บทที่ 6
การสกัดแยกกรดนิวคลิอิกจากแหล่งต่าง ๆ

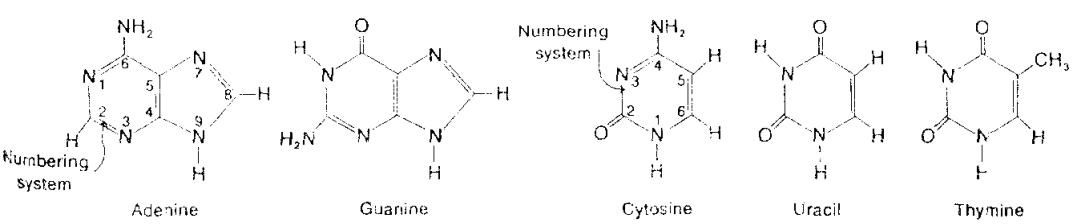
วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้ทราบวิธีการสกัดแยกกรดนิวคลิอิก ชนิด DNA และ RNA
2. เพื่อให้เข้าใจหลักการและวิธีการในการหาปริมาณ DNA และ RNA
3. เพื่อให้สามารถอธิบายคุณสมบัติบางประการของ DNA และ RNA

บทนำ

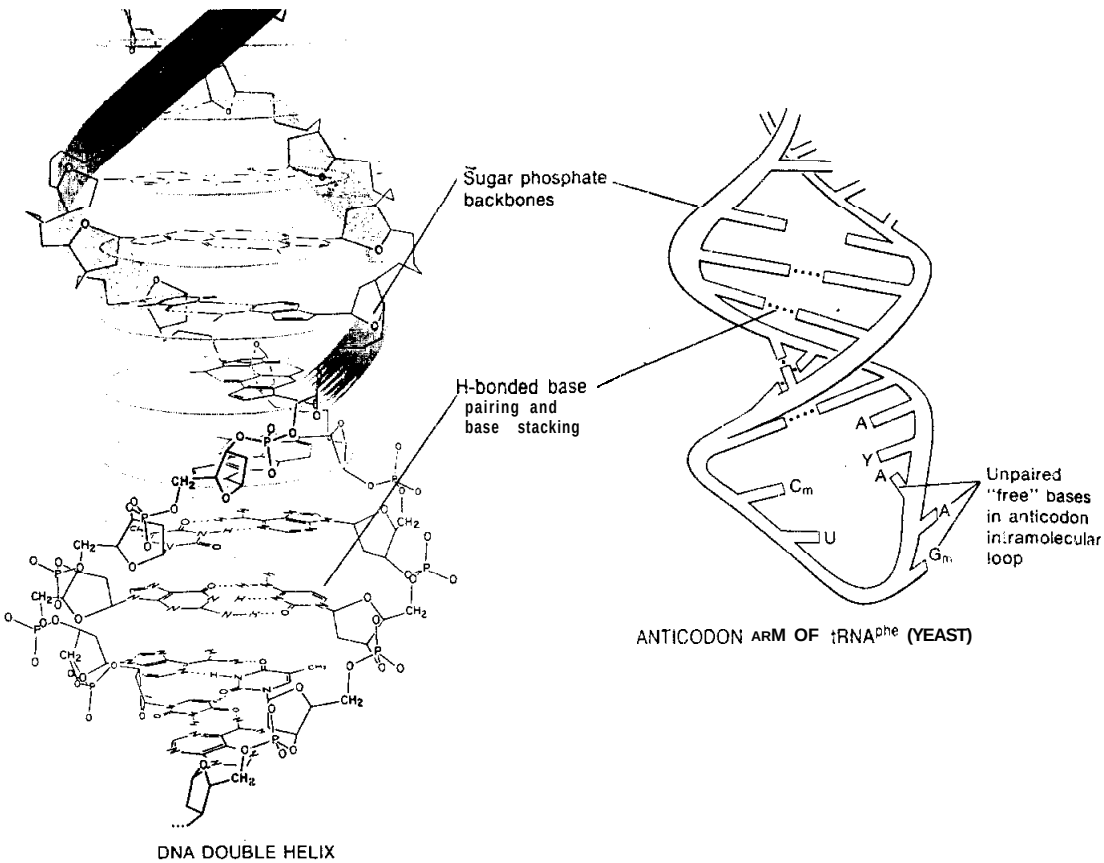
กรดนิวคลิอิกเป็นpolymer ที่ประกอบด้วยหน่วยโครงสร้างเป็น nucleotide แต่ละ nucleotide เกิดจากองค์ประกอบ 3 หน่วยมาเชื่อมต่อกัน คือ nitrogenous base (purine หรือ pyrimidine),sugar(pentose) และ phosphate กรดนิวคลิอิก แบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบ 3 หน่วย คือ

