บทปฏิบัติการที่ 2
การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากเซลล์แบคทีเรีย

หลักการ

พลาสมิดเป็นดีเอ็นเอชนิดหนึ่งในเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งอยู่ภายนอกโครโมโซม (extrachromosomal DNA) โดยทั่วไปแบคทีเรียจะมีโครโมโซม แต่แบคทีเรียบางชนิดจะมีทั้งโครโมโซมและพลาสมิด ความแตกต่างของดีเอ็นเอทั้ง 2 ชนิด คือ โครโมโซมเป็นดีเอ็นเอเกลียวคู่รูปวงแหวน (circular DNA) ที่มีขนาดใหญ่มาก เป็นส่วนที่มีการสร้างสังเคราะห์โปรตีนต่างๆในเซลล์ ส่วนพลาสมิดเป็นดีเอ็นเอเกลียวคู่รูปวงแหวนที่มีขนาดเล็กกว่าโครโมโซมประมาณ 100-1,000 เท่า โครงสร้างของพลาสมิดเป็นวงแหวนเกลียวคู่ มีการพันเกลียวซ้อนเกลียว (supercoiled) มีขนาดตั้งแต่ 1-200 กิโลเบส (kilobases; kb) หรือประมาณ 0.2-4% ของโครโมโซม พลาสมิดมีจุดเริ่มต้นของการลอกแบบ (origin of replication) ซึ่งเรียกย่อ ๆ ว่า ORI หรือ ori อยู่บนโมเลกุล ดังนั้นจึงสามารถเพิ่มจำนวนได้ด้วยตนเอง พลาสมิดโดยทั่วไปจะมียีน (gene) ที่ควบคุมลักษณะกรรมพันธุ์ (phenotype) สำคัญ ๆ อยู่ด้วย ซึ่งจะสร้างโปรตีนหรือเอนไซม์หรือสารที่มีประโยชน์กับแบคทีเรียในบางสภาวะ ทำให้แบคทีเรียที่เป็นเจ้าของพลาสมิดมีคุณสมบัติพิเศษบางประการ เช่น ทำให้เกิดความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ, ผลิตยาปฏิชีวนะได้, สร้างเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzymes) ที่จำเป็นต่อแบคทีเรียนั้น ๆ, ผลิตสารโคลิซิน (colicin) ซึ่งจะฆ่าแบคทีเรียที่ไม่สามารถผลิตสารนี้, ต้านทานต่อโลหะหนัก, ใช้น้ำตาลบางชนิดเป็นแหล่งพลังงานได้ หรือชักนำให้เกิดปุ่มปมขึ้นในพืช เป็นต้น พลาสมิดไม่ใช่สิ่งจำเป็นในเซลล์ของแบคทีเรีย ยกเว้นในบางสภาวะเท่านั้น ดังนั้นจึงอาจจะพบหรือไม่พบพลาสมิดในเซลล์แบคทีเรีย พลาสมิดแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ 1) พลาสมิดซึ่งถ่ายทอดระหว่างเซลล์ (conjugate self transmissible plasmid) เป็นพลาสมิดขนาดใหญ่และมีปริมาณจำกัดระหว่าง 1-3 โมเลกุลต่อเซลล์ ส่วนใหญ่เป็น stringent plasmid ซึ่งมีการจำลองตัวหรือลอกแบบภายใต้การควบคุมหรือควบคู่ไปกับจำลองตัวของโครโมโซมของแบคทีเรีย ในธรรมชาติเซลล์สามารถถ่ายทอดพลาสมิดนี้ไปยังอีกเซลล์หนึ่งที่ไม่มีพลาส

มิดได้โดยวิธี conjugation ทำให้มีการถ่ายทอดคุณสมบัติของพลาสมิดไปยังเซลล์ใหม่ได้ 2) พลาสมิดที่ไม่ถ่ายทอดระหว่างเซลล์ (non-conjugative plasmid) เป็นพลาสมิดขนาดเล็กและมีปริมาณหลายโมเลกุลในเซลล์แต่ละชนิด (30-50 หรือ 100 โมเลกุลต่อเซลล์) พลาสมิดประเภทนี้ไม่สามารถถ่ายทอดจากเซลล์เดิมไปยังเซลล์ใหม่ได้ และเป็น relaxed plasmid ซึ่งมีการจำลองตัวได้ตลอดเวลาและไม่ขึ้นกับการจำลองตัวของโครโมโซม ในห้องปฏิบัติการสามารถถ่ายพลาสมิดประเภทนี้เข้าไปในเซลล์ที่ต้องการได้ โดยการแยกพลาสมิดนี้ออกมาจากเซลล์เดิมก่อนแล้วส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์ใหม่ โดยทำให้เซลล์ผู้รับเกิดการเปลี่ยนแปลงที่ผนังเซลล์ (competent cells) และสามารถรับเอาดีเอ็นเอหรือพลาสมิดจากภายนอกเข้าไปได้โดยกระบวนการทรานสฟอร์เมชั่น (transformation)

จากคุณสมบัติของพลาสมิดที่สามารถจำลองตัวเองได้ในเซลล์ จึงนำพลาสมิดมาใช้เป็นดีเอ็นเอพาหะ (vector DNA) ในการสร้างดีเอ็นเอสายผสมสำหรับการโคลนยีน (gene cloning) หรือดีเอ็นเอ เพื่อให้ดีเอ็นเอสายผสมนี้สามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมไปสู่เซลล์รุ่นลูกหลานได้ พลาสมิดที่พบในธรรมชาติมีข้อเสียหลายอย่างไม่เหมาะที่จะใช้เป็นดีเอ็นเอพาหะในการโคลนยีน เช่น มีตำแหน่งการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะไม่เหมาะสมหรือมีมากกว่า 1 ตำแหน่ง (เป็นตำแหน่งที่ใช้ในการสอดใส่ดีเอ็นเอหรือยีนที่ต้องการโคลน), ไม่มีลักษณะเฉพาะที่จะใช้จำแนกเซลล์ที่มีและไม่มีพลาสมิด (ตัวอย่างเช่น ขาดยีนต้านยาปฏิชีวนะ), มีขนาดใหญ่แยกออกจากเซลล์ได้ยากทำให้การสกัดและใส่กลับเข้าสู่เซลล์ผู้รับได้ยากและมีประสิทธิภาพต่ำ เป็นต้น ดังนั้นจึงมีการสร้างพลาสมิดขึ้นมาใหม่โดยตัดต่อมาจากพลาสมิดที่พบในธรรมชาติร่วมกับการสังเคราะห์หรือดัดแปลงเบสเพิ่มเติมตามต้องการ ตัวอย่างเช่น pBR 322, pUC18, pUC19 เป็นต้น

พลาสมิดที่ใช้ในการโคลนยีนในงานด้านพันธุวิศวกรรม นิยมใช้ที่มีขนาดเล็กและมีการจำลองตัวแบบ relaxed นอกจากนี้ต้องมียีนเครื่องหมาย (marker gene) ที่กำหนดลักษณะที่สามารถตรวจสอบได้ และมีตำแหน่งที่ตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดใดชนิดหนึ่งเพียง 1 ตำแหน่ง (unique site) การใช้พลาสมิดที่มีขนาดเล็กจะทนต่อการขาดในระหว่างขั้นตอนต่าง ๆ แยกออกจากเซลล์ที่เป็นเจ้าของได้ง่าย และเมื่อนำไปเชื่อมต่อกับชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการโคลนแล้วขนาดต้องไม่ใหญ่มากนัก ถ้าขนาดใหญ่มากเวลานำไปถ่ายลงในเซลล์ผู้รับโดยวิธี transformation จะเกิดได้ยาก

ตารางที่ 2-1 คุณสมบัติของพลาสมิดบางชนิด

พลาสมิด	ขนาดโมเลกุล (ล้านดัลตัน)	จำนวนต่อเซลล์	การส่งถ่ายข้ามเซลล์	คุณสมบัติ
ColE1	4.2	10-15	-	ผลิตโคลิซิน
RSF 1030	5.6	20-40	-	ต้านทานแอมพิซิลิน
clo DF 13	6.0	10	-	ผลิต cloacin
R6K	25.0	13-38	+	ต้านทานแอมพิซิลินและสเตร็ปโตมัยซิน
F	62.0	1-2	+	-
RI	62.5	3-6	+	ต้านทานยาหลายชนิด
Ent P307	65.0	1-3	+	ผลิต enterotoxin

เนื่องจากพลาสมิดเป็นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กแยกออกมาจากดีเอ็นเอของโครโมโซม ดังนั้นการสกัดแยกเฉพาะพลาสมิดออกจากดีเอ็นเอของโครโมโซมจากเซลล์แบคทีเรียจึงอาศัยหลักการของขนาดที่แตกต่างของดีเอ็นเอทั้ง 2 ชนิดนี้ วิธีการสกัดมีหลายวิธี แต่ที่นิยมกันมากคือ การใช้ด่าง (rapid alkaline extraction) แล้วทำให้ดีเอ็นเอนั้นกลับสู่สภาวะสายคู่ดังเดิม โดยทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วหรือปรับ pH ให้เป็นกลาง แต่เนื่องจากพลาสมิดมีขนาดเล็กกว่ามากและอยู่ในรูปวงแหวน ทำให้สามารถกลับสู่สภาวะเดิมของสายคู่ได้ แต่ดีเอ็นเอของโครโมโซมมีขนาดใหญ่กว่ามากไม่สามารถกลับสู่สภาวะเดิมได้ จึงสูญเสียสภาพเป็นตะกอนขึ้น ดังนั้นจึงสามารถแยกเอาส่วนของพลาสมิดออกจากดีเอ็นเอของโครโมโซมได้ วิธีการสกัดแยกพลาสมิดได้แก่

1. การแยกโดยอาศัยความหนาแน่นลอยตัวในซีเซียมคลอไรด์ (CsCl)

เมื่อแบคทีเรียถูกทำให้เซลล์แตก จะได้โครโมโซมและพลาสมิดออกมาปะปนกัน โดยที่โครโมโซมจะขาดเป็นดีเอ็นเอปลายเปิด (linear DNA) ส่วนพลาสมิดยังคงสภาพเป็นปลายปิด (circular) ทำการแยกเอาส่วนของโครโมโซมออกไปพร้อมกับเศษเซลล์ วิธีหนึ่งที่นิยมใช้กันคือ ทำให้ผนังเซลล์อ่อนตัวลงด้วยเอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozyme) จากไข่

