

การสกัดและวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

วัตถุประสงค์ เพื่อให้ นักศึกษาฝึกทักษะการสกัดสารพันธุกรรมชนิดดีเอ็นเอ

เนื้อหา

กรดนิวคลีอิก (nucleic acid) เป็นสารพันธุกรรม (genetic material) ที่ประกอบขึ้นจากพอลิเมอร์ของนิวคลีโอไทด์ โดยแต่ละนิวคลีโอไทด์ประกอบด้วย

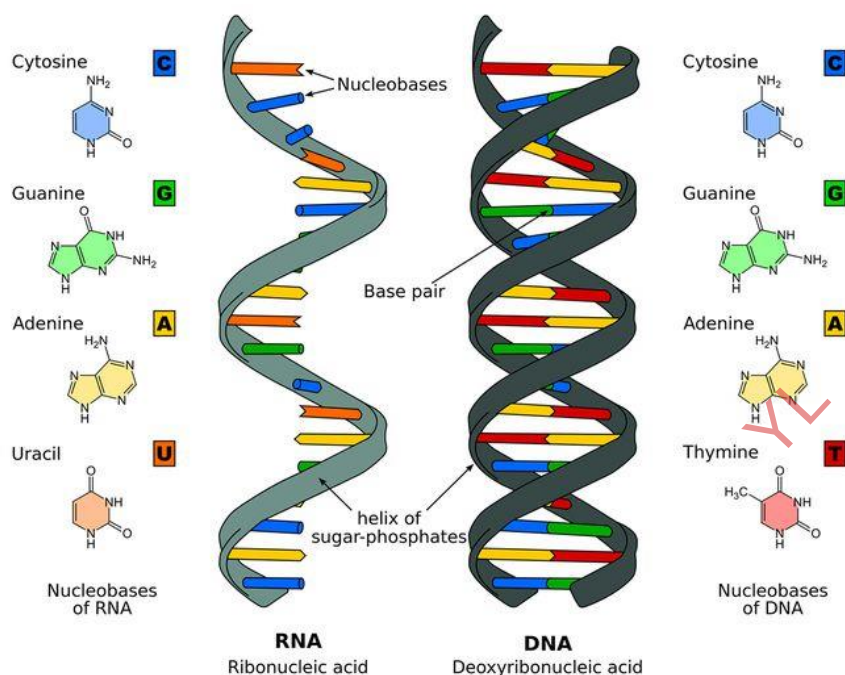
1. เบสไนโตรเจน (nitrogenous base) ซึ่งแบ่งได้ตามลักษณะโครงสร้างของโมเลกุลที่แตกต่างกัน 2 ชนิด คือ ไพริมิดีน (pyrimidine) ได้แก่ ไซโตซีน (cytosine; C) ไทมีน (thymine; T) และยูราซิล (uracil; U) ส่วน เพียวรีน (purine) ได้แก่ อะดีนีน (adenine; A) และกัวนีน (guanine; G)
2. น้ำตาลเพนโทส ซึ่งแบ่งได้ 2 ชนิดตามน้ำตาลเพนโทสที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุล คือ น้ำตาลดีออกซีไรโบส (D-2-deoxyribose) และน้ำตาลไรโบส (D-ribose)
3. หมู่ฟอสเฟต

กรดนิวคลีอิกสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด ตามองค์ประกอบโครงสร้างนิวคลีโอไทด์ ซึ่งต่างกันว่า เบสไนโตรเจน และน้ำตาลเพนโทส คือ ดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid; DNA) มีเบสไนโตรเจนที่ประกอบด้วย A, C, G, T และน้ำตาลเพนโทสเป็นน้ำตาลดีออกซีไรโบส (D-2-deoxyribose) และอาร์เอ็นเอ (ribonucleic acid; RNA) มีเบสไนโตรเจนที่ประกอบด้วย A, C, G, U และน้ำตาลเพนโทสเป็นน้ำตาลไรโบส (D-ribose) โดยดีเอ็นเอ เป็นสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่มีหน้าที่กำหนดการสังเคราะห์โปรตีนในสิ่งมีชีวิตนั้นๆ

การสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์สามารถสรุปเป็นขั้นตอนดังนี้ คือ ทำให้ เซลล์แตก (cell lysis) ได้ นิวเคลียสออกมา จากนั้นทำให้เยื่อหุ้มนิวเคลียสแตก ใ้ดีเอ็นเอละลายออกมาใน สารละลาย แล้วทำการลดการละลายของดีเอ็นเอโดยการตกตะกอนออกมา

ข้อที่ควรคำนึงถึงในการสกัดดีเอ็นเอ คือ เอนไซม์ย่อยดีเอ็นเอ (DNase) ภายในเซลล์เอง การขาด เป็นสายเล็กๆ (fragmentation) ของดีเอ็นเอ เนื่องจากแรงที่เกิดจากการกวนหรือคนอย่างรุนแรง (shear force) และ DNase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายดีเอ็นเอ