1. Deoxyribonucleic acid (DNA) แต่ละ nucleotideของ DNA ประกอบด้วย
   - 1.1 Nitrogenous base - purine เช่น adenine(A),guanine(G)
     - pyrimidine เช่น cytosine(C),thymine(T)
   - 1.2 Sugar : deoxyribose
   - 1.3 Phosphate
2. Ribonucleic acid (RNA) แต่ละ nucleotideของ RNA ประกอบด้วย
   - 2.1 Nitrogenous base - purine เช่น adenine(A),guanine(G)
     - pyrimidine เช่น cytosine(C),uracil(U)
   - 2.2 Sugar : ribose
   - 2.3 Phosphate



รูปที่ 6.1 แสดงสูตรโครงสร้างของ nitrogenous base

8. จากการทดลองสกัดโปรตีนที่เป็น enzymeในบทนี้ นักศึกษาสามารถนำไปประยุกต์ใช้งานในโรงงานหรืออุตสาหกรรมอย่างไรบ้าง ให้ยกตัวอย่าง enzymeชนิดอื่นที่นักศึกษาคิดว่าสำคัญ



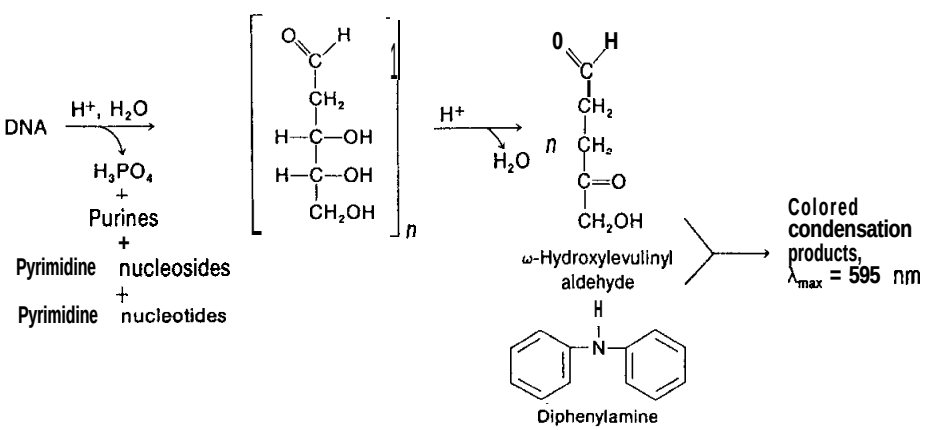
รูปที่ 6.2 แสดงสูตรโครงสร้างของสาย DNA และ RNA

DNA เป็นสารพันธุกรรมที่พบอยู่ในนิวเคลียสของเซลล์ โครงสร้างของDNA ในธรรมชาติจะพบอยู่ในรูปของ double helix ซึ่งสามารถถูกทำลายได้ง่ายด้วยแรงที่เกิดจากการคน หรือกวนอย่างเร็ว เรียกแรงนี้ว่า"Shear force" ผลคือ DNAจะแตกออกเป็น fragment หรือชิ้นส่วนที่สั้นลง นอกจากนี้ในเซลล์ ยังมีเอ็นไซม์ deoxyribonuclease หรือ DNase อยู่ทั่วไป ซึ่งสามารถย่อยสลาย DNA ได้ ดังนั้นการสกัดแยก DNA ออกมาจากเซลล์ จึงควรใช้วิธีที่ไม่รุนแรงหรือรุนแรงน้อยที่สุด เริ่มตั้งแต่ขั้นตอนในการทำให้เซลล์แตก มักจะใช้detergent พวก sodium dodecyl sulfate (SDS)ในการละลาย cell membrane กรณีที่มี cell wall อาจต้องใช้เอ็นไซม์ lysozyme ช่วยในการย่อยสลายและมีสารพวก chelating agent เช่น EDTA ผสมอยู่ในสารละลายที่ใช้ในการสกัดแยก DNA เพื่อทำหน้าที่จับกับ divalent ion เช่น Mg^{2+} ซึ่งจะ

ไปยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ DNase เนื่องจาก Mg^{2+} เป็น cofactor ของเอ็นไซม์ DNA ที่ได้นี้อาจมีการจับรวมตัวกับโปรตีน เพื่อให้ได้เฉพาะ DNA ออกมาสามารถใช้เอ็นไซม์ protease ช่วยในการย่อยสลายโปรตีนได้ หรือ ใช้สารละลายอิ่มตัวของphenol ในการ extractโดยโปรตีนจะถูกทำให้เสียสภาพธรรมชาติตกตะกอนอยู่ในระหว่าง phaseทั้งสอง ส่วน DNA จะยังอยู่ใน aqueous phase จากนั้นเราสามารถแยกDNA ออกมาโดยการเติมเกลือที่มีความเข้มข้นสูงเพื่อลดการละลายของ DNA แล้วจึงเติมethanol ลงไปในปริมาตร 2เท่า จากนั้นDNA ที่อยู่ในสภาพอิสระ จะรวมตัวกันเป็นเส้นใยแยกออกจากสารละลายได้

DNA ที่สกัดออกมาได้นี้ เราสามารถนำมาหาปริมาณโดย

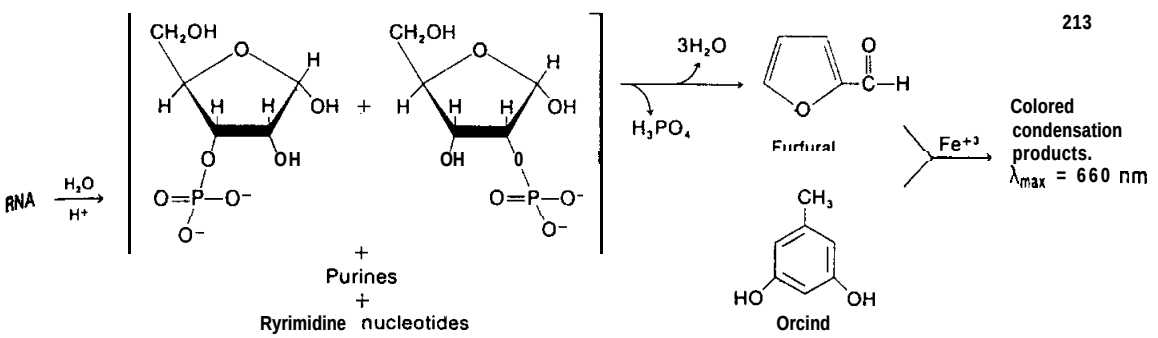
1. อาศัยคุณสมบัติในการดูดกลืนคลื่นแสงโดยตรงของสารละลาย DNA ดังความสัมพันธ์ต่อไปนี้ ปริมาณ DNA ในหน่วย mg/ml = ค่าการดูดกลืนแสง ณ 260 nm. x 0.05
2. อาศัยคุณสมบัติในการดูดกลืนคลื่นแสงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของน้ำตาล deoxyribose ซึ่งเป็นองค์ประกอบของ DNA กับ diphenylamine ในสภาวะที่เป็นกรด โดยเทียบกับสารละลาย DNA มาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น ดังสมการ



RNA เป็นตัวกลางในการถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรมจาก DNA ไปเป็นโปรตีน เช่น ribosomal RNA(r-RNA),messenger RNA(m-RNA)และ transfer RNA(t-RNA)เป็นต้น RNA ที่พบในธรรมชาติจะมีโครงสร้างเป็นสายเดี่ยว แต่ถ้ามีการจับคู่กันเองของ nitrogenous baseเกิดพันธะไฮโดรเจนขึ้นในสายเดียวกัน จะทำให้โครงสร้างของ RNA มีลักษณะเป็น loop ขึ้นมา นอกจากนี้ RNA มักจะจับรวมตัวกับโปรตีน ดังนั้นในการสกัดแยกจำเป็นต้องกำจัดโปรตีนออกไปโดยใช้สารละลายphenolเข้มข้น และยังเป็นการทำให้เยื่อหุ้มเซลล์แตกออกด้วย จากนั้นทำการแยกส่วนผสมทั้งหมดด้วยการหมุนเหวี่ยง จะเกิดการแยกชั้นของสารละลายขึ้นคือ ชั้นล่างเป็นชั้นของphenolจะมี DNAละลายอยู่ และชั้นบนเป็นชั้นของน้ำ ซึ่งจะมี RNA และคาร์โบไฮเดรต

