห์เปรียบเทียบการใช้งานสารเคมีทางเลือกทดแทนเอธิเดียมโบรไมด์

วิเคราะห์เปรียบเทียบสารเคมีทางเลือกทดแทนเอธิเดียมโบรไมด์ ทั้งการใช้งาน ความเป็นอันตราย วิธีการกำจัดของเสีย งบประมาณ ความปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติงาน และข้อควรระวัง ในรูปแบบตารางและการบรรยายให้เห็นถึงข้อดี ข้อเสีย และความปลอดภัยในการใช้สารเคมีในห้องปฏิบัติการ

ผลการวิจัย

การทำอิเล็กโตรโฟรีซิส และการย้อมแถบดีเอ็นเอ

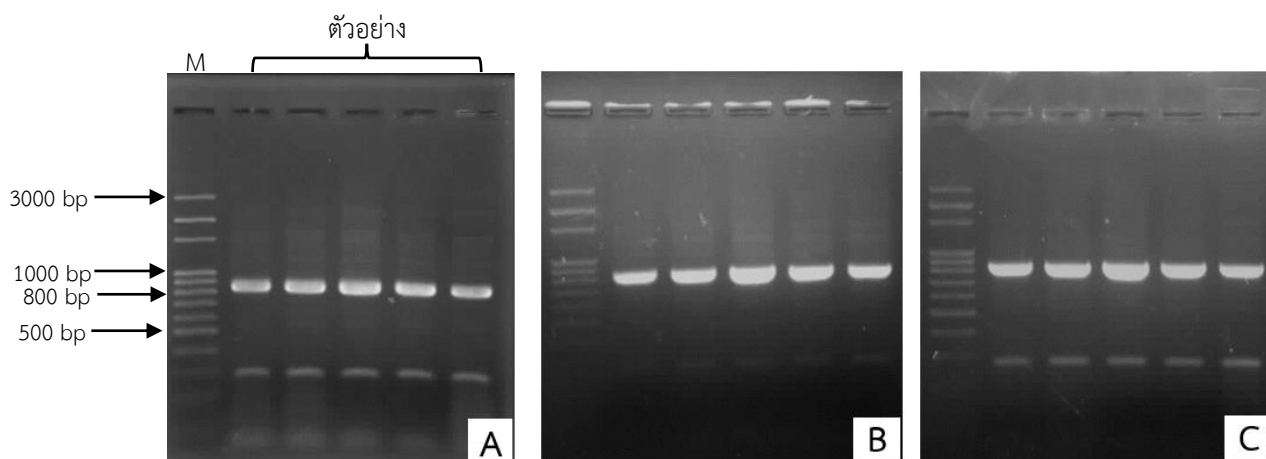
จากการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส เพื่อดูขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยใช้อะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ และให้กระแสไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที หลังจากนำแผ่นอะกาโรสเจลไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวี พบว่าดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาด 800 คู่เบส (bp) เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 แสดงแถบดีเอ็นเอตัวอย่างภายใต้แสงยูวีจากการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสด้วยอะกาโรสเจลเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ และย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ 100 bp DNA ladder เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน (M)

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพสารเคมีทางเลือกทดแทนเอธิเดียมโบรไมด์

จากการทดสอบประสิทธิภาพสารเคมีทางเลือกทดแทนเอธิเดียมโบรไมด์สำหรับการย้อมแถบดีเอ็นเอในห้องปฏิบัติการชีววิทยา โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สนใจด้วยเทคนิคปฏิกิริยาโพลีเมอเรส และทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ 100 bp DNA ladder เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน จากนั้นนำแผ่นอะกาโรสเจลมาย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ภาพที่ 2A) เปรียบเทียบกับสารเคมีทางเลือก 2 ชนิด คือ GelRed® (ภาพที่ 2B) และ SYBR® Safe (ภาพที่ 2C) พบว่า แถบดีเอ็นเอที่ย้อมด้วยสารเคมีทางเลือกทดแทนเอธิเดียมโบรไมด์มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับแถบดีเอ็นเอที่ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์