ขาว แล้วจึงทำให้เซลล์แตกโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide, NaOH) และ sodium dodecyl sulfate (SDS) โครโมโซมรวมทั้งพลาสมิดถูกทำให้เสียสภาพ (denature) โดยพันธะไฮโดรเจน (H-bond) จะถูกทำลาย จากนั้นจึงปรับให้กลับสู่สภาพเดิม (renature) โดยทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วหรือปรับ pH ให้เป็นกลางโดยการเติมโปแตสเซียมหรือโซเดียมอะซีเตทที่เป็นกรด โครโมโซมมีขนาดใหญ่และอยู่ในรูปปลายเปิด ยังคงเสียสภาพเกิดการจับกลุ่มและรวมตัวกันเป็นกลุ่มตกตะกอนไม่ละลาย ส่วนพลาสมิดมีขนาดเล็กกว่าและอยู่ในรูปวงแหวน สามารถกลับสู่สภาพเดิมและยังคงมีคุณสมบัติในการละลายได้ ขณะเดียวกันโปแตสเซียมหรือโซเดียมอะซีเตทที่มีความเข้มสูงนั้น ก็จะทำให้โปรตีนและอาร์เอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ ๆ จับตัวกับ SDS ตกตะกอนไปด้วย ในขั้นตอนที่ใช้ด่างนั้น ถ้าควบคุมความเป็นกรดเป็นด่างให้พอเหมาะ พลาสมิดไม่เสียสภาพจึงไม่ตกตะกอน สามารถกำจัดสารโมเลกุลใหญ่ที่ตกตะกอนออกไปได้ โดยการปั่นแยกตะกอนแล้วจึงตกตะกอนพลาสมิดในส่วนลอยหรือส่วนใสด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยปั่นเหวี่ยงให้ถึงจุดสมดุลย์ในซีเซียมคลอไรด์ที่มีเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide; EtBr) อยู่ด้วย EtBr จะแทรกตัวเข้าไปในโมเลกุลของดีเอ็นเอได้ เนื่องจากพลาสมิดมีโครงสร้างเป็นวงแหวนปลายปิด (covalently closed circular) ทำให้ EtBr แทรกตัวเข้าไปได้น้อย ส่วนโครโมโซมที่แตกหักที่ปะปนอยู่มีโครงสร้างเป็นเส้นยาว EtBr จึงแทรกตัวเข้าไปในโมเลกุลได้มาก เนื่องจาก EtBr มีความหนาแน่นลอยตัวน้อยกว่าดีเอ็นเอ เมื่อ EtBr แทรกเข้าไปในโมเลกุลมาก ๆ จึงทำให้ความหนาแน่นลอยตัวของดีเอ็นเอนั้นลดลง เมื่อนำไปปั่นแยกความหนาแน่นในสารละลาย CsCl แถบของพลาสมิดจะปรากฏอยู่ต่ำกว่าแถบของดีเอ็นเอที่เจือปน สามารถแยกพลาสมิดให้บริสุทธิ์ได้

2. การแยกโดยอาศัยความร้อน

เมื่อผนังของแบคทีเรียกถูกสลายด้วยเอนไซม์ไลโซไซม์และถูกความร้อนประมาณ 90-100°C โครโมโซมและพลาสมิดจะปะปนอยู่ในสารละลาย โครโมโซมซึ่งมีขนาดใหญ่และขาดเป็นเส้นตรงจะถูกทำให้เสียสภาพไปด้วยความร้อน ส่วนพลาสมิดซึ่งมีขนาดเล็กและเป็นรูปวงแหวนอยู่ จะถูกทำให้เสียสภาพไปด้วยความร้อนเช่นกัน แต่เมื่อทำให้สารละลายดีเอ็นเอนี้เย็นลงอย่างรวดเร็ว (quick cool) พลาสมิดจะสามารถกลับสู่สภาพเดิม ส่วนโครโมโซมซึ่งมีปลายเปิดและขนาดใหญ่จะรวมตัวกลับสู่สภาพเดิมไม่ได้ ก็จะตกเป็นตะกอนลงมา วิธีนี้จะแยกพลาสมิดได้ไม่บริสุทธิ์มาก

3. การแยกโดยวิธีด่าง (Rapid alkaline)

เมื่อใช้เอนไซม์ไลโซไซม์สลายผนังของแบคทีเรีย หลังจากนั้นทำให้เซลล์แตกโดยใช้ NaOH/SDS ในสภาวะที่เป็นด่างนี้ โครโมโซมรวมทั้งพลาสมิดถูกทำให้เสียสภาพ เนื่องจากพลาสมิดมีขนาดเล็กและยังคงเป็นรูปวงแหวน เมื่อทำให้กลับสู่สภาวะที่เป็นกลาง (neutral pH) โดยการเติมโซเดียมอะซีเตท pH 4.8 พลาสมิดจะสามารถกลับสู่สภาพเดิม ส่วนโครโมโซมยังคงเสียสภาพและรวมตัวกันเป็นกลุ่มตกตะกอนลงมา ทำให้สามารถแยกพลาสมิดออกจากโครโมโซมได้

การเตรียมพลาสมิดโดยวิธีการใช้ด่างนี้เป็นการเตรียมอย่างหยาบๆ (crude preparation) พลาสมิดที่ได้อาจจะไม่บริสุทธิ์มากนัก ถ้าต้องการจะนำไปใช้งานที่ค่อนข้างเฉพาะเจาะจงควรจะทำให้บริสุทธิ์เพิ่มยิ่งขึ้นเสียก่อน โดยทั่วไปการแยกพลาสมิดที่มีขนาดเล็กจะทำได้ง่ายและได้ผล (yield) สูงกว่าการแยกพลาสมิดขนาดใหญ่ ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อพลาสมิดมีขนาดใหญ่ขึ้น จะมีคุณสมบัติคล้ายดีเอ็นเอในโครโมโซมมากขึ้น นอกจากการแยกจะทำได้ยากและได้ผลต่ำแล้ว ยังจะได้พลาสมิดที่มีความบริสุทธิ์ต่ำอีกด้วย เนื่องจากจะมีดีเอ็นเอของโครโมโซมปนเปื้อนมาก

รูปร่างของดีเอ็นเอหรือพลาสมิดจะมีลักษณะที่ขดเป็นวงเกลียวแน่น (supercoiled), ปลายเปิดเป็นเส้นตรง (linear) และที่คลายเป็นวง (relaxed; polymeric หรือ nick) ดังนั้นการหาขนาดของพลาสมิดสามารถหาจากกราฟมาตรฐานที่เขียนขึ้นจากค่าระยะทางของการเคลื่อนที่และ log ของขนาดโมเลกุลของพลาสมิดมาตรฐานหรือดีเอ็นเอมาตรฐาน ซึ่งพลาสมิดที่ต้องการหาขนาดต้องอยู่ในรูปที่เป็นปลายเปิดเป็นเส้นตรง จึงสามารถที่จะหาขนาดของพลาสมิดได้

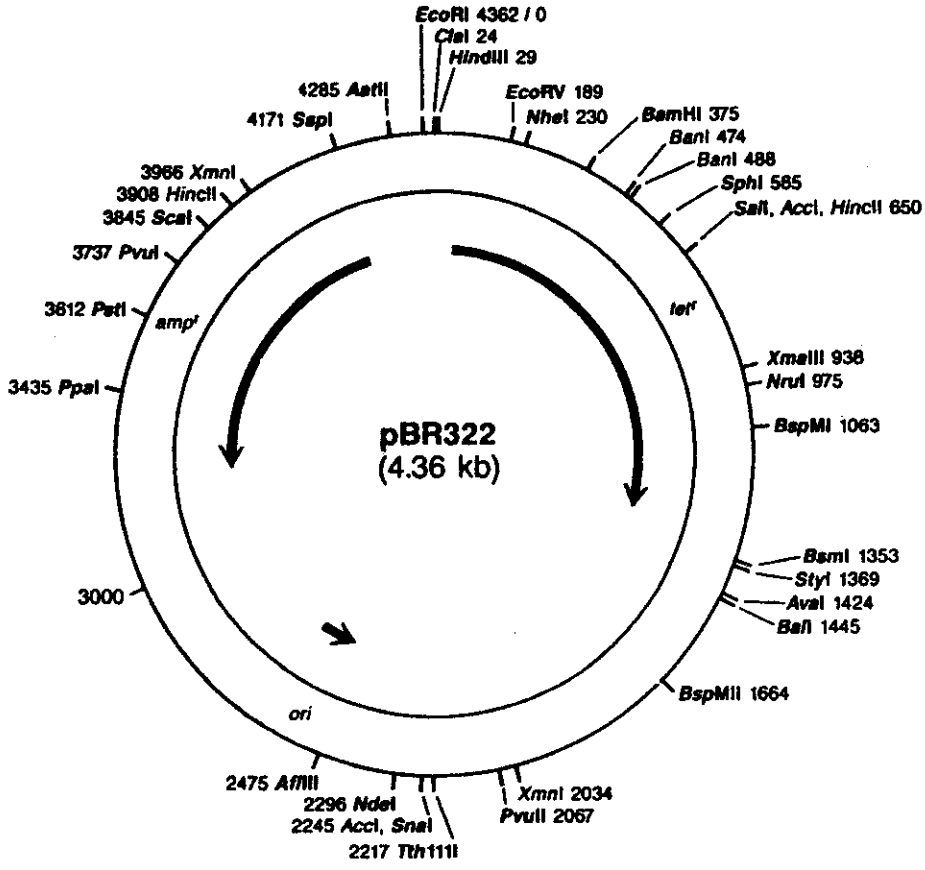
วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้รู้วิธีการสกัดแยกพลาสมิดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย
2. เพื่อให้เข้าใจคุณสมบัติ รูปร่าง ของพลาสมิด

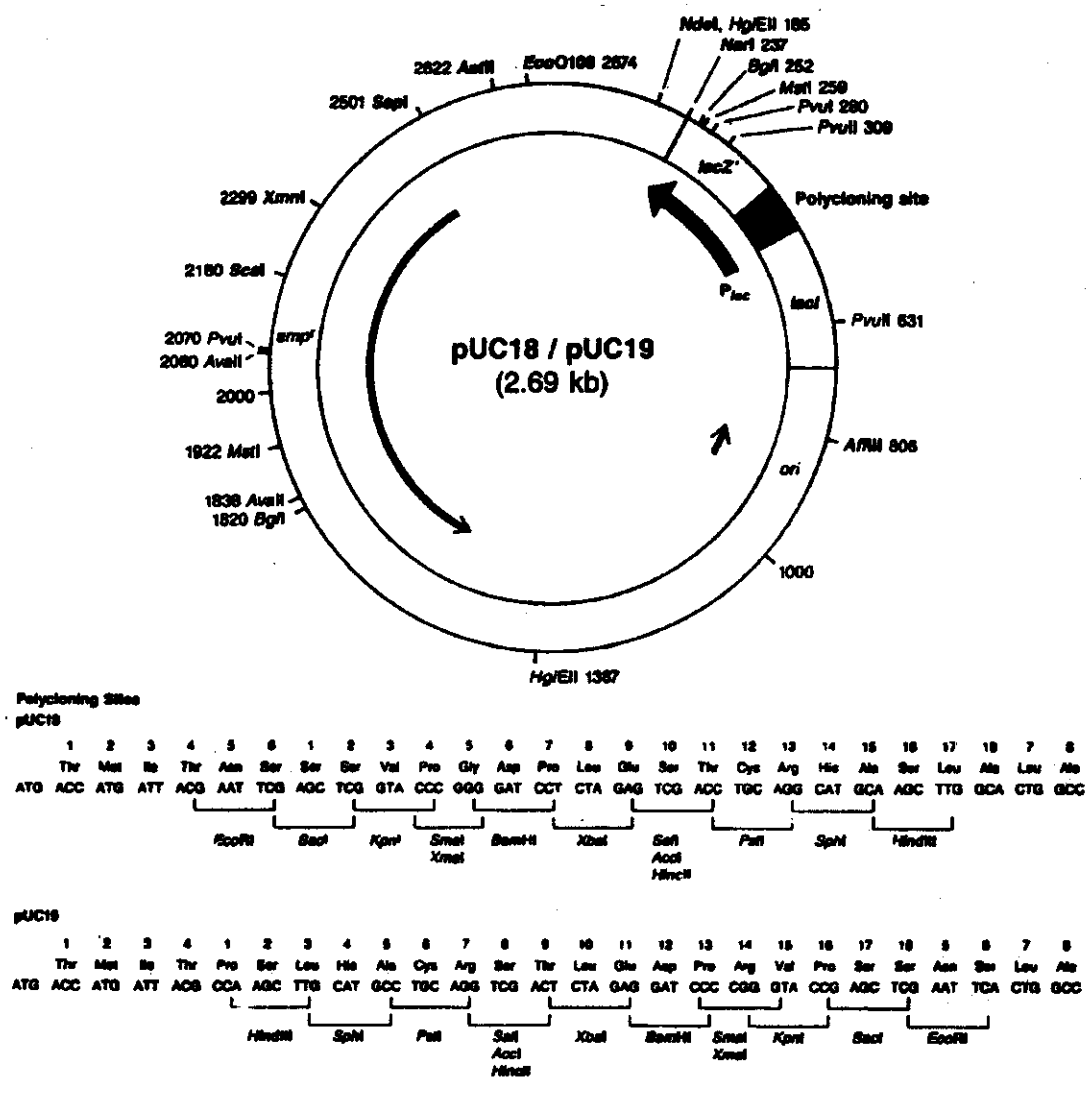
สารเคมีที่ใช้

1. แบคทีเรีย *E. coli* ที่มีพลาสมิด pBR322 ที่ตัดต่อใส่ยีนไวรัสตับอักเสบบีที่มีความยาว 3.2 กิโลเบส (pBR322 มีขนาด 4.36 กิโลเบส ประกอบด้วยยีนที่ทำให้เซลล์เจ้าบ้าน (host cells) ดื้อต่อยาแอมพิซิลิน (ampicillin) และเตตร้าซัยคลิน (tetracyclin) และ