ละลายอยู่ ส่วนโปรตีนที่ถูกdenaturedจะปรากฏอยู่ระหว่างชั้นทั้งสองและชั้นบน เมื่อนำชั้นของน้ำมาเติมด้วย alcohol ในปริมาตร 2เท่า จะสามารถตกตะกอน RNA ออกมาได้ เพื่อให้ตะกอนที่ได้ไม่มีคาร์โบไฮเดรตปนออกมา สามารถกระทำได้โดยการเติม potassium acetate ลงในชั้นของน้ำก่อนที่จะตกตะกอนด้วย alcohol เพื่อละลายพวก non-ionic polysaccharide และ ionic molecule อื่น ๆ ที่มีขนาดเล็ก เช่น 5 s RNA , t-RNA , กรดอะมิโน และ nucleotide เป็นต้น

RNA ที่สกัดได้ออกมานี้ เราสามารถนำมาหาปริมาณโดยอาศัยปฏิกิริยาของ furfural ซึ่งเกิดจากการดึงน้ำออกจากโมเลกุลของ ribose ในสารละลายกรดเข้มข้น กับ orcinol ซึ่งมี ferric chloride เป็น catalyst ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีเขียว สามารถนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 nm. ดังสมการ



การทดลองจะแบ่งออกเป็น 3 ตอนคือ

<u>ตอนที่ 1</u> เป็นการสกัดแยก D N A จากเซลล์เม็ดเลือดแดงไก่

<u>ตอนที่ 2</u> เป็นการสกัดแยก R N A จากยีสต์

<u>ตอนที่ 3</u> เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณ DNAและ R N A จากสารที่สกัดได้จากตอนที่1และ2

<u>ตอนที่ 1</u> การสกัดแยก D N A จากเซลล์เม็ดเลือดแดงไก่

<u>อุปกรณ์และวัสดุที่ใช้ ต่อ 1 กลุ่มการทดลอง</u>

1. Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml. 1ใบ
2. Serological pipette ขนาด 1 ml. 1อัน
3. Rubber bulb และ tip 1 ชุด
4. Cylinder ขนาด 100 ml. 1ใบ
5. Centrifuge tube ขนาดใหญ่ 1 หลอด
6. หลอดทดลอง ขนาด 16x150 mm. 1หลอด
7. Beaker ขนาด 2.50 ml. 1ใบ
8. Stirring rod 1 อัน
9. Dropper 1 อัน
10. Parafilm ขนาด 1X1นิ้ว 1แผ่น
11. Wash bottle 1 ขวด
12. Brush 1 อัน

<u>สารเคมีที่ใช้ร่วมกัน</u>

1. 10 % Sodium dodecyl sulfate (SDS) และ beaker ขนาด 100 ml.
2. สารละลาย II. พร้อม beaker ขนาด 250 ml. และ cylinder ขนาด 25 ml.
3. 6 M NaCl พร้อม beaker ขนาด 100 ml. และ cylinder ขนาด 10 ml.
4. 95 % Ethanol พร้อม cylinder ขนาด 100 ml.
5. สารละลาย ข . พร้อม beaker ขนาด 250 ml.. และ cylinder ขนาด 10 ml.
6. เลือดไก่ที่มี ACD solution ในอัตราส่วน 2:1 โดยปริมาตรพร้อม serological pipette ขนาด 1 ml.
7. Protease solution พร้อม serological pipette ขนาด 1 ml.