ดังนั้นในสารละลายที่ใช้สกัดดีเอ็นเอจากเซลล์สิ่งมีชีวิต จึงประกอบด้วยสารต่อไปนี้คือ สารซักฟอก (detergent) เช่น sodium dodecyl sulfate (SDS) ซึ่งเป็นสารที่ใช้ในการละลายเยื่อหุ้มเซลล์ และเยื่อหุ้มนิวเคลียส สารคีเลต (chelating agent) เช่น $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ซึ่งทำหน้าที่ในการจับกับสารที่มีประจุบวก (divalent cation) เช่น Mg^{2+} เป็นโคแฟกเตอร์ในการทำงานของ DNase สาร โปรติเอสใช้ในการย่อยสลายโปรตีนฮิสโตนที่จับอยู่กับสายดีเอ็นเอ เกลือที่มีความเข้มข้นสูง เช่น โซเดียมคลอไรด์ เพื่อให้ภาวะของสารละลายเป็นประจุบวกช่วยในการปรับภาวะของดีเอ็นเอให้เป็นกลาง (neutralize negative charge) และจากนั้นเติมแอลกอฮอล์ เช่น ไอโซโพรพานอล หรือ เอทานอล เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอที่เตรียมได้



ภาพที่ 1 โครงสร้างดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ

ที่มา: Helmenstine, A. M. (12 มีนาคม 2562).

การตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้

ดีเอ็นเอที่สกัดได้จะมีลักษณะเป็นสารละลายใส ซึ่งสามารถบ่งชี้ว่าสารละลายดังกล่าวเป็น ดีเอ็นเอได้ โดยอาศัยคุณสมบัติการดูดกลืนคลื่นแสงอัลตราไวโอเล็ตของเบสที่เป็นองค์ประกอบของ ดีเอ็นเอ ที่ ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร โดยการดูดกลืนคลื่นแสง 1 หน่วย (OD) ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร จะมี ปริมาณของดีเอ็นเอประมาณ 50 ไมโครกรัม และตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยการหาอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ต่อความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร หากว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพที่ดี มีความบริสุทธิ์มากจะมีค่าอัตราส่วนดังกล่าวเท่ากับ 1.7-1.8 แต่ถ้าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีส่วนของอาร์เอ็นเอเจือปนอยู่ จะมีค่ามากกว่า 1.8 เนื่องจากอาร์เอ็นเอก็เป็นกรดนิวคลีอิกเช่นกัน ดังนั้นจึงมีเบสที่สามารถดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตได้เช่นกัน จึงทำให้ค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตมากขึ้น และถ้าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีโปรตีนปนเปื้อนอยู่จะมีค่าอัตราส่วนน้อยกว่า 1.7 เนื่องจากโปรตีนมีหมู่ที่สามารถดูดกลืนคลื่นแสงได้ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

สูตรคำนวณปริมาณดีเอ็นเอและตรวจสอบความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้

1. คำนวณปริมาณดีเอ็นเอ

ปริมาณดีเอ็นเอ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = $A_{260} \times 50 \times \text{Dilution factor}$

A_{260} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร

50 คือ นิยามเปรียบเทียบ

นั่นคือ ดีเอ็นเอสายคู่ปริมาณ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร เท่ากับ 1

Dilution factor คือ ค่าการเจือจางตัวอย่างดีเอ็นเอ

2. คำนวณความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้

$$\text{ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ} = A_{260} / A_{280}$$

A_{260} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอที่ 260 นาโนเมตร

A_{280} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ 280 นาโนเมตร

ถ้า A_{260} / A_{280} อยู่ระหว่าง 1.7-1.8 แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์

ถ้า $A_{260} / A_{280} < 1.7$ แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้ปนเปื้อนโปรตีน

ถ้า $A_{260} / A_{280} > 1.8$ แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้ปนเปื้อนอาร์เอ็นเอ

อุปกรณ์/เครื่องมือ

1. ตัวอย่างพืชที่มีลักษณะนิยม ได้แก่ หัวหอม มะเขือเทศ สตอเบอร์รี่ แตงโม
2. สารละลาย CTAB buffer (Extraction buffer)
3. สารละลาย Tris EDTA (TE)
4. สารละลาย 10 mM TE buffer
5. Absolute ethanol 96-99%
6. Absolute ethanol 70%
7. ออร์โต้ปิเปตขนาด 10, 200 และ 1000 ไมโครลิตร
8. eppendorf ขนาด 1.5 หรือ 2 มิลลิลิตร
9. ที่วาง eppendorf (rack)
10. ตะเกียงแอลกอฮอล์ และไฟแช็ค
11. เอทานอลร้อยละ 70
12. กระดาษเช็ดโต๊ะ
13. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง
14. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์
15. คิวเวตต์แบบควอร์ทซ์
16. บีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร
17. มีดและเคียง
18. โกร่ง
19. ปากกาเลเบล