บนยีนเหล่านี้มีลำดับเบสที่เอนไซม์ตัดจำเพาะจดจำได้หนึ่งตำแหน่ง ซึ่งสามารถใช้เป็นจุดตัดเพื่อการสอดใส่ยีนที่สนใจในการแสดงออก) โดยทั่วไปเซลล์ของแบคทีเรียกรัมลบ (gram negative bacteria) จะแตกง่ายเมื่อถูก SDS ส่วนแบคทีเรียกรัมบวก (gram positive bacteria) จะต้องทำให้ผิวหนังเซลล์คลายความแข็งแรงก่อนโดยใช้เอนไซม์ไลโซไซม์ ก่อนที่จะทำให้เซลล์แตกโดยใช้ SDS



รูปที่ 2-1 พลาสมิด pBR322 (จาก Sambrook และคณะ, 1989)



รูปที่ 2-2 พลาสมิด pUC18 และ pUC19 แสดงลำดับเบสบริเวณ multiple cloning site (จาก Sambrook และคณะ, 1989)

2. อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย

LB-agar : 1% Bacto tryptone, 0.5% Yeast extract, 0.5% NaCl, 1.5% Bacto agar

LB-broth : 1% Bacto tryptone, 0.5% Yeast extract, 0.5% NaCl

3. แอมพิซิลิน 10 mg/ml (ละลายในน้ำกลั่น และนำไปกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 μm และแบ่งส่วนย่อยๆเก็บไว้ที่ –20 °C)
4. TGE solution : 50 mM Glucose, 25 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8.0
5. Lysis solution : 0.2 N NaOH, 1% SDS ส่วนผสมนี้ให้เตรียมก่อนใช้ (เตรียม 0.4 N NaOH และ 2% SDS ผสมสารละลายทั้ง 2 ในปริมาตรที่เท่ากัน)
6. Neutralize solution : 3 M NaOAc, pH 4.8 (ปรับ pH ด้วย glacial acetic acid)
7. Absolute ethanol และ 70% ethanol
8. TE buffer : 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0

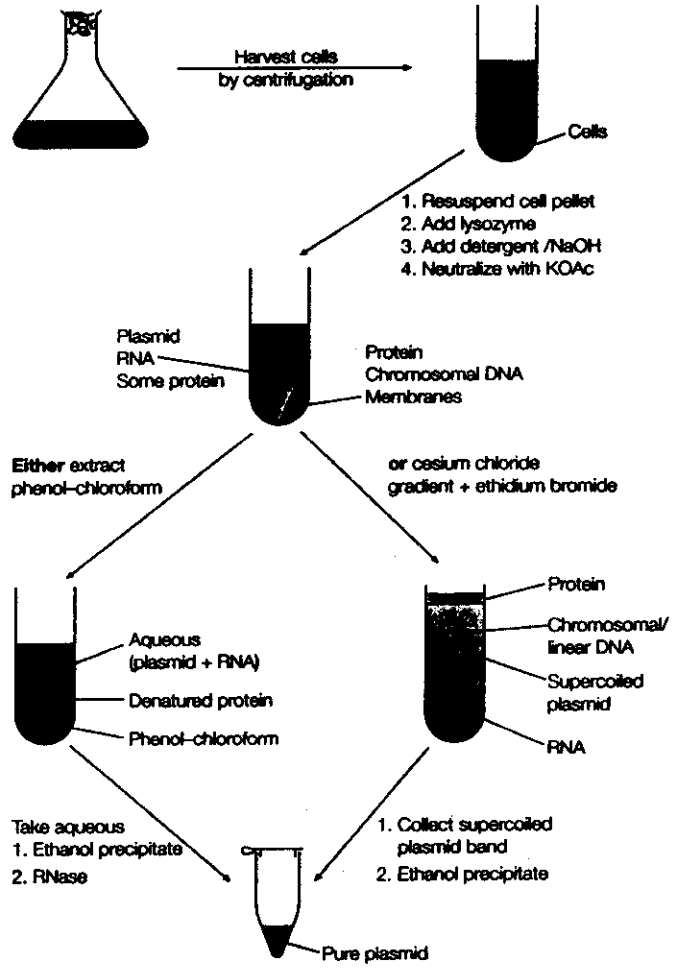
หมายเหตุ : อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายที่นำมาใช้ต้องทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C และความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

อุปกรณ์

1. ตู้อบ 37°C พร้อมเครื่องเขย่า (shaker incubator)
2. เครื่องปั่นเหวี่ยง microtube (microcentrifuge)
3. เครื่องผสมสาร (vortex mixer)
4. Microtube หรือ microcentrifuge tube
5. Micropipette พร้อม tips

วิธีทำการทดลอง

1. สตรีค (streat) เชื้อแบคทีเรียที่มีพลาสมิดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง LB-agar ที่มีแอมพิซิลิน 100 μg/ml นำไปบ่มที่ 37°C ข้ามคืน (15-17 ชั่วโมง)
2. เขี่ยเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวที่เลี้ยงไว้ในข้อ 1 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว LB-broth ที่มีแอมพิซิลิน 100 μg/ml ในปริมาตร 2 ml เขย่าที่ 37°C ข้ามคืน
3. นำแบคทีเรียที่เลี้ยงข้ามคืนแล้วจำนวน 1.5 ml มาปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 x g เป็นเวลา 5 นาที
4. นำตะกอนมาเติม 150 μl ของ TGE solution เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที



รูปที่ 2-3 แสดงขั้นตอนการสกัดพลาสมิด (จาก Turner และคณะ, 1997)

5. เติม 300 μl ของ Lysis solution เขย่าให้เข้ากันเบาๆโดยจับหลอดพลิกคว่ำหงายประมาณ 2-3 ครั้ง ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที
6. เติม 250 μl ของ Neutralize solution เขย่าให้เข้ากันเบาๆ จะเห็นตะกอนสีขาวๆเกิดขึ้น นำหลอดไปแช่น้ำแข็งอีก 30 นาที
7. นำหลอดทดลองไปปั่นแยกเอาตะกอนทิ้งไปที่ความเร็ว 3,000 x g เป็นเวลา 10 นาที
8. ดูดเอาส่วนใส (supernate) ที่ได้ซึ่งมีดีเอ็นเอของพลาสมิดออกมาใส่ในหลอดใหม่

9. เติม absolute alcohol ที่เย็น จำนวน 2 เท่าปริมาตรของส่วนใสที่ได้ ผสมให้เข้ากัน
10. นำไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 x g เป็นเวลา 10 นาที จะเห็นตะกอนสีขาวเล็กๆ
11. เทหรือดูดสารละลายส่วนใสออกให้หมด เหลือแต่ตะกอนไว้
12. เติม 500 μl ของ 70% ethanol เพื่อล้างตะกอนพลาสมิดให้บริสุทธิ์
13. นำไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 x g เป็นเวลา 5 นาที
14. เทหรือดูดสารละลายส่วนใสออกให้หมด ตั้งหลอดไว้ที่อุณหภูมิห้อง หรือนำไป vacuum ในเครื่องดูดความชื้น (desiccator) จนตะกอนดีเอ็นเอของพลาสมิดแห้ง
15. นำตะกอนที่ได้มาละลายใน TE buffer 30 μl
16. ดูด 10 μl ของสารละลายดีเอ็นเอผสมกับ 2 μl ของ 6x loading dye นำไปวิเคราะห์บนอะกาโรสอิเลคโตรโฟรีซิสที่ 1% agarose ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ จนกระทั่งสีบรอมฟีนอลบลูวิ่งจากขั้วลบไปขั้วบวกก่อนถึงปลายประมาณ 1-2 ซม.
17. หยุดการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า นำแผ่นเจลไปย้อมในสารเอธิเดียมโบร์ไมด์ 0.5 μg/ml เป็นเวลา 10 นาที ล้างอะกาโรสด้วยน้ำกลั่น
18. ตรวจดูแถบดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจล โดยส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลต หรือเครื่องวิเคราะห์ภาพเจล (Gel Imaging)
19. บันทึกผลการทดลองด้วยการถ่ายรูป

ข้อควรระวัง : เพื่อป้องกันอันตรายจากแสงอัลตราไวโอเลตที่จะเกิดกับตา ควรสวมแว่นตาหรือใช้แผ่นพลาสติกใสปิดครอบอะกาโรสเจล

การแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า

การแยกสารด้วยกระแสไฟฟ้าหรือเทคนิคอิเลคโตรโฟรีซิส (electrophoresis) อาศัยหลักการของอนุภาคที่มีประจุ เช่น โปรตีนและกรดนิวคลีอิคเคลื่อนที่ไปในกระแสไฟฟ้าโดยอนุภาคที่มีประจุสุทธิแตกต่างกันจะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วไฟฟ้าที่มีประจุตรงกันข้ามด้วยความเร็วไม่เท่ากัน ซึ่งขึ้นกับความแตกต่างของชนิดและปริมาณของประจุ ขนาดและรูปร่าง (shape) ของโมเลกุลของสารที่ต้องการจะแยกนั้น ในกรณีของดีเอ็นเอซึ่งมีประจุลบเนื่องจากหมู่ฟอสเฟตก็จะเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวก เทคนิคอิเลคโตรโฟรีซิสสามารถใช้แยกสารให้บริสุทธิ์ และสามารถใช้คำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลได้ เช่น การหาน้ำหนัก

โมเลกุลของดีเอ็นเอ โดยใช้ดีเอ็นเอที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล (DNA marker) วิ่งควบคู่กันไป เป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยากโดยมีส่วนประกอบหลักได้แก่

1. สารที่ต้องการแยก
2. ตัวกลาง (medium) สำหรับให้อนุภาคเคลื่อนที่ผ่าน
3. บัฟเฟอร์เพื่อทำให้ครบวงจรไฟฟ้า
4. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply)

