วิธีการสกัดกรดนิวคลีอิก (NTK) สำหรับการเรียนกลุ่มชีวเคมีพื้นฐานและการวิจัยทางด้านชีวเคมี

Nucleic acid Tool Kits (NTK) for basic Biochemistry and Biochemistry research

ไพศาล ขาวสัก[1*]
Paisarn Khawsak[1*]

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันเทคนิคการสกัดกรดนิวคลีอิกถือว่ามีบทบาทที่สำคัญในอณูชีววิทยา ดีเอ็นเอที่ได้ต้องมีคุณภาพและปริมาณสูง อย่างไรก็ตามชุดสกัดดีเอ็นเอมาตรฐานยังต้องใช้อุปกรณ์และสารเคมีที่มีต้นทุนสูงและซับซ้อน วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้คือ พัฒนาวิธีการสกัดกรดนิวคลีอิกที่เรียกว่า วิธี NTK (Nucleic acid Tool Kits) ให้มีความสะดวก เพื่อใช้ในการเรียนการสอนในกลุ่มวิชาชีวเคมีพื้นฐานและงานวิจัย โดยประยุกต์ใช้กับอุปกรณ์และสารเคมีที่มีราคาถูก มีความเหมาะสม สะดวก ประหยัดเวลาและมีประสิทธิภาพดีเทียบเท่ากับชุดสกัดดีเอ็นเอที่ได้มาตรฐานจากการศึกษาเปรียบเทียบคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัด ตามวิธี NTK กับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวิธีมาตรฐานคือ ชุดสกัดดีเอ็นเอของ Trizol® reagent (Invitrogen, USA), ชุดสกัดดีเอ็นเอของ NucleoSpin® tissue (MACHERREY-NAGEL, Germany), และ ชุดสกัดดีเอ็นเอของ QIAamp® DNA Mini kit (QIAgen, Germany) จากตัวอย่างแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบคือ *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* และ *Staphylococcus aureus* ผลการวิจัยพบว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้ ตามวิธี NTK มีความบริสุทธิ์ ไม่แตกต่างจากวิธีมาตรฐานอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพและปริมาณสูงกว่าวิธีมาตรฐานอื่น ($p<0.05$) ดังนั้น ดีเอ็นเอจากการสกัด ตามวิธี NTK จึงมีคุณภาพสูงกว่าดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดตามวิธีมาตรฐาน ยืนยันผลการวิจัยเมื่อเปรียบเทียบด้วยแถบความเข้มของดีเอ็นเอ ที่ได้จากเทคนิคพีซีอาร์ ดังนั้นการสกัดดีเอ็นเอ ตามวิธี NTK เป็นวิธีสกัดดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอมาตรฐานอื่น ด้วยต้นทุนที่ถูกกว่า เป็นวิธีการที่ง่ายและสะดวกกว่า จึงเป็นทางเลือกให้ อาจารย์ นิสิต นักศึกษา และ นักวิจัย ได้นำไปใช้ในการเรียนการสอนและงานวิจัยต่อไป

คำสำคัญ: กรดนิวคลีอิก ดีเอ็นเอ การสกัดกรดนิวคลีอิก วิธีการสกัดดีเอ็นเอ

Abstract

Presently, all of the nucleic extraction techniques are required the high yield and quality of the DNA. However, the standard DNA extraction kits required a high cost and complicated equipment. Thus, researcher has developed the nucleic acid extraction method which is easy and cheap. It still results in excellent quality via only the basic equipment and chemical reagent called NTK (Nucleic acid Tool Kits). In this study, researcher compared the qualities of DNA from the NTK method with other standard methods: Trizol® reagent (Invitrogen, USA), NucleoSpin® tissue (MACHERREY-NAGEL, Germany), and QIAamp® DNA Mini kit (QIAgen, Germany) in Gram-negative and Gram-positive bacteria (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus)*. Results showed that the DNA purity from the NTK method was no significantly different than another method. However, in quality and quantity, the NTK method showed a higher DNA yield than other methods ($p<0.05$). Also, DNA extraction from NTK method showed higher quality than the other methods via the PCR band intensity. Therefore, the NTK method showed higher

[1] ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร 10110
[1] Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, Bangkok, 10110
*Corresponding author: e-mail: paisark@g.swu.ac.th
Received: *February 5, 2021*, Accepted: *March 6, 2021*, Published: *April 21, 2021*

performance than other standard methods with cheaper cost and easier. The NTK method can be used as an alternative method to extract the DNA for teachers, students, and researchers to use in teaching and researching.

Keywords: nucleic acid, DNA, nucleic acid extraction, DNA extraction

บทนำ

ภายใต้การเรียนการสอนในกลุ่มวิชาพื้นฐานทางด้านชีวเคมี และการวิจัยนั้น ส่วนใหญ่จะให้ความสำคัญต่อการสกัดกรดนิวคลีอิก ให้ได้กรดนิวคลีอิกที่มีความสะอาดและบริสุทธิ์ นำไปประยุกต์ใช้ต่อได้นั้น การพัฒนาและปรับปรุงการสกัดกรดนิวคลิอิก ก่อให้เกิดประโยชน์และเป็นแนวทาง แก้ไขปัญหาของการสกัดกรดนิวคลีอิกให้สะอาดและบริสุทธิ์ และเป็นการลดการนำเข้าชุดสกัดที่นำมาจากต่างประเทศ ที่มีราคาแพงได้

