บทปฏิบัติการที่ 4
การวิเคราะห์หาปริมาณของกรดนิวคลีอิค

หลักการ

ดีเอ็นเอเป็นสารชีวโมเลกุลที่ทำหน้าที่เก็บข้อความทางพันธุกรรมและถ่ายถอดจากพ่อแม่ไปสู่รุ่นลูกหลาน ส่วนใหญ่จะพบที่นิวเคลียสของเซลล์เรียกว่า genomic DNA มีบางส่วนที่พบในไมโตคอนเดรียเรียกว่า mitochondrial DNA ดังนั้นจึงพบดีเอ็นเอในเซลล์ทุกชนิด ยกเว้นเม็ดเลือดแดงของคนที่ไม่มีนิวเคลียสและไมโตคอนเดรีย

กรดนิวคลีอิคสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ซึ่งแตกต่างกันที่น้ำตาล กรดนิวคลีอิคที่มีน้ำตาลไรโบส (ribose) เป็นส่วนประกอบเรียกว่า กรดไรโบนิวคลีอิค (ribonucleic acid) หรือ RNA และพวกที่ประกอบด้วยน้ำตาลดีออกซิไรโบส (2′-deoxyribose) เรียกว่า กรดดีออกซิไรโบนิวคลีอิค (deoxyribonucleic acid) หรือ DNA

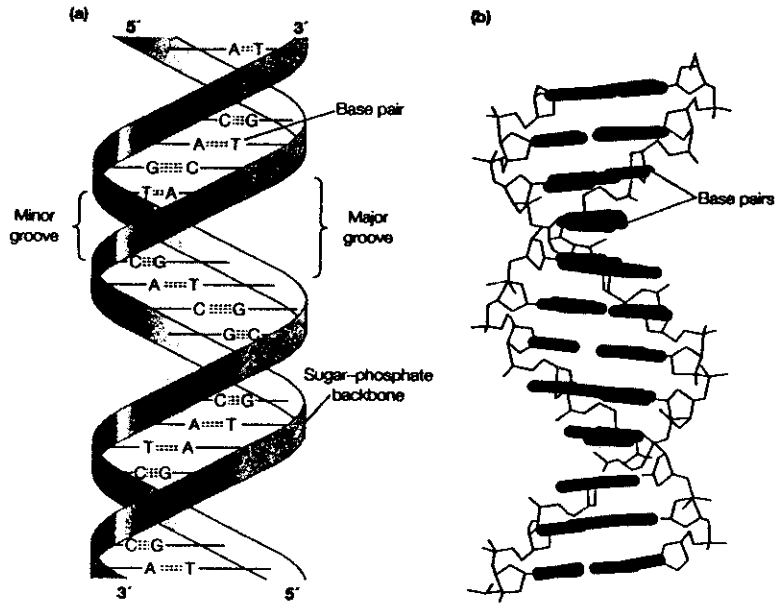
โมเลกุลนิวคลีโอไซด์ (nucleoside) เป็นโมเลกุลขนาดเล็ก ประกอบด้วยเบสและน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ ส่วนนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) เป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ ประกอบด้วย เบส น้ำตาล และฟอสเฟต กรดนิวคลีอิคประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์หลายหน่วยต่อกัน (polynucleotides) เป็นเส้นยาว มีทั้งเส้นเดี่ยว (single stranded) และเส้นคู่ (double stranded) โดยปรกติดีเอ็นเอประกอบด้วยโพลีนิวคลีโอไทด์ 2 เส้น พันกันเป็นเกลียวคู่ (double helix) และอาร์เอ็นเอพบเป็นโพลีนิวคลีโอไทด์เส้นเดียว

ไนโตรจีนัสเบส (nitrogenous base) ที่พบในกรดนิวคลีอิคมีอยู่ 2 ชนิด คือ พิริมิดีน (pyrimidine) ได้แก่ ไซโตซีน (Cytosine = C) ยูราซิล (Uracil = U) และไธมีน (Thymine = T) และอีกชนิดคือ เพียวรีน (purine) ได้แก่ อะดีนีน (Adenine = A) และกวานีน (Guanine = G) ดีเอ็นเอพบเบส 4 ชนิด คือ A, T, C และ G ในอาร์เอ็นเอพบเบส 4 ชนิด เหมือนกันคือ A, U, C และ G ไม่พบเบส T สารไนโตรจีนัสเบสนี้เป็นสารประกอบพวกอะโรเมติก (aromatic compound) จึงสามารถดูดกลืนแสงเหนือม่วงหรืออัลตราไวโอเลตที่มีความยาวคลื่น 260-280 นาโนเมตร ได้ ดังนั้นดีเอ็นเอจึงสามารถดูด