ส่วนประกอบหลักเหล่านี้จะแตกต่างกันไปตามความเหมาะสมและลักษณะงานโดยเฉพาะชนิดของสารที่ต้องการแยก สำหรับการแยกดีเอ็นเอตัวกลางที่ใช้มากที่สุดคือ อะกาโรส (agarose) และโพลีอะคริลาไมด์ (polyacrylamide)

อะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis)

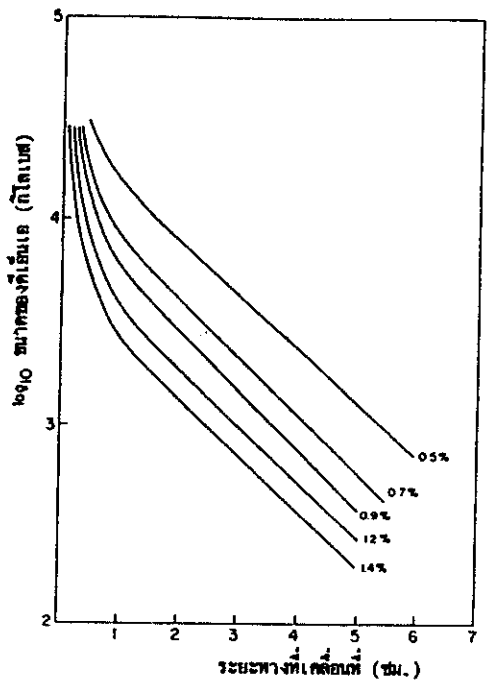
เป็นวิธีการมาตรฐานที่ใช้ในการแยก วิเคราะห์ และทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์จึงเป็นเทคนิคที่สำคัญมากในการศึกษาและวิจัยด้านพันธุวิศวกรรม อีกทั้งยังเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว และประหยัด ใช้แยกดีเอ็นเอขนาด 0.2-50 กิโลเบส นอกจากนั้นยังมีข้อดีที่สำคัญคือสามารถใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดไม่แตกต่างกันมากได้ โดยที่เทคนิคอื่น ๆ เช่น การหมุนเหวี่ยงในเกรเดียนต์ของความหนาแน่น (density gradient centrifugation) ไม่สามารถแยกได้ การตรวจหาตำแหน่งดีเอ็นเอ (DNA fragments) บนเจลหลังแยกด้วยกระแสไฟฟ้าแล้ว ทำได้ค่อนข้างง่ายและมีความไวสูง ซึ่งทำโดยการย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ที่ความเข้มข้นต่ำๆ ซึ่งเอธิเดียมโบรไมด์จะสอดแทรก (intercalate) ระหว่างเกลียวคู่ของดีเอ็นเอ ตรวจหาสารเชิงซ้อนของเอธิเดียมโบรไมด์และดีเอ็นเอ (ethidium bromide–DNA complex) โดยดูการเรืองแสง (fluorescence) ในช่วงคลื่นของแสงอัลตราไวโอเลต โดยวิธีนี้สามารถที่จะตรวจแถบดีเอ็นเอที่มีปริมาณต่ำมากขนาด 1 นาโนกรัมได้

อะกาโรสเป็น purified linear galactan hydrocolloid ที่สกัดแยกจากผนังเซลล์ของสาหร่ายทะเล มีโครงสร้างทางเคมีอย่างง่ายทำให้มีขนาดของรู (pore size) ค่อนข้างใหญ่ อะกาโรสเป็นสายโพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบไปด้วยกาแลคโตส (galactose) และอนุพันธ์ของกาแลคโตส (3,6-anhydro L-galactose) โดยอาศัยพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลอิสระของน้ำตาลดังกล่าว ทำให้สายอะกาโรสพันไขว้ (crosslinked) กันได้

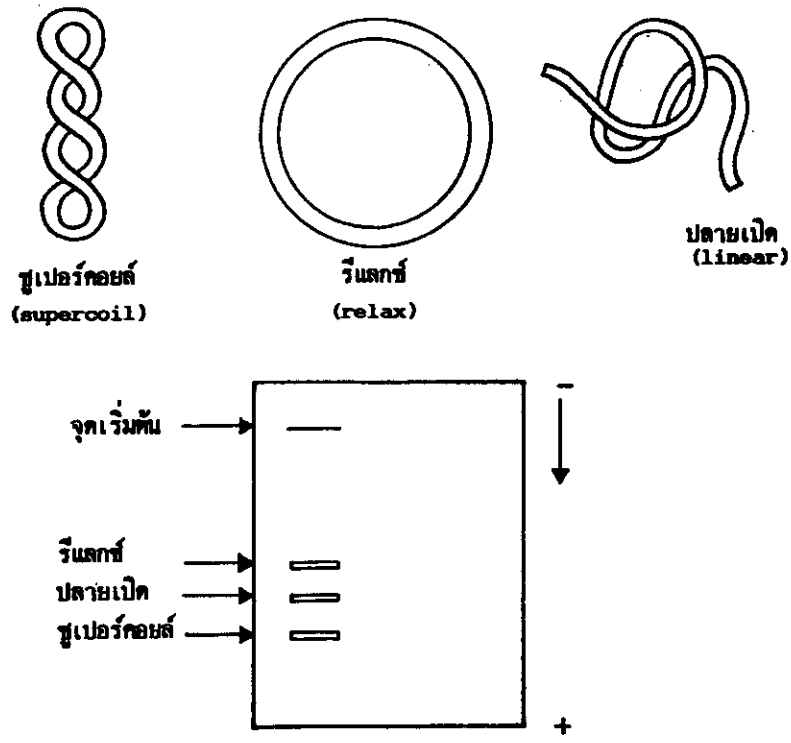
เป็นเหตุให้อะกาโรสในสารละลายกลายเป็นเจลที่มีลักษณะเป็นรูพรุน ความเข้มข้นของอะกาโรสในสารละลายจะเป็นตัวกำหนดขนาดของรูพรุน การเตรียมอะกาโรสเจลทำได้ง่าย เนื่องจากละลายได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 100°C และแข็งตัวได้เองที่อุณหภูมิห้อง แต่เป็นเจลที่มีความเปราะ เพราะโมเลกุลของเจลจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจนที่อ่อน การแยกดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลให้ได้ผลดีขึ้นกับปัจจัยที่สำคัญ ดังนี้

1. ขนาดของดีเอ็นเอ (size of DNA) ดีเอ็นเอขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอขนาดใหญ่และระยะทางในการเคลื่อนที่จะมีความสัมพันธ์ในลักษณะผกผันกับค่า log ของน้ำหนักโมเลกุลของดีเอ็นเอ

2. รูปร่างของดีเอ็นเอ (conformation of DNA) ภายใต้สภาวะเดียวกัน DNA ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันจะเคลื่อนที่ได้ต่างกันถ้ามีรูปร่างหรือโครงรูปแตกต่างกันโดยอัตราความเร็วจะเป็นดังนี้ ดีเอ็นเอที่ขดเป็นวงเกลียวแน่น (supercoiled DNA) จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอปลายเปิดเป็นเส้นตรง (linear DNA) และดีเอ็นเอที่คลายเป็นวง (relaxed DNA) หรือวงกลมเปิด (open circular หรือ nicked circular)

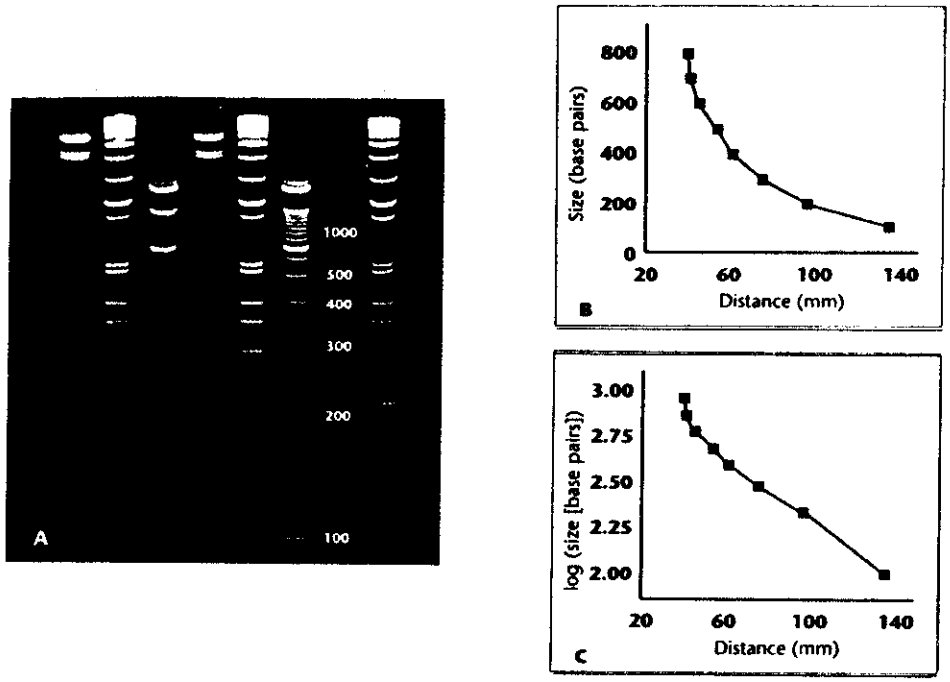


รูปที่ 2-4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของดีเอ็นเอ (log_{10} Molecular Weight) และระยะทางของการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอปลายเปิดเส้นตรงในอะกาโรสเจล



รูปที่ 2-5 แสดงการเคลื่อนที่ของพลาสมิดซึ่งอยู่ในโครงรูปต่าง ๆ กัน 3 แบบ คือ supercoiled, relaxed และ linear (จาก ศิริพร, 2531)

3. ความเข้มข้นของอะกาโรส (agarose concentration) ในขณะทำอิเลคโตรโฟรีซิสดีเอ็นเอจะต้องเคลื่อนที่ผ่านรูพรุน (pore) ภายในเจล ถ้ารูพรุนมีขนาดใหญ่อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอก็จะสูง ขนาดของรูพรุน (pore size) ภายในเจลจะเปลี่ยนแปลงไปตามความเข้มข้นของอะกาโรสที่ใช้เตรียมเจล กล่าวคือเมื่อใช้อะกาโรสความเข้มข้นสูงๆ ขนาดรูพรุนก็จะเล็กกว่าเมื่อใช้อะกาโรสความเข้มข้นต่ำ ๆ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าอัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลระหว่างอิเลคโตรโฟรีซิส จะขึ้นกับความเข้มข้นของอะกาโรส ดังนั้นการแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันจำเป็นต้องเลือกใช้อะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้นเหมาะสม ความเข้มข้นส่วนใหญ่ที่นิยมใช้คือ 0.5-2%



รูปที่ 2-6 (a) ตัวอย่างการแยกดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเลคโตรโฟรีซิส
(b และ c) การเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน (base pairs; bp) กับระยะทาง (distance) (จาก Hoefer Scientific Instruments)

ตารางที่ 2-2 ความเข้นข้นของอะกาโรสกับการแยกขนาดของดีเอ็นเอ

ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล (%W/V)	ขนาดของดีเอ็นเอปลายเปิดเส้นตรง (kb)
0.3	5-60
0.6	1-20
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
2.0	0.1-2

