

รายงานการไปศึกษาฝึกอบรม ณ ต่างประเทศ

ส่วนที่ 1 ข้อมูลทั่วไป

1.1 ชื่อ/นามสกุล ดร.อรรชนี บัญประกอบ อายุ 45 ปี

ตำแหน่ง อาจารย์พนักงาน

ระดับการศึกษาสูงสุด ปริญญาเอก

1.2 ที่ทำงาน ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง
โทร. 086-9007066

1.3 ชื่อเรื่อง (ภาษาไทย) “เทคนิคใหม่ในการวิเคราะห์ชนิดไดอะตอม *Chaetoceros* และ *Rhizosolenia*”

(ภาษาอังกฤษ) “New techniques for diagnosis of diatom *Chaetoceros* and *Rhizosolenia*”

สาขาหลัก ชีววิทยา (Biology)

สาขาย่อย วิทยาศาสตร์ทางทะเล (Marine Science)

สาขาที่เกี่ยวข้อง อณูชีววิทยา (Molecular Biology)

เพื่อ ☐ ประชุมเสนอบทความ ☐ ศึกษา ☒ ฝึกอบรม และดูงาน

แหล่งเงินทุน มหาวิทยาลัยรามคำแหง ประเทศที่ไป เดนมาร์ก

ระหว่างวันที่ 20 พฤษภาคม 2557 ถึง วันที่ 9 กรกฎาคม 2557

ภายใต้โครงการ Study of *Chaetoceros* and *Rhizosolenia*

ของหน่วยงาน Natural History Museum, University of Copenhagen, Denmark

ส่วนที่ 2 สรุปย่อของหลักสูตร

การวิเคราะห์ชนิดของไดอะตอม (diatom) ในสกุล *Chaetoceros* และ *Rhizosolenia* ด้วยเทคนิคใหม่ในการสกัดสารดีเอ็นเอ (DNA extraction) ที่เฉพาะและเหมาะสมสำหรับไดอะตอมที่สุด ในปัจจุบัน ซึ่งการสกัดสารดีเอ็นเอเป็นขั้นตอนแรกที่สำคัญในการศึกษาด้านวิวัฒนาการชาติพันธุ์ (phylogeny analysis) ซึ่งการอบรมครั้งนี้ได้นำตัวอย่างเซลล์ไดอะตอม สกุล *Chaetoceros* และ *Rhizosolenia* ซึ่งเก็บจากชายฝั่งเมืองไทยไปทำการคัดแยกเซลล์ให้บริสุทธิ์อีกครั้ง และทำการเลี้ยงให้ได้ปริมาณมากด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร L-1 หลังจากสกัดดีเอ็นเอแล้วจึงทำความสะอาดดีเอ็นเอ (Cleaning DNA) วัดปริมาณดีเอ็นเอก่อนเข้าขั้นตอนการทำ PCR (Polymerase Chain Reaction)

ส่วนที่ 3 ข้อมูลที่ได้รับจากการไปฝึกอบรม

3.1 วัตถุประสงค์

- เพื่อพัฒนาความรู้ในการวิเคราะห์ชนิดไดอะตอมด้วยดีเอ็นเอซึ่งในเมืองไทยยังไม่มีผู้เชี่ยวชาญ
- เพื่อแลกเปลี่ยนความรู้ และเทคนิคต่าง ๆ กับอาจารย์ผู้มีความเชี่ยวชาญ
- เพื่อสร้างความสัมพันธ์อันดี และเพิ่มพูนประสบการณ์การทำงานวิจัยร่วมกันกับผู้เชี่ยวชาญ ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำความรู้ที่ได้มาช่วยพัฒนาการเรียนการสอน และการทำงานวิจัย รวมถึงเพื่อความร่วมมือในการทำวิจัยร่วมกันในอนาคตอีกด้วย

3.2 รายละเอียดเกี่ยวกับการไปฝึกอบรม

3.2.1 แผนการฝึกอบรม

“New techniques for diagnosis of diatom *Chaetoceros* and *Rhizosolenia*”

19-30 May 2014: Techniques for isolation of single cells, establishing and culturing species, and DNA extraction methods