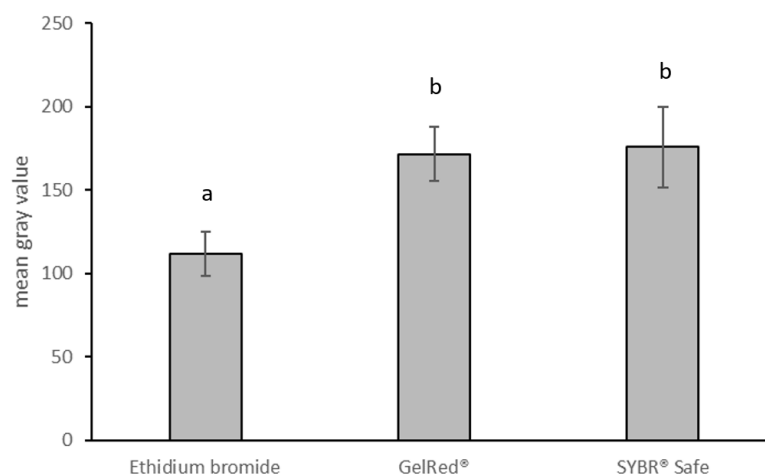
ภาพที่ 2 แสดงแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวีจากการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสด้วยอะกาโรสเจลเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ และย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (A) GelRed® (B) และ SYBR® Safe (C)

จากการวิเคราะห์ความสว่างของแถบดีเอ็นเอในแผ่นอะกาโรสเจลโดยใช้ค่าเฉลี่ยเฉดสีเทา (mean gray value) ของแถบดีเอ็นเอ พบว่าความสว่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากสารย้อมทั้งสามมีความแตกต่างกันอย่างมี

นัยสำคัญ ($p < 0.0001$; ตารางที่ 1) และจากการทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มพบว่าแถบดีเอ็นเอที่ใช้สีย้อม GelRed® และ SYBR® Safe มีความสว่างมากกว่าแถบที่ดีเอ็นเอที่ใช้สีย้อมเอธิเดียมโบรไมด์ ($p < 0.0001$ ทั้งสองคู่) แต่สีย้อม GelRed® และ SYBR® Safe ให้ผลความสว่างของแถบดีเอ็นเอไม่แตกต่างกัน ($p = 0.5570$) (ภาพที่ 3)

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) ของความแตกต่างระหว่างความสว่างของแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวีระหว่างชุดการทดลองที่ทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสด้วยอะกาโรสเจลเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ และย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย เอธิเดียมโบรไมด์ (A) GelRed® (B) และ SYBR® Safe (C) โดยใช้ค่าเฉลี่ยเฉดสีเทาที่วิเคราะห์จากพื้นที่พิกเซลของแถบดีเอ็นเอในไฟล์ภาพ โดยใช้ฟังก์ชัน Image Analysis ของโปรแกรม Adobe Photoshop

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups (A, B/C)	38630.98	2	19315.49	56.4833	1.24E-12	3.219942
Within Groups (B/C)	14362.67	42	341.9683			
Total	52993.64	44				



ภาพที่ 3 เปรียบเทียบความสว่างของแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวีระหว่างชุดการทดลองที่ทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสด้วยอะกาโรสเจลเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ และย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (A) GelRed® (B) และ SYBR® Safe (C) โดยใช้ค่าเฉลี่ยเฉดสีเทา ($\pm$ SD) ที่วิเคราะห์จากพื้นที่พิกเซลของแถบดีเอ็นเอเป้าหมาย (800 bp) ในไฟล์ภาพ โดยใช้ฟังก์ชัน Image Analysis ของโปรแกรม Adobe Photoshop

นอกจากนี้จากผลการวิเคราะห์การใช้สารเคมีทางเลือกทดแทนเอธิเดียมโบรไมด์พบว่ามีประสิทธิภาพในการเข้าจับกับดีเอ็นเอเทียบเท่ากับเอธิเดียมโบรไมด์ โดยสามารถใช้ได้กับดีเอ็นเอปริมาณน้อย ๆ อีกทั้งยังมีความสะดวกใน

การใช้งาน และไม่มีรายงานความเป็นอันตรายต่อสุขภาพต่อผู้ใช้งานและสิ่งแวดล้อมอีกด้วย อย่างไรก็ตามการใช้งานสารเคมีทางเลือกทดแทนเอธิเดียมโบรไมด์ ยังคงต้องคำนึงถึงชนิดของสารเคมีทางเลือกที่จะนำมาใช้ เนื่องจากบางชนิดยังมีราคาแพงเมื่อเทียบกับเอธิเดียมโบรไมด์ ซึ่งจะส่งผลต่อต้นทุนที่จะเกิดขึ้นในห้องปฏิบัติการ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบการใช้งานเอธิเดียมโบรไมด์กับสารเคมีทางเลือกทดแทนเอธิเดียมโบรไมด์*