ตารางที่ 2-3 แสดงความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่ใช้

บัฟเฟอร์	ความเข้มข้นที่ใช้	ความเข้มข้นที่เตรียมไว้ต่อลิตร
Tris-acetate (TAE)	1x : 0.04 M Tris-acetate 0.002 M EDTA	50x : 342 g Tris base, 57.1 ml glacial acetic acid, 100 ml 0.5 M EDTA (pH8.0) หรือ 37.2 g Na_2 EDTA
Tris-borate (TBE)	0.5x : 0.045 M Tris-borate 0.001 M EDTA	5x : 54 g Tris base, 27.5 g boric acid, 20 ml 0.5 M EDTA (pH8.0) หรือ 4.65 g Na_2 EDTA
Tris-phosphate (TP)	1x : 0.09 M Tris-phosphate 0.002 M EDTA	10x : 108 g Tris base, 15.5 ml 85% phosphoric acid, 540 ml 0.5 M EDTA (pH8.0) หรือ 9.3 g Na_2 EDTA

พลาสมิดโดยทั่วไปจะมีรูปร่าง 3 แบบ คือ

1. ขดเป็นวงเกลียวแน่น (supercoiled DNA) โดยทั่วไปพลาสมิดจะอยู่ในสภาพขดเป็นวง เพราะเป็นสภาวะที่มีเสถียรภาพมากที่สุด รูปร่างเช่นนี้ทำให้สามารถเคลื่อนที่ในอะกาโรสเจลได้เร็วที่สุด

2. คลายเป็นวง (relaxed DNA) เป็นลักษณะเกลียวคู่ของดีเอ็นเอเกิดขาดเพียงเส้นใดเส้นหนึ่ง ทำให้คลายจากขดออกมา ลักษณะนี้ทำให้สามารถเคลื่อนที่ในอะกาโรสเจลได้ช้าที่สุด

3. ปลายเปิดเป็นเส้นตรง (linear NDA) เป็นลักษณะที่เกลียวคู่ของดีเอ็นเอขาดออกทั้งสองเส้น ดีเอ็นเอลักษณะนี้จะเคลื่อนที่ได้ปานกลาง

ความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอเคลื่อนที่ในอะกาโรสเจลจะใช้ได้เฉพาะรูปร่างที่คลายเป็นเส้นตรงเท่านั้น

4. บัฟเฟอร์ (buffer) บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ในการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิสมีหลายชนิด ซึ่งแต่ละชนิดจะมีส่วนประกอบของอิออนและ ionic strength ที่แตกต่างกันทำให้มีผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ โดยปรกติเมื่อทำอิเลคโตรโฟรีซิสไประยะเวลาหนึ่งขั้วบวกจะเพิ่มความเป็นด่าง (pH สูงขึ้น) ส่วนขั้วลบจะเพิ่มความเป็นกรด (pH ต่ำลง) เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลง pH ซึ่งจะเกิดขึ้นให้ได้มากที่สุด จึงนิยมใช้บัฟเฟอร์ที่มีความจุ (capacity) สูง แต่เมื่อจำเป็นที่จะต้องใช้บัฟเฟอร์ที่มีความจุต่ำระหว่างอิเลคโตรโฟรีซิส จะ

ต้องทำการผสมบัฟเฟอร์ระหว่างขั้วทั้งสองเข้าด้วยกันโดยสม่ำเสมอหรือตลอดเวลาเพื่อปรับให้ pH ของบัฟเฟอร์ที่ขั้วทั้งสองเท่ากัน บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทำเจลอิเลคโตรโฟรีซิสของดีเอ็นเอจะใช้บัฟเฟอร์ pH 8 เช่น Tris-acetate, Tris-borate และ Tris-phosphate buffer และมักจะเตรียมในรูปสารละลายที่มีความเข้มข้นสูงกว่าความเข้มข้นที่จะใช้จริง 10 เท่า (10x) ขึ้นไป เมื่อต้องการใช้จึงจะนำมาทำให้เจือจางลง บัฟเฟอร์ทั้ง 3 ชนิด มีความแตกต่างกันคือ

Tris-acetate (TAE) เป็นบัฟเฟอร์ที่มีความจุของบัฟเฟอร์ (buffer capacity) ต่ำที่สุด จึงจำเป็นต้องอาศัยการถ่ายเทหมุนเวียน (recirculation) ระหว่าง 2 ขั้วอยู่ตลอดเวลาในการวิเคราะห์เจลยาวๆ หรือนานๆ เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญในบัฟเฟอร์ชนิดนี้ได้ ดังนั้นการที่จะช่วยให้เก็บบัฟเฟอร์นี้ได้นานขึ้นจะนำไปอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ก่อนที่จะนำไปเก็บที่ 4°C การใช้บัฟเฟอร์ชนิดนี้มีข้อดีคือ สามารถทำอิเลคโตรโฟรีซิสโดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าสูง ๆ ได้โดยที่อะกาโรสเจลจะไม่ร้อน

Tris-borate (TBE) เป็นบัฟเฟอร์ที่มีความจุของบัฟเฟอร์สูง แถบดีเอ็นเอที่แยกได้จะเล็กและคมชัด เนื่องจากกรดบอริคเป็นตัวยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ จึงทำให้เก็บบัฟเฟอร์นี้ได้นานๆ ที่อุณหภูมิห้อง จึงเป็นบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ในงานประจำโดยทั่วไป บัฟเฟอร์ชนิดนี้ถ้าเตรียมไว้ในความเข้มข้นที่สูงมาก ๆ จะทำให้เกิดการตกผลึกได้

Tris-phosphate (TP) เป็นบัฟเฟอร์ที่มีความจุสูงคล้าย TBE แถบดีเอ็นเอที่แยกโดยใช้บัฟเฟอร์นี้จะคมชัดดี แต่จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้จึงเก็บไว้ไม่ได้นาน นอกจากนี้ TP เป็นบัฟเฟอร์ที่ให้ความสะดวกกว่า TBE ในกรณีที่จะนำเจลนั้นไปละลายโดยใช้โปแตสเซียมไอโอได หรือโซเดียมเปอคลอเรท

5. ค่าความต่างศักย์ (Voltage) โดยปรกติอะกาโรสอิเลคโตรโฟรีซิสจะทำโดยใช้ความต่างศักย์อยู่ในช่วง 0.5-5 โวลต์/เซนติเมตร แต่ความต่างศักย์ที่นิยมใช้มักจะมีค่าต่ำ ๆ ประมาณ 1 โวลต์/เซนติเมตร ที่ใช้ทั่วไปประมาณ 1-5 โวลต์/เซนติเมตร (เซนติเมตรคือระยะห่างระหว่างขั้วไฟฟ้าเป็นเซนติเมตร) ที่ความต่างศักย์ต่ำๆ อัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอปลายเปิดเส้นตรงจะเป็นสัดส่วนกับความต่างศักย์ แต่ถ้าใช้ความต่างศักย์สูงขึ้น การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอปลายเปิดโมเลกุลใหญ่ ๆ จะเพิ่มขึ้นมากกว่าพวกที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก เป็นเหตุให้เมื่อใช้ความต่างศักย์สูงๆ ช่วงขนาดของดีเอ็นเอปลายเปิดที่แยก

ได้จะแคบลงสำหรับดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ โดยเฉพาะที่ใหญ่กว่า 70 กิโลเบส การที่จะทำให้แยกจากกันได้ดีจะต้องใช้ความต่างศักย์ต่ำ (0.5 โวลต์/เซนติเมตร)

การใช้ความต่างศักย์ต่ำ ๆ (1 โวลต์/เซนติเมตร) จะใช้เวลานานในการแยกดีเอ็นเอ ซึ่งอาจจะทำให้เกิดการแพร่ของแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กได้มาก ทำให้ดีเอ็นเอที่แยกได้ไม่คมหรือในกรณีที่ขนาดโมเลกุลไม่ต่างกันมากจะไม่สามารถแยกจากกันได้เลย ดังนั้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็ก (ต่ำกว่า 2 กิโลเบส) จะใช้ความต่างศักย์สูง ๆ เพื่อลดการแพร่ของแถบดีเอ็นเอลง

อะกาโรสอิเลคโตรโฟรีซิสมักจะทำในแนวราบและนิยมทำที่อุณหภูมิห้อง อัตราเร็วสัมพัทธ์ของการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอปลายเปิดขนาดต่างๆ จะไม่เปลี่ยนแปลงในช่วง 4-30°C แต่ถ้าความเข้มข้นของเจลต่ำกว่า 0.5% จะทำอิเลคโตรโฟรีซิสที่ 4°C เพราะความเข้มข้นของเจลต่ำจะอยู่ในสภาพนิ่ม ในที่เย็นจะช่วยให้เจลคงรูปมากขึ้น

นอกจากนี้แล้วการเตรียมเจลก็มีผลต่อประสิทธิภาพในการแยกดีเอ็นเอเช่นกัน โดยปรกติเจลที่เตรียมควรหนาประมาณ 3-5 มิลลิเมตร และควรวางหวี (comb) ที่ใช้เตรียมช่องใส่ดีเอ็นเอให้สูงจากพื้นถาดประมาณ 0.5-1 มิลลิเมตร ส่วนปริมาณดีเอ็นเอที่จะใส่ลงในหลุมจะขึ้นกับจำนวนและขนาดของดีเอ็นเอ

การหยอดสารตัวอย่างดีเอ็นเอ

เมื่อเตรียมอะกาโรสเจลได้แล้วในเจลแชมเบอร์ (gel chamber) ในการเติมหรือหยอดดีเอ็นเอลงในหลุม (well) ของเจล เพื่อป้องกันไม่ให้สารตัวอย่างดีเอ็นเอที่หยอดลงในหลุมฟุ้งขึ้นมา และเพื่อติดตามการเคลื่อนที่ของสารที่มีประจุลบและมีขนาดโมเลกุลเล็กในสนามไฟฟ้าระหว่างอิเลคโตรโฟรีซิส จะผสมสารตัวอย่างดีเอ็นเอลงใน gel loading buffer ที่มีส่วนประกอบเป็นสีติดตาม (tracking dye) 2 ชนิด คือ บรอมฟีนอลบลู (bromphenol blue) และไซลีนไซยานอลเอฟเอฟ (xylene cyanol FF) กับสารที่ช่วยเพิ่มความหนาแน่นและความหนืดของดีเอ็นเอ ซึ่งอาจจะเป็นกลีเซอรอล (glycerol) ซูโครส (sucrose) หรือไฟคอลล์ (ficoll) นอกจากนี้อาจจะใส่สารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กและมีประจุลบ ซึ่งเป็นสารที่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ เช่น SDS หรือยูเรีย (urea) โดยทั่วไป gel loading buffer มักจะเตรียมอยู่ในรูปสารละลายที่เข้มข้นประมาณ 6 เท่า เมื่อต้องการใช้

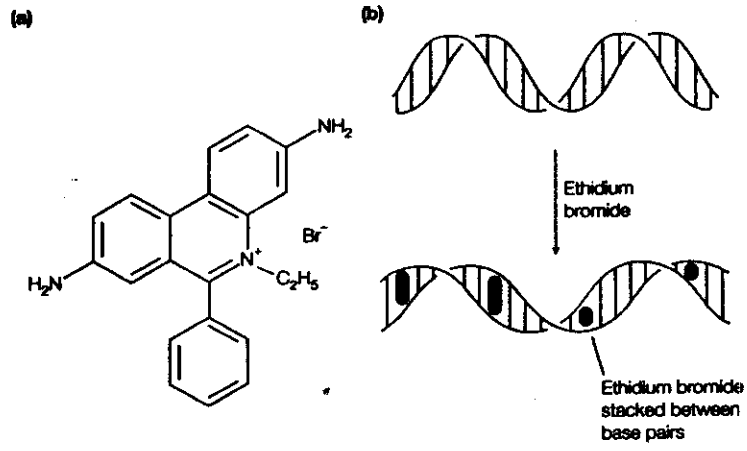
จะผสมกับสารตัวอย่างดีเอ็นเอในอัตราส่วน 1:5 แล้วจึงนำไปหยอดลงในหลุมบนอะกาโรสเจลที่เตรียมไว้

