รหัสโครงการ SUT1-104-52-12-10

รายงานการวิจัย

การสกัดพลาสมิดโดยซิลิกาเมมเบรนคอลัมน์ที่นำกลับมาใช้ใหม่

(Plasmid Purification by Regenerated Silica Membrane Column)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT1-104-52-12-10

รายงานการวิจัย

การสกัดพลาสมิดโดยซิลิกาเมมเบรนคอลัมน์ที่นำกลับมาใช้ใหม่

(Plasmid Purification by Regenerated Silica Membrane Column)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผศ. ภกญ. ดร. นวลน้อย จูฑะพงษ์

สาขาวิชาเภสัชวิทยา

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2552

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

พฤษภาคม 2556

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ นางสาวปะการัง คำไกร ในฐานะผู้ช่วยวิจัยที่ช่วยเหลือทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ และขอขอบคุณ ดร. นวรัตน์ นันทพงษ์ สำหรับข้อแนะนำในการดำเนินการวิจัย ผู้วิจัยรู้สึกขอบคุณเป็นอย่างสูงต่อ ดร. พงษ์ฤทธิ์ ครบปรัชญา และ นางสาวรัตติกาล ทองสัมฤทธิ์ ในการเตรียม Transformed bacteria สายพันธุ์ *Escherichia coli* TOP10 ที่มี pGAPZαA vector และยีน α–amylase เพื่อใช้ในการทดลอง สุดท้ายผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติและมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีสำหรับการให้ทุนสนับสนุนการวิจัยนี้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อภาษาไทย

ในปัจจุบัน คอลัมน์ที่ประกอบด้วยแผ่นซิลิกาเป็นที่นิยมใช้ในการสกัดกรดนิวคลิอิก เนื่องจากได้ปริมาณและความบริสุทธิ์สูง แต่ข้อเสียคือชุดซิลิกาเมมเบรนคอลัมน์ดังกล่าวพร้อมน้ำยาสกัดต้องนำเข้าจากต่างประเทศทำให้มีราคาค่อนข้างแพง งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาหลักฐานสนับสนุนให้มีการนำคอลัมน์ซึ่งได้ผ่านการใช้งานแล้วกลับมาใช้ใหม่ และเพื่อให้การนำไปใช้งานใหม่เกิดขึ้นได้จริง ผู้วิจัยได้คิดค้นส่วนผสมน้ำยาที่จำเป็นในการสกัดพลาสมิดจากแบคทีเรีย เพื่อให้ผู้ใช้สามารถเตรียมได้เองหลังน้ำยาที่บริษัทให้มาพร้อมกับคอลัมน์หมดลง ผลการทดลองพบว่าหลังการแช่คอลัมน์ที่ใช้แล้วด้วย 1 N HCl นาน 4 ชั่วโมง แล้วปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที ล้างตามด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง สามารถนำคอลัมน์กลับมาใช้ใหม่ได้โดยไม่มี DNA จากการสกัดครั้งก่อนตกค้างอยู่ และไม่ทำให้ประสิทธิภาพของคอลัมน์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับสารละลายที่จำเป็นต้องใช้ประกอบด้วย สารละลาย 5 ชนิด ได้แก่ (1) Resuspension buffer (2) Lysis buffer (3) Neutralization buffer (4) Washing buffer และ (5) Elution buffer ตามลำดับ จากสารละลายทั้งหมด 5 ชนิด ดังกล่าว ส่วนผสมของน้ำยาชนิดที่ 3 มักจะเป็นสูตรเฉพาะของบริษัทผู้ผลิตและถูกเก็บเป็นความลับไม่เปิดเผยทั้งส่วนประกอบและวิธีเตรียม จากผลการวิจัยนี้พบว่า สามารถใช้สารละลาย 1 M potassium acetate ผสมกับ 5.5 M guanidine HCl (pH 6.0) เป็น neutralization buffer ทำหน้าที่ในการ ตกตะกอนโปรตีน ทำให้พลาสมิดเกิดการ renature และแยกตัวออกจากน้ำเข้าจับกับหมู่ anionic บนซิลิกาได้ดีขึ้น ผลการวิจัยนี้ได้แสดงหลักฐานเป็นที่ประจักษ์ว่าสามารถนำคอลัมน์ที่ผ่านการใช้งานแล้วกลับมาใช้ใหม่ได้จริงในทางปฏิบัติ อันจะทำให้เกิดทางเลือกอื่น สามารถประหยัดงบประมาณ อีกทั้งยังเป็นการรักษาสภาพแวดล้อมด้วยการลดขยะจากการทิ้งคอลัมน์อีกด้วย

คำสำคัญ: พลาสมิด, การสกัด, คอลัมน์ที่นำกลับมาใช้ใหม่

Abstract

Nowadays, silica membrane column is very popular for extraction of nucleic acid because of purity and high yield. However, disadvantage of the commercial extraction kits is that they are quite expensive because all of them are imported. The aim of this study was to establish a line of evidence to support the practical use of regenerated columns from the commercial kit. All the buffers needed were prepared and tested. The results showed that after soaked in 1 N HCl for 4 hours and centrifuged at 12,000 rpm followed by rinsing with distilled water for three times, the columns were reusable. There were no DNA from the previous extract contaminated and efficiency of the columns was not significantly decreased. There are 5 solutions that are needed in this method including (1) Resuspension buffer, (2) Lysis buffer, (3) Neutralization buffer, (4) Washing buffer, and (5) Elution buffer, sequentially. Usually, the formula of the third solution is a proprietary of the company and kept it confidential. The results from this research showed that 1 M potassium acetate solution plus 5.5 M guanidine HCl could be used as a neutralization buffer. Its functions were to precipitate protein, renature plasmids, and dissociate the plasmids from water and then bind to anionic group on silica. The data provide evidence to support that regenerated nucleic acid extraction column can be used efficiently. This will give users an alternative choice which will benefit them financially. Moreover utilization of regenerated columns means that these will be less discarded columns to contaminate the environment.

Keywords: Plasmid, Extraction, Regenerated column

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญภาพ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	2
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	3
บทที่ 3 ผลการวิจัย	6
บทที่ 4 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	10
เอกสารอ้างอิง	16
ภาคผนวก	
ผลงานวิจัยจากโครงการที่ได้นำไปเผยแพร่ในการประชุมวิชาการนานาชาติ	17

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

รูปที่ 3.1 การตรวจสอบการปนเปื้อนในการสกัด plasmid DNA ด้วย regenerated silica column 7

รูปที่ 3.2 Chromatogram ที่ได้จากการวิเคราะห์การจัดเรียงลำดับ nucleotide ของ A1 domain gene ใน pQE60 vector ที่สกัดได้จากน้ำยาสกัดที่ผลิตขึ้น (HM) 11

รูปที่ 3.3 ลำดับ nucleotide ของ VWF A1 gene ที่แทรกอยู่ใน pQE-60 vector..... 12

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

ตารางที่ 3.1 การเปรียบเทียบ yield และความบริสุทธิ์ของ plasmid ที่ได้จากการใช้ column ใหม่และ reused column จากน้ำยาของบริษัทเดียวกัน 7
ตารางที่ 3.2 การเปรียบเทียบ yield ที่ได้จากการใช้ column ใหม่กับน้ำยาสกัด HM และน้ำยาของบริษัทต่าง ๆ 8
ตารางที่ 3.3 การเปรียบเทียบ yield ที่ได้ระหว่างจากการใช้ column ใหม่ กับน้ำยาของบริษัทและ น้ำยาสกัด HM กับ regenerated column 9

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ปัจจุบันการสกัด nucleic acid มีความสำคัญและจำเป็นอย่างมากในห้องปฏิบัติการทางชีวโมเลกุล ในการสกัด nucleic acid มีหลักการซึ่งอาจแบ่งได้เป็น 3 แบบ ได้แก่ 1) classic extraction method 2) unmodified silica resin–dependent protocol และ 3) commercial column–base strategy วิธีที่ใช้แบบดั้งเดิม หรือ classic alkaline lysis [1] โดยการสกัดด้วย phenol และ chloroform หรือ alcohol precipitation นั้นเป็นที่นิยมเนื่องจากราคาไม่แพงและไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือชั้นสูงที่ซับซ้อน อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อจำกัดในด้านคุณภาพและความบริสุทธิ์ของ nucleic acid ที่สกัดได้ รวมทั้งต้องใช้เวลานานกว่าวิธีอื่น ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อต้องสกัดตัวอย่างจำนวนมาก อีกทั้งไม่นิยมใช้กับตัวอย่างทางคลินิกเนื่องจากมีความเสี่ยงที่ตัวอย่างจะมีการปนเปื้อนค่อนข้างสูง ด้วยข้อจำกัดเหล่านี้จึงได้มีการพัฒนาการสกัด nucleic acid โดยการใช้ silica resin [2, 3] เพื่อปรับปรุงคุณภาพในการสกัดให้ดีขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการสกัดโดยใช้ native silica resin ก็ยังไม่เพียงพอต่องานที่ต้องการความบริสุทธิ์สูงเช่น in vitro transcription/translation, microinjection หรือ immunization [4] ดังนั้นจึงมีบริษัทผู้ผลิตในต่างประเทศจำนวนมากคิดค้น commercial nucleic acid extraction column ซึ่งประกอบด้วย silica membrace ซึ่ง modified ให้มี strong anionic group ติดอยู่ เช่น diethylaminoethyl moiety อันจะทำให้ resin สามารถเข้าจับกับ nucleic acid ได้อย่างเฉพาะเจาะจงในสภาวะที่มีความเป็นเบสและความเข้มข้นของเกลือสูง ๆ nucleic acid ที่สกัดได้จากวิธีที่ 3 จะมีปริมาณ DNA และความบริสุทธิ์สูง อย่างไรก็ตามการสกัด nucleic acid ด้วยวิธีนี้ มีราคาแพงและคอลัมน์ที่ใช้มักจะเป็นการใช้เพียงครั้งเดียวแล้วทิ้ง แนวความคิดที่ต้องการนำคอลัมน์ที่ใช้แล้วกลับมาใช้อีกจึงเป็นที่สนใจของนักวิจัยในประเทศที่ยังไม่มีศักยภาพในการผลิต silica column ได้เอง เมื่อไม่นานมานี้ Siddappa และคณะ [5] พบว่า commercial nucleic acid extraction column ที่ใช้แล้วสามารถนำมาล้างด้วย 1 N HCl นาน 24 ชั่วโมงสามารถกลับมาใช้ใหม่ได้โดยจะทำให้ DNA ถูกขจัดออกไปจาก membrane หมดและไม่สูญเสียคุณสมบัติในการแยกสกัดครั้งต่อ ๆ ไป ซึ่งผู้วิจัยกลุ่มนี้ยังพบว่าสามารถนำคอลัมน์กลับมาใช้ใหม่ได้ถึง 20 ครั้ง

อย่างไรก็ตาม แม้ว่าจะสามารถนำคอลัมน์กลับมาใช้ใหม่ได้ก็ยังติดปัญหาน้ำยาที่บริษัทให้มาควบคู่กันจะมีปริมาณที่พอดีกับจำนวนคอลัมน์เท่านั้น และส่วนประกอบต่าง ๆ ของน้ำยานั้นเป็นความลับที่แต่ละบริษัทไม่เปิดเผย ปัจจุบันยังไม่มีผู้ใดผลิตอุปกรณ์ชุดสกัด nucleic acid เพื่อใช้กับซิลิกาเมมเบรนคอลัมน์ออกจำหน่ายในประเทศไทย จำเป็นต้องนำเข้าจากต่างประเทศ อีกทั้งผู้ผลิตไม่นิยมแยกส่วนขายแต่เพียงน้ำยาเท่านั้น เพราะอาจจะต้องขายในราคาต่ำทำให้ไม่คุ้มกับค่าใช้จ่ายในการผลิต เนื่องจากการผลิตคอลัมน์มีต้นทุนสูงที่สุดในบรรดาส่วนประกอบทั้งหมด ผู้ใช้โดยเฉพาะอย่างยิ่งนักวิจัยไทยไม่มีทางเลือกอื่น จำเป็นต้องใช้ชุดเครื่องมือดังกล่าวที่นำเข้าจากต่างประเทศทั้งสิ้น ไม่ว่าจะเป็นในการแยกสกัด genomic DNA, plasmid DNA หรือ PCR product งานวิจัยชิ้นนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตน้ำยาในการสกัด plasmid จากแบคทีเรียเพื่อใช้กับซิลิกาเมมเบรนคอลัมน์ที่ผ่านการล้างด้วยวิธีที่เหมาะสม อันจะทำให้ผู้ใช้มีทางเลือกอื่น สามารถประหยัดงบประมาณทำให้เกิดความคุ้มค่าในการใช้คอลัมน์ อีกทั้งยังเป็นการรักษาสภาพแวดล้อม ลดขยะจากการทิ้งคอลัมน์ลงอีกด้วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการนำซิลิกาเมมเบรนคอลัมน์กลับมาใช้ใหม่ และผลิตน้ำยาสกัด plasmid DNA จากแบคทีเรียสำหรับใช้กับ regenerated column

ขอบเขตของการวิจัย

ในการวิจัยนี้ได้ทำการทดลองผลิตน้ำยาในการสกัด plasmid DNA ก่อนเพื่อนำร่องในการขยายผลไปผลิตน้ำยาสกัด DNA แบบอื่น ๆ ต่อไปในอนาคต เนื่องจาก plasmid จะมีคุณสมบัติในการรับ insert gene ทำให้การตรวจสอบการปนเปื้อนด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) ทำได้ง่าย

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

นักวิจัยจะมีทางเลือกอื่นในการทำวิจัยด้านชีววิทยาระดับโมเลกุล สนับสนุนให้เกิดการพึ่งพาตนเอง ลดการนำเข้าวัสดุจากต่างประเทศ ลดต้นทุนในการทำวิจัย และอาจนำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์ภายในประเทศ

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

การทดลองและสารเคมี

1. การเตรียม Transformed bacteria

Transformed bacteria ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นแบคทีเรียที่ประกอบด้วย vector ที่ต่างกัน 2 ชนิด คือ

1.1. pGAPZαA (Invitrogen) ขนาด 3.1 Kb ประกอบด้วย plasmid ที่มีและไม่มียีน α–amylase (AML) ขนาด 1542 base pair แทรกอยู่ ทำการ transform เข้าสู่ competent bacteria สายพันธุ์ *Escherichia coli* TOP10

1.2. pQE-60 (Qiagen) ขนาด 3.4 Kb ประกอบด้วย plasmid ที่มีและไม่มียีน von Willibrand Factor A1 domain (VWF A1) ขนาด 768 base pair แทรกอยู่ ทำการ transform เข้าสู่ competent bacteria สายพันธุ์ JM109

หลังจากบ่มเชื้อแบคทีเรียข้ามคืนแล้วทำการเก็บเซลล์โดยการปั่นให้ตกตะกอน จากนั้น resuspend ด้วยสารละลาย buffer (50 mM Tris•Cl, pH 8.0; 10 mM EDTA) แล้วทำการ aliquot ให้แต่ละหลอดมีจำนวนเซลล์ประมาณเท่า ๆ กัน จากนั้นปั่นให้ตกตะกอน ดูด supernatant ออก เก็บเซลล์ไว้ที่ -20° C จนกระทั่งนำไปใช้

2. การล้างคอลัมน์ที่ผ่านการใช้งานแล้ว

สกัด plasmid จากแบคทีเรียในข้อ 1 ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิต ได้แก่ บริษัท Qiagen (Q), GE Healthcare (G) และ Fermentus (F) จากนั้นทำการล้างคอลัมน์ที่ผ่านการสกัด plasmid มาแล้ว โดยการแช่ใน 1 N HCl นาน 4 ชั่วโมง [เนื่องจากได้ทำ preliminary experiment พบว่าหลังการแช่ 1 ชั่วโมง ยังมีการปนเปื้อน DNA จากการสกัดครั้งก่อนอยู่ แต่การแช่นาน 4 ชั่วโมงไม่พบการปนเปื้อน เช่นเดียวกับการแช่นาน 24 ชั่วโมงตามการศึกษาวิจัยที่เคยรายงานมาแล้ว (Siddappa และคณะ, 2007)] จากนั้นนำไป centrifuge ด้วยความเร็ว 12,000 rpm (~15,000 x g) นาน 1 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นจำนวนมาก (ประมาณ 15 ml) แล้ว centrifuge ด้วยความเร็ว 12,000 rpm นาน 1 นาที อีก 3 ครั้ง

3. การทดสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่ใช้แล้วหลังจากการล้าง

นำคอลัมน์ที่ผ่านการล้างตามข้อ 2 ตรวจสอบประสิทธิภาพและการปนเปื้อน โดยแบคทีเรียที่ใช้ในการสกัดครั้งแรกเป็น Transformed bacteria (*E. coli* TOP10) ที่มี insert gene และแบคทีเรียที่ใช้ในการสกัดในครั้งถัดมาหลังการล้างเป็น Transformed bacteria ที่ไม่มี insert gene จากนั้นทำการตรวจปริมาณและคุณสมบัติของ plasmid ที่สกัดได้จากคอลัมน์ที่ผ่านใช้งานและล้างแล้ว ดังต่อไปนี้

3.1 ตรวจสอบปริมาณ plasmid DNA ที่สกัดได้โดยวัดค่า UV absorbance ที่ความคลื่น 260 nm พร้อมกับตรวจสอบการปนเปื้อน RNA โดยใช้อัตราส่วนระหว่างค่า UV absorbance ที่ 260/280 nm

3.2 ตรวจสอบการปนเปื้อนโดย gel electrophoresis และ PCR

4. การเตรียมส่วนประกอบของ buffer ต่าง ๆ ในการสกัด plasmid (Homemade: HM)

4.1. Resuspension buffer

50 mM Tris•Cl, pH 8.0

10 mM EDTA

100 µg/ml RNase A

4.2. Lysis buffer

200 mM NaOH

1% SDS (w/v)

4.3. Neutralization buffer

5.5 M Guanidine HCl

1 M Potassium acetate

Acetic acid ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.0

4.4. Washing buffer

75% EtOH

25 mM NaCl

5 mM Tris–HCl

4.5. Elution buffer

Distilled water

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

5. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำยาสกัด HM

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างน้ำยาสกัด HM กับน้ำยาของบริษัทผู้ผลิต แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน ดังต่อไปนี้

5.1. เปรียบเทียบ yield ระหว่างการสกัดด้วยน้ำยา HM และ น้ำยาของบริษัทด้วยการใช้คอลัมน์ใหม่ทั้งคู่ โดยการวัด UV absorbance ที่ความคลื่น 260 nm พร้อมกับตรวจสอบการปนเปื้อน RNA โดยใช้อัตราส่วนระหว่างค่า UV absorbance ที่ 260/280 nm

5.2. เปรียบเทียบ yield ระหว่างการสกัดด้วยน้ำยา HM โดยใช้คอลัมน์ที่ผ่านการใช้และล้างมาแล้วเปรียบเทียบกับการสกัดด้วยน้ำยาของบริษัทโดยใช้คอลัมน์ใหม่

6. การยืนยันคุณภาพของ product ที่ได้ด้วยการส่งทำการวิเคราะห์หาลำดับเบส

นำคอลัมน์ที่ผ่านการล้างตามข้อ 2 ร่วมกับน้ำยา HM โดยใช้แบคทีเรียที่ Transformed bacteria (JM109) ที่มี insert gene เป็น VWF A1 แล้วส่ง plasmid ที่สกัดได้ไปวิเคราะห์หาลำดับเบสเพื่อยืนยันคุณภาพของ plasmid ที่สกัดได้ว่ามีความบริสุทธิ์ไม่มีการปนเปื้อนจนไม่สามารถทำการวิเคราะห์หาลำดับเบสได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3

ผลการวิจัย

1. ประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่ใช้แล้วหลังจากการล้าง

1.1 ผลการตรวจสอบการปนเปื้อน DNA จากการสกัดครั้งที่ 1 โดยใช้ gel electrophoresis

รูปที่ 3.1 (A) แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของ regenerated column ว่าหลังจากการล้างด้วย ใน 1 N HCl นาน 4 ชั่วโมง สามารถนำมาใช้อีกได้โดยปราศจากการปนเปื้อนจากการสกัดครั้งก่อน โดยพบว่า plasmid ที่สกัดจาก column ที่เคยใช้มาแล้ว ปรากฏเป็น band เดี่ยวเพียง band เดียวซึ่งมีขนาดเล็กกว่า plasmid ที่สกัดได้จากครั้งก่อน

1.2 ผลการตรวจสอบการปนเปื้อน DNA จากการสกัดครั้งที่ 1 โดยวิธี PCR

เมื่อทำการตรวจสอบการปนเปื้อน plasmid ที่สกัดด้วย regenerated column โดยการทำ PCR ซึ่งเป็นวิธีที่ไวกว่าการใช้ gel electrophoresis พบว่าไม่มีการปนเปื้อนจากการสกัดครั้งก่อน

จากรูปที่ 3.1 (B) จะเห็นว่าเมื่อนำ column ใหม่ของแต่ละบริษัทมาสกัด plasmid ที่มี insert gene แทรกอยู่ สามารถนำมาเพิ่มจำนวน gene ที่แทรกอยู่ได้ แต่เมื่อใช้ column ที่ผ่านการล้างมาสกัด plasmid ที่ไม่มี insert gene แทรกอยู่ พบว่าไม่สามารถทำการเพิ่มจำนวน gene ด้วยการทำ PCR แสดงว่าหลังจากทำการล้าง column ไม่มี plasmid เดิมตกค้างอยู่

1.3 การเปรียบเทียบ yield ที่ได้ระหว่างการใช้คอลัมน์ใหม่และ regenerated column

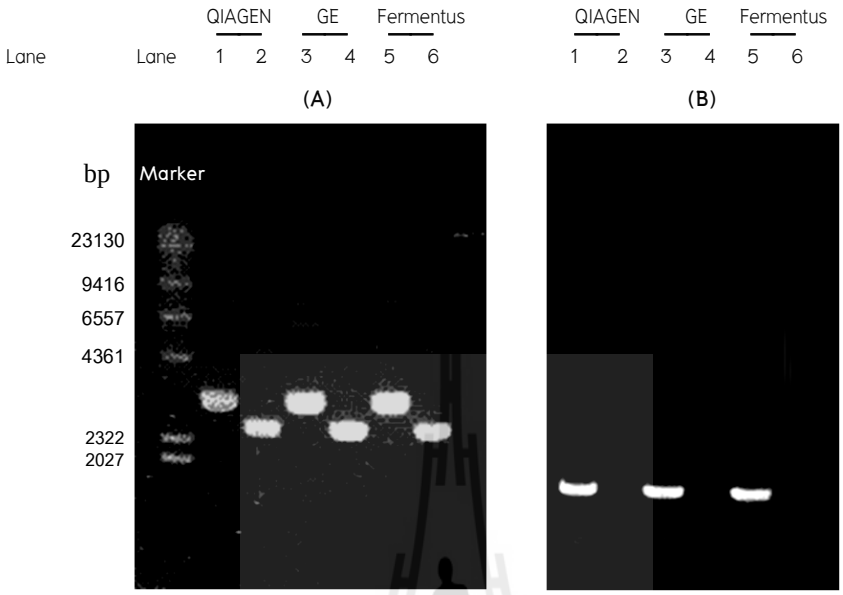
เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของ regenerated column ว่ามีประสิทธิภาพลดลงหรือไม่ โดยการวัดความเข้มข้นของ nucleic acid ที่สกัดได้ด้วยการวัดค่า UV absorbance ที่ความคลื่น 260 nm พบว่าไม่แตกต่างจากการใช้คอลัมน์ใหม่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ พร้อมกันนี้ได้เปรียบเทียบอัตราส่วนของ 260/280 พบว่าอัตราส่วนดังกล่าวไม่เกิน 1.8 ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้ว่า DNA ที่สกัดได้ปราศจาก RNA (ตารางที่ 3.1) เนื่องจาก transformed bacteria มีการสร้างจำนวน copy ของ plasmid ไม่เท่ากันดังนั้นจึงทำให้ DNA ที่สกัดได้จาก pGAPZαA มีความเข้มข้นของ DNA ต่ำกว่าการสกัดจาก pQE-60 คือ ต่ำกว่า 200 (ng/μl) และ มากกว่า 200 (ng/μl) ตามลำดับ

2. ประสิทธิภาพน้ำยาสกัด plasmid ที่ทำขึ้นเอง (HM)

2.1 การเปรียบเทียบ yield ที่ได้จากการใช้น้ำยาสกัด HM และน้ำยาของบริษัทต่าง ๆ ด้วยการใช้คอลัมน์ใหม่

ตารางที่ 3.2 แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของน้ำยา HM จากทำการทดลองเปรียบเทียบกับน้ำยาของบริษัททั้ง 3 โดยใช้คอลัมน์ใหม่ พบว่าน้ำยา HM มีประสิทธิภาพไม่แตกต่างอย่างมี

นัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับน้ำยาของบริษัท Qiagen และ Fermentus แต่ว่าน้ำยา HM ที่ทำขึ้นนั้นสามารถสกัด DNA plasmid ได้มากกว่าของน้ำยาของบริษัท GE อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 3.1 การตรวจสอบการปนเปื้อนในการสกัด plasmid DNA ด้วย regenerated silica column *Panel (A)* = Plasmid ที่สกัดได้โดยใช้น้ำยา commercial kit ของ 3 บริษัท โดย Lane 1, 3 และ 5 เป็น plasmid ขนาดประมาณ 4.6 (vector ขนาด 3.1 kb รวม insert gene ขนาด 1542 bp) ซึ่งสกัดได้จากการใช้ column ใหม่; Lane 2, 4 และ 6 เป็น plasmid ชนิดเดียวกันแต่ไม่มี insert gene ซึ่งสกัดได้จากการใช้ column ที่เคยผ่านการสกัด plasmid ใน lane 2, 4 และ 6 มาแล้ว 1 ครั้ง พบว่าไม่มี การปนเปื้อนจากการสกัดครั้งก่อน *Panel (B)* = PCR product ซึ่งได้จากการใช้ plasmid ในที่กล่าวถึงใน panel (A) เป็น template ผลการทดลองยืนยันว่า column ที่ผ่านการใช้งานและล้างแล้วไม่มีการตกค้างของ plasmid จากการสกัดในรอบแรก

ตารางที่ 3.1 การเปรียบเทียบ yield และความบริสุทธิ์ของ plasmid ที่ได้จากการใช้ column ใหม่และ reused column จากน้ำยาของบริษัทเดียวกัน

		Yield (ng/μl)	% yield เทียบกับ column ใหม่	260/280 ratio
Qiagen	New	263.77 ± 26.12	-	1.86 ± 0.01
	reused	235.32 ± 15.61	86.77 ± 5.72	1.85 ± 0.01
GE	New	248.48 ± 17.65	-	1.89 ± 0.01
	reused	215.41 ± 21.65	90.70 ± 5.89	1.91 ± 0.01
Fermentus	New	139.25 ± 3.77	-	1.87 ± 0.01
	reused	132.66 ± 3.93	95.55 ± 4.30	1.87 ± 0.00

แสดงค่าด้วย $\bar{x} \pm$ S.D., $p > 0.05$; n= 5

ตารางที่ 3.2 การเปรียบเทียบ yield ที่ได้จากการใช้ column ใหม่กับน้ำยาสกัด HM และน้ำยาของบริษัทต่าง ๆ

	Yield (ng/μl)	% yield เทียบกับน้ำยาของบริษัท	260/280 ratio
Qiagen	307.22 ± 29.61	-	1.89 ± 0.01
HM	293.69 ± 32.41	95.44 ± 8.88	1.90 ± 0.02
GE	255.01 ± 13.47	-	1.82 ± 0.01
HM	359.54 ± 8.62*	141.07 ± 9.63*	1.82 ± 0.01
Fermentus	249.96 ± 13.99	-	1.87 ± 0.00
HM	244.11 ± 30.98	96.79 ± 8.07	1.87 ± 0.01

แสดงค่าด้วย $\bar{x} \pm$ S.D., *$p < 0.05$; n = 5

หมายเหตุ ใช้ transformed bacteria ที่มี pQE-60 เป็น plasmid

ตัวอย่างที่สกัดได้ไม่มีการปนเปื้อน RNA สังเกตได้จากอัตราส่วนระหว่างการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 nm ที่ไม่ต่ำกว่า 1.80

2.2 การเปรียบเทียบ yield ที่ได้จากการใช้น้ำยาสกัด HM ร่วมกับ regenerated column เปรียบเทียบกับการสกัดด้วยน้ำยาของบริษัทร่วมกับการใช้คอลัมน์ใหม่

การใช้น้ำยา HM ร่วมกับ *regenerated column* เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้คอลัมน์ใหม่ร่วมกับน้ำยาของบริษัท พบว่าได้ผลทำนองเดียวกับการใช้คอลัมน์ใหม่ในหัวข้อ 2.1 คือ น้ำยา HM ที่ทำขึ้นนั้นสามารถสกัด DNA plasmid ได้มากกว่าของน้ำยาของบริษัท GE อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่น้ำยา HM มีประสิทธิภาพไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับน้ำยาของบริษัท Qiagen และ Fermentus (ตารางที่ 3.3)

2.2 การทดสอบคุณภาพของ plasmid ที่สกัดได้จากน้ำยา HM

คุณภาพของ plasmid ที่สกัดได้จากน้ำยา HM สามารถทำการวิเคราะห์ลำดับเบสได้ ไม่พบปัญหาในการวิเคราะห์แต่อย่างใด สังเกตได้จากผลที่ได้จากการส่งตัวอย่างไปตรวจวิเคราะห์ ซึ่งแสดงไว้ในรูปที่ 3.2 และอ่านลำดับเบสได้ดังรูปที่ 3.3