ลักษณะ	เอธิเดียมโบรไมด์	GelRed®	SYBR® Safe
ความเข้มข้น	10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร	10,000 เท่า	10,000 เท่า
ปริมาตร/ขวด (มิลลิลิตร)	10	1	0.4
ราคา/ขวด (บาท)	2,000	2,600	8,300
ราคา/ไมโครลิตร (บาท)	0.2	2.6	20.75
ปริมาตร/ภาคการศึกษา (ไมโครลิตร)	1,000	60	60
ราคา/ภาคการศึกษา (บาท)	200	156	1,245
การใช้งาน	ผสมน้ำ ใช้ย้อมแผ่นอะกาโรสเจล หลังการทำให้เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส	ผสมกับอะกาโรสเจล ก่อนเทเจลใส่ถาดเตรียมเจล	ผสมกับอะกาโรสเจล ก่อนเทเจลใส่ถาดเตรียมเจล
อัตราส่วน	1 มิลลิลิตร: น้ำ 1 ลิตร	1 ไมโครลิตร: อะกาโรสเจล 10 มิลลิลิตร	1 ไมโครลิตร: อะกาโรสเจล 10 มิลลิลิตร
การดูภายใต้แสงยูวี	ย้อมแผ่นอะกาโรสเจล 10 นาที และล้างน้ำ 5 นาที	ดูภายใต้แสงยูวีได้ทันที	ดูภายใต้แสงยูวีได้ทันที
การก่อกวน	เป็นสารก่อกวน	ไม่มีรายงานสารก่อกวน	ไม่มีรายงานสารก่อกวน

*ข้อมูลการใช้เอธิเดียมโบรไมด์ และสารทดแทนเอธิเดียมโบรไมด์ประจำภาคการศึกษา 1/2566 รายวิชาปฏิบัติการพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

จากการดำเนินงานการจัดการของเสียปนเปื้อนเอธิเดียมโบรไมด์ในห้องปฏิบัติการชีววิทยา ภายใต้โครงการยกระดับมาตรฐานความปลอดภัยห้องปฏิบัติการวิจัยในประเทศไทย (ESPreL) นอกจากจะมีการใช้งานภายใต้มาตรการความปลอดภัยแล้ว ผู้ปฏิบัติงานจะต้องจัดเก็บของเสียให้ถูกวิธี ทั้งของเสียชนิดของแข็งและของเสียชนิดของเหลวที่ปนเปื้อนเอธิเดียมโบรไมด์ และส่งกำจัดด้วยวิธีการเผาเท่านั้น ทั้งนี้จากการวิเคราะห์ปริมาณขยะปนเปื้อนเอธิเดียมโบรไมด์ในห้องปฏิบัติการชีววิทยาระหว่างปี 2560-2563 พบว่ามีของเสียปนเปื้อนเอธิเดียมโบรไมด์ทั้งชนิดที่เป็นของแข็ง และชนิดที่เป็นของเหลวจำนวน 73 กิโลกรัม ส่งผลให้มีต้นทุนและงบประมาณในการจัดการของเสียในห้องปฏิบัติการเพิ่มขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การจัดการของเสียปนเปื้อนเอธิเดียมโบรไมด์ ในห้องปฏิบัติการชีววิทยา*

รายละเอียด	การจัดการ
พื้นที่ปฏิบัติงาน	แยกพื้นที่พิเศษ ไม่รวมกับพื้นที่ปฏิบัติงานอื่น
การจัดเก็บของเสียปนเปื้อน	ของเสียชนิดของแข็ง: แยกจัดเก็บในภาชนะ พลาสติก โดยแยกระหว่างแผ่นอะกาโรสเจล และของแข็งปนเปื้อนอื่น ๆ เช่น ปลายทิวป์ ถุงมือ และกระดาษทิชชู เป็นต้น ของเสียชนิดของเหลว: ห้ามเททิ้งในอ่างน้ำเด็ดขาด โดยจัดเก็บในถังเก็บของเสียพิเศษ และส่งกำจัด