<u>เครื่องมือที่ใช้ร่วมกัน</u>

1. Centrifuge และ Two-pan rough balance
2. Water bath

<u>วิธีการทดลอง</u>

1. Pipette เลือดไก่มา 0.5 ml.ใส่ลงใน erlenmayer flask ขนาด 250 ml. (เลือดไก่ที่จะ pipette ขึ้นมาควรผสมให้เข้ากันเสียก่อน)
2. เติมสารละลาย n. 13.5 ml. เขย่าให้เข้ากัน
3. Pipette 10 % SDS "ı 0.9 ml.ค่อยๆ หยดลงในflask พร้อมกับเขย่าขวดเป็นวงกลมไปด้วยขณะเติม เมื่อเติมหมดแล้ว ให้เขย่า flask ต่ออีก 10 นาที
4. นำ flask ไปแช่ใน water bath 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม protease solution ลงไป 0.2 ml.เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที
5. เติม 6 M NaCl 4.5 ml.ลงไปพร้อมกับเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเทใส่centrifuge tube ขนาดใหญ่
6. นำไปหมุนเหวี่ยง 5000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ดูดเอาเฉพาะส่วนใสออกมาใส่กระบอกตวง (ระวังอย่าให้เศษเลือดปนลงไป) ทิ้งส่วนที่เป็นตะกอนไป
7. อ่านปริมาตรที่ได้ จากนั้นเติม 95 % ethanol จำนวน 2 เท่าของปริมาตรที่วัดได้ลงในกระบอกตวง
8. ใช้แท่งแก้วกวนในลักษณะวงกลมอย่างช้า ๆ เพื่อเก็บสาย DNA ซึ่งคล้ายเส้นใย(ควรให้เส้นใยม้วนกันอยู่บริเวณปลาย ๆ แท่งแก้ว) ตั้งแท่งแก้วที่มี DNA ทิ้งไว้สักครู่ เมื่อแห้งแล้วใส่ลงในหลอดทดลอง
9. เติมสารละลาย ข.ลงไป 10 ml.ใช้แท่งแก้วคนจนแน่ใจว่า DNAที่เกาะติดอยู่ละลาย

ออกหมด เพื่อจะได้นำไปหาปริมาณ DNA ที่สกัดได้ในตอนที่ 3 จากนั้นปิดปากหลอดด้วย parafilm คว่ำหลอดไปมา 10 ครั้ง ติดฉลากกลุ่มที่หลอดทดลองให้เรียบร้อยแล้วนำไปเก็บที่ภาชนะรวม ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ตอนที่ 2 การสกัดแยก RNA จากยีสต์

อุปกรณ์และวัสดุที่ใช้ ต่อ 1 กลุ่มการทดลอง

1. Erlenmeyer flask ขนาด 25 ml.1ใบ
3. Centrifuge tube ชนิดหนา 2 หลอด
4. Dropper 1 อัน
5. Cylinder ขนาด 100 ml. 1ใบ
6. Stirring rod 1 อัน
6. Rubber bulb และ tip 1 ชุด
7. Parafilm ขนาด 1X1นิ้ว 2แผ่น
8. Wash bottle 1 ขวด
9. Brush 1 อัน
10. ผงยีสต์

สารเคมีที่ใช้ร่วมกัน

1. สารละลาย phenolเข้มข้น(900g/l) พร้อมbeaker ขนาด 250 ml.และburette
2. สารละลาย potassium acetate (200g/l pH 5.0) พร้อม beaker ขนาด 100 ml. และ serological pipette ขนาด 1 ml.
3. 95 % Ethanol (เย็น) พร้อม beaker ขนาด 250 ml. และ cylinder ขนาด 25 ml.
4. สารละลาย ข. พร้อม beaker ขนาด 250 ml. และ cylinder ขนาด 10 ml.

เครื่องมือที่ใช้ร่วมกัน

1. High speed centrifuge และ two-pan balance
2. Two-pan rough balance (2 decimal points)
3. Water bath

วิธีการทดลอง

1. ชั่งผงยีสต์ 1 g. ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 25 ml. แล้วเติมน้ำกลั่นลงไป 4 ml.
2. นำไปอุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมสารละลาย phenol เข้มข้นลงไป 5 ml. (ระวังอย่าให้สัมผัสถูกสาร เพราะจะทำให้ผิวหนังเกิดการไหม้ได้)
3. เขย่า flask เป็นวงกลมจนครบ 30 นาที จึงเทใส่ centrifuge tube ชนิดหนา นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 5000 rpm, 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
4. ใช้ dropper ดูดเอาเฉพาะชั้นน้ำข้างบน ใส่ลงใน centrifuge tube ชนิดหนา

นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 rpm, 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

5. เทส่วนใสใส่ cylinderขนาด 10 ml.วัดปริมาตรที่ได้ เติมสารละลายpotassium acetate ลงไป 1/9 เท่าของปริมาตรที่วัดได้ ผสมให้เข้ากัน อ่านปริมาตรสุดท้ายที่ได้ เทใส่ centrifuge tube ชนิดหนา
6. เติม 95 % ethanol (เย็น) ลงไปในปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรสุดท้ายที่อ่านได้ ผสมให้เข้ากัน
7. ปิดปากหลอดด้วย parafilm ติดฉลากกลุ่มที่หลอดทดลองให้เรียบร้อย นำไปแช่ในช่องแช่แข็ง 30 นาที
8. นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 rpm, 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
9. เทส่วนที่ใสทิ้ง คว่ำหลอดบนกระดาษซับเพื่อให้ของเหลวไหลออกมามากที่สุด
10. เติมสารละลาย ข.ลงไป 10 ml.เขย่าให้ตะกอนละลายออกมามากที่สุด เพื่อนำไปใช้ในตอนที่ 3 จากนั้นปิดปากหลอดด้วย parafilm ติดฉลากกลุ่มให้เรียบร้อย นำไปเก็บในภาชนะรวม 4 องศาเซลเซียส