สีที่ผสมนี้เป็นโมเลกุลที่มีประจุลบ ดังนั้นจะเคลื่อนที่เข้าหาประจุบวกด้วยความเร็วที่แน่นอน จึงช่วยให้คาดคะเนการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอได้ สีบรอมฟีนอลบลูจะเคลื่อนที่ได้เร็วที่สุดในสนามไฟฟ้าเมื่อเทียบกับโมเลกุลของดีเอ็นเอ ซึ่งจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าไซลีนไซยานอลเอฟเอฟ 2.2 เท่า และจะเคลื่อนที่ผ่านอะกาโรสเจลใน 0.5x TBE บัฟเฟอร์ในอัตราเทียบเท่ากับดีเอ็นเอเส้นคู่ปลายเปิดเส้นตรง (linear double-stranded DNA) ขนาด 300 คู่เบส (base pairs, bp) ความสัมพันธ์นี้จะไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของเจลโดยเฉพาะอะกาโรสเจล

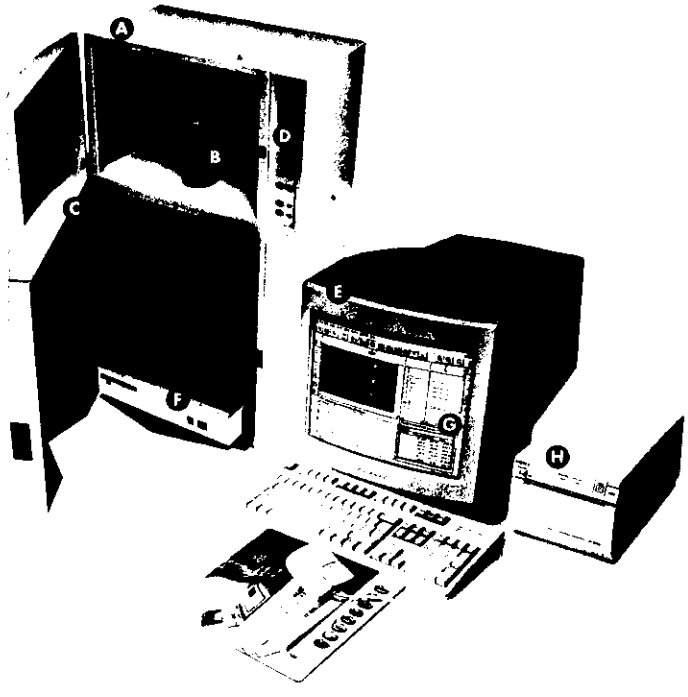
การตรวจสอบดีเอ็นเอ

หลังจากทำอิเลคโตรโฟรีซิสแล้ว เจลจะถูกนำไปย้อมด้วยสีฟลูออเรสเซนต์คือเอธิเดียมโบรไมด์ ที่ความเข้มข้น 0.5 μg/ml นานประมาณ 15-30 นาที แล้วนำมาล้างในน้ำกลั่นหรือน้ำประปาเพื่อลด background สีย้อมนี้จะสอดแทรกเข้าไปอยู่ระหว่างคู่เบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ เมื่อเอธิเดียมโบรไมด์จับอยู่กับดีเอ็นเอจะเรืองแสงมากกว่าขณะที่อยู่เป็นสีอิสระ (การใช้สีนี้ต้องทำด้วยความระมัดระวังและสวมถุงมือทุกครั้งเนื่องจากเป็นสารก่อมะเร็งหรือ carcinogen) การใส่เอธิเดียมโบรไมด์นี้สามารถใส่ไปพร้อมกับการเตรียมอะกาโรสเจลและบัฟเฟอร์ และติดตามการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอโดยนำมาดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

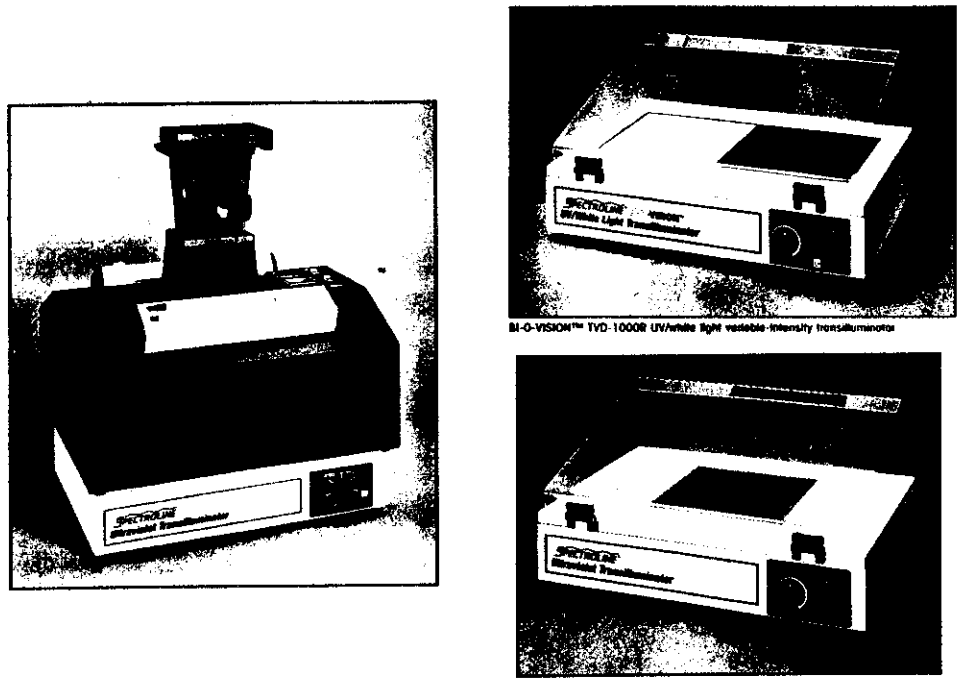
เมื่อดีเอ็นเอถูกย้อมเรียบร้อยแล้ว นำเจลมาส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่มีความยาวคลื่นประมาณ 260-360 นาโนเมตร (nanometer, nm) ดีเอ็นเอจะดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และปล่อยแสงออกมาที่ 302 และ 366 นาโนเมตร สีที่แทรกอยู่กับดีเอ็นเอจะดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 302 และ 366 นาโนเมตร ทั้งดีเอ็นเอและสีจะปล่อยพลังงานออกมาที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ซึ่งเป็นบริเวณสีแดงเข้ม (red-orange) ของสเปคตรัมที่มองเห็นได้ จึงสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอที่ความเข้มข้นต่ำๆ ได้ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถเห็นการเรืองแสงได้ประมาณ 1-2 นาโนกรัม



รูปที่ 2-7 โครงสร้างของเอธิเดียมโบรไมด์และการแทรกเข้าไปในชั้นเบสของดีเอ็นเอ (จาก Turner และคณะ, 1997)



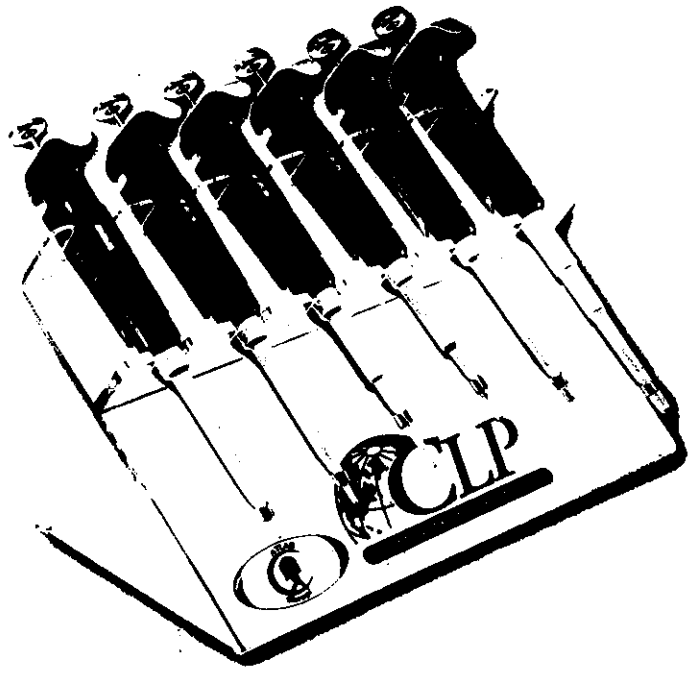
รูปที่ 2-8 เครื่อง Gel imaging หรือ Gel Doc (Syngene) ใช้สำหรับตรวจดูและวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่แยกด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิส

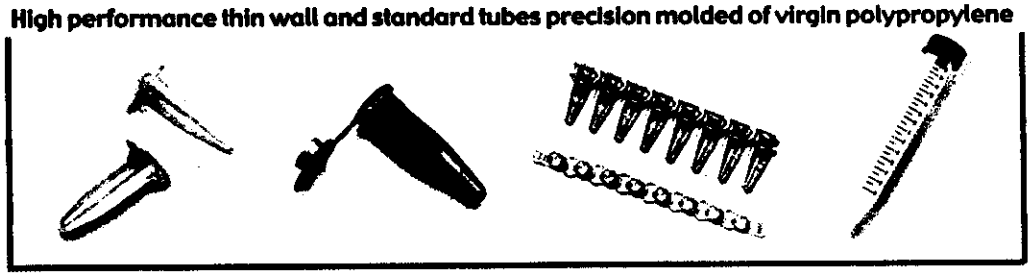


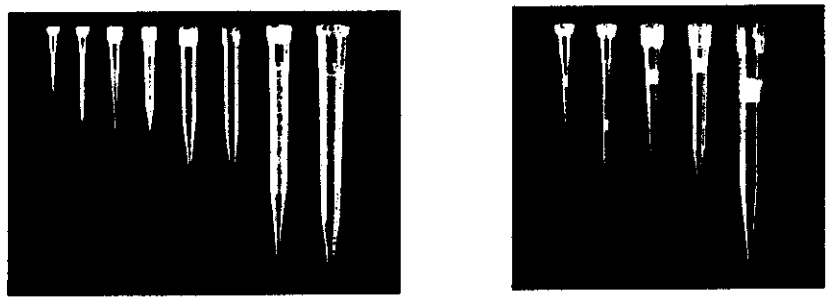
รูปที่ 2-9 เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV transilluminator, Spectroline)