รายละเอียด	การจัดการ
พื้นที่จัดเก็บของเสีย	แยกพื้นที่พิเศษที่ห่างไกลพื้นที่ใช้งานอื่น และระบุพื้นที่และข้อความเตือนให้เห็นอย่างชัดเจน
การป้องกันการหก รั่วไหล	1. เตรียมชุดน้ำยากำจัดการปนเปื้อนของเอธิเดียมโบรไมด์ ไว้พร้อมใช้งานได้ทันที 2. หากมีการหกของเอธิเดียมโบรไมด์ ให้เช็ดทำความสะอาดด้วยผ้าเปียกและทิ้งผ้าลงในถังขยะสารเคมี หากมีการรั่วของของเหลวให้ซับด้วยกระดาษซับจนแห้ง แล้วใช้แสง UV ส่องตรวจเอธิเดียมโบรไมด์ที่หลงเหลืออยู่
การกำจัดของเสีย ปนเปื้อน	การเผาเท่านั้น
งบประมาณการจัดการ ของเสียปนเปื้อน (บาท)	ของเสียชนิดของแข็ง จำนวน 22 กิโลกรัม งบประมาณกำจัด 580.58 บาท ของเสียชนิดของเหลว จำนวน 51 กิโลกรัม งบประมาณกำจัด 1,345.89 บาท
*ข้อมูลปี 2564	

*ข้อมูล: การส่งกำจัดของเสียโดยบริษัทรับกำจัดในปี 2564 โดยเฉลี่ยกิโลกรัมละ 26.39 บาท

จากการศึกษาข้อมูล และเอกสารสำหรับสารเคมีทางเลือกทดแทนเอธิเดียมโบรไมด์ พบว่ายังไม่มีรายงานความเป็นอันตราย และความเป็นพิษ สามารถใช้งานร่วมกับวัสดุ อุปกรณ์อื่น ๆ ได้ โดยไม่ต้องแยกพื้นที่พิเศษ นอกจากนี้แผ่นอะกาโรสเจล สามารถทั้งเป็นขยะปนเปื้อนสารเคมีทั่วไป สารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้กับแผ่นอะกาโรสเจลสามารถนำมาใช้ซ้ำได้ และเบื้องต้นไม่มีต้นทุนการจัดเก็บและการกำจัด

สรุปผลการวิจัย

การทดสอบประสิทธิภาพสารเคมีทางเลือกทดแทนเอธิเดียมโบรไมด์

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีทางเลือกทดแทนเอธิเดียมโบรไมด์ทั้ง 2 ชนิด คือ GelRed® และ SYBR® Safe เพื่อใช้ศึกษาแถบดีเอ็นเอบนแผ่นอะกาโรสเจลสำหรับห้องปฏิบัติการชีววิทยา มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ พบว่าสารเคมีทางเลือกทั้ง 2 ชนิด สามารถวิเคราะห์แถบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ (PCR product) ได้อย่างมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับเอธิเดียมโบรไมด์ โดยผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยเจดสีเทาของแถบดีเอ็นเอ พบว่าความสว่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากสารย้อมทั้งสามชุดการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.0001$) และจากการทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มพบว่าแถบดีเอ็นเอที่ใช้สารย้อม GelRed® และ SYBR® Safe มีความสว่างมากกว่าแถบดีเอ็นเอที่ใช้สารย้อม เอธิเดียมโบรไมด์ ($p < 0.0001$ ทั้งสองคู่) แต่สารย้อม GelRed® และ SYBR® Safe ให้ผลความสว่างของแถบดีเอ็นเอไม่แตกต่างกัน ($p = 0.5570$) ดังนั้นสารย้อมทั้งสองนี้สามารถใช้ทดแทนเอธิเดียมโบรไมด์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

นอกจากนี้ จากการวิเคราะห์การใช้งานของสารเคมีทางเลือกทดแทนเอธิเดียมโบรไมด์ พบว่าสามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอได้อย่างมีประสิทธิภาพ แมตต์เอ็นเอมีความเข้มข้นน้อยเพียง 0.625 - 1.25 นาโนกรัมสำหรับ GelRed® และ 2.5 นาโนกรัมสำหรับ SYBR® Safe (Mikhail *et al.*, 2017) อีกทั้งวิธีการใช้งานสะดวก และรวดเร็ว โดยการผสมสารเคมีทางเลือกในอะกาโรสเจลในอัตราส่วน 1 ไมโครลิตรต่อ 10 มิลลิตร และยังไม่มีรายงานความเป็นอันตรายและการก่อกลายพันธุ์ของสารเคมีทางเลือก ดังนั้นจึงมีความปลอดภัยต่อสุขภาพของผู้ปฏิบัติงาน ผู้ที่เกี่ยวข้อง และสิ่งแวดล้อม และจากการเปรียบเทียบต้นทุนการใช้งานต่อภาคการศึกษาของเอธิเดียมโบรไมด์ GelRed® และ SYBR® Safe พบว่าเท่ากับ 200 บาท 156 บาท และ 1,245 บาท ตามลำดับ