ตอนที่ 3 การวิเคราะห์หาปริมาณ DNA และ RNA จากสารที่สกัดได้จากตอนที่1และ2

<u>อุปกรณ์และวัสดุที่ใช้ ต่อ 1 กลุ่มการทดลอง</u>

1. หลอดทดลอง ขนาด 16x150 mm. 14 หลอด พร้อม rack
2. Test tube holder 1 อัน
3. Serological pipette ขนาด 5 ml. และ 2 ml. อย่างละ 1 อัน
4. Beaker ขนาด 250 ml. และ 500 ml. อย่างละ 1 ใบ
5. Stirring rod 1 อัน
6. Rubber bulb และ tip 1 ชุด
7. Aluminium foil ขนาด 1 x 1 นิ้ว 7 แผ่น
8. Wash bottle 1 ขวด
9. Brush 1 อัน

<u>สารเคมีที่ใช้ร่วมกัน</u>

1. 1.5 M $HClO_4$ พร้อม beakerขนาด 100 ml.และserological pipetteขนาด 2 ml.
2. 0.45 M $HClO_4$ พร้อม beaker ขนาด 250 ml. และ burette
3. Diphenylamine reagent พร้อม beaker ขนาด 250 ml. และ burette
4. Orcinol reagent พร้อม beaker ขนาด 250 ml. และ burette

5. 0.1 % สารละลาย DNA มาตรฐานเข้มข้น 0.1% (W/V) ใน 0.45 M $HClO_4$

6. สารละลาย RNA มาตรฐานเข้มข้น 0.1% (W/V) ใน สารละลาย ข.

<u>เครื่องมือที่ใช้ร่วมกัน</u>

1. Hot plate และ ceramic plate

2. Spectrophotometer พร้อม cuvette

<u>วิธีการทดลอง</u>

3.1 <u>การวิเคราะห์หาปริมาณ DNA จากเซลล์เม็ดเลือดแดงไก่</u>

1. เทสารละลาย DNA ที่เตรียมได้จากตอนที่ 1 ใส่ลงใน quartz cuvette นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm. (ค่าการดูดกลืนแสง x 0.05 = ปริมาณ DNA ในหน่วย mg/ml) จากนั้นเทกลับหลอดเดิม

2. Pipette สารละลาย DNA ที่เตรียมได้ 3.5 ml. ใส่ลงในหลอดทดลอง

3. เติม 1.5 M $HClO_4$ จำนวน 1.5 ml.ลงไป($HClO_4$ เป็นกรดแก่ จึงควรระวังอย่าให้ถูกผิวหนัง) ผสมให้เข้ากันนำไปต้มในน้ำเดือด 15 นาที ตั้งทิ้งให้เย็น เรียกว่า "สารละลาย DNA ที่เตรียมได้ "

4. เตรียมหลอดทดลอง 6 หลอด และเติมสารต่างๆ ตามตารางข้างล่างนี้

หลอดที่ใช้ / สารละลายที่ใช้	ปริมาตร (ml.) ที่ใช้					
	1	2	3	4	5	6
0.1%สารละลายDNAมาตรฐาน	—	0.5	1.0	1.5	—	—
สารละลาย DNA ที่เตรียมได้	—	—	—	—	0.5	1.0
0.45 M $HClO_4$	1.5	1.0	0.5		1.0	0.5

5. ผสมให้เข้ากันแล้วเติม diphenylamine reagent ลงไปหลอดละ 4 ml.