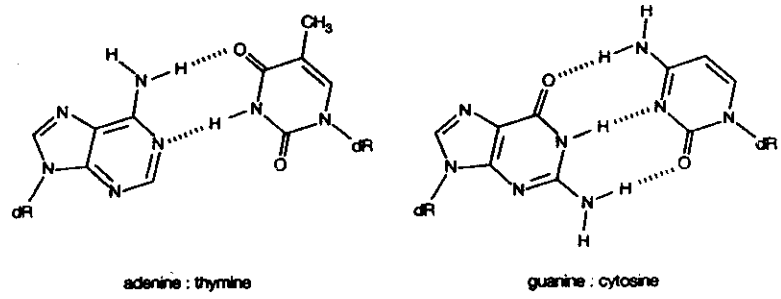
กลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และดีเอ็นเอเส้นเดี่ยวจะดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นนี้ได้ดีกว่าดีเอ็นเอเส้นคู่

การเรียนรู้องค์ประกอบ คุณสมบัติ และลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ประกอบกันขึ้นเป็นยีนที่ทำหน้าที่ในการเก็บข้อความทางพันธุกรรมนั้น ทำให้มนุษย์มีความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกการทำงานของสารชีวโมเลกุลเหล่านี้ ทั้งในด้านความรู้พื้นฐานที่เกี่ยวข้องกับการเก็บ การถ่ายทอด และการแปลรหัสพันธุกรรม รวมทั้งการแสดงออกของยีนที่ถูกควบคุมในระดับต่างๆ เช่น งานด้านการแพทย์ที่ช่วยในการวินิจฉัยโรค และอาจช่วยในการรักษาโรคทางพันธุกรรม

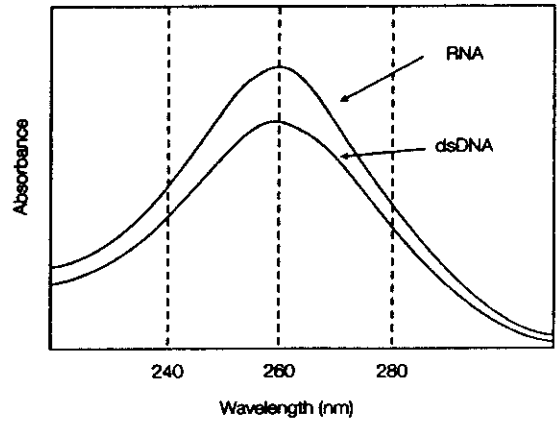
การวัดปริมาณและคุณภาพของกรดนิวคลีอิคสามารถทำได้โดยวิธีง่ายๆ โดยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยวิธีสเปคโตรโฟโตเมตรี โดยอาศัยหลักการที่กรดนิวคลีอิคสามารถดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตได้ดี ซึ่งนำมาใช้วิเคราะห์หาได้ทั้งปริมาณและความบริสุทธิ์ของกรดนิวคลีอิค ดีเอ็นเอเป็นสารชีวโมเลกุลที่ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ จึงมีคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร จากคุณสมบัตินี้สามารถคำนวณหาปริมาณของดีเอ็นเอในสารละลายได้



รูปที่ 4-1 โครงสร้างของดีเอ็นเอแบบเกลียวคู่ ซึ่งจับกันด้วยเบสคู่สม (complementary bases) (จาก Turner และคณะ, 1997)



รูปที่ 4-2 การจับกันระหว่างเบสคู่สมด้วยพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) โดยเบส A : T และ C : G (จาก Turner และคณะ, 1997)



รูปที่ 4-3 แสดงช่วงการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ (จาก Turner และคณะ, 1997)