การจัดการของเสียปนเปื้อนเอธิเดียมโบรไมด์

การจัดการของเสียปนเปื้อนเอธิเดียมโบรไมด์สำหรับการเรียนปฏิบัติการชีววิทยา ได้ดำเนินการภายใต้การดำเนินงานตามโครงการยกระดับมาตรฐานความปลอดภัยห้องปฏิบัติการวิจัยในประเทศไทย (ESPreL) โดยจัดเก็บของแข็ง และของเหลวปนเปื้อนเอธิเดียมโบรไมด์ในภาชนะที่กำหนด ในพื้นที่ที่แยกเป็นพิเศษ และส่งกำจัดด้วยบริษัทรับกำจัด จากข้อมูลการจัดการของเสียปนเปื้อนเอธิเดียมโบรไมด์ในห้องปฏิบัติการชีววิทยาระหว่างปี 2560-2563 พบว่ามีจำนวน 73 กิโลกรัม ใช้งบประมาณในการกำจัด จำนวน 1,926.47 บาท ดังนั้นการจัดหาสารเคมีทางเลือกมาใช้ทดแทนเอธิเดียมโบรไมด์มาใช้ในห้องปฏิบัติการชีววิทยา นอกจากจะสามารถลดปริมาณของเสียปนเปื้อนเอธิเดียมโบรไมด์ ต้นทุนการจัดเก็บ และงบประมาณในการกำจัดแล้ว ยังเป็นการส่งเสริมให้ห้องปฏิบัติการมีความปลอดภัยสำหรับการเรียนการสอนปฏิบัติการอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการทดสอบประสิทธิภาพสารเคมีทางเลือกทดแทนเอธิเดียมโบรไมด์จำนวน 2 ชนิด คือ GelRed® และ SYBR® Safe ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ทดแทนเอธิเดียมโบรไมด์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากการวิเคราะห์ความสว่างของแถบดีเอ็นเอภายในแผ่นอะกาโรสเจล โดยใช้ค่าเฉลี่ยเฉดสีเทา ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการย้อมด้วยสารเคมีทางเลือกมีความสว่างมากกว่าแถบดีเอ็นเอที่ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และเมื่อนำไปวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) ของความแตกต่างระหว่างความสว่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างชุดการทดลอง พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์มีความแตกต่างกับแถบดีเอ็นเอที่ย้อมด้วยสารเคมีทางเลือกอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.0001$) แต่ความสว่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการย้อมด้วยสารเคมีทางเลือกทั้งสองชนิดไม่มีความแตกต่าง ทั้งนี้เนื่องจาก GelRed® และ SYBR® Safe สามารถจับกับดีเอ็นเอได้อย่างมีประสิทธิภาพแม้มีความเข้มข้นเพียง 0.62 - 1.25 นาโนกรัม และ 2.50 นาโนกรัม ตามลำดับ ขณะที่เอธิเดียมโบรไมด์ ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอความเข้มข้น 1-5 นาโนกรัม (Biotium, 2008; Frank, 1994)

อย่างไรก็ตามแม้สารเคมีทางเลือกทดแทนเอธิเดียมโบรไมด์จะมีประสิทธิภาพสูงในการใช้งาน แต่การจัดซื้อใช้งานในห้องปฏิบัติการยังคงต้องคำนึงถึงราคาต้นทุนต่อภาคการศึกษาอีกด้วย ซึ่งจากการศึกษาราคาต้นทุนต่อภาคการศึกษาของเอธิเดียมโบรไมด์ GelRed® และ SYBR® Safe คือ 200 บาท 156 บาท และ 1,245 บาท ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่า SYBR® Safe มีราคาสูงมาก ถ้าใช้ในปริมาณมาก ๆ จะเป็นเพิ่มค่าใช้จ่ายสำหรับห้องปฏิบัติการ ในขณะที่ GelRed® มีราคาน้อยกว่าเอธิเดียมโบรไมด์ และให้ประสิทธิภาพเทียบเท่าเอธิเดียมโบรไมด์ จึงเหมาะสำหรับการใช้เป็นสารเคมีทดแทนเอธิเดียมโบรไมด์