6. ผสมสารละลายให้เข้ากัน ปิดปากหลอดด้วย aluminium foil นำไปต้มในน้ำเดือด 15 นาที

7. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 610 nm. โดยใช้หลอดที่ 1 เป็น blank

3.2 <u>การวิเคราะห์หาปริมาณ RNA จากยีสต์</u>

1.เตรียมหลอดทดลอง 6 หลอด และเติมสารต่างๆ ตามตารางข้างล่างนี้

หลอดที่ใช้ / สารละลายที่ใช้	ปริมาตร (ml.) ที่ใช้					
	1	2	3	4	5	6
น้ำกลั่น	2.0	1.5	1.0	0.5	1.5	1.0
0.1%สารละลายRNAมาตรฐาน	–	0.5	1.0	1.5	–	–
สารละลาย RNA ที่เตรียมได้	–	–	–	–	0.5	1.0

2.ผสมให้เข้ากันเติม orcinol reagent ลงไปหลอดละ 3 ml

6.ผสมให้เข้ากัน ปิดปากหลอดด้วยaluminium foilนำไปต้มในน้ำเดือด 15 นาที

7.ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 nm. โดยใช้หลอดที่ 1 เป็น blank

<u>การเตรียมสารละลายชนิดที่ใช้ในการทดลอง</u>

1. <u>Protease solution</u>:

ละลาย $Na_2EDTA.2H_2O$ 0.007 g.ในน้ำกลั่น 10 ml.จากนั้นเติม SDS ลงไป 0.1g.ตั้งทิ้งไว้ให้ละลายแล้วจึงเติมผง protease (จาก Aspergillus oryzae) 1 g. ลงไป ผสมให้เข้ากัน นำไปอุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เตรียมแล้วใช้ทันที

2. <u>Diphenylamine reagent</u>:

ละลาย diphenylamine 4 g.ใน glacial acetic acid 400 ml.จากนั้นเติม H_2SO_4 conc. ลงไป 10 ml. ผสมให้เข้ากัน แล้วจึงเติม acetaldehyde ลงไป 4 ml. ผสมให้เข้ากันเตรียมแล้วใช้ทันที

3. <u>ACD solution</u>:

ละลาย trisodium citrate.2 H_2O 2.2 g.,citric acid.H_2O 0.8 g. และ dextrose.H_2O 2.45 g.ในน้ำกลั่น 100 ml. จะได้ pH ประมาณ 5.0

4. <u>สารละลาย ก</u>:

ละลาย trizma base (Tris)1.21 g., NaCl 23.4 g., Na_2EDTA 0.74 g. ในน้ำกลั่น 500 ml. ปรับ pH ให้ได้ 8.2 ด้วย HCl หรือ NaOH จากนั้นเติมน้ำกลั่น

ให้ครบ 1000 ml.

5. <u>สารละลาย ข</u>:

ละลาย trizma base (Tris) 1.21 g,Na_2EDTA 0.37 g ในน้ำกลั่น 500 ml. ปรับ pH ให้ได้ 7.4 ด้วย HCl หรือ NaOH จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 ml.

6. <u>Orcinol reagent</u>:

ละลาย $FeCl_3.6H_2O$ 0.4 g.ใน HCl conc. 400 ml.(ทำในตู้ควัน) จากนั้นจึงเติม 6% (W/V) orcinol ใน alcohol ลงไป 14 ml. ผสมให้เข้ากัน

รายงานการทดลอง

เรื่อง การสกัดแยกกรดนิวคลิอิกจากแหล่งต่าง ๆ

ชื่อผู้ทดลองและเขียนรายงาน_____ รหัส _____เลขที่_____

ชื่อผู้ทดลอง 1_____ รหัส _____เลขที่_____

2_____ รหัส _____เลขที่_____

กลุ่มที่_____Section/วันที่ทำการทดลอง_____เวลา_____

ห้องที่ทำการทดลอง_____

อาจารย์ผู้ควบคุมการทดลอง 1_____

2_____

ตอนที่ 1 ผลการสกัด DNA จากเซลล์เม็ดเลือดแดงไก่

ปริมาตรของเลือดไก่ = ...ml.

ปริมาตรของส่วนใสที่ได้ = ...ml.

ปริมาตรของ 95% alcohol ที่เติม = ...ml.

ปริมาตรของสารละลาย ข. ที่ใช้ในการละลาย DNA =.....ml.

ตอนที่ 2 ผลการสกัด RNA จากยีสต์

ผงยีสต์ที่ใช้ = ...ml.

ปริมาตรของส่วนใสที่ได้ = ...ml.

ปริมาตรของ 95% alcohol ที่เติม = ...ml.

ปริมาตรของสารละลาย ข. ที่ใช้ในการละลาย RNA =.....ml.

ตอนที่ 3 ผลการหาปริมาณ DNA และ RNA จากสารที่สกัดได้

3.1 ปริมาณ DNA ที่พบในเซลล์เม็ดเลือดแดงไก่

ปริมาตรของสารละลาย DNA จากตอนที่ 1 = ...ml.