- **19-21 May 2014:** Single cell isolations for establishing cultures of type species of diatoms from Thailand, maintained in L1-medium (Guillard&Hargraves, 1993) at a salinity of 31 and a temperature of 22-26°C
- **22-23 May 2014:** Learn further techniques for isolation of single diatom cells from field samples. Discussion about different culturing techniques.
- **26-27 May 2014:** Harvesting and concentrating cellular material from the cultures, to a frozen and stored for DNA analyses. This is to be continued during the following weeks.
- **28-30 May 2014:** Learn more about DNA extraction methods and precipitation of DNA using different methods

1-30 June 2014: Cleaning DNA, method for PCR-product

- **2-6 June 2014:** Learn more techniques for cleaning DNA and PCR amplification of selected genes. Meeting for discussions about selection of genes for different purposes, problems with techniques and culturing
- **9-13 June 2014:** Learning and practicing methods for single cell PCR amplification of diatoms from field samples. Sequencing of PCR products. Start analyzing data and writing paper
- **16-20 June 2014:** Further morphological and molecular studies on established cultures and single cells from field samples. Discussions about different types of phylogenetic analyses, and their advantages and drawbacks

- 23-27 June 2014: Continued discussion and practising of phylogenetic analyses. Discuss data and potential problems. Searching useful references from the Royal Library of Copenhagen
- 30 June 2014: Finalizing reference search from the Royal Library of Copenhagen and the Botanical Library

1-8 July 2014: Try to get all result for write the paper for publication

- 1-4 July 2014: Continued analyses and writing of paper
- 7 July 2014: Discussion of data and other results for publication and plans for the future
- 8 July 2014: Gathering and checking data for continued work in Thailand

DNA extraction

Equipment

1. Ice tray
2. 2x CTAB, Chloroform, Isoamyl alcohol, 96% & 70%EtOH
3. 3M sodium acetate (NaAc)
4. Temp's centrifuge (in hood)
5. Oven (60-65 °C), Vortex machine
6. Small centrifuge machine
7. Pipette (200P and 1000P) and tip
8. 1.5 ml micro-tubes = no.sample x 3
9. Parafilm, beaker and erlenmeyer flask 20 ml



Method

1. Keep CTAB (from refrigerator) in 60 °C oven until disappear small white ball but from the table it already!



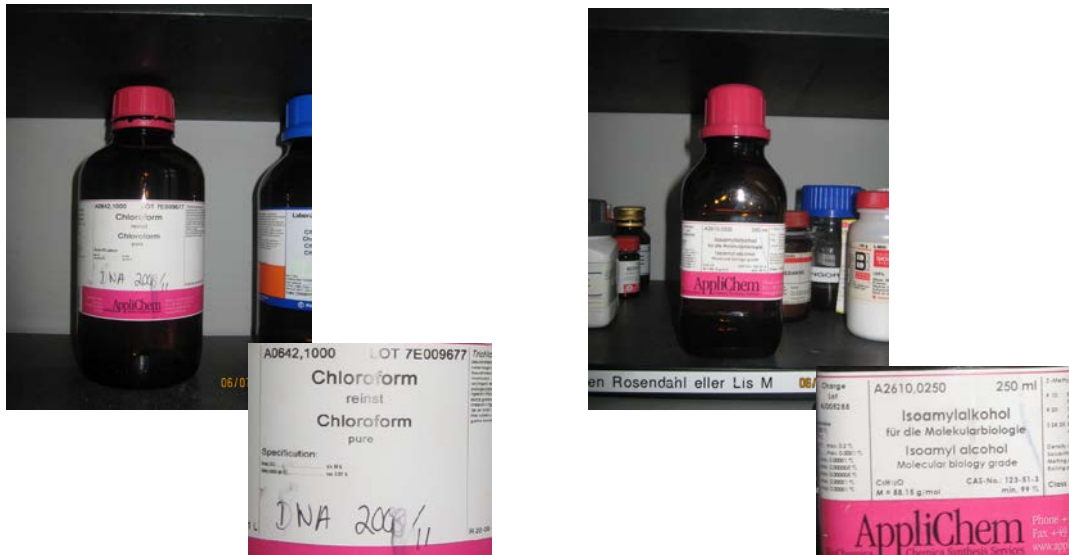
2. Centrifuge samples (small centrifuge) few min and throw away all water from samples and keep tubes in rack on ice tray.



