

การจัดการความรู้ (KM)		One-Point Lesson (บทเรียนหนึ่งประเด็น)			
ชื่อเรื่อง	การทำ complementary DNA (cDNA)		เลขที่เอกสาร	15/2566	
			วันที่รายงาน	31 มีนาคม 2566	
ประเภท	☒ ความรู้ทั่วไป	สาขาวิชาเวชพันธุศาสตร์ อาคาร 1 ชั้น 8 โทร 022012782	หัวหน้าภาควิชา	หัวหน้าสาขาวิชา	ผู้จัดทำ*
	☐ ปัญหาและการแก้ไข ☐ การต่อยอดปรับปรุง		ศ.นพ.อนันต์นิตย์ วิสุทธิพันธ์	ศ.พญ.ดวงฤดี วัฒนศิริชัยกุล	นางสาวสายสุตา หนูเจริญ

ที่มาและความสำคัญ

การเตรียม complementary DNA (cDNA) ด้วยการสังเคราะห์จาก messenger RNA (mRNA) โดยการใช้ reverse transcriptase enzyme เพื่อนำมาวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในลำดับการถอดรหัสจาก DNA เป็น RNA เป็นวิธีที่มีประโยชน์และใช้อย่างแพร่หลาย แต่มีขั้นตอนเฉพาะที่ผู้ปฏิบัติงานควรทราบและทำได้อย่างถูกต้องวิธี¹⁻²

วัตถุประสงค์

เพื่อถ่ายทอดวิธีการสังเคราะห์ cDNA อย่างง่ายให้กับผู้ที่ต้องการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนในลำดับการถอดรหัสของยีน

ขั้นตอน

- เขียนรายละเอียดของตัวอย่าง mRNA ให้ครบถ้วน เช่น mRNA ตัวอย่างเลือดผู้ป่วยเมื่อวันที่ 1 ม.ค. พ.ศ.2566, number 101, concentration 300 ng/ μ l และ อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร/280 นาโนเมตร ประมาณ 2.0
- เตรียมสารที่ต้องใช้ให้ครบถ้วน และเตรียมปริมาณดังนี้ **โดยในขณะที่เตรียมตัวอย่างให้ทำบน ice box หรือวางบนน้ำแข็ง
 - iScript RT Supermix 4 μ l
 - RNA template (1 μ g- 1pg total RNA) ปริมาตรไม่เกิน 16 μ l
 - Nuclease-free water ปรับปริมาตรรวมไม่เกิน 20 μ l
 - Total volume 20 μ l
- เมื่อเตรียมตัวอย่างเรียบร้อยแล้วให้นำลงเครื่อง PCR รุ่นใดก็ได้โดยตั้งอุณหภูมิและเวลาดังนี้
 - Priming 5 min at 25°C
 - Reverse transcription 20 min at 46°C
 - RT inactivation 1 min at 95°C
- เมื่อครบเวลาเครื่อง PCR แล้วให้นำ cDNA ที่สังเคราะห์ได้มาวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง NanoDrop และ อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร/280 นาโนเมตร ประมาณ 1.8
- เก็บ cDNA ที่สังเคราะห์ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C นานกว่า 1 ปี

หมายเหตุ

การสังเคราะห์ cDNA เป็นขั้นตอนทำต่อจากการสกัด mRNA ดังนั้นหากต้องการให้ได้ cDNA ที่มีคุณภาพ จึงต้องเริ่มต้นจากการสกัด mRNA ให้ได้คุณภาพที่ดีก่อนด้วย ซึ่งการสกัด mRNA จากเลือดให้ได้คุณภาพดี จะต้องทำภายในวันนั้นหลังจากเจาะเลือดผู้ป่วย หรือหากทำไม่ได้ภายในวันเดียวกับที่เจาะเลือดนั้น สามารถแช่ตู้เย็นช่อง 4°C และสกัดภายใน 72 ชั่วโมงหลังจากเจาะเลือดผู้ป่วย

ประโยชน์ที่ได้รับ

สามารถสังเคราะห์ cDNA จาก mRNA อย่างง่ายและมีคุณภาพได้

ข้อควรระวัง

- ควรสวมถุงมือระหว่างทำการเก็บเลือดและเตรียมตัวอย่าง เพื่อป้องกันการปนเปื้อน
- ทำตัวอย่างบน ice box เนื่องจาก mRNA ถูกทำลายได้โดยง่ายจากอุณหภูมิที่สูง

ผลการนำไปใช้	วันที่											
	ผู้ถ่ายทอด											
	ผู้รับการถ่ายทอด											

เอกสารอ้างอิง

1. Baisnee P-F, Hampson S, Baldi P. Why are complementary DNA strands symmetric? Bioinformatics. 2002;18(8):1021-33.
2. Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, et al. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. Nature. 1986;324(6092):73-6