เติม 1.5 M $HClO_4$ ลงไป = ...ml.

ปริมาตรของสารละลาย DNA ที่เตรียมได้ = ...ml.

หลอดที่ใช้ / สารละลายที่ใช้	ปริมาตรที่ใช้และปริมาณค่าต่าง ๆ					
	1	2	3	4	5	6
0.45 M $HClO_4$	1.5ml	1.0ml	0.5ml	-	1.0ml	0.5ml
0.1%สารละลายDNAมาตรฐาน	—	0.5ml	1.0ml	1.5ml	—	—
สารละลาย DNA ที่เตรียมได้	—	—	—	—	0.5ml	1.0ml
OD_{610}						
ปริมาณ DNA (mg.)	-					
ความเข้มข้นของDNA(mg/ml)	-	-	-	-		

กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง OD_{610} และปริมาณ DNA(mg.)

ความเข้มข้นของ DNA จากที่เตรียมได้ในหลอดที่ 5 =..... mg/ml

ความเข้มข้นของ DNA จากที่เตรียมได้ในหลอดที่ 6 =..... mg/ml

ความเข้มข้นเฉลี่ยของ DNA ที่เตรียมได้ =..... mg/ml

ความเข้มข้นของ DNA ที่สกัดเตรียมได้จากตอนที่ 1 =..... mg/ml

ปริมาณของ DNA ที่หาได้ในเลือดไก่ 0.5 ml. =..... mg.

วิธีการคำนวณหาความเข้มข้นของ DNA

สรุปและวิเคราะห์ผลการทดลอง

3.2 <u>ปริมาณ RNA ที่พบจากยีสต์</u>

หลอดที่ใช้ / สารละลายที่ใช้	ปริมาตรที่ใช้และปริมาณค่าต่าง ๆ					
	1	2	3	4	5	6
น้ำกลั่น	2.0ml	1.5ml	1.0ml	0.5ml	1.5ml	1.0ml
0.1%สารละลายRNAมาตรฐาน	—	0.5ml	1.0ml	1.5ml	—	—
สารละลาย RNA ที่เตรียมได้	-	-	-	-	0.5ml	1.0ml
OD 610						
ปริมาณ RNA (mg.)	-					
ความเข้มข้นของRNA(mg/ml)	-	-	-	-		

ความเข้มข้นของ RNA จากที่เตรียมได้ในหลอดที่ 5 =..... mg/ml

ความเข้มข้นของ RNA จากที่เตรียมได้ในหลอดที่ 6 =..... mg/ml

ความเข้มข้นเฉลี่ยของ RNA ที่เตรียมได้ =..... mg/ml

ปริมาณของ RNA ที่พบในผงยีสต์ 1 g. =..... mg.

<u>วิธีคำนวณหาความเข้มข้นของ RNA</u>

<u>สรุปและวิเคราะห์ผลการทดลอง</u>

<u>คำถาม</u>

1. เปรียบเทียบปริมาณ DNA โดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงของ DNA โดยตรงและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาของน้ำตาล deoxyribose กับ diphenylamine

2. เหตุใดจึงใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงไก่ในการสกัดแยก DNA และถ้าใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงมนุษย์สกัดได้หรือไม่ เพราะเหตุใด

3. มีแหล่งอื่นหรือไม่ที่สามารถสกัด DNA ออกมาได้ บอกมา 2 แหล่ง

4. เนื่องจาก double helix DNA ถูกทำลายได้ง่าย ถ้านักศึกษาสกัดออกมาแล้ว DNA เสียสภาพธรรมชาติไป เราจะทดสอบได้อย่างไร

5. ถ้า DNA ที่นักศึกษาสกัดออกมาได้ ถูก DNase ย่อยพันธะ phosphodiester ไป อยากทราบว่า การหาปริมาณโดยวิธี diphenylamine จะเป็นอย่างไร

6. เหตุใดจึงใช้ orcinol reagent ในการหาปริมาณ RNA ได้

7. นักศึกษาคิดว่าแหล่งที่สามารถสกัด RNA ได้ มีอะไรบ้าง

8. ให้นักศึกษาบอกข้อแตกต่างระหว่าง DNA และ RNA ทั้งในด้านองค์ประกอบ, โครงสร้างและคุณสมบัติทางเคมีมาพอสังเขป