สารเคมีที่ใช้

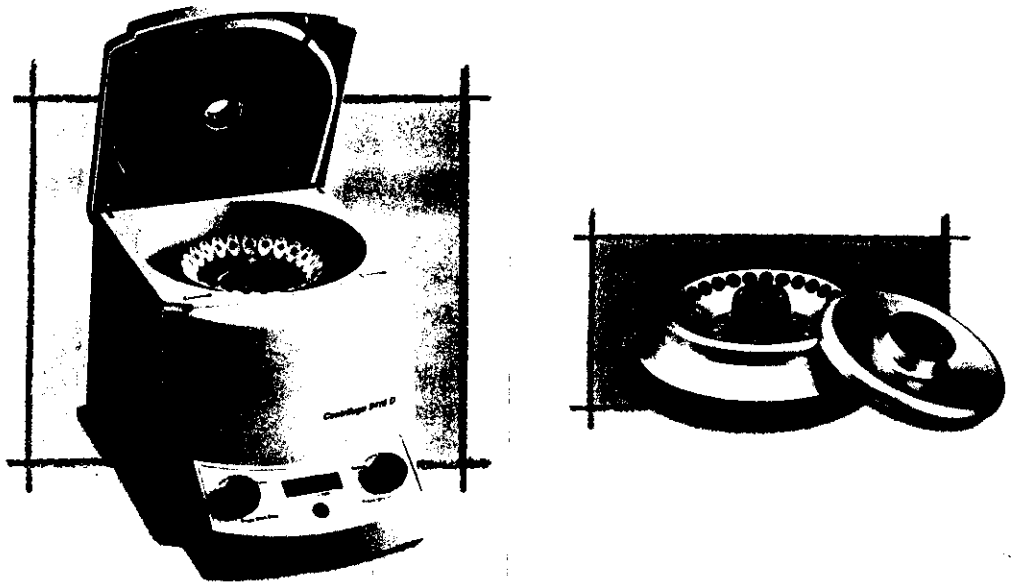
1. 0.5x Tris-borate buffer (TBE) : 45 mM Tris, 45 mM boric acid, 1 mM EDTA
2. Agarose gel : 1% agarose ใน 0.5xTBE
3. 6x Loading dye : 10% glycerol, 0.25% bromphenol blue ใน TE buffer หรือน้ำกลั่น
4. Staining solution : 0.5 μg/ml ethidium bromide (สารเอธิเดียมโบรไมด์เป็นสารอันตรายต้องใส่ถุงมือทุกครั้ง)
5. สารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน : λDNA/*Hin*dIII (ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดดีเอ็นเอของเฟจแลมบ์ดาด้วย *Hin*dIII ซึ่งประกอบด้วยชิ้นดีเอ็นเอขนาด 23.4, 9.6, 6.6, 4.4, 2.3, 2.1 และ 0.6 กิโลเบส)



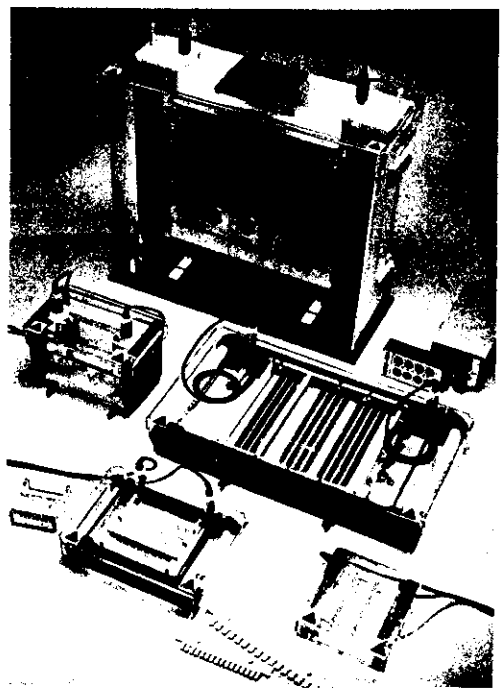




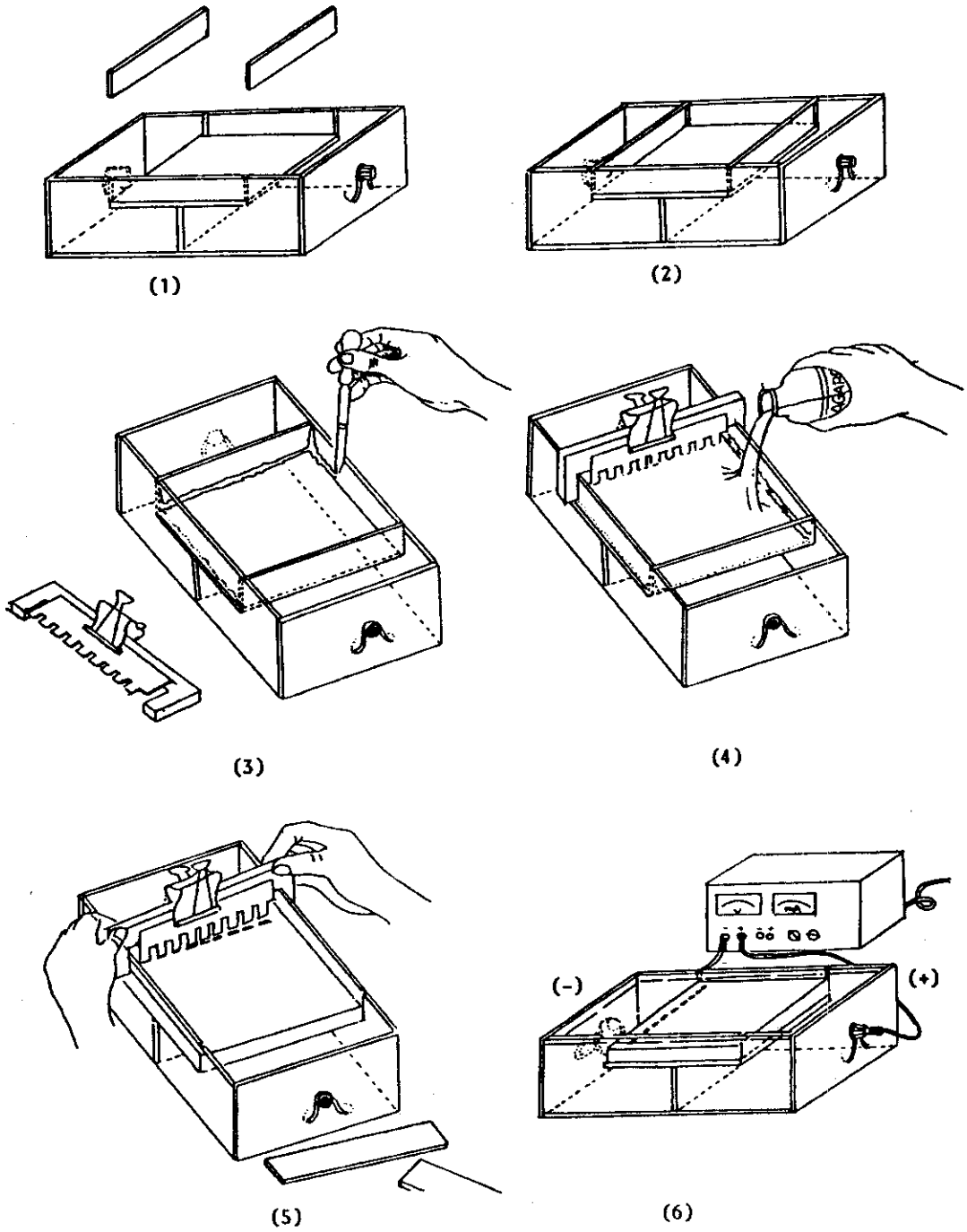
รูปที่ 2-10 Micropipettes, microtubes และ tips ในขนาดปริมาตรต่างๆ สำหรับใช้ในงานพันธุวิศวกรรม (จาก Continental Lab Products และ Eppendorf)



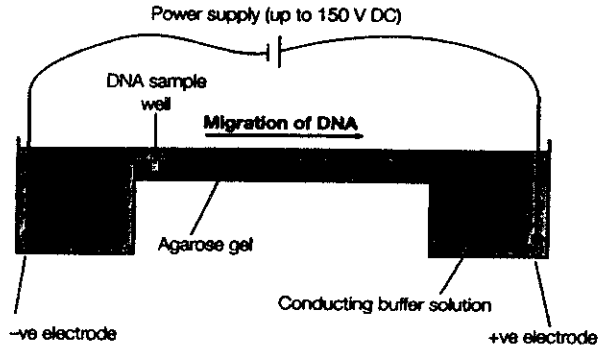
รูปที่ 2-11 เครื่องปั่นเหวี่ยง microtube (Microcentrifuge, Eppendorf)



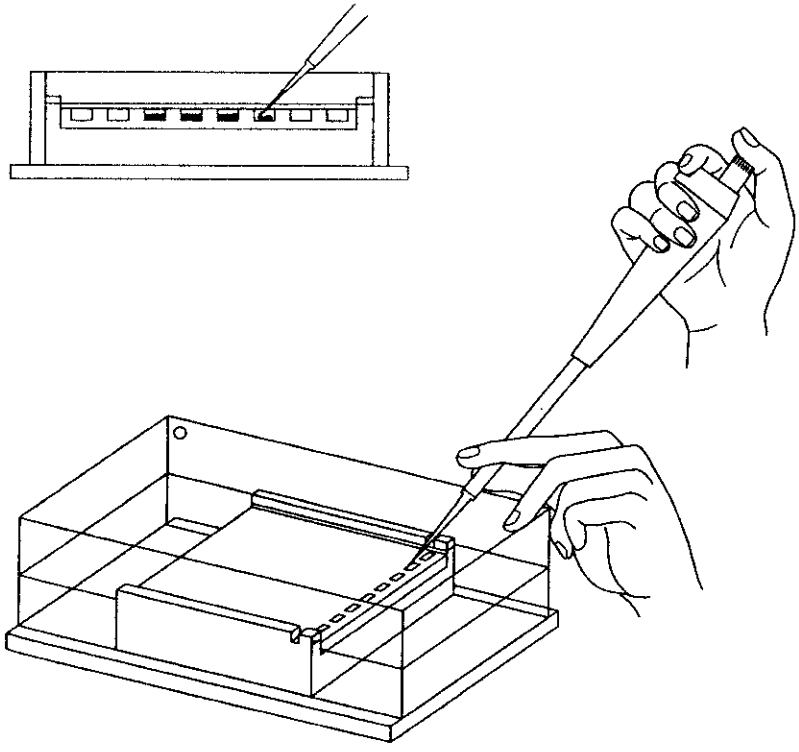
รูปที่ 2-12 เครื่องแยกปริมาณสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้าแบบแนวตั้งและแนวนอน (Electrophoresis; SCIE-PLAS)