3. Run no. of samples on 1.5 ml micro-tubes (1).
4. Add **500 μ l CTAB** in all 3. add oven 10 min if want add iron ball for break chain add here 2 min
5. Add few samples in 4. (be careful! same name on each tube) and vortex
6. Keep in 60 $^{\circ}$ C oven and vortex every 10 min in 1 hr.(about 5-6 time)
7. Make 2 set 1.5 ml micro-tubes code set (no.2) and real name set (no.3)

Rinse with Chloroform

1. Make 960 μl Chloroform + 40 μl isoamyl alcohol (Isopentyl ethanol) for all samples
(calculate 24 Chloroform : Isoamyl alcohol see in table 1)



2. Add 500 μl 24:1 of Chloroform:Isoamylalcohol to every tubes and turn tubes
3. Centrifuge 10,000 G 10 min Temp. 4 $^{\circ}\text{C}$ (centrifuge in hood)



Clean iron ball: add 0.4M HCl 20 min
and add 96% EtOH and leave in oven

4. Take supernatant (upper layer) to new micro-tube no.2 (P1000 and P200)
5. Add 500 μl 24:1 of Chloroform:Isoamylalcohol to every tubes and turn tubes

6. Centrifuge **10,000 G 10 min** Temp. 4°C (centrifuge in hood)
7. Take supernatant to new micro-tube no.3

Precipitation of DNA (EtOH in refrigerator)

1. Add **1,000 μl** 96% EtOH and Add **50 μl** 3M Sodium acetate (NaAc) and shake
2. Centrifuge 10 min at **20,000G** 4°C
3. Remove carefully liquid without disturbing pellet (P1000)
4. Add **500 μl** 70% EtOH, wash gently and centrifuge **10 min at 20,000G**
5. Remove carefully liquid without disturbing pellet (P1000) and centrifuge **10 min at 20,000G**
6. Remove remaining liquid (P200)
7. Dry in rack at 60°C in oven (few minutes ONLY!) add **31 μl** MQ-water (distill water) and close with parafilm and leave at 30°C until next day.

Be careful:

1. Keep DNA samples on ice tray all time.
 2. Chloroform is carcinogen reagent please make in hood only.
-

3.2.2 ประโยชน์ที่ได้รับ

1. ได้รู้ความรู้อเพิ่มเติมเรื่องเทคนิคการเลี้ยงเซลล์ (cell culture) เรื่องเทคนิคการแก้ไขเซลล์ที่สภาพผิดปกติด้วยวิธีง่าย ๆ ซึ่งเซลล์ที่มีสภาพผิดปกตินี้เป็นปัญหาเรื่องทำให้ไม่สามารถทราบลักษณะสัณฐานวิทยาที่แท้จริงของเซลล์ได้ ปัญหานี้เกิดจากการเลี้ยงเซลล์ไว้นาน ๆ การแก้ปัญหาโดยปกติต้องใช้เครื่องมือเฉพาะที่มีราคาแพงมากมาเพิ่มในขั้นตอนการเลี้ยงเซลล์ การอบรมครั้งนี้ทำให้ทราบถึงเครื่องมือที่ประยุกต์ขึ้นใช้เองได้
2. ได้เรียนรู้เพิ่มเติมถึงเทคนิคการเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้วิเคราะห์ชนิดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope: TEM) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM) ซึ่ง

การเรียนรู้ถึงเทคนิคเฉพาะทำให้ชิ้นงานที่เตรียมได้มีคุณภาพมากยิ่งขึ้น เป็นการช่วยประหยัดวัสดุ สารเคมีซึ่งมีราคาแพง และประหยัดเวลา รวมถึงช่วยประหยัดตัวอย่างซึ่งบางครั้งมีอยู่อย่างจำกัด