การใช้สารเคมีทางเลือกทดแทนเอธิเดียมโบรไมด์ในห้องปฏิบัติการ นอกจากจะคำนึงถึงประสิทธิภาพในการใช้งานแล้วยังคำนึงถึงความปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติงานอีกด้วย เนื่องจากเอธิเดียมโบรไมด์เป็นสารที่มีการรายงานถึงการก่อกลายพันธุ์ มีความเป็นพิษต่อสุขภาพของผู้ปฏิบัติงาน สามารถเข้าสู่ร่างกายโดยการดูดซึมผ่านทางผิวหนัง อีกทั้งหากมีการสัมผัสจะมีอาการระคายเคืองทั้งผิวหนัง ดวงตา ปาก และระบบหายใจส่วนบน ในการใช้งานจึงต้องปฏิบัติตามข้อกำหนดการใช้งานอย่างเคร่งครัด มีขั้นตอนการตอบโต้กรณีเกิดการหกรั่วไหล มีการแยกพื้นที่พิเศษบริเวณใช้งาน จัดเก็บของเสียปนเปื้อนในภาชนะที่กำหนด และกำจัดโดยการเผาเท่านั้น และขณะปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้องกับเอธิเดียมโบรไมด์ ผู้ปฏิบัติงานต้องสวมใส่อุปกรณ์ป้องกันส่วนบุคคลอย่างเหมาะสม สำหรับสารเคมีทางเลือกทดแทนเอธิเดียมโบรไมด์ชนิด GelRed® ได้มีการศึกษาในหลาย ๆ ปัจจัย เช่นฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในแบคทีเรีย ความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำ การซึมผ่านถุงมือ และการผ่านสู่เซลล์ของสิ่งมีชีวิต พบว่า GelRed® เป็นสารย้อมกรดนิวคลีอิกที่ไม่ซึมผ่านถุงมือ และเซลล์เมมเบรนของเซลล์ ดังนั้นจึงไม่เป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงาน และขยะที่เกิดจากการปนเปื้อนสารย้อม GelRed® เช่น ถุงมือ กระดาษทิชชู อะกาโรสเจล และสารละลายบัฟเฟอร์ เป็นต้น ไม่จัดเป็นขยะพิษหรือขยะ

อันตราย สามารถทิ้งหรือกำจัดเป็นขยะทั่วไปหรือขยะควบคุมปกติ จึงเป็นการลดขยะปนเปื้อน และลดต้นทุนในการกำจัดของเสียปนเปื้อนในห้องปฏิบัติการ (Biotium, 2013)

อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาผู้ปฏิบัติงานสามารถเลือกใช้สารเคมีทางเลือกทดแทนเอธิเดียมโบรไมด์ในห้องปฏิบัติการชีววิทยาได้ตามความเหมาะสม เพื่อลดการเกิดของเสียปนเปื้อนเอธิเดียมโบรไมด์ในห้องปฏิบัติการ ลดต้นทุนการจัดเก็บของเสีย และลดงบประมาณในการกำจัด อีกทั้งเป็นการพัฒนาห้องปฏิบัติการชีววิทยาให้มีความปลอดภัยตามโครงการยกระดับมาตรฐานความปลอดภัยห้องปฏิบัติการวิจัยในประเทศไทย (ESPreL) ต่อไป

ข้อเสนอแนะสำหรับการนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

ปัจจุบันมีการนำสารเคมีทางเลือกทดแทนเอธิเดียมโบรไมด์มาใช้ในห้องปฏิบัติการอย่างกว้างขวางมากขึ้น ด้วยเหตุผลที่สำคัญคือมีความปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติงาน และสิ่งแวดล้อม ลดขยะปนเปื้อนสารเคมีอันตรายในห้องปฏิบัติการ และงบประมาณในการกำจัด นอกจากนี้สารเคมีทางเลือกทดแทนเอธิเดียมโบรไมด์ก็เป็นสารเคมีที่สามารถเข้าจับกับนิวคลีอิกในเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และยังไม่พบรายงานการซึมผ่านเซลล์ และเป็นสารก่อกลายพันธุ์ในสิ่งมีชีวิต ผู้ปฏิบัติงานยังคงต้องตระหนักถึงความปลอดภัยต่อสุขภาพเป็นสำคัญ ควรดำเนินงานภายใต้ความปลอดภัยอย่างเคร่งครัด เช่น การเตรียมสารย้อมในตู้ดูดควัน สวมใส่อุปกรณ์ป้องกันส่วนบุคคล เช่น เสื้อกาวน์ รองเท้าหุ้มส้น แว่นตากันสารเคมี และถุงมือชนิดไนไตร เป็นต้น นอกจากนี้ห้องปฏิบัติการที่ใช้เอธิเดียมโบรไมด์ หรือสารทดแทนเอธิเดียมโบรไมด์ควรยกระดับความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการตามโครงการยกระดับมาตรฐานความปลอดภัยห้องปฏิบัติการวิจัยในประเทศไทย (ESPreL) เพื่อให้ห้องปฏิบัติการมีความปลอดภัยในทุก ๆ ด้าน ส่งผลให้มีความปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติงาน ผู้ที่เกี่ยวข้อง และสิ่งแวดล้อมสามารถใช้งานห้องปฏิบัติการได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เพราะได้รับความอนุเคราะห์จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภูวดล บางรักษ์ ผู้อำนวยการศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณ วัสดุ อุปกรณ์ และห้องปฏิบัติการในการทำงานวิจัยนี้ และอาจารย์ ดร.สีบพงศ์ สงวนศิลป์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ได้ให้คำแนะนำในการออกแบบการทดลอง การวิเคราะห์ข้อมูล และการเขียนรายงานวิจัย ผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณทุกท่านที่กล่าวมา ณ ที่นี้เป็นอย่างสูง

เอกสารอ้างอิง

โครงการยกระดับมาตรฐานความปลอดภัยห้องปฏิบัติการวิจัยในประเทศไทย. (2557). *คู่มือการประเมินความปลอดภัยห้องปฏิบัติการ ฉบับแก้ไขเพิ่มเติมครั้งที่ 1*. กรุงเทพมหานคร.

Behzad, H., Kaan, Y., Mohammad, A. Z., Susana, R. C., Inderjeet, T., Shilpi, A., & Vinod, K. G. (2016). Adsorption of ethidium bromide (EtBr) from aqueous solutions by natural pumice and aluminium-coated pumice. *Journal of Molecular Liquids*, 21.

Biotium. (2008). *Ethidium Bromide: The Alternatives*. Retrieved from <https://bitesizebio.com/417/ethidium-bromide-the-alternatives-2/>

Biotium. (2013). *GelRed-and-GelGreen-Safety-Report*. Retrieved from <https://biotium.com/wp-content/uploads/2013/07/GelRed-and-GelGreen-Safety-Report.pdf>

Breaker, R. R., & Joyce, G. F. (2014). The expanding view of RNA and DNA function. *Chemical Biology*, 21(9), 1059–1065.

- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13–15.
- Frank, J. J. (1994). Basic methods for the detection of PCR products. *Genome Research*, 3, S77–S82.
- Gherghi, I. C., Girousi, S. T., Voulgaropoulos, A., & Tzimou-Tsitouridou, R. (2004). Interaction of the mutagen ethidium bromide with DNA, using a carbon paste electrode and a hanging mercury drop electrode. *Analytical Chimica Acta*, 505(1), 135–144.
- Jeppson, J. O., Laurell, C. B., & Bi, F. (1979). Agarose gel electrophoresis. *Clinical Chemistry*, 25(4), 629–638.
- Mikhail, G., Xue, L., Candice, P., Wai-Y, L., & Lori, R. (2017). **Biotium; Glowing Products for Science™** (pp. 1-4).
- Möller, M., & Cronk, Q. C. B. (1997a). Origin and relationships of Saintpaulia (Gesneriaceae). *American Journal of Botany*, 84, 956–965.
- Pinar, K., & Oguz, O. (2013). Ethidium bromide binding to DNA cryogels. *Reactive and Functional Polymers*, 73(3), 442–450.
- Zarrintaj, P., Ahmadi, Z., Vahabi, H., Ducos, F., Reza, S. M., & Mozafari, M. (2018). Polyaniline in retrospect and prospect. *Materials Today: Proceedings*, 5(7), 15852–15860.