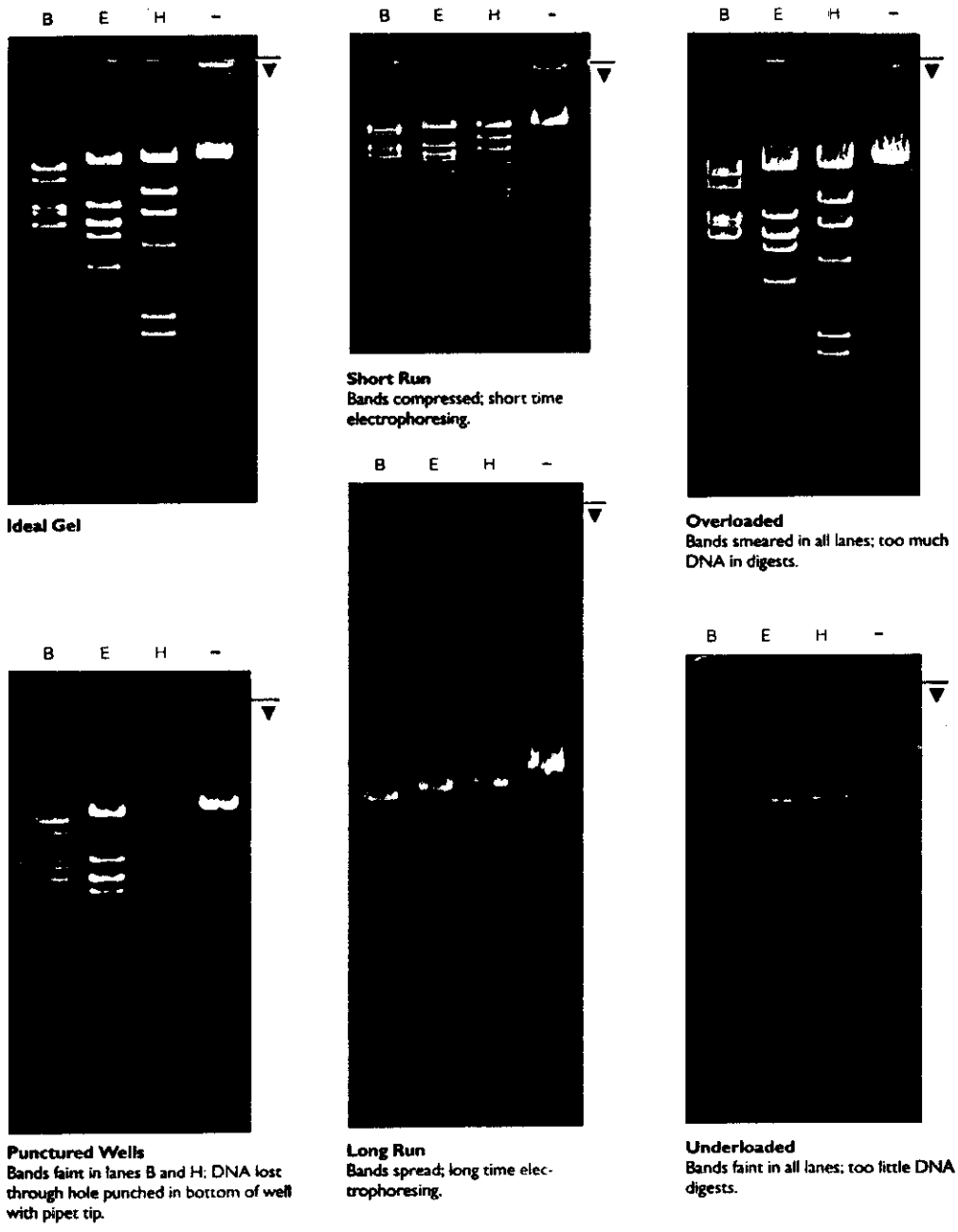
รูปที่ 2-13 ภาพแสดงส่วนประกอบต่างๆของเจลแชมเบอร์และการเทอะกาโรสเจลลงในแชมเบอร์



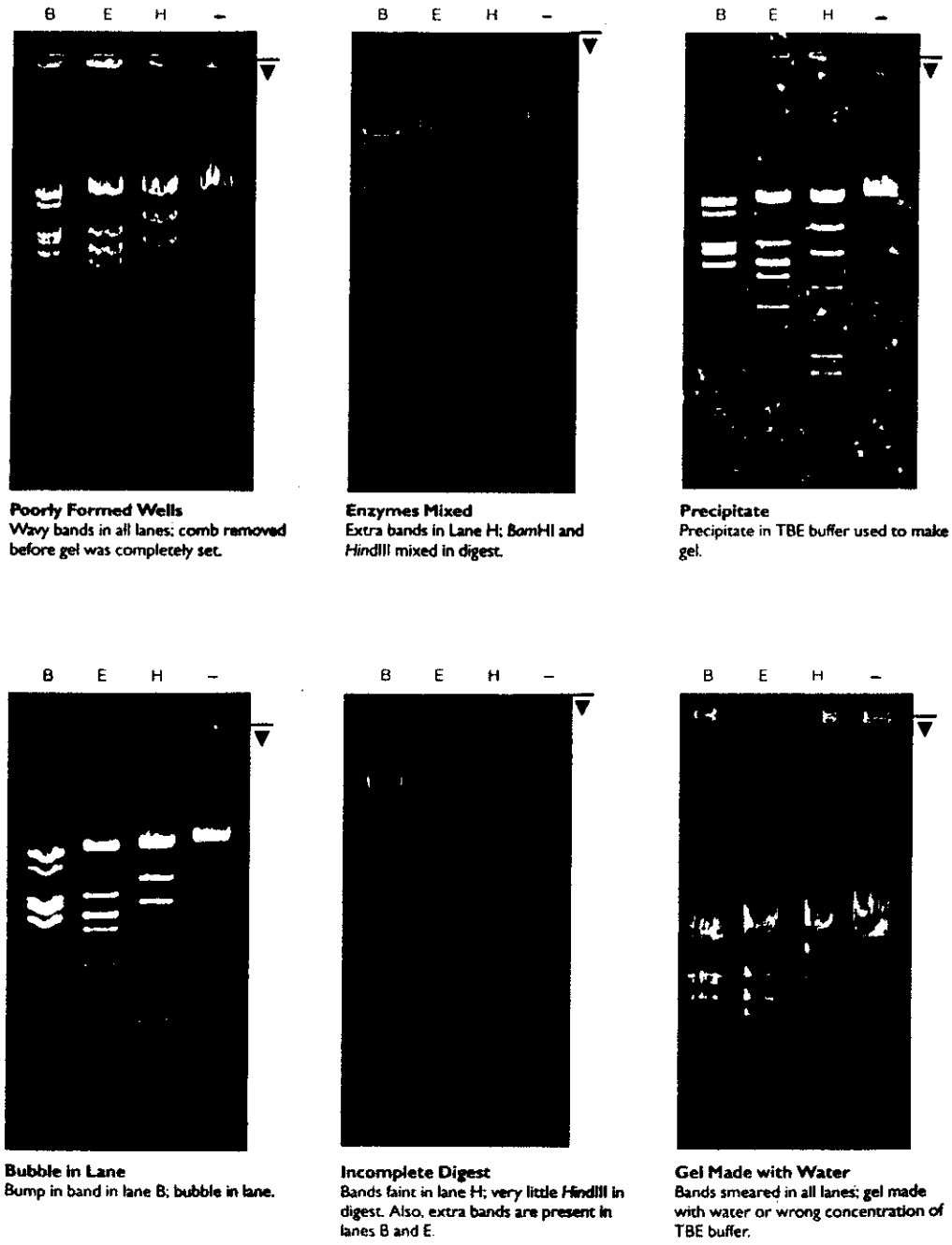
รูปที่ 2-14 การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอบนเจลอิเลคโตรโฟรีซิสจากขั้วลบไปขั้วบวก
(จาก Bloom และคณะ, 1996)



รูปที่ 2-15 วิธีการหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอลงในหลุมอะกาโรสเจล
(จาก Bloom และคณะ, 1996)



รูปที่ 2-16 แสดงลักษณะการเคลื่อนที่ของ λDNA ที่เกิดจาก Electrophoresis Effect บน 0.8% agarose gel electrophoresis และย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์, (-) : ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์, (B) : ตัดด้วย *Bam*HI, (E) : ตัดด้วย *Eco*RI, (H) : ตัดด้วย *Hin*dIII (จาก Bloom และคณะ, 1996)



Poorly Formed Wells
Wavy bands in all lanes; comb removed before gel was completely set.

Enzymes Mixed
Extra bands in Lane H; *Bam*HI and *Hin*dIII mixed in digest.

Precipitate
Precipitate in TBE buffer used to make gel.

Bubble in Lane
Bump in band in lane B; bubble in lane.

Incomplete Digest
Bands faint in lane H; very little *Hin*dIII in digest. Also, extra bands are present in lanes B and E.

Gel Made with Water
Bands smeared in all lanes; gel made with water or wrong concentration of TBE buffer.

รูปที่ 2-17 แสดงลักษณะการเคลื่อนที่ของ λDNA ที่เกิดจาก Electrophoresis Effect บน 0.8% agarose gel electrophoresis และย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์, (-) : ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์, (B) : ตัดด้วย *Bam*HI, (E) : ตัดด้วย *Eco*RI, (H) : ตัดด้วย *Hin*dIII (จาก Bloom และคณะ, 1996)

อุปกรณ์

1. เจลแชมเบอร์ (gel chamber) และเครื่องกำเนิดไฟฟ้า (power supply)
2. เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV transilluminator)
3. ปิเปต (pipette) หรือไมโครปิเปต (micropipette) พร้อม tips
4. ไมโครเวฟ (microwave)
5. กล่องพลาสติก (เพื่อใช้สำหรับย้อมเจล) และที่ตักเจล
6. กล้องถ่ายรูปและฟิล์ม หรือเครื่องวิเคราะห์ภาพเจล (Gel Imaging)

วิธีทำการทดลอง

1. เตรียม 1% agarose gel (ชั่งอะกาโรส 1 กรัม ลงใน 100 ml 0.5xTBE) นำไปหลอมละลายในไมโครเวฟ
2. เทอะกาโรสที่ละลายแล้วและเย็นลงที่ประมาณ 55°C ลงในเจลแชมเบอร์พร้อมหวี (comb)
3. รอจนอะกาโรสเย็นลงจนแข็งตัว จึงดึงหวีออก
4. เท 0.5x TBE ลงบนอะกาโรสเจลที่แข็งตัวให้ท่วมเจลประมาณ 1-3 มิลลิลิตร เรียกว่าเป็นวิธีใต้น้ำ (submerine)
5. นำดีเอ็นเอตัวอย่างผสมกับ 6x loading dye ในอัตราส่วน 5:1 บนกระดาษพาราฟิล์ม (parafilm paper) จากนั้นจึงหยอดลงในหลุมอะกาโรสเจลด้วยไมโครปิเปต และหยอดสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐานในความเข้มข้น 0.5 μg ที่ผสมกับ 6x loading dye ลงในหลุมอะกาโรสเจลอีกหลุมด้วย
6. ต่อขั้วไฟฟ้าทั้งสองบนแชมเบอร์เข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า โดยให้ดีเอ็นเอวิ่งจากขั้วลบไปขั้วบวก
7. เปิดกระแสไฟฟ้าโดยตั้งโวลต์ (Volt) คงที่ที่ 100 โวลต์
8. ปิดกระแสไฟฟ้าเมื่อสีน้ำเงินของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่มาใกล้ถึงขอบเจลอีกด้านหนึ่ง (ห่างจากขอบประมาณ 1-2 ซม.)
9. นำอะกาโรสเจลไปแช่ในกล่องพลาสติกที่มี staining solution ประมาณ 10 นาที ล้างอะกาโรสด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลต
10. บันทึกผลด้วยการถ่ายรูป

ผลการทดลอง

1. การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอโครงรูปต่างๆ

รูป	supercoiled	เคลื่อนที่ได้	.....	ซม.
รูป	linear	เคลื่อนที่ได้	.....	ซม.
รูป	relaxed	เคลื่อนที่ได้	.....	ซม.

2. ขนาดของดีเอ็นเอรูป linear ..... กิโลเบส

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

แบบฝึกหัดบทปฏิบัติการที่ 2

1. รูปร่างของพลาสมิดชนิดใดที่เคลื่อนที่ได้เร็วที่สุด
2. ในการสกัดแยกพลาสมิด สาร SDS และเอนไซม์ไลโซไซม์ ใส่ลงไปในขั้นตอนสกัดเพื่ออะไร
3. พลาสมิดชนิดใดที่มีการแบ่งตัวไม่ขึ้นกับการแบ่งตัวของโครโมโซมในเซลล์แบคทีเรีย