3. ได้เรียนรู้เพิ่มเติมถึงเทคนิคการวิเคราะห์ชนิดไดอะตอมโดยใช้เทคนิคสกดดีเอ็นเอจากเซลล์เดียว ซึ่งกรณีนี้เป็นสิ่งจำเป็นอย่างมากสำหรับตัวอย่างที่ไม่สามารถเลี้ยงให้ขึ้นได้โดยวิธีใดวิธีหนึ่ง หรือกรณีที่ไม่สามารถสกดดีเอ็นเอได้จากเซลล์ที่เลี้ยงไว้ได้
4. ได้มีการแลกเปลี่ยนความรู้ความเข้าใจด้านงานวิจัย ขนบธรรมเนียม และศิลปวัฒนธรรมของทั้งสองประเทศ คือ ประเทศไทยและประเทศเดนมาร์ก ทำให้ได้รับรู้ถึงความเหมือนและความแตกต่างของทั้งสองประเทศ ทำให้สามารถเข้าใจและปรับวิสัยทัศน์ให้ทำงานร่วมกันได้อย่างราบรื่น รวมทั้งเป็นการเผยแพร่ขนบธรรมเนียม วัฒนธรรมไทยให้ต่างชาติได้รับรู้อีกทางหนึ่งด้วย
5. สร้างสายงานการทำวิจัยในต่างชาติดอย่างต่อเนื่องกับผู้เชี่ยวชาญ ซึ่งสามารถเชิญผู้เชี่ยวชาญเหล่านั้นมาทำการฝึกอบรมแลกเปลี่ยนความคิดเห็นสำหรับนักวิจัยและผู้สนใจในการศึกษาวิจัยด้านไดอะตอมของประเทศไทยต่อไปได้ในอนาคต

3.2.3 การนำมาประยุกต์ใช้กับงานที่ปฏิบัติ

- สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการเรียนการสอนในกระบวนวิชา BID 4803: แพลงก์ตอนวิทยา (Planktonology) และกระบวนวิชา BID 4908: ปัญหาพิเศษด้านความหลากหลายทางชีวภาพ (Special Problem in Biodiversity) ซึ่งเนื้อหาส่วนหนึ่งนักศึกษาต้องเรียนเรื่องการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอน รวมไปถึงเทคนิคในการคัดแยกเซลล์ให้บริสุทธิ์ การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และการเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้ศึกษาชนิดด้วยกล้องจุลทรรศน์ การถ่ายทอดองค์ความรู้ใหม่ต่าง ๆ ให้กับนักศึกษาจึงเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง โดยเน้นหลักสอนให้คิด วางแผน และลงมือทำ และรู้จักแก้ปัญหา เพื่อเตรียมความพร้อมให้นักศึกษาให้มากที่สุด

- สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับการทำงานวิจัย เนื่องจากการได้แลกเปลี่ยนทัศนคติ และเรียนรู้องค์ความรู้ใหม่ ๆ ที่ทันสมัย ทำให้จุดประกายความคิดในการวางแผนในการทำงานวิจัยที่ดีในอนาคตที่เป็นประโยชน์ต่อประเทศชาติต่อไปได้เป็นอย่างดี

3.2.3 ภาพประกอบ

- ภาพประกอบการอบรม



- ภาพถ่ายสัมพันธ์และขนบธรรมเนียมในสังคม



ส่วนที่ 4 ข้อคิดเห็นและเสนอแนะ

จากการที่ได้มีโอกาสได้ไปอบรมในครั้งนี้ ทำให้ได้มีโอกาสใช้ห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอ (DNA-Laboratory) ของสถาบัน Natural History Museum, University of Copenhagen, Denmark ทำให้เห็นถึงความพร้อมของอุปกรณ์เครื่องมือต่าง ๆ ซึ่งอุปกรณ์บางรายการเราไม่มี เพื่อให้งานวิจัยมีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น หากทางมหาวิทยาลัยสนับก็จะเป็โอกาสที่ดีของการทำวิจัยต่อไป

.....
(อาจารย์ ดร.อรรชนี บัญประกอบ)

ผู้รายงาน

ส่วนที่ 5 ความคิดเห็นของผู้บังคับบัญชาของเจ้าสังกัด และโครงการที่ดำเนินงานต่อไป (ยกเว้นผู้รายงาน
เป็นข้าราชการตั้งแต่ระดับอธิบดีหรือเทียบเท่าขึ้นไป)

5.1 ความเห็นของหัวหน้าภาควิชา

.....

.....

.....

.....

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โสภณ บุญมีวิเศษ)
หัวหน้าภาควิชาชีววิทยา

5.2 ความเห็นของคณบดี

.....

.....

.....

.....

.....

(รองศาสตราจารย์ปรีชา พหลเทพ)

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์