การเตรียมสารละลาย 1 M TE buffer, pH 8.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่ง Tris-HCl ปริมาณ 12.11 กรัม ลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่นที่ผ่านการกำจัดไอออน (Deionized water) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นทำการปรับพีเอชให้เท่ากับ 8.0 ด้วยสารละลาย 1 M NaOH แล้วเทใส่ขวดปรับปริมาตรและปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

การเตรียมสารละลาย 0.5 M EDTA ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่ง EDTA ปริมาณ 18.612 กรัม ลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่นที่ผ่านการกำจัดไอออน (Deionized water) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นทำการปรับพีเอชให้เท่ากับ 8.0 ด้วยสารละลาย 0.5 M NaOH

แล้วเทใส่ขวดปรับปริมาตรและปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารละลาย Tris EDTA (TE) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ปิเปตสารละลาย 1 M TE buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสารละลาย 0.5 M EDTA ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่นที่ผ่านการกำจัดไอออน (Deionized water) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นทำการปรับพีเอชให้เท่ากับ 8.0 ด้วยสารละลาย 0.01 M NaOH แล้วเทใส่ขวดปรับปริมาตรและปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

การเตรียมสารละลาย CTAB buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่ง Cetyltrimethyl ammonium bromide 2 กรัม และ NaCl ปริมาณ 14.96 กรัม ลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่นที่ผ่านการกำจัดไอออน (Deionized water) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมให้ละลาย จากนั้นปิเปตสารละลาย 1 M TE buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และสารละลาย 0.5 M EDTA ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเทใส่ขวดปรับปริมาตรและปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ: CTAB buffer ประกอบด้วย 20 g CTAB/L; 2.56 M NaCl; 0.1 M Tris-HCl และ 20 mM EDTA

การทดลองปฏิบัติการ

1. หั่นตัวอย่างพืชเป็นชิ้นเล็กๆ และชั่งตัวอย่างให้ได้ 1 กรัม ลงในโกร่ง จากนั้นปิเปต Tris EDTA (TE) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และปิเปต CTAB buffer (Extraction buffer) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (อุ่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ก่อนใช้) ลงไปในโกร่งที่มีตัวอย่าง จากนั้นบดตัวอย่างให้ละเอียด
2. ปิเปตตัวอย่างสารละลายที่มีตัวอย่างพืช ลงในหลอด eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 3 หลอดๆละ 700 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยทุกๆ 10 นาที ให้เขย่าผสมให้เข้ากัน โดยกลับหลอดไปมา
3. เติมสารละลาย Chloroform ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ลงไป ปิดฝาหลอดให้แน่น เขย่าแรงๆ ประมาณ 2-3 นาที หรือ vortex ประมาณ 2-3 นาที ให้ผสมเข้าด้วยกัน
4. นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 16,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นปิเปตสารละลายส่วนบนเกือบทั้งหมด ลงในหลอด eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่
5. เติม Cold absolute ethanol 96-99% ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ลงไป ผสมให้เข้ากัน โดยกลับหลอดไปมา จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 16,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บตะกอน โดยเทส่วนใสทิ้งไป จากนั้นซับส่วนใสบนกระดาษ โดยคว่ำปากหลอด ลงบนกระดาษ
6. เติม Cold absolute ethanol 70% ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร ลงไป ดัดหลอดเบาๆ เพื่อให้ตะกอนดีเอ็นเอหลุดออกจากกันหลอด จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 16,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บตะกอน โดยเทส่วนใสทิ้งไป จากนั้นซับส่วนใสบนกระดาษ โดยคว่ำปากหลอด eppendorf ลงบนกระดาษ

7. เติมสารละลาย Tris EDTA (TE) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ลงไป จากนั้นนำหลอดที่มีสารละลายดีเอ็นเอ 1 หลอด ไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์ดีเอ็นเอต่อไป

การวิเคราะห์หาปริมาณดีเอ็นเอ

1. ปิเปตสารละลายดีเอ็นเอลงในคิวเวตต์แบบควอร์ทซ์ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร
2. คำนวณปริมาณดีเอ็นเอและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ



รายงานปฏิบัติการ

วันที่ทำการทดลอง.....

กลุ่มที่.....หมู่เรียนที่.....

ชื่อ-สกุล รหัส.....

บันทึกการทดลอง และตอบคำถามต่อไปนี้

1. จงอธิบายสิ่งที่เกิดขึ้นในแต่ละขั้นตอนของการสกัดสารพันธุกรรม ชนิดดีเอ็นเอจากพืช
2. จงแสดงวิธีการคำนวณปริมาณดีเอ็นเอและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ

บันทึกผลการทดลอง

ตารางที่ 1 ผลของความเข้มข้นของเอทิลแอลกอฮอล์

ค่าดูดกลืนแสงที่ 260 nm	ค่าดูดกลืนแสงที่ 280 nm	ปริมาณดีเอ็นเอ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ

สรุปผลการทดลอง

.....

.....

.....