บทที่ 5

การสกัดแยกกรดนิวคลิอิกจากแหล่งต่าง ๆ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้ทราบวิธีการสกัดแยกกรดนิวคลิอิก ชนิดดีเอ็นเอ
2. เพื่อให้เข้าใจหลักการ และวิธีการในการหาปริมาณดีเอ็นเอ
3. เพื่อให้สามารถอธิบายสมบัติบางประการของดีเอ็นเอ

ทฤษฎีเบื้องต้น

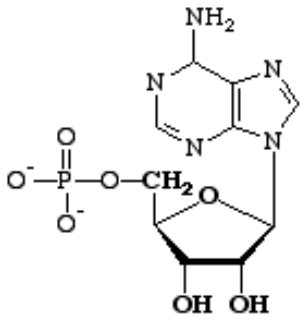
กรดนิวคลิอิก (nucleic acid) เป็นสารพันธุกรรม (genetic material) ที่ประกอบขึ้นจาก พอลิเมอร์ของนิวคลีโอไทด์ (รูปที่ 5.1) โดยแต่ละนิวคลีโอไทด์ประกอบด้วย

1. เบสไนโตรเจน (nitrogenous base) ซึ่งแบ่งได้ตามลักษณะโครงสร้างของโมเลกุลที่แตกต่างกัน 2 ชนิด คือ ไพริมิดีน (pyrimidine) ได้แก่ ไซโตซีน (cytosine; C) ไทมีน (thymine; T) และยูราซิล (uracil; U) ส่วนเพียวรีน (purine) ได้แก่ อะดีนีน (adenine; A) และกัวนีน (guanine; G) (รูปที่ 5.2)

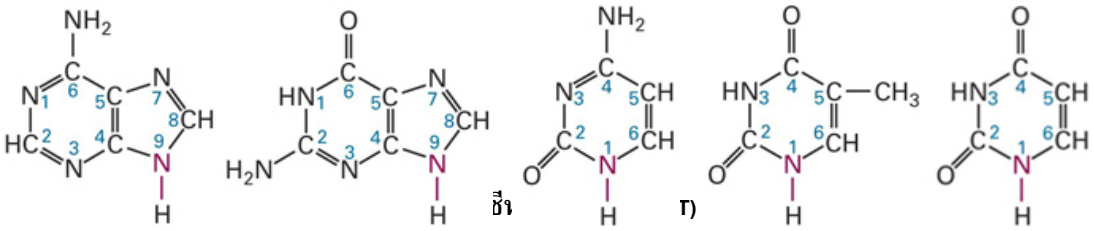
2. น้ำตาลเพนโทส ซึ่งแบ่งได้ 2 ชนิดตามน้ำตาลเพนโทสที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุล คือ น้ำตาลดีออกซีไรโบส (D-2-deoxyribose) และน้ำตาลไรโบส (D-ribose) (รูปที่ 5.3)

3. หมู่ฟอสเฟต

กรดนิวคลิอิกสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด ตามองค์ประกอบโครงสร้างนิวคลีโอไทด์ ซึ่งต่างกันที่เบสไนโตรเจน และน้ำตาลเพนโทส คือ **ดีเอ็นเอ** (deoxyribonucleic acid; DNA) มีเบสไนโตรเจนที่ประกอบด้วย A, C, G, T และน้ำตาลเพนโทสเป็นน้ำตาลดีออกซีไรโบส (D-2-deoxyribose) และ**อาร์เอ็นเอ** (ribonucleic acid; RNA) มีเบสไนโตรเจนที่ประกอบด้วย A, C, G, U และน้ำตาลเพนโทสเป็นน้ำตาลไรโบส (D-ribose) โดยดีเอ็นเอเป็นสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด หรือกล่าวได้ว่าดีเอ็นเอเป็นพิมพ์เขียว (blue print) ของสิ่งมีชีวิตนั่นเอง มีหน้าที่กำหนดการสังเคราะห์โปรตีนในสิ่งมีชีวิตนั้นๆ

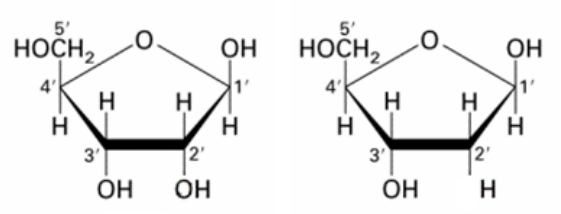


รูปที่ 5.1 แสดงโครงสร้างของนิวคลีโอไทด์



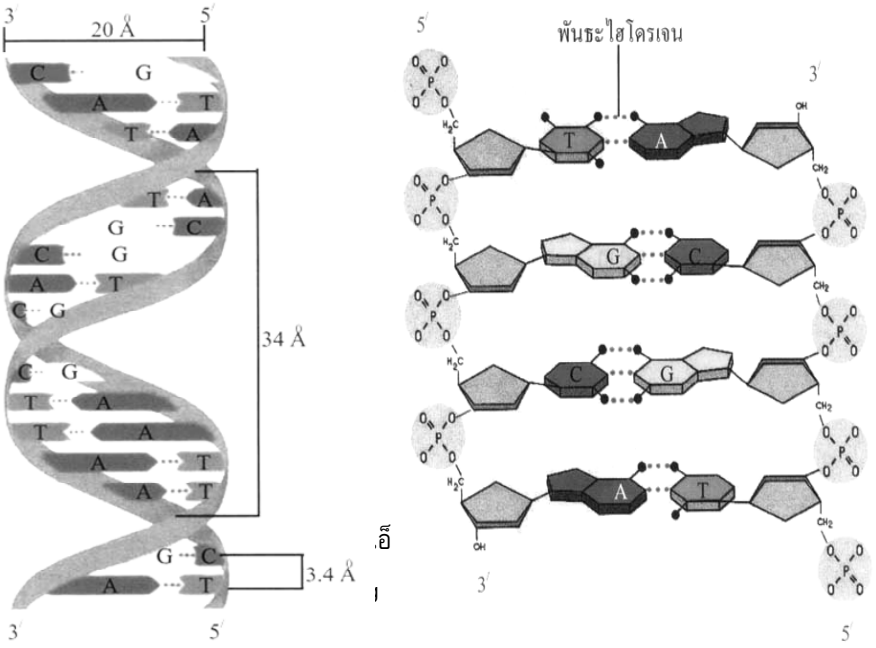
ชีน T)

<u>รูปที่ 5.2</u> แสดงโครงสร้างของเบสไนโตรเจน



<u>รูปที่ 5.3</u> แสดงโครงสร้างของน้ำตาลดีออกซีไรโบสและน้ำตาลไรโบส

ในสัตว์ชั้นสูง ดีเอ็นเอจะมีโครงสร้างตามธรรมชาติเป็นเกลียวคู่สายยาว (double helix) พันอยู่กับโปรตีนฮีสโตน (รูปที่ 5.4) ในลักษณะเหมือนลูกปัดบนสร้อยคอ (beads on a string) เป็นลักษณะของโครโมโซมที่นิวเคลียสของเซลล์มีเยื่อหุ้ม (nuclear membrane) ซึ่งพบได้ที่นิวเคลียส และไมโทคอนเดรีย สำหรับในพืชยังสามารถพบดีเอ็นเอได้ที่คลอโรพลาสต์



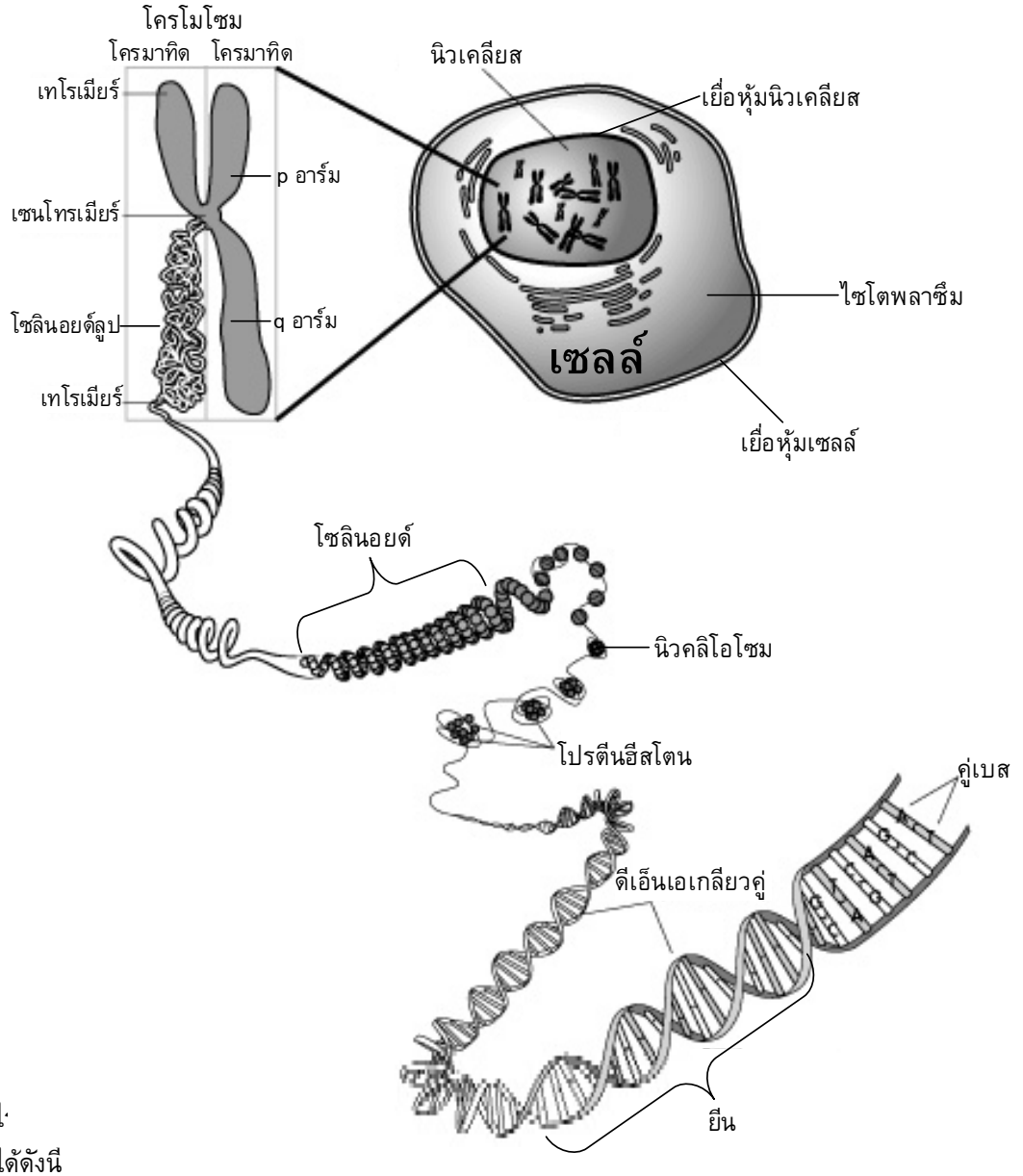
ที่มา: อ็

การสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ของสัตว์ชั้นสูง (รูปที่ 5.5) สามารถสรุปเป็นขั้นตอนดังนี้ คือ ทำให้เซลล์แตก (cell lysis) ได้นิวเคลียสออกมา จากนั้นทำให้เยื่อหุ้มนิวเคลียสแตก ให้ดีเอ็นเอละลายออกมาในสารละลาย แล้วทำการลดการละลายของดีเอ็นเอโดยการตกตะกอนออกมา

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

ดังนั้นในสารละลายที่ใช้สกัดดีเอ็นเอจากเซลล์สิ่งมีชีวิต จึงประกอบด้วยสารต่อไปนี้คือ สารซักฟอก (detergent) เช่น sodium dodecyl sulfate (SDS) ซึ่งเป็นสารที่ใช้ในการละลายเยื่อหุ้มเซลล์ และเยื่อหุ้มนิวเคลียส สารคีเลต (chelating agent) เช่น $Na_2EDTA.2H_2O$ ซึ่งทำหน้าที่ในการจับกับสารที่มีประจุบวก (divalent cation) เช่น Mg^{2+} เป็นโคแฟกเตอร์ในการทำงานของ DNase สาร โปรตีเอสใช้ในการย่อยสลายโปรตีนฮีสโตนที่จับอยู่

กับสายดีเอ็นเอ เกลือที่มีความเข้มข้นสูง เช่น โซเดียมคลอไรด์ เพื่อให้ภาวะของสารละลายเป็นประจุบวก ช่วยในการปรับภาวะของดีเอ็นเอให้เป็นกลาง (neutralize negative charge) และจากนั้นเติมแอลกอฮอล์ เช่น ไอโซโพรพานอล หรือ เอทานอล เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอที่เตรียมได้



ดีออกซีไ·
ปริมาณได้ดังนี

- การดูดกลืนแสงของหมู่เบสไนโตรเจน
- การทำปฏิกิริยาของหมู่ดีออกซีไรโบส กับสารละลาย diphenylamine ในสารละลายที่เป็นกรดจะเกิดการไฮโดรไลซ์ของเบสเพียวรีน ได้น้ำตาลโครงสร้างแบบเปิด และจะเกิดการดึงน้ำออกจากโมเลกุลน้ำตาลได้สาร hydroxylevulinyl aldehyde ทำปฏิกิริยา condensation กับ diphenylamine ได้ผลิตภัณฑ์สีน้ำเงินเข้มที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
- การเกิดปฏิกิริยาของหมู่ฟอสเฟต $[PO_4]^{3-}$ โดยจะทำปฏิกิริยากับสารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดท ($(NH_4)_2MoO_4$) ในกรดไนตริกเจือจางที่มากเกินพอ ได้ตะกอนสีเหลืองของแอมโมเนียมฟอสโฟโมลิบเดท ($(NH_4)_3PO_4 \cdot 12MoO_3$) เกิดขึ้น

<u>การตรวจสอบสมบัติบางประการดีเอ็นเอ</u>

ดีเอ็นเอที่สกัดได้จะมีลักษณะเป็นสารละลายใส ซึ่งสามารถบ่งชี้ว่าสารละลายดังกล่าวเป็น ดีเอ็นเอได้ โดยอาศัยคุณสมบัติการดูดกลืนคลื่นแสงอัลตราไวโอเลตของเบสที่เป็นองค์ประกอบของ ดีเอ็นเอ ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร โดยการดูดกลืนคลื่นแสง 1 หน่วย (OD) ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร จะมีปริมาณของดีเอ็นเอประมาณ 50 ไมโครกรัม และสามารถตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยการทำอิเลกโทรโฟรีซีสแบบอะกาโรส (agarose gel electrophoresis) โดยอาศัยโครงสร้างของสายดีเอ็นเอในธรรมชาติที่มักพบในลักษณะ 2 สายคู่กัน อยู่ในสภาพเกลียวคู่ที่เป็นแบบ 2 สายสวนทางกัน (antiparallel) มีคู่เบสจับกันเป็นขั้นบันได ทำให้สารเรืองแสง เช่น เอทิเดียมโบรไมด์ (EtBr) แทรกเข้าไปในเกลียวคู่ของดีเอ็นเอ เมื่อส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลต จะเห็นเรืองแสงได้ดีขึ้น โดยถ้าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดีจะเห็นแถบเรืองแสงเดี่ยว แต่ถ้าคุณภาพของดีเอ็นเอไม่ดี มีการแตกหักของสายดีเอ็นเอเป็นสายสั้นๆ (fragments) จะเห็นแถบเรืองแสงคล้ายดาวหางบนแผ่นอะกาโรส

นอกจากนี้ยังสามารถตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอได้อีกวิธี คือ การหาอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ต่อความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร หากว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพที่ดี มีความบริสุทธิ์มากจะมีค่าอัตราส่วนดังกล่าวเท่ากับ 1.7-1.8 แต่ถ้าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีส่วนของอาร์เอ็นเอเจือปนอยู่ จะมีค่ามากกว่า 1.8 เนื่องจากอาร์เอ็นเอก็เป็นกรดนิวคลิอิกเช่นกัน ดังนั้นจึงมีเบสที่สามารถดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตได้เช่นกัน จึงทำให้ค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตมากขึ้น และถ้าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีโปรตีนปนเปื้อนอยู่จะมีค่าอัตราส่วนน้อยกว่า 1.7 เนื่องจากโปรตีนมีหมู่ที่สามารถดูดกลืนคลื่นแสงได้ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

ดังนั้น ในการทดลองนี้จะได้ทำการศึกษาเทคนิคที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตชั้นสูง ซึ่งโดยปกติแล้วไม่สามารถสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม เพราะว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมไม่มีนิวเคลียส (เซลล์เม็ดเลือดแดงจะมีนิวเคลียสเฉพาะตอนที่ยังคงเป็นเซลล์อ่อน) ดังที่กล่าวมาแล้วในเบื้องต้นว่า สามารถพบดีเอ็นเอได้ที่นิวเคลียส ในการทดลองนี้จึงได้ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเม็ดเลือดแดงของไก่ เนื่องจากไก่เป็นสัตว์ปีกซึ่งในเม็ดเลือดแดงของไก่ยังคงมีนิวเคลียสอยู่ จากนั้นทำการหาปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยการวัดค่าดูดกลืนคลื่นแสงของหมู่เบสไนโตรเจน และหาปริมาณโดยอาศัยการทำปฏิกิริยาของหมู่ดีออกซี- ไรโบสกับสารละลาย diphenylamine และในส่วนสุดท้ายของการทดลองนั้น จะได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของดีเอ็นเอในด้านคุณภาพ โดยการทำอิเลกโทรโฟรีซีสแบบอะกาโรส และการหาอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ต่อความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

การทดลอง

ตอนที่ 1 การสกัดแยกดีเอ็นเอจากเซลล์เม็ดเลือดแดงไก่

วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. กระบอกตวง (cylinder)
2. ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask)
3. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
4. แท่งแก้ว (stirring rod)
5. บีกเกอร์ (beaker)
6. ปิเปตต์ (pipette)
7. พาราฟิล์ม (parafilm)
8. ลูกยาง (rubber bulb)
9. หลอดเซนตริฟิวจ์ (centrifuge tube)
10. หลอดทดลอง (test tube)
11. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. เลือดไก่ที่ผสมสารละลาย ACD
2. สารละลาย 10 เปอร์เซ็นต์ SDS
3. สารละลายโปรตีเอส
4. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 6 โมลาร์
5. สารละลาย 95 เปอร์เซ็นต์ ของเอทานอลที่เย็น
6. สารละลาย ก.
7. สารละลาย ข.

วิธีการทดลอง

1. ปิเปตต์เลือดไก่ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร (เลือดไก่ที่ปิเปตต์ขึ้นมาควรผสมให้เข้ากันเสียก่อน)
2. เติมสารละลาย ก. ปริมาตร 13.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3. ปิเปตต์สารละลาย 10 เปอร์เซ็นต์ ของ SDS ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตรค่อยๆ หยดลงในขวดรูปชมพู่ พร้อมเขย่าขวดเป็นวงกลมช้าๆ ไปด้วยขณะเติม เมื่อเติมหมดแล้วให้เขย่าขวดรูปชมพู่ต่ออีก 10 นาที
4. นำขวดรูปชมพู่ไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายโปรตีเอสปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มต่ออีก 30 นาที
5. เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 6 โมลาร์ ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร ลงไปพร้อมกับเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเทใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาดใหญ่
6. นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทเอาเฉพาะส่วนใสออกใส่กระบอกตวง วัดปริมาตรที่ได้ (ระวังอย่าให้เศษเลือดปนลงไป) ทิ้งส่วนที่เป็นตะกอน
7. เทส่วนที่วัดได้ลงในบีกเกอร์ จากนั้นเติมสารละลาย 95 เปอร์เซ็นต์ ของเอทานอลที่เย็นในปริมาตรเป็น 2 เท่าของปริมาตรที่วัดได้ หรือไอโซโพรพานอลที่เย็นในปริมาตรเท่า กับปริมาตรที่วัดได้
8. ใช้แท่งแก้วกวนในลักษณะวงกลมอย่างช้าๆ เพื่อเก็บสายดีเอ็นเอซึ่งมีลักษณะคล้ายเส้นใย (ควรให้เส้นใยม้วนกันอยู่บริเวณปลายๆ แท่งแก้ว) ตั้งแท่งแก้วที่มีดีเอ็นเอทิ้งไว้สักครู่ เมื่อแห้งแล้วใส่ลงในหลอดทดลอง
9. นำแท่งแก้วที่มีสายดีเอ็นที่แห้งแล้วติดอยู่ วนในสารละลาย ข. ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่อยู่ในหลอดทดลองขนาดใหญ่ จนแน่ใจว่าดีเอ็นเอที่เกาะติดอยู่ปลายแท่งแก้วละลายออกหมด เพื่อนำไปใช้ในการหาปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ในการทดลองตอนที่ 3 ต่อไป จากนั้นปิดปากหลอดทดลองด้วยพาราฟิล์ม คว่ำหลอดทดลองไปมาเพื่อสายของดีเอ็นเอที่จับพันกันแน่นอยู่คลายออกจากกัน เพื่อให้ดีเอ็นเอสามารถละลายได้ในสารละลาย ข. ง่ายขึ้น ติดฉลากกลุ่มให้เรียบร้อย แล้วนำไปเก็บที่ภาชนะรวมที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

<u>ตอนที่ 2 การสกัดดีเอ็นเอจากหอมหัวใหญ่</u>

<u>วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง</u>

1. กระชอน
2. กระบอกตวง (cylinder)
3. เครื่องปั่น (blender)
4. ช้อนตักสาร (spoon)
5. แท่งแก้ว (stirring rod)
6. บีกเกอร์ (beaker)
7. ปิเปตต์ (pipette)
8. พาราฟิล์ม (parafilm)
9. มีดและเขียง
10. ลูกยาง (rubber bulb)
11. หลอดทดลองขนาดใหญ่ (test tube)

<u>สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง</u>

1. หอมหัวใหญ่

2. น้ำยาล้างจาน
3. ผงเนื้อนุ่ม
4. สารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ ของเกลือแกง
5. สารละลาย 95 เปอร์เซ็นต์ ของเอทานอลที่เย็น
6. สารละลาย ข.

วิธีการทดลอง

1. ปอกเปลือกหอมหัวใหญ่แล้วแบ่งครึ่งลูก หั่นให้ได้ขนาดเล็กๆ
2. เทใส่เครื่องปั่น เติมสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ ของเกลือแกงพอท่วม ปั่นเป็นช่วงๆ ช่วงละประมาณ 10-15 วินาที
3. เทส่วนที่ปั่นได้ลงในบีกเกอร์ เติมน้ำยาล้างจานปริมาตร 5 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันนานประมาณ 5-10 นาที หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน
4. กรองสารละลายหัวหอมด้วยกระชอนพลาสติกลงในบีกเกอร์
5. เติมผงเนื้อนุ่มปริมาณครึ่งช้อนชา ค่อยๆ คนช้าๆ ให้เข้ากันประมาณ 5 นาที
6. แบ่งสารละลายจากบีกเกอร์ลงในหลอดทดลองประมาณ 10 มิลลิลิตร
7. เติมสารละลาย 95 เปอร์เซ็นต์ ของเอทานอลที่เย็นลงไปปริมาตร 20 มิลลิลิตร เอียงหลอดขึ้นลงช้าๆ จะเห็นเส้นใยสีขาวของดีเอ็นเอหอมหัวใหญ่เกิดขึ้นในหลอด
8. ใช้แท่งแก้วกวนในลักษณะวงกลมอย่างช้าๆ เพื่อเก็บสายดีเอ็นเอ ซึ่งคล้ายเส้นใย (ควรให้เส้นใยม้วนกันอยู่บริเวณปลายๆ แท่งแก้ว) ตั้งแท่งแก้วที่มีดีเอ็นเอทิ้งไว้สักครู่ เมื่อแห้งแล้วใส่ลงในหลอดทดลอง
9. นำแท่งแก้วที่มีสายดีเอ็นที่แห้งแล้วติดอยู่ วนในสารละลาย ข. ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่อยู่ในหลอดทดลองขนาดใหญ่ จนแน่ใจว่าดีเอ็นเอที่เกาะติดอยู่ปลายแท่งแก้วละลายออกหมด เพื่อนำไปใช้ในการหาปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ในการทดลองตอนที่ 3 ต่อไป จากนั้นปิดปากหลอดทดลองด้วยพาราฟิล์ม คว่ำหลอดทดลองไปมาเพื่อให้สายของ ดีเอ็นเอที่จับพันกันแน่นอยู่คลายออกจากกัน เพื่อให้ดีเอ็นเอสามารถละลายได้ในสารละลาย ข. ง่ายขึ้น ติดฉลากกลุ่มให้เรียบร้อย แล้วนำไปเก็บที่ภาชนะรวม ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ตอนที่ 3 การวิเคราะห์หาปริมาณดีเอ็นเอจากสารที่สกัดได้จากตอนที่ 1 และ 2

วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. คิวเวตต์แบบควอร์ทซ์ (quartz cuvette) และแบบพลาสติก (plastic cuvette)
2. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
3. เตาแก๊ส และหม้อต้มน้ำ
4. ปิเปตต์ (pipette)
5. แผ่นฟอยล์ (foil)
6. แรกซ์ (rack)
7. ลูกยาง (rubber bulb)
8. หลอดทดลอง (test tube)

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายดีเอ็นเอจากตอนที่ 1 และ 2
2. สารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมได้
3. สารละลายกรดเปอร์คลอริก ($HClO_4$) ความเข้มข้น 0.45 โมลาร์
4. สารละลายกรดเปอร์คลอริก ($HClO_4$) ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์
5. สารละลายดีเอ็นเอตัวอย่าง (unknown)
6. สารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
7. สารละลาย diphenylamine

วิธีการทดลอง

การหาปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสง

1. เทสารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากการทดลองตอนที่ 1 และ 2 ใส่ลงในคิวเวตต์แบบ ควอร์ทซ์ นำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร
2. คำนวณปริมาณดีเอ็นเอ โดยนำค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร คูณ 0.05 ค่าที่ได้จะเท่ากับปริมาณดีเอ็นเอในหน่วยมิลลิกรัม จากนั้นเทกลับหลอดเดิม

การหาปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีทำปฏิกิริยากับสารละลาย diphenylamine

1. ทำเฉพาะดีเอ็นเอตัวอย่างจากตอนที่ 1 (สกัดจากเลือดไก่) โดยปิเปตต์สารละลาย ดีเอ็นเอที่เตรียมได้ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง
2. เติมสารละลายกรดเปอร์คลอริก ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ลงไป ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ส่วนที่ได้เรียกว่า “สารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมได้” (กรดเปอร์คลอริกเป็นกรดแก่ ระวังอย่าให้ถูกผิวหนัง)
3. เตรียมหลอดทดลอง 6 หลอด และเติมสารต่างๆ ตามตารางข้างล่างนี้

หลอดที่ / สาร	ปริมาตร (มิลลิลิตร) ที่ใช้							
	1	2-2’	3-3’	4-4’	5-5’	6-6’	7-7’	8-8’
สารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	-	0.2	0.4	0.6	0.8	-	-	-
$HClO_4$ ความเข้มข้น 0.45 โมลาร์	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0.5	-	0.5
สารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมได้	-	-	-	-	-	0.5	1	-
ดีเอ็นเอตัวอย่าง (unknown)	-	-	-	-	-	-	-	0.5

*__หมายเหตุ__ n-n’ หมายถึง การทำซ้ำ (duplicate)

4. ผสมให้เข้ากันแล้วเติมสารละลาย diphenylamine ลงไปหลอดละ 2.5 มิลลิลิตร
5. ผสมสารละลายให้เข้ากัน ปิดปากหลอดด้วยแผ่นฟอยล์ นำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 15 นาที
6. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น นำไปอ่านค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตร โดยใช้หลอดทดลองที่ 1 เป็นสารละลายเปรียบเทียบ (blank)

ตอนที่ 4 การตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้

วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. คิวเวตต์แบบควอร์ทซ์ (quartz cuvette)
2. เครื่องกำเนิดไฟฟ้า (power supply)
3. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
4. เจลแชมเบอร์ (gel chamber)
5. ออโตปิเปตต์ และทิป (auto pipette, tip)
6. ชุดอิเลกโทรโฟรีซีส (horizontal gel electrophoresis system)
7. UV transilluminator และอุปกรณ์บันทึกภาพ

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. อะกาโรส
2. สารละลายบัฟเฟอร์ TBE
3. ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส (base pair ladder)
4. สีย้อมดีเอ็นเอ (loading dye)
5. เอทิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีการทดลอง

ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสง

1. เทสารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากการทดลองตอนที่ 1 และ 2 ใส่ลงในคิวเวตต์แบบ ควอร์ทซ์ นำไปแสกนวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร จากนั้นเทกลับหลอดเดิม
2. คำนวณหาอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 นาโนเมตร

ด้วยวิธีการทำอิเลกโทรโฟรีซีสแบบอะกาโรส

1. เตรียมเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์ ของอะกาโรส โดยชั่งอะกาโรส 1.5 กรัม ผสมกับ สารละลายบัฟเฟอร์ TBE ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปต้มให้สารละลายใส
2. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วเทอะกาโรสลงในชุดเซตเจลที่ปรับระดับสมดุล และวางหวีไว้แล้ว ตั้งทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว แล้วจึงค่อยๆ ดึงหวีออก
3. นำเจลที่ได้ไปวางในแชมเบอร์ จากนั้นเทสารละลายบัฟเฟอร์ TBE ให้ท่วมแผ่นเจล
4. นำดีเอ็นเอผสมกับสีย้อมดีเอ็นเอในอัตราส่วน 5:1 จากนั้นจึงหยอดตัวอย่างลงในหลุมด้วยไมโครปิเปตต์ โดยใช้ตัวอย่าง 10 ไมโครลิตรต่อหลุม
5. ต่อขั้วไฟฟ้าทั้งสองบนแชมเบอร์เข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า ใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 50-100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 40-50 นาที
6. ทำอิเลกโทรโฟรีซีส จนกระทั่งสีย้อมตัวอย่างอยู่ห่างจากปลายแผ่นเจลทางด้านล่างประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วจึงปิดเครื่อง
7. นำอะกาโรสเจลไปแช่ในกล่องพลาสติกที่มีสารละลายเอทิเดียมโบรไมด์ประมาณ 5 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 5-10 นาที
8. นำอะกาโรสเจลไปส่องดูภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง UV-transilluminator แล้วถ่ายภาพ

การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

1. **สารละลายโปรตีเอส**

   -ละลาย $Na_2EDTA.2H_2O$ ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ในน้ำกลั่น

   -เติม SDS เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ตั้งทิ้งไว้ให้ละลาย

   -เติมโปรตีเอส (จาก *Aspergillus oryzae*) 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ผสมให้เข้ากัน นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (เตรียมแล้วใช้ทันที)

2. **สารละลาย diphenylamine**

   -ละลาย diphenylamine เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ในสารละลายกรดแอซิติกเข้มข้น

   -เติมสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ผสมให้เข้ากัน

   -เติมสารละลาย acetaldehyde 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ผสมให้เข้ากัน (เตรียมแล้วใช้ทันที)

3. **สารละลาย ACD**

   โดยเตรียมเป็นสารละลายผสมให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละชนิด ในน้ำกลั่น จะได้พีเอช ประมาณ 5.0 ดังนี้

   -ไตรโซเดียมซิเตรท ($C_6H_5Na_3O_7.2H_2O$) ความเข้มข้น 75 มิลลิโมลาร์

   -กรดซิตริก ($C_6H_8O_7.H_2O$) ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์

   -เด็กโทรส 2.45 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

4. **สารละลาย ก.**

   โดยเตรียมเป็นสารละลายผสมให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละชนิด ในน้ำกลั่น ดังนี้

   -trizma base (Tris) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์

   -โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 85 มิลลิโมลาร์

- $Na_2EDTA.2H_2O$ ความเข้มข้น 4 มิลลิโมลาร์

-ปรับพีเอชให้ได้ 8.2 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (ละลายส่วนผสมทั้งหมดก่อนด้วยน้ำกลั่น โดยใช้ปริมาตรครึ่งหนึ่งของทั้งหมด จากนั้นปรับพีเอชตามค่าที่กำหนด จึงค่อยเติมน้ำกลั่นให้ได้ครบตามปริมาตรที่ต้องการ)

5. <u>สารละลาย ข.</u>

โดยเตรียมเป็นสารละลายผสมให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละชนิด ในน้ำกลั่น ดังนี้

-trizma base (Tris) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์

-$Na_2EDTA.2H_2O$ ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์

-ปรับพีเอชให้ได้ 7.4 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ละลายส่วนผสมทั้งหมดก่อนด้วยน้ำกลั่น โดยใช้ปริมาตรครึ่งหนึ่งของทั้งหมด จากนั้นปรับพีเอชตามค่าที่กำหนด จึงค่อยเติมน้ำกลั่นให้ได้ครบตามปริมาตรที่ต้องการ)

6. <u>สารละลายบัฟเฟอร์ TBE</u>

-ละลาย Tris และกรดบอริก ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.178 โมลาร์ ในน้ำกลั่น

-ละลาย $Na_2EDTA.2H_2O$ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ในน้ำกลั่น ปรับพีเอชให้ได้ 8.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 10 นอร์มอล (ละลายสารทั้งหมดก่อนด้วยน้ำกลั่น โดยใช้ปริมาตรครึ่งหนึ่งของทั้งหมด จากนั้นปรับพีเอชตามค่าที่กำหนด จึงค่อยเติมน้ำกลั่นให้ได้ครบตามปริมาตรที่ต้องการ)

-ผสมสารละลาย $Na_2EDTA.2H_2O$ ลงในสารละลาย Tris-boric ในอัตรส่วน 1 ต่อ 250

8. **<u>ย้อมดีเอ็นเอ (loading dye)</u>**

-ละลาย $Na_2EDTA.2H_2O$ ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ในน้ำกลั่น

-เติมสารละลายกลีเซอรอล ในอัตราส่วน 1 ต่อ 4 ของสารละลาย $Na_2EDTA.2H_2O$

-เติม bromophenol blue 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรทั้งหมด ผสมให้เข้ากัน

9. **<u>ละลายเอทิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide)</u>**

-ละลายเอทิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในน้ำกลั่น

<u>รายงานผลการทดลอง</u>

<u>เรื่อง การสกัดแยกกรดนิวคลิอิกจากแหล่งต่าง ๆ</u>

ชื่อผู้ทดลองและเขียนรายงาน_____รหัส_____

ชื่อผู้ร่วมทดลอง 1. _____ รหัส_____

2. _____ รหัส_____

กลุ่มที่_____section/วันที่ทำการทดลอง_____เวลา_____

ห้องที่ทำการทดลอง_____

อาจารย์ผู้ควบคุมการทดลอง 1. _____

2. _____

.....

<u>ตอนที่ 1 และตอนที่ 2</u> การสกัดแยกดีเอ็นเอจากสารตัวอย่าง

วิธีการ	ผลการทดลอง
<u>ตอนที่ 1. การสกัดแยกดีเอ็นเอจากเม็ดเลือดแดงไก่</u>	
1.1 ปริมาตรเลือดไก่ที่ใช้	.....มิลลิลิตร
1.2 ลักษณะของเลือดไก่หลังเติมสารละลาย 10เปอร์เซ็นต์ SDS	.....
1.3 ลักษณะของเลือดไก่หลังเติมสารละลายโปรตีเอส	.....
1.4 ปริมาตรของส่วนใสที่ได้หลังจากเซนตริฟิวจ์	.....มิลลิลิตร
1.5 ปริมาตรของ 95 เปอร์เซ็นต์ แอลกอฮอล์ที่เติม	.....มิลลิลิตร
1.6 ปริมาตรของสารละลาย ข. ที่ใช้ในการละลายดีเอ็นเอ	.....มิลลิลิตร
<u>ตอนที่ 2. ผลการสกัดดีเอ็นเอจากหัวหอมใหญ่</u>	
2.1 ปริมาตรของหอมหัวใหญ่ที่ได้จากการปั่น	.....มิลลิลิตร
2.2 ปริมาตรของส่วนใสที่ได้	.....มิลลิลิตร
2.3 ปริมาตรของ 95 เปอร์เซ็นต์ แอลกอฮอล์ที่เติม	.....มิลลิลิตร
2.4 ปริมาตรของสารละลาย ข. ที่ใช้ในการละลายดีเอ็นเอ	.....มิลลิลิตร

<u>ตอนที่ 3</u> ผลการหาปริมาณดีเอ็นเอจากสารที่สกัดได้

<u>วิธีวัดค่าการดูดกลืนแสง</u>

ดีเอ็นเอตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสง OD_{260}	ปริมาณดีเอ็นเอที่คำนวณได้ (มิลลิกรัม)
ตอนที่ 1	.....	.....
ตอนที่ 2	.....	.....

<u>วิธีทำปฏิกิริยากับสารละลาย diphenylamine</u>

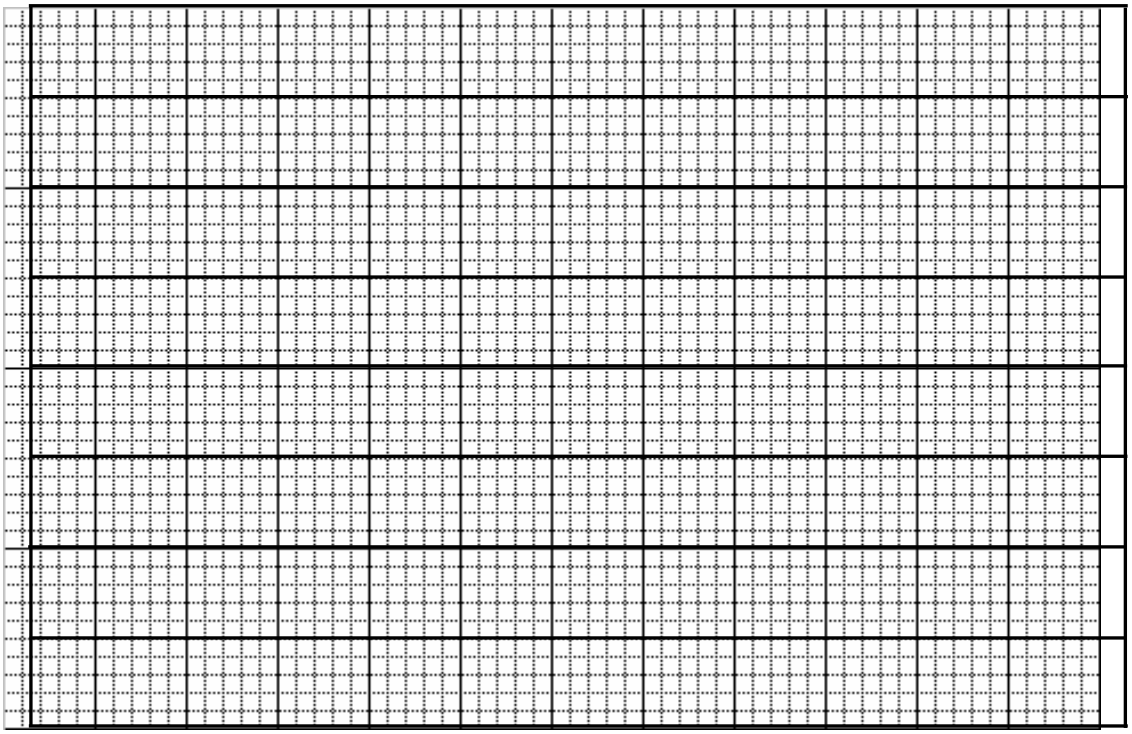
ปริมาตรของสารละลายดีเอ็นเอจากตอนที่ 1 = ... มิลลิลิตร

เติมสารละลาย $HClO_4$ ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ ลงไป = ... มิลลิลิตร

ปริมาตรของสารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมได้ = ... มิลลิลิตร

หลอดที่	ปริมาตร (มิลลิลิตร) ที่ใช้

สาร	1	2-2’	3-3’	4-4’	5-5’	6-6’	7-7’	8-8’
สารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	-	0.2	0.4	0.6	0.8	-	-	-
$HClO_4$ ความเข้มข้น 0.45 โมลาร์	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0.5	-	0.5
สารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมได้	-	-	-	-	-	0.5	1	-
ดีเอ็นเอตัวอย่าง (unknown)	-	-	-	-	-	-	-	0.5
ค่า OD_{610} ที่อ่านได้	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
ปริมาณของดีเอ็นเอ (มิลลิกรัม)	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....



กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD_{610} และปริมาณดีเอ็นเอ (มิลลิกรัม)

จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD_{610} และปริมาณดีเอ็นเอ (มิลลิกรัม)

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากที่เตรียมได้ในหลอดที่ 6 = ... มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากที่เตรียมได้ในหลอดที่ 7 = ... มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ความเข้มข้นเฉลี่ยของดีเอ็นเอที่เตรียมได้ = ... มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอจาก unknown ในหลอดที่ 8 = ... มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ปริมาณของดีเอ็นเอที่หาได้ในเลือดไก่ 0.5 มิลลิลิตร = ... มิลลิกรัม

<u>วิธีคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ</u>

<u>ตอนที่ 4</u> การตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้
<u>ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสง</u>

ดีเอ็นเอตัวอย่าง	ค่า OD_{260}	ค่า OD_{280}	OD_{260} : OD_{280}	สรุปผล
ตอนที่ 1	.....	.....	.....	.....
ตอนที่ 2	.....	.....	.....	.....

ด้วยวิธีการทำอิเลกโทรโฟรีซีสแบบอะกาโรส

รูปแสดงลักษณะการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอบนแผ่นอะกาโรส

สรุปและวิเคราะห์ผลการทดลอง

คำถามท้ายบท

1. เพราะเหตุใดจึงเลือกใช้เลือดของไก่ ในการสกัดแยกดีเอ็นเพื่อใช้ในการทดลอง สามารถใช้เลือดของมนุษย์ในการสกัดได้หรือไม่ เพราะเหตุใด และสามารถสกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการศึกษาได้จากแหล่งอื่นๆ จากที่ใดได้อีกบ้าง
2. จงอธิบายถึงหลักการ และหน้าที่ของสารเคมีแต่ละชนิดในการสกัดดีเอ็นเอ จากที่ได้ทำการทดลอง พอสังเขป
3. นักศึกษามีวิธีการใดบ้างที่ช่วยในการรักษาสภาพความเป็นสายดีเอ็นให้คงไว้
4. นักศึกษาสามารตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอได้โดยวิธีการใดบ้าง จงอธิบาย
5. นักศึกษาสามารถหาปริมาณของดีเอ็นเอได้จากวิธีการใดบ้าง ให้อธิบายแต่ละวิธีการ และนักศึกษาคิดว่าวิธีการใดน่าจะให้ความถูกต้องน่าเชื่อถือมากกว่ากัน