1. การวัดด้วย Optical method

วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้เข้าใจหลักการวิเคราะห์หาปริมาณของกรดนิวคลีอิคโดยวิธีการวัดการดูดกลืนแสง
2. สามารถวัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ

สารเคมีที่ใช้

1. TE buffer สำหรับใช้เจือจางกรดนิวคลีอิคหรือดีเอ็นเอ (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA)
2. น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ
3. ตัวอย่างของกรดนิวคลีอิคหรือดีเอ็นเอที่ต้องการวัดปริมาณ

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
2. คิวเวต (cuvette)
3. Micropipette พร้อม tips
4. Microtube

วิธีการทดลอง

1. เจือจางตัวอย่างของดีเอ็นเอ, อาร์เอ็นเอ หรือโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (oligonucleotides) ด้วย TE buffer หรือน้ำกลั่นปราศจากเชื้อในอัตราส่วนที่เหมาะสม
2. วัดการดูดกลืนแสง(absorbance ; A) ของสารละลายตัวอย่างนี้ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}) และ 280 นาโนเมตร (A_{280})
3. นำค่าที่วัดได้ไปคำนวณหาปริมาณ ดีเอ็นเอ, อาร์เอ็นเอ หรือโอลิโกนิวคลีโอไทด์

   สำหรับดีเอ็นเอใช้ค่า A_{260} = 1 หมายถึงมีความเข้มข้นของดีเอ็นเอ = 50 μg/ml

   สำหรับอาร์เอ็นเอใช้ค่า A_{260} = 1 หมายถึงมีความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ = 40 μg/ml

   สำหรับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ใช้ค่า A_{260} = 1 หมายถึงมีความเข้มข้นของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ = 20 μg/ml

การตรวจสอบคุณภาพของกรดนิวคลีอิคที่ได้โดยการหาอัตราส่วนของค่า A_{260}/A_{280} ถ้าได้ค่าระหว่าง 1.65-1.85 แสดงว่าได้ดีเอ็นเอสายคู่ที่บริสุทธิ์ ถ้าหากได้ค่ามากกว่า 1.85 แสดงว่าในการเตรียมดีเอ็นเอมีอาร์เอ็นเอปะปนอยู่ ถ้าค่าน้อยกว่า 1.65 แสดงว่ามีโปรตีนหรือฟีนอล (ที่ใช้ในขั้นตอนการสกัด) ปะปนอยู่ สำหรับอาร์เอ็นเอที่บริสุทธิ์ควรจะได้ค่า A_{260}/A_{280} = 2

นอกจากนี้การตรวจสอบคุณภาพยังกระทำได้โดยการทำ scanning วัดความเข้มขันตั้งแต่ความยาวคลื่น 230-320 นาโนเมตร ซึ่งควรจะได้ peak เดียวที่ความยาวคลื่น (wavelength) ประมาณ 260 นาโนเมตร

ผลการทดลอง

วิธีคำนวณ

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

2. การวัดด้วย Fluorescence method

วิธีการนี้สามารถใช้วัดปริมาณของดีเอ็นเอโดยเทียบกับดีเอ็นเออื่นที่รู้ความเข้มข้น โดยอาศัยสารเอธิเดียมโบรไมด์ ซึ่งจะเข้าไปแทรกอยู่ระหว่างสายของดีเอ็นเอและเมื่อนำไปดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ก็จะปล่อยแสงออกมาให้มองเห็นได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้เข้าใจหลักการวิเคราะห์หาปริมาณของกรดนิวคลีอิคโดยวิธีการใช้แสงอัลตราไวโอเลต (UV light)
2. สามารถวัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ

สารเคมีที่ใช้

1. ดีเอ็นเอที่ทราบความเข้มข้น
2. ตัวอย่างของดีเอ็นเอที่ต้องการวัดปริมาณ
3. แผ่นพลาสติกบางๆ เช่น saran wrap
4. TE buffer ที่มีเอธิเดียมโบรไมด์ 1 μg/ml ผสมอยู่

อุปกรณ์

1. เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV transilluminator)
2. Micropipette พร้อม tips
3. Microtube

วิธีการทดลอง

1. วางแผ่น saran wrap ลงบน UV transilluminator
2. เจือจางสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐานด้วย TE buffer ที่มีเอธิเดียมโบรไมด์ โดยเจือจางดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้น 5, 2.5, 1.25, 0.5 และ 0.25 ng/ml หยดดีเอ็นเอจำนวนตัวอย่างละ 20 μl ลงบน saran wrap ซึ่งจะได้ปริมาณดีเอ็นเอตัวอย่างละ 100, 50, 25, 10 และ 5 ng ตามลำดับ
3. หยดสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการทราบความเข้มข้นซึ่งเจือจางด้วย TE buffer ที่มีเอธิเดียมโบรไมด์ จำนวน 20 μl ลงบน saran wrap ประมาณ 2-3 ตัวอย่าง
4. เปรียบเทียบความเข้มข้นของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นที่เตรียมไว้ในข้อ 2 โดยเปรียบเทียบความเข้มของการเรือง

แสง (fluorescence) ที่ใกล้เคียงกัน ค่าที่ได้จะเป็นค่าที่แม่นยำพอสมควร (การดูต้องป้องกันสายตาไม่ให้ถูกแสงอัลตราไวโอเลต เครื่อง UV transilluminator รุ่นใหม่ๆ จะมีแผ่น plexiglass ป้องกันแสงอัลตราไวโอเลตไว้ไม่ให้ออกมาถูกผู้ใช้เครื่อง)

อย่างไรก็ตามค่าที่ได้โดยวิธีนี้อาจคลาดเคลื่อนเมื่อนำดีเอ็นเอไปแยกใน gel electrophoresis ซึ่งปริมาณดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจลอาจน้อยกว่าที่คำนวณได้ ทั้งนี้อาจเกิดจากสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มี SDS หรือสารอื่นๆ ปะปน หรือแม้แต่อาร์เอ็นเอก็สามารถทำให้เกิดการเรืองแสงได้เมื่อมีเอธิเดียมโบรไมด์อยู่ในสารละลาย เพราะอาร์เอ็นเอมักมี secondary structure (บางส่วนของโมเลกุลเกิดการจับคู่ได้เป็น D/S) ดังนั้นวิธีการนี้จึงใช้ได้เฉพาะการวัดปริมาณดีเอ็นเอที่สะอาดเท่านั้น

นอกจากนี้สามารถใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแล้วนำมาแยกด้วย agarose gel electrophoresis เทียบกับดีเอ็นเอที่ต้องการทราบความเข้มข้น เมื่อแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าแล้ว นำเจลไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และนำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต แล้วเปรียบเทียบดูความเข้มของการเรืองแสงระหว่างแถบของดีเอ็นเอมาตรฐานกับดีเอ็นเอตัวอย่าง การดูสามารถดูโดยตรงจากเจลหรือดูจากรูปถ่ายของเจลก็ได้

ตัวอย่างเช่น ใช้ λDNA ที่ทราบความเข้มข้น หรือ 100 bp ladder DNA ที่ทราบความเข้มข้น หรือ λDNA/*Hin*dIII ที่ทราบความเข้มข้น

ถ้าใช้ 100 bp ladder DNA มีแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 11 แถบ และแถบดีเอ็นเอ 500 bp มีความเข้มข้นเป็น 3 เท่าของแถบอื่นๆ ดังนั้นถ้าใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน 500 ng

เพราะฉะนั้น 1 แถบ มีปริมาณดีเอ็นเอประมาณ 46 ng นั่นคือที่ 500 bp มีความเข้มข้นประมาณ 138 ng

เปรียบเทียบการเรืองแสงของดีเอ็นเอได้โดยประมาณ

ผลการทดลอง

ปริมาณดีเอ็นเอที่อ่านได้ = ... ng

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

แบบฝึกหัดบทปฏิบัติการที่ 4

1. ทำไมกรดนิวคอิคสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร
2. ถ้าตรวจสอบคุณภาพของกรดนิวคลีอิคได้อัตราส่วนค่า A_{260}/A_{280} มากกว่า 1.85 จะมีวิธีการทำอย่างไรให้กรดนิวคอิคมีความบริสุทธิ์มากขึ้น
3. ข้อดีของการวัดปริมาณกรดนิวคลีอิคด้วยวิธีสเปคโตรโฟโตเมตรี มีอะไรบ้าง