ปัจจุบัน การสกัดกรดนิวคลีอิกโดยเฉพาะ ดีเอ็นเอ (DNA) จึงมีความสำคัญและมีความจำเป็นอย่างมากในด้านชีวเคมี ในการสกัดกรดนิวคลีอิก แบ่งได้เป็น 3 แบบ ได้แก่ แบบที่ 1 Classic extraction method วิธีที่ใช้แบบดั้งเดิม หรือ classic alkaline lysis (Boyle and Lew, 1995; Michael and Sambrook, 2012) โดยการสกัดด้วย phenol และ chloroform และตกตะกอน DNA ด้วย alcohol นั้น (Lakshmi et al., 1999; Wilson, 2001; Terry et al., 2002) เป็นที่นิยมเนื่องจากราคาไม่แพง และไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือชั้นสูงที่ซับซ้อน อย่างไรก็ตาม วิธีการนี้ยังมีข้อจำกัดในด้านคุณภาพและความบริสุทธิ์ของกรดนิวคลีอิกที่สกัดได้ รวมทั้งต้องใช้เวลานานกว่าวิธีอื่น ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อต้องสกัดตัวอย่างจำนวนมาก อีกทั้งไม่นิยมใช้กับตัวอย่างทางคลินิกเนื่องจากมีความเสี่ยงที่ตัวอย่างจะปนเปื้อนค่อนข้างสูง ด้วยข้อจำกัดเหล่านี้ จึงได้มีการพัฒนาการสกัดกรดนิวคลีอิกแบบที่ 2 unmodified silica resin-dependent protocol และแบบที่ 3 commercial column base strategy โดยการใช้ silica resin (Boyle and Lew, 1995; Carter and Milton, 1993) ดังนั้นจึงมีบริษัทผู้ผลิตในต่างประเทศจำนวนมากคิดค้นการสกัดกรดนิวคลีอิกในทางการค้า ที่ใช้คอลัมน์ในการแยกกรดนิวคลีอิกให้มีความบริสุทธิ์ ซึ่งประกอบด้วย silica membrane ซึ่งออกแบบให้มี strong anionic group ติดอยู่ อันจะทำให้ resin สามารถจับกับกรดนิวคลีอิกได้อย่างเฉพาะเจาะจง ในสภาวะความเป็นเบสและมีความเข้มข้นของเกลือสูง กรดนิวคลีอิก ที่สกัดได้จากแบบที่ 2 และ 3 นี้ จะมีปริมาณ DNA และความบริสุทธิ์สูง อย่างไรก็ตาม การสกัดกรดนิวคลีอิก ด้วยวิธีนี้มีราคาแพงและคอลัมน์ที่ใช้มักจะเป็นการใช้เพียงครั้งเดียวแล้วทิ้ง นอกจาก commercial nucleic acid extraction column เป็นชุดสกัดที่มีราคาแพง และทางบริษัทผู้ผลิตยังผูกขาดน้ำยาที่แต่ละบริษัทผลิตมาใช้ควบคู่กับคอลัมน์นั้นค่อนข้างที่จะเป็นความลับ ไม่เปิดเผยว่าเป็นน้ำยาอะไร ในแต่ละบริษัทจะไม่เปิดเผยข้อมูล และรายละเอียดของน้ำยา ในปัจจุบันชุดสกัดชนิดนี้จะถูกนำเข้ามาจากต่างประเทศ ประเทศไทยยังไม่มีผู้ผลิตใดผลิตชุดสกัด กรดนิวคลีอิก เพื่อใช้กับ silica membrane column ออกจำหน่ายในประเทศไทย จำเป็นต้องนำเข้าจากต่างประเทศ อีกทั้งผู้ผลิตไม่นิยมแยกส่วนขายแต่เพียงน้ำยาเท่านั้น เพราะอาจจะต้องขายในราคาที่ต่ำทำให้ไม่คุ้มค่ากับค่าใช้จ่ายในการผลิต เนื่องจากการผลิตคอลัมน์ต้นทุนสูงที่สุดในบรรดาส่วนประกอบทั้งหมดของชุดสกัด ผู้ใช้โดยเฉพาะอย่างยิ่งนักวิจัย นิสิต นักศึกษา และผู้ใช้ในประเทศไทยไม่มีทางเลือกอื่นจำเป็นต้องใช้ชุดสกัดที่นำเข้าจากต่างประเทศทั้งสิ้น ไม่ว่าจะเป็นการสกัด genomic DNA Plasmid DNA หรือ PCR product

ผู้วิจัยจึงให้ความความสำคัญของการสกัด DNA ให้มีปริมาณ คุณภาพ และประสิทธิภาพสูง มีมาตรฐานเพื่อใช้การเรียนการสอนในรายวิชาชีวเคมีพื้นฐานและงานวิจัยทางด้านชีวเคมี ได้ตรงตามมาตรฐานและได้องค์ความรู้ อันจะเป็นหัวใจหลักที่สำคัญของการเรียนทางด้านชีวเคมีพื้นฐาน พันธุศาสตร์ และอณูชีววิทยา ซึ่งบรรจุไว้ในหลักสูตรการเรียนในระดับปริญญาตรีและระดับบัณฑิตศึกษา ของคณะแพทยศาสตร์ ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ซึ่งผู้วิจัยได้พบปัญหาว่า การสกัดกรดนิวคลีอิกได้ DNA ที่มีคุณภาพต่ำ ปริมาณน้อย และ DNA ไม่บริสุทธิ์ มีสิ่งปนเปื้อนเยอะ เกิดปัญหาต่อการทดลอง ได้ผลการทดลองที่คลาดเคลื่อน ไม่สามารถวิเคราะห์ผลได้แน่นอน ทำให้สิ้นเปลืองต่อการเรียนการสอนและการวิจัยเป็นอย่างมากเป็นประจำทุกปี ดังนั้น อาจารย์ผู้สอนและผู้วิจัย จึงใช้ชุดสกัดกรดนิวคลีอิกจากต่างประเทศ มาใช้ในการเรียนการสอน ข้อดีของชุดสกัด DNA จากต่างประเทศนั้นจะใช้เทคโนโลยีการสกัดกรดนิวคลิอิกที่ดี มีประสิทธิภาพ DNA ที่สกัดที่ได้ค่อนข้างจะมีความบริสุทธิ์สูง และมีการปนเปื้อนน้อย แต่ข้อเสีย คือ ผู้ใช้งานที่เป็นนิสิต นักศึกษา ไม่ได้องค์ความรู้ความเข้าใจ

และกลไกการทำงานของสารเคมีในแต่ละขั้นตอนของการสกัด DNA จากชุดสกัดที่นำเข้าจากต่างประเทศ อีกทั้งยังมีราคาแพงและมีจำนวนจำกัด ดังนั้น เพื่อลดปัญหาที่เกิดขึ้นต่อเนื่องทุกปี ผู้วิจัยจึงได้พิจารณาศึกษา วิเคราะห์หาองค์ความรู้จากการชุดสกัดกรดนิวคลีอิกที่นำเข้าจากต่างประเทศ และศึกษาจากงานวิจัยอื่นที่เกี่ยวข้องมาพัฒนา ปรับปรุง สร้างชุดสกัดกรดนิวคลีอิก NTK ให้ได้สารสกัด DNA ที่มีคุณภาพ ปริมาณ และบริสุทธิ์สูง อีกทั้งสร้างองค์ความรู้ใหม่ ก่อให้เกิดประโยชน์ต่อผู้เรียน ผู้สอนและผู้ที่นำไปใช้ ดังนั้นชุดสกัดกรดนิวคลีอิก NTK ที่ได้จึงมีองค์ความรู้และวิธีการตามมาตรฐานการเรียนด้านปฏิบัติการ และได้นำเสนอชุดสกัดดังกล่าวไปใช้ในการเรียนการสอนในรายวิชาชีวเคมีพื้นฐานและการวิจัยทางด้านชีวเคมี เพื่อลดค่าใช้จ่ายและการสิ้นเปลือง สามารถทดแทนการนำเข้าชุดสกัดจากต่างประเทศได้

งานวิจัยอื่นที่เกี่ยวข้อง ต่อการพัฒนาและปรับปรุงการสกัดกรดนิวคลีอิก NTK มีดังนี้

การสกัด DNA แบบ phenol chloroform ตามวิธีของ Wilson (Wilson, 2001) เป็นการสกัด DNA แบบ phenol-chloroform ซึ่งวิธีนี้จะใช้สารเคมี sodium dodecyl sulfate (SDS) และเอนไซม์ proteinase K ในการทำให้เยื่อหุ้มเซลล์แตกออก และโปรตีนเสียสภาพและใช้ phenol-chloroform เพื่อให้โปรตีนแยกออกจาก DNA เหลือเพียงดีเอ็นเอที่จะนำไปใช้ร่วมกับการทำ Polymerase Chain Reaction (PCR)

วิธีการสกัด DNA แบบ alkaline extraction ตามวิธีของ Bimboim (Birnboim and Doly, 1979) การสกัด DNA แบบ alkaline นั้นเป็นสภาวะที่ใช้ สารละลายในภาวะที่เป็นด่าง ใช้ในการสกัด DNA ที่เป็น plasmid โดยหลักการพื้นฐานของวิธีการสกัด DNA แบบนี้ คือ เลือกใช้สภาวะที่เป็นด่าง (สารเคมีจะประกอบด้วย NaOH และ SDS) เพื่อที่จะทำลาย chromosomal DNA ซึ่งเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ ในขณะที่ พันธะ covalent ของ plasmid DNA ยังคงสภาพและไม่ถูกทำลาย หลังจากที่ทำให้สภาวะให้เป็นกลางแล้ว chromosomal DNA ไม่สามารถที่จะคืนสภาพของสาย DNA ได้ และถูกแยกออกโดยการตกตะกอน แต่ในขณะที่ DNA ขนาดเล็ก หรือ plasmid DNA ยังคงล่องลอยอยู่ในสารละลาย และนี่คือวิธีที่ใช้ประโยชน์จากการแยก DNA ขนาดใหญ่และขนาดเล็กได้ ก่อนที่จะนำ DNA หรือ plasmid DNA ไปประยุกต์ใช้ต้องทำให้สะอาดและบริสุทธิ์ก่อนทุกครั้ง

วิธีสกัด DNA แบบซีแทบ (CTAB extraction) ตามวิธีของ Zhou, Terry และ Tan (Zhou et al., 1996; Terry et al, 2002; Tan and Yiap, 2009) วิธีการสกัดแบบ CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) วิธีการนี้ส่วนใหญ่จะใช้ในการสกัด DNA จากตัวอย่างพืช สารเคมีที่ใช้จะมีส่วนประกอบของ CTAB 2% ในสภาวะที่เป็นด่าง การทำงานของ CTAB คือ การตกตะกอนกรดนิวคลีอิก และพอลิแซคคาไรด์ที่มีสภาวะเป็นกรด ในขณะที่โปรตีนและพอลิแซคคาไรด์ที่มีสภาวะเป็นกลางจะล่องลอยในสารละลาย ซึ่ง CTAB ที่จับกับกรดนิวคลีอิกจะเป็นโมเลกุลที่ซับซ้อน สามารถละลายได้ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง และสามารถที่จะแยกเอา พอลิแซคคาไรด์ ที่ตกตะกอนออกจากกรดนิวคลีอิกได้ (Zhou et al., 1996; Tan and Yiap, 2009) จากการสกัด DNA ด้วยวิธี CTAB การตกตะกอนและการล้างกรดนิวคลีอิก จะใช้ร่วมกันกับวิธีการสกัดแบบใช้สารอินทรีย์และแอลกอฮอล์ เช่น สารละลาย phenol-chloroform-isoamyl alcohol และ mercaptoethanol ข้อเสียของการสกัด DNA แบบ CTAB นี้คือใช้เวลานาน และเสี่ยงต่อการใช้สารเคมีที่เป็นอันตราย เช่น phenol และ chloroform ยิ่งไปกว่านั้น DNA ที่สกัดได้จากวิธีนี้ จำเป็นต้องเพิ่มขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ เพื่อป้องกันการถูกยับยั้งในกระบวนการทำ PCR

การสกัดแบบ Guanidine thiocyanate-phenol-chloroform ตามวิธีของ Chomczynski และ Pitcher (Chomczynski and Sacchi, 1987; Pitcher et al., 1989) เป็นวิธีการสกัด DNA โดย lysis บัฟเฟอร์ ที่มี lysozyme ย่อยผนังเซลล์ของแบคทีเรีย และใช้สารเคมี ที่มีส่วนประกอบของ gaunidine thiocyanate ร่วมกับการใช้ phenol-chloroform-isoamyl alcohol และ ล้างตะกอน DNA ด้วย 75% ethanol ให้ได้ DNA ที่สะอาดและบริสุทธิ์ อย่างไรก็ตามวิธีการสกัดแบบนี้จะถูกพัฒนา และได้รับการแก้ไขอย่างต่อเนื่อง วิธีการนี้ใช้แยกของกรดนิวคลีอิกที่เป็น RNA ออกจาก DNA หรือ โปรตีน ในสภาวะที่เป็นกรด โดยที่ RNA จะอยู่ในส่วนของสารละลาย (aqueous phase) แต่ในขณะที่ DNA และโปรตีน จะอยู่ในส่วนชั้นสารละลายอินทรีย์และ อยู่ระหว่างชั้น (interphase) ภายใต้สภาวะที่เป็นกรด สารละลาย RNA ทั้งหมดจะถูกแยกออกมาและตกตะกอนโดยการใช้สาร isopropanol ข้อเสียของการสกัด DNA แบบ guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform นี้คือ ใช้เวลานาน และเสี่ยงต่อการใช้สารเคมีที่เป็นอันตราย เช่น phenol และ chloroform ข้อดีคือ สารละลาย RNA ที่สกัดได้นั้นมีความบริสุทธิ์สูง

วัตถุประสงค์การวิจัย

งานวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนา วิธีการสกัด กรดนิวคลีอิก NTK โดยการใช้เชื้อแบคทีเรียเป็นต้นแบบ ให้ได้สารสกัด DNA มีปริมาณและคุณภาพสูง มีคุณสมบัติเทียบเท่ากับชุดสกัดมาตรฐานที่นำเข้าจากต่างประเทศ และสร้างองค์ความรู้ให้กับผู้ใช้ ที่เป็นนิสิต นักศึกษา นักวิจัย เพื่อได้มีทางเลือก ต่อการประหยัดงบประมาณทำให้เกิดความคุ้มค่าต่อการทำวิจัย หรือการเรียนการสอนต่อไป

ระเบียบวิธีวิจัย

ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย

ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่นำมาใช้เป็นต้นแบบในการสกัด DNA นี้ ใช้แบคทีเรียแกรมลบ 2 สายพันธุ์ คือ *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* แบคทีเรียแกรมบวก 2 สายพันธุ์ คือ *Enterococcus faecalis*และ *Staphylococcus aureus* แบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ ในแต่ละสายพันธุ์จะถูกเลี้ยงในอาหาร Luria broth (LB) 3 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 15-18 ชั่วโมง วัดความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรียในแต่ละหลอดให้ได้ประมาณ 10^8CFU โดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Thermo Spectronic, USA) เก็บเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยงไว้จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่หลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยง 8,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วย TES บัฟเฟอร์ (50 มิลลิโมล EDTA และ 0.15 โมล NaCl, pH 8.0) 0.5 มิลลิลิตร กระจายเซลล์แบคทีเรีย แล้วนำไปหมุนเหวี่ยง 8,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทน้ำล้างเซลล์ทิ้ง เก็บตะกอนเซลล์แบคทีเรียไว้ เพื่อใช้เป็นตัวอย่างในการสกัด DNA ในขั้นตอนต่อไป

การสกัด DNA

1. ชุดสกัดมาตรฐานที่ 1 Trizol® reagent

การสกัด DNA ของแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยการใช้ Trizol® reagent (Invitrogen, USA) ซึ่งมีขั้นตอนการสกัด DNA โดยย่อคือ นำเซลล์แบคทีเรียที่เตรียมไว้ในหลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Trisolution ผสมให้เข้ากันโดยการใช้ pipette ดูดขึ้นลง หลาย ๆ ครั้ง เติม chloroform-isoamyl alcohol (อัตราส่วน 24:1 v/v) vortex ตั้งทิ้งไว้ 5-10 นาที นำไปหมุนเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แยกสารละลายส่วนบนที่เป็นชั้นน้ำ (aqueous phase) ใส่ในหลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตรใหม่ ตกตะกอน DNA ที่ได้โดยการเติม isopropanol ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ทิ้งน้ำใสและเก็บตะกอน ล้างตะกอน DNA ที่ได้ด้วย 75% ethanol จำนวน 2 ครั้ง ละลายตะกอน DNA ด้วย TE elution บัฟเฟอร์

2. ชุดสกัดมาตรฐานที่ 2 NucleoSpin® Tissue

การสกัด DNA ของแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยใช้ชุดสกัด NucleoSpin® Tissue (MACHERREY-NAGEL, Germany) เป็นชุดสกัดที่ใช้การทำ DNA ให้บริสุทธิ์โดยวิธีการใช้ silica membrane ดักจับ DNA ซึ่งมีขั้นตอนการสกัด DNA โดยย่อคือ นำเซลล์แบคทีเรียที่เตรียมไว้ในหลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย lysis บัฟเฟอร์ แยกเศษเซลล์ออกโดยการใช้ NucleoSpin Column นำสารละลายตัวอย่างมาตกตะกอน DNA แล้วนำไปผ่าน NucleoSpin Column โดย column นี้ จะทำหน้าที่ในการดักจับเฉพาะ DNA ไว้ที่บนแผ่น silica membrane filter และล้าง DNA ด้วยสารละลาย B5 และ BW บัฟเฟอร์ ที่มีความเข้มข้นของเกลือที่แตกต่างกัน ให้ได้ DNA ให้มีความบริสุทธิ์ ทำการชะ DNA ที่จับจำเพาะกับ silica membrane filter ออกโดยการใช้สารละลาย BE elution บัฟเฟอร์

3. ชุดสกัดมาตรฐานที่ 3 QIAamp® DNA Mini kit

การสกัด DNA ของแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยใช้ชุดสกัด QIAamp® DNA Mini kit (QIAgen, Germany) เป็นการสกัด DNA ให้บริสุทธิ์โดยวิธีการใช้ silica gel membrane ดักจับ DNA และลดการใช้แอลกอฮอล์ในขั้นตอนการตกตะกอน DNA และหลีกเลี่ยงการใช้สารที่เป็นอันตราย เช่น phenol และ chloroform ซึ่งมีขั้นตอนการสกัด DNA โดยย่อคือ นำเซลล์แบคทีเรียที่เตรียมไว้ในหลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย lysis บัฟเฟอร์ ที่มีส่วนผสมของสาร chaotropic ที่ทำหน้าที่ในการทำลายสารที่เป็น macromolecule เช่น โปรตีน ไขมัน เป็นต้น เมื่อเติม ethanol ลงไปทำให้ DNA นั้นจับกัน อย่างจำเพาะกับ

membrane ส่วนสารปนเปื้อนต่าง ๆ ก็จะถูกชะออกมาจากการล้าง membrane filter ด้วยสารละลาย Washing buffer 1 และ 2 ซึ่งบัฟเฟอร์ทั้งสองจะมีความเข้มข้นของเกลือที่แตกต่างกัน จากนั้น ก็ทำการชะ DNA ที่จับกับ membrane ด้วยสารละลาย AE บัฟเฟอร์

4. วิธีสกัด DNA ตามวิธี NTK

วิธีการสกัด DNA ของแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ ตามวิธี NTK เป็นการดัดแปลงวิธีสกัด DNA โดยใช้สารเคมีร่วมกับเอนไซม์ กล่าวคือ นำเซลล์แบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ที่เตรียมไว้ เติม 300 ไมโครลิตร lysis บัฟเฟอร์ (50 มิลลิโมล Tris-HCl, 3 มิลลิโมล EDTA; pH 8.0, lysozyme 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ใช้เครื่อง vortex กระจายเซลล์แบคทีเรีย ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติม 300 ไมโครลิตร NTK solution (ประกอบด้วย 4 โมล guanidinethiocyanate; pH 8.0, 25 มิลลิโมล sodiumcitrate, pH 7.0, 0.5% sarcosyl และ 100 มิลลิโมล mercaptoethanol) ผสมสารให้เข้ากันโดยการใช้ pipette ดูดขึ้นลง 10-15 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที เติม 100 ไมโครลิตร ของ 2 โมล sodium acetate; pH 5.2 ผสมให้เข้ากัน เติม 600 ไมโครลิตร ของ phenol-chloroform-isoamyl alcohol (อัตราส่วน 25 : 24 : 1 v/v) ผสมสารให้เข้ากันโดยการพลิกหลอด 10-15 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แยกสารละลายส่วนบนที่เป็นชั้นน้ำ (aqueous phase) ใส่ในหลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตรใหม่ ตกตะกอน DNA ที่ได้โดยการเติม 750 ไมโครลิตร ของ isopropanol ต่อ 1 มิลลิลิตร สารละลายที่ดูดออกมาได้ (ชั้นของ aqueous phase) ในอัตราส่วน 0.75 : 1 v/v) ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2-3 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ทิ้งน้ำใสและเก็บตะกอน ล้างตะกอน DNA ที่ได้ด้วย 70% ethanol จำนวน 2 ครั้ง ละลายตะกอน DNA ด้วยสารละลาย TE บัฟเฟอร์ (ประกอบด้วย 50 มิลลิโมล EDTA, 5 มิลลิโมล Tris-HCl, pH 8.5)

การวิเคราะห์หาปริมาณ DNA และตรวจสอบคุณภาพ DNA

ตรวจสอบปริมาณความเข้มข้น และคุณภาพของ DNA ของแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ ที่สกัดได้จากวิธีที่กล่าวไว้ข้างต้น จะนำมาเปรียบเทียบคุณภาพและหาปริมาณความเข้มข้น ของ DNA ที่สกัดได้ วัดค่าการดูดกลืนแสง โดยวิธี spectrophotometry (Wilfinger et al., 1997) ด้วยเครื่อง NanoDrop : Thermo Fisher Scientific nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA) โดยหยด DNA ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ตรงจุดหยดสารภายในเครื่อง อ่านค่าพร้อมบันทึกผลปริมาณ DNA ที่ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 230, 260 และ 280 นาโนเมตร ตามลำดับ ตรวจสอบคุณภาพความบริสุทธิ์ของ DNA และสิ่งปนเปื้อน โดยหาค่าอัตราส่วนระหว่างค่า A_{260}/A_{280} และค่าอัตราส่วนระหว่าง A_{260}/A_{230} โดยค่าที่คำนวณได้จะได้นำไปวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ต่อไป (Michael and Sambrook, 2012) ตรวจสอบความสมบูรณ์และคุณภาพของ DNA โดยวิธี เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) ใช้เจลอะกาโรส ที่มีความเข้มข้นของ 1.0% ภายใต้สนามไฟฟ้า 110 โวลต์ นาน 20 นาที นำไปส่องดูแถบแบนของ DNA บนแผ่นเจลอะกาโรส พร้อมวิเคราะห์ผลต่อไป

การเพิ่มปริมาณ DNA โดยการใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction; PCR

เป็นเทคนิคที่สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนของ DNA ที่มีปริมาณน้อย โดยใช้เทคนิค PCR (Adkins et al., 2002) ใช้ primer 16S rDNA ซึ่งมีความจำเพาะต่อการเพิ่มปริมาณของ DNA โดยมีลำดับเบสดังนี้ 16S rDNA/F : 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' และ 16S rDNA/R :5'-ACGGTTACCTTGTTATTACGACTT-3' (Bio Basic inc., Canada) ในปริมาตร 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย DNA ที่สกัดได้ 1 ไมโครลิตร และ 24 ไมโครลิตรของ 1x reaction mix (Vivantis Technology, Malaysia) ประกอบด้วย 0.2 มิลลิโมล ของ dNTPs, 2.0 มิลลิโมล ของ $MgCl_2$, 0.4 ยูนิต ของ *Taq* DNA polymerase, 0.8 ไมโครโมล ของ primer 16S rDNA/F และ primer 16S rDNA/R ผสมให้เข้ากันในหลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร แล้วนำไปใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณ DNA : T100™ Thermal Cycler (BIO-RAD, USA) โดยให้เครื่องทำการปรับอุณหภูมิอัตโนมัติ ดังนี้ ขั้นที่ 1 ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 5 นาที ขั้นที่ 2 PCR amplification 35 รอบ ประกอบด้วย อุณหภูมิ 95°C นาน 45 วินาที อุณหภูมิ 55°C นาน 45 วินาที และ อุณหภูมิ 72°C 60 วินาที และขั้นที่ 3 final extension ที่อุณหภูมิ 72°C นาน 5 นาที หลังจากนั้นก็นำ PCR product ไปแยกขนาดของ DNA โดยเทคนิค gel electrophoresis ใช้ความเข้มข้นของเจลอะกาโรสที่ 2% โดยใช้กระแสไฟฟ้า 110 โวลต์ นาน 20 นาที และนำไปส่องดูแถบแบนของ PCR product บนแผ่นเจลอะกาโรส ภาพที่ได้จะได้นำไปวิเคราะห์ความเข้มของแถบ DNA

การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลจะใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ กำหนดระดับความเชื่อมั่นในการทดสอบทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญเท่ากับ 0.05 ซึ่งแบ่งเป็นการวิเคราะห์ข้อมูลดังนี้ วิเคราะห์ข้อมูลทั่วไป รายงานผลเป็นค่าเฉลี่ยข้อมูลและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ทดสอบสถิติเพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของกลุ่มด้วย one way ANOVA

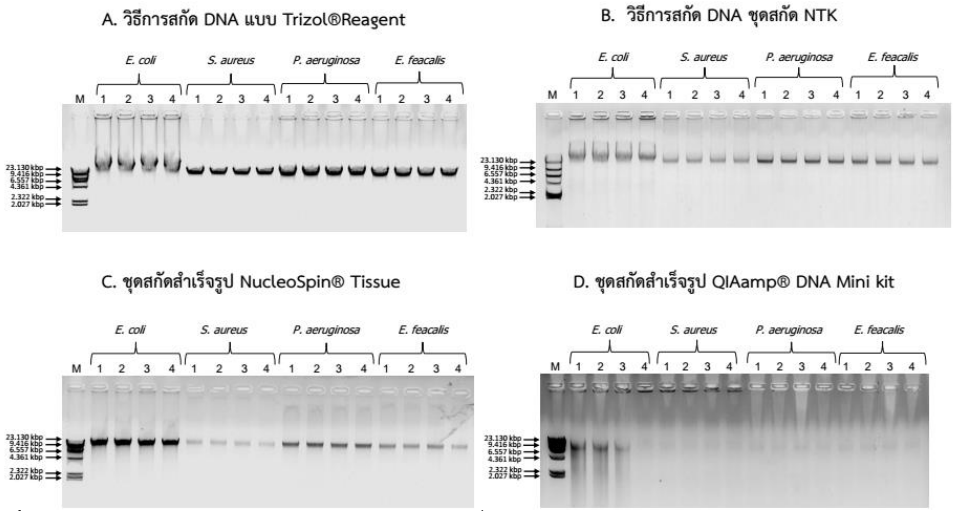
ผลการวิจัย

ผลการเปรียบเทียบ คุณภาพของ DNA ของแบคทีเรียที่สกัดได้

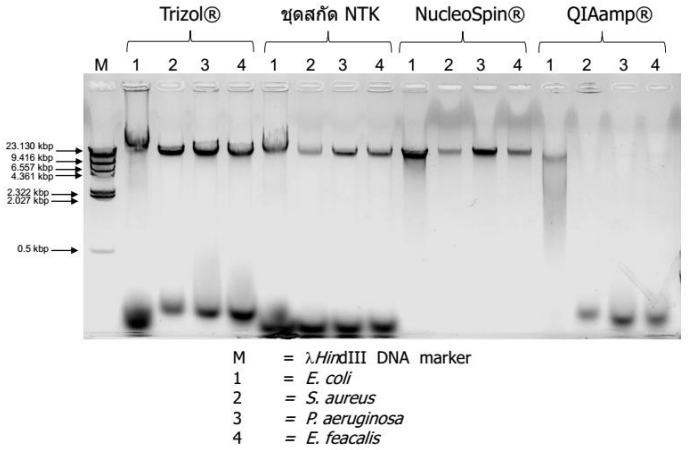
DNA ที่สกัดได้จากแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ นำมาเปรียบเทียบกับวิธีการสกัด DNA ทั้ง 4 วิธีโดยวิธี gel electrophoresis นั้น เมื่อนำมาตรวจสอบแถบ DNA บนเจลอะกาโรส ไม่พบลักษณะของการแตกหัก การถูกทำลายหรือถูกย่อยของสาย DNA จากลักษณะแถบความเข้มของ DNA ที่ปรากฏบนเจล ผลการทดสอบพบว่า DNA ที่สกัดได้โดยตามวิธี NTK จะมีความสมบูรณ์และหนาแน่นมากกว่าแถบ DNA ที่ได้จากการสกัดตามวิธีมาตรฐานทั้ง 3 วิธี คือ Trizol® reagent, NucleoSpin® tissue, และ QIAamp® DNA Mini kit (ภาพที่ 1) ในขั้นตอนของการสกัด DNA ทั้ง 4 วิธี จะใช้ lysis บัฟเฟอร์ ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้ทั้งแกรมลบและแกรมบวก ดังแสดงให้เห็นความเข้มของแถบ DNA ในภาพเจล (ภาพที่ 2)

ผลการเปรียบเทียบ ปริมาณความเข้มข้นของ DNA ที่สกัดได้

จากค่าการดูดกลืนแสง A_{260}ไปคำนวณหาปริมาณความเข้มข้นของ DNA พบว่า DNA ที่ได้จากการสกัด DNA ตามวิธี NTK มีค่าอยู่ในช่วง 37.32±0.92 - 70.73±5.75 ชุดสกัดTrizol® reagent มีค่าอยู่ในช่วง 14.30±0.91 - 73.46±6.63, ชุดสกัด NucleoSpin® tissue มีค่าอยู่ในช่วง 1.78±0.03 - 3.87±1.84 และ ชุดสกัด QIAamp® DNA Mini Kit มีค่าอยู่ในช่วง 3.13±1.03 - 40.83±6.35 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ และค่าอัตราส่วน A_{260}/A_{280} ของสารละลาย DNA ที่ได้จากวิธีการสกัด NTK มีค่าอยู่ในช่วง 1.65±0.03 - 1.86±0.02 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดสกัดที่เป็นมาตรฐานทั้ง 3 วิธี พบว่า ชุดสกัดTrizol® reagent มีค่าอยู่ในช่วง 1.67±0.08-1.88±0.01, NucleoSpin® tissue มีค่าอยู่ในช่วง1.39±0.04 - 1.85±0.03, และ QIAamp® DNA Mini kit มีค่าอยู่ในช่วง 1.57±0.02 - 2.09±0.01 ตามลำดับ บ่งชี้ว่า DNA ที่สกัดได้จากการสกัด DNA ตามวิธี NTK มีความบริสุทธิ์สูงเทียบเท่ากับวิธีมาตรฐานทั้ง 3 วิธี มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 (ตารางที่ 1 และ ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 ผลจากการตรวจสอบคุณภาพของ DNA ที่สกัดได้จากแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ โดยใช้เทคนิค gel electrophoresis โดยที่ A. ใช้ชุดสกัด Trizol® reagent B. การสกัด DNA ตามวิธี NTK C. ใช้ชุดสกัด NucleoSpin® tissue และ D. ใช้ชุดสกัด QIAamp® DNA Mini kit โดยที่ 1-4 เป็นจำนวนตัวอย่างของแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ เทียบกับ M ขนาดน้ำหนักของโมเลกุล DNA มาตรฐาน คือ DNA marker λ*Hind*III



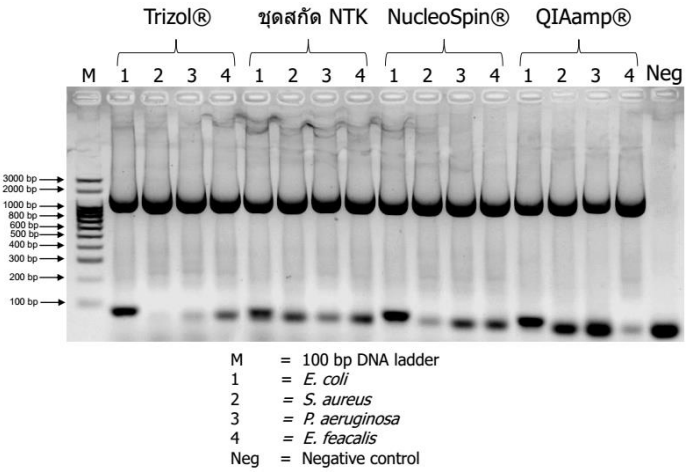
ภาพที่ 2 การเปรียบเทียบความเข้มของแถบ DNA ของแบคทีเรียทั้งแกรมลบและแกรมบวก จากวิธีการสกัดแบบชุดสกัดTrizol® reagent วิธีการสกัด DNA ตามวิธี NTK ชุดสกัด NucleoSpin® tissue และ ชุดสกัด QIAamp® DNA Mini kit ตามลำดับ

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบปริมาณ ความเข้มข้น ความบริสุทธิ์ และการปนเปื้อน ของ DNA ที่สกัดได้จากแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ ด้วยวิธีการสกัด DNA ที่แตกต่างกัน

ลำดับ	สายพันธุ์ (spp.)	ความเข้มข้น (นาโนกรัม/ไมโครลิตร) ต่อ 10^8 CFU	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	วิธีการสกัด
1	*E. coli*	70.54±1.21	1.88±0.01	1.00±0.44	Method Standard 1 วิธี GuSCN-Trizolหรือ Trizol®Reagent
2	*S. aureus*	14.30±0.91	1.67±0.08	0.34±0.05	
3	*P. aeruginosa*	52.77±0.48	1.84±0.06	0.67±0.12	
4	*E. feacalis*	73.46±6.63	1.82±0.07	0.68±0.01	
1	*E. coli*	3.87±1.84	1.84±0.02	1.96±0.02	Method standard 2 ชุดสกัด DNA สำเร็จรูป NucleoSpin®Tissue
2	*S. aureus*	1.78±0.03	1.39±0.04	0.70±0.01	
3	*P. aeruginosa*	2.78±0.34	1.85±0.03	3.37±0.07	
4	*E. feacalis*	2.78±0.07	1.73±0.12	0.77±0.36	
1	*E. coli*	3.13±1.03	1.57±0.02	0.56±0.06	Method Standard 3 ชุดสกัด DNA สำเร็จรูป QIAamp®DNA Mini kit
2	*S. aureus*	6.49±0.39	1.77±0.13	1.18±0.06	
3	*P. aeruginosa*	40.83±6.35	2.09±0.01	1.93±0.01	
4	*E. feacalis*	25.74±2.26	2.09±0.01	1.72±0.02	
1	*E. coli*	67.51±7.19	1.86±0.02	0.61±0.06	NTK Method
2	*S. aureus*	37.32±0.92	1.76±0.01	0.55±0.04	
3	*P. aeruginosa*	65.53±0.22	1.72±0.02	0.38±0.06	
4	*E. feacalis*	70.73±5.75	1.65±0.03	0.41±0.02	

ผลการเปรียบเทียบ yield และตรวจสอบการปนเปื้อนของ DNA โดยนำไปเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้เทคนิค PCR

จากการสกัด DNA ในแต่ละวิธีดังกล่าวมาแล้วนั้น เมื่อนำ DNA ไปแยกด้วยวิธี gel electrophoresis จะปรากฏแถบความเข้มของ DNA แตกต่างกัน ทำให้ปริมาณของ DNA จะแตกต่างกันไปด้วย แต่เมื่อนำ DNA ที่มีปริมาณน้อยไปเพิ่มปริมาณโดยใช้เทคนิค PCR ผลปรากฏว่า ไม่มี PCR product เกิดขึ้น บ่งบอกว่าสารละลาย DNA นั้นมีสารปนเปื้อน สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ได้ ดังนั้นการพิสูจน์ความสะอาดของ DNA จะใช้เทคนิค PCR โดยใช้ primer ที่มีความจำเพาะ ไปเพิ่มปริมาณ DNA ที่มีปริมาณน้อย ๆ ได้ จากการทดลองพบว่า DNA ที่ได้จาก การสกัด ตามวิธี NTK สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้เกิด yield ค่อนข้างสูง ดังปรากฏแถบ PCR product ขนาด 1.60 kbp บนเจล (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 การเปรียบเทียบ yield และตรวจสอบความปนเปื้อนของสารละลาย DNA ที่มีปริมาณน้อย จากวิธีวิธีการสกัดใช้เซลล์แบคทีเรียที่แตกต่างกัน ปรากฏแถบ PCR product มีขนาด 1.60 kbpจาก 2% gel electrophoresis

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาและวิเคราะห์วิธีการสกัด DNA ของแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ และนำ DNA มาเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานทั้ง 3 วิธี ผู้วิจัยได้แนวทางการสร้างวิธีการสกัด DNA แบบ NTK ขึ้นมา โดยใช้สารเคมีพื้นฐานร่วมกับการใช้เอนไซม์ที่มีใช้อยู่ทั่วไปในห้องปฏิบัติการพื้นฐานทางชีวเคมี โดยมีหลักการสกัด DNA อยู่ 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนที่ 1 เป็นขั้นตอนการทำให้เซลล์แตก ขั้นตอนที่ 2 เป็นขั้นตอนที่กำจัดสิ่งปนเปื้อนที่ไม่ต้องการออกไป ให้เหลือเฉพาะสารละลาย DNA ไว้ ขั้นตอนที่ 3 เป็นขั้นตอนที่ทำให้ได้ DNA ที่สะอาด บริสุทธิ์ และไม่มีสิ่งปนเปื้อน สารละลาย DNA ที่สกัดออกมาได้ จะถูกนำไปหาปริมาณความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ ตรวจสอบดูคุณภาพของ DNA ด้วยเทคนิค วัดค่าการดูดกลืนแสง และ ตรวจสอบคุณภาพของ DNA ด้วย gel electrophoresis จะเห็นว่า DNA ที่ได้จากการสกัดตามวิธี NTK มีความสมบูรณ์ของชิ้น DNA ไม่แตกหักของสาย DNA เมื่อดูผลจากความเข้มของแถบ DNA เมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง พบว่า DNA ที่สกัดได้มีปริมาณความเข้มข้นของ DNA อยู่ที่ 37.32±0.92 - 70.73±5.75 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และมีความบริสุทธิ์สูง โดยใช้อัตราส่วนของค่า A_{260}/A_{280} ได้ค่าอัตราส่วนอยู่ระหว่าง 1.65±0.03 - 1.86±0.02 ผลจากการตรวจสอบการปนเปื้อน โดยใช้เทคนิค PCR พบว่า DNA ที่จากการสกัดตามวิธี NTK ทำปฏิกิริยาได้ PCR product ได้มากเทียบเท่ากับชุดสกัดมาตรฐาน แสดงถึงความบริสุทธิ์และไม่มีสิ่งปนเปื้อนที่ปนมากับ DNA ที่สกัดได้

ดังนั้นจากผลการวิจัย พบว่า วิธีการสกัด DNA ตามแบบวิธี NTK มีประสิทธิภาพดีเทียบเท่ากับวิธีมาตรฐาน มีความสะดวก ง่ายต่อการนำไปใช้ในการเรียนการสอนและใช้กับงานวิจัยได้ เป็นทางเลือกให้ อาจารย์ ผู้สอน นิสิต นักศึกษา รวมไปถึงนักวิจัย ประหยัดค่าใช้จ่ายการนำเข้าชุดสกัดจากต่างประเทศได้

อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากผลการเปรียบเทียบคุณภาพ ปริมาณ และความบริสุทธิ์ ของสารละลาย DNA ของแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ ที่สกัดได้ โดยวิธี gel electrophoresis ผลการทดลองแสดงแถบ DNA เป็นสายยาว ไม่พบลักษณะของการถูกย่อย หรือการแตกหักเสียหาย แถบของ DNA ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีที่ใช้ phenol-chloroform (Trizol® reagent และ การสกัดวิธี NTK) จะมีความหนามากกว่าแถบ DNA ที่สกัดได้จากการสกัดโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป ซึ่งใช้ซิลิกาเมมเบรน ในการจับ DNA ที่มีพื้นที่น้อย (ภาพที่ 2) ได้ผลสอดคล้องกับผลที่ได้จากการวัดปริมาณความเข้มข้นโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยวิธี spectrophotometry (Zhou et al., 1996) ดังแสดงค่าไว้ในตารางที่ 1 เมื่อพิจารณาจากค่าอัตราส่วน A_{260}/A_{280} ค่านี้จะใช้เป็นตัวบ่งชี้ที่ดีจากการปนเปื้อนของโปรตีน เมื่ออัตราส่วนใกล้เคียง 1.8 แสดงว่าเป็น DNA ที่มีความบริสุทธิ์สูง แต่ถ้าค่าอัตราส่วน

A_{260}/A_{280} มีมากกว่า 2.0 แสดงว่ามี RNA ปนเปื้อน ในทางกลับกันถ้าค่าอัตราส่วน A_{260}/A_{280} มีน้อยกว่า 1.6 แสดงว่ามีโปรตีนปนเปื้อนปะปนอยู่กับสารละลาย DNA จากค่าอัตราส่วน A_{260}/A_{230} เมื่อน้อยกว่า 1.8 แสดงถึงการปนเปื้อนที่อาจเกิดจากสารประกอบอินทรีย์หรือสาร chaotropic ซึ่งดูดซับที่ 230 นาโนเมตร ค่าที่คาดไว้ A_{260}/A_{230} โดยทั่วไปอยู่ในช่วง 2.0 - 2.2 หากอัตราส่วนนั้นต่ำกว่า 1.5 คาดว่ามีสารปนเปื้อนสามารถดูดกลืนแสงที่ 230 นาโนเมตร ส่วนใหญ่จะเป็นสารจำพวก EDTA คาร์โบไฮเดรต และ phenol เป็นต้น (Michael and Sambrook, 2012; Dahm, 2008)

การสร้างชุดสกัด DNA แบบ NTK นั้นจะใช้สารเคมีร่วมกับเอนไซม์ จำเป็นต้องทราบคุณสมบัติและหน้าที่ของสารเคมีที่นำไปใช้ในการสกัด เพื่อให้มีประสิทธิภาพ ได้ปริมาณ DNA มากและคุณภาพสูง ง่ายและสะดวกต่อการนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด เช่น สาร Tris-HCl ทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ทำให้ pH คงที่ สาร EDTA ทำหน้าที่เป็นตัวจับโลหะประจุ 2+ เช่น Ca^{2+} Mg^{2+} เป็นต้น เอนไซม์ lysozyme ทำหน้าที่ทำให้ย่อยผนังเซลล์ของแบคทีเรียให้เสียสภาพ สาร gaunidium thiocyanate ทำหน้าที่ เป็น chaotropic ทำให้สารที่เป็น macromolecules เสียสภาพ เช่นโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรท เป็นต้น SDS และ sarcosyl ทำหน้าที่เป็นสารลดแรงตึงผิว ทำให้เซลล์เมมเบรนแตกตัว สาร mercaptoethanol และ เอนไซม์ proteinase K ทำหน้าที่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ สาร phenol ทำหน้าที่ ให้โปรตีนหรือไขมันจับส่วนที่เป็นขั้วของโมเลกุล phenol และให้ DNA ละลายอยู่ในสารละลาย chloroform ทำหน้าที่ดึงส่วนที่ไม่มีขั้วของโมเลกุล phenol สาร ethanol และ สาร isopropanol ทำหน้าที่ดึงน้ำจากโมเลกุล DNA ทั้งนี้ สารเคมีส่วนใหญ่ก็มีส่วนเสีย คือเป็นสารที่ค่อนข้างจะเป็นพิษ และระคายเคืองต่อระบบทางเดินหายใจ เพื่อความปลอดภัยจึงต้องใช้อย่างระมัดระวัง

ตารางที่ 2 สรุปเปรียบเทียบข้อดี และ ข้อเสีย ของการสกัด DNA ทั้ง 4 วิธี

วิธีการสกัด	ข้อดี	ข้อเสีย	ชุดสกัดมาตรฐาน
1. Trizol®reagent	DNA มีความบริสุทธิ์สูง มีปริมาณความเข้มข้น DNA สูง	ราคาแพง ไม่ได้ความรู้ สารเคมีที่ใช้อันตราย และเป็นพิษ	ใช้เป็นมาตรฐาน 1
2. ชุดสกัดสำเร็จรูป NucleoSpin®tissue	DNA มีความบริสุทธิ์สูง สารเคมีไม่อันตราย สะดวก รวดเร็ว วิธีการใช้งานง่าย	ราคาแพง ไม่ได้ความรู้ DNA มีความเข้มข้นน้อย มีจำนวนจำกัด	ใช้เป็นมาตรฐาน 2
3. ชุดสกัดสำเร็จรูป QIAamp®DNA Mini kit	DNA มีความบริสุทธิ์สูง สารเคมีไม่อันตราย สะดวก รวดเร็ว วิธีการใช้งานง่าย	ราคาแพง ไม่ได้ความรู้ DNA มีความเข้มข้นน้อย มีจำนวนจำกัด	ใช้เป็นมาตรฐาน 3
4. ชุดสกัด NTK ใช้สารเคมี (Guanidine thiocyanate phenol/chloroform extraction)	DNA มีคุณภาพและความบริสุทธิ์สูง มีปริมาณความเข้มข้น DNA สูง ราคาถูก ประหยัดเวลา ได้ความรู้ในการนำไปใช้	สารเคมีที่ใช้อันตราย และเป็นพิษ	(สร้างชุดสกัด)

จากการศึกษาการสกัด DNA โดยวิธี NTK เป็นการสกัด DNA โดยใช้วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมี ที่ไม่มีราคาแพง และใช้เวลาในการทำไม่เกิน 2 ชั่วโมง ในการสกัด DNA จะเห็นถึงการประหยัดเวลา แต่มีข้อเสีย ที่ได้สรุปไว้ในตารางที่ 2 คือ ตามแบบวิธีของ NTK จะใช้การสกัดแบบสารเคมี คือ Guanidine thiocyanate ร่วมกับ phenol–chloroform-isoamyl alcohol ซึ่งสารเคมีที่ใช้ เป็นสารกัดกร่อน ถ้าสัมผัสกับผิวหนังจะทำให้เกิดอันตราย จะเกิดรอยไหม้ และหากสัมผัสกับกรดจะให้ก๊าซที่เป็นพิษสูง ระคายเคืองต่อระบบทางเดินหายใจ แต่เราสามารถที่จะป้องกันได้โดยการสวมถุงมือ (Glove) สวมเสื้อกาวน์ (Gown) สวมแว่นตา (Goggle) และใช้หน้ากากปิดจมูกและปาก (Mask) เพื่อป้องกันการสัมผัสโดยตรง จากสารเคมีเหล่านี้

นอกจากนี้ เพื่อเป็นการรักษาสิ่งแวดล้อม ผู้วิจัยจึงตระหนักถึงความอันตรายจากสารเคมี ที่ใช้ในการสกัด DNA ตามวิธี NTK โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สาร phenol ซึ่งการใช้ phenol ในห้องปฏิบัติการในการสกัด DNA จะใช้ phenol ที่บริสุทธิ์ในรูปของของเหลว เมื่อใช้แล้วจะให้ phenol ที่ปนเปื้อนด้วยโปรตีน และสารอินทรีย์อื่น เช่นไขมัน และเศษเซลล์ เป็นต้น รวมเรียกว่า phenol waste ซึ่งมีวิธีการกำจัด phenol waste ในปริมาณขนาด laboratory scale โดยการใช้ Fenton oxidation ตามวิธีการของ Osaki

(Osaki et al., 1990) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้คือ เจือจาง phenol waste ให้มีความเข้มข้นประมาณ 2% ต้มที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส โดยมี ferrous ion 10 มิลลิกรัม/ลิตร และ 6%H_2O_2 ต้องแบ่งเติม 3 ช่วง คือ 20% 30% และ 50% ของปริมาตรทั้งหมด มิฉะนั้นปฏิกิริยา oxidation อาจเกิดรุนแรง จนเป็นอันตรายได้ ต้มจนกระทั่งสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีม่วงแดงเป็นสีเหลือง ทำให้สารละลายมี pH เป็นกลาง ด้วย sodium hydroxide ต้มอีกประมาณ 1 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็น แล้วจึงเททิ้งในท่อระบายน้ำได้

เอกสารอ้างอิง

Adkins, K.K., Strom, D.A., Jacobson, T.E., Seemann, C.R., O'Brien, D.P. and E.M. Heath. 2002. Utilizing genomic DNA purified from clotted blood samples for single nucleotide polymorphism genotyping. Arch Pathol Lab Med. 126: 266-270.

Birnboim, H.C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic AcidsRes. 7: 1513-1523.

Boyle, J.S. and A.M. Lew. 1995. An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. Trends Genet. 11: 8.

Carter, M.J. and I.D. Milton. 1993. An inexpensive and simple method for DNA purifications on silica particles. Nucleic Acids Res. 21: 1044.

Chomczynski, P. and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem. 162: 156-159.

Dahm, R. 2008. Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. Hum Genet. 122: 565-581.

Lakshmi, R., Baskar, V. and U. Ranga. 1999. Extraction of superior-quality plasmid DNA by a combination of modified alkaline lysis and silica matrix. Anal Biochem. 272: 109-112.

Michael, R.G. and J. Sambrook. 2012. Molecular cloning: A laboratory Manual. 4th Edition., Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor., New York.

Osaki, S., Sugihira,S., Kaji, T. and Y. Takashima. 1990. Treatment of radioactive waste phenol with Ffenton's oxidation. Radioisotopes. 39: 174-177.

Pitcher, D.G., Saunders, N.A. and R.J. Owen. 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. Letters in Applied Microbiology. 8: 151-156.

Tan, S.C. and B.C. Yiap. 2009. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. Biomed Biotechnol journal. Article ID 574398. doi: 10.1155/2009/574398. Erratum in: J Biomed Biotechnol. 2013;2013:628968. PMID: 20011662; PMCID: PMC2789530.

Terry, C.F., Harris, N. and H.C. Parkes. 2002. Detection of genetically modified crops and their derivatives: critical steps in sample preparation and extraction. J AOAC Int. 85: 768-774.

Wilfinger, W.W., Mackey, K. and P. Chomczynski. 1997. Effect of pH and ionic strength on thespectrophotometric assessment of nucleic acid purity. Biotechniques. 22: 474-481.

Wilson, K. 2001. Preparation of genomic DNA from bacteria. Curr Protoc Mol Biol. 56: Chapter 2: Unit 2.4.1-2.4.5.

Zhou, J., Bruns, M.A. and J.M. Tiedje. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. Appl Environ Microbiol. 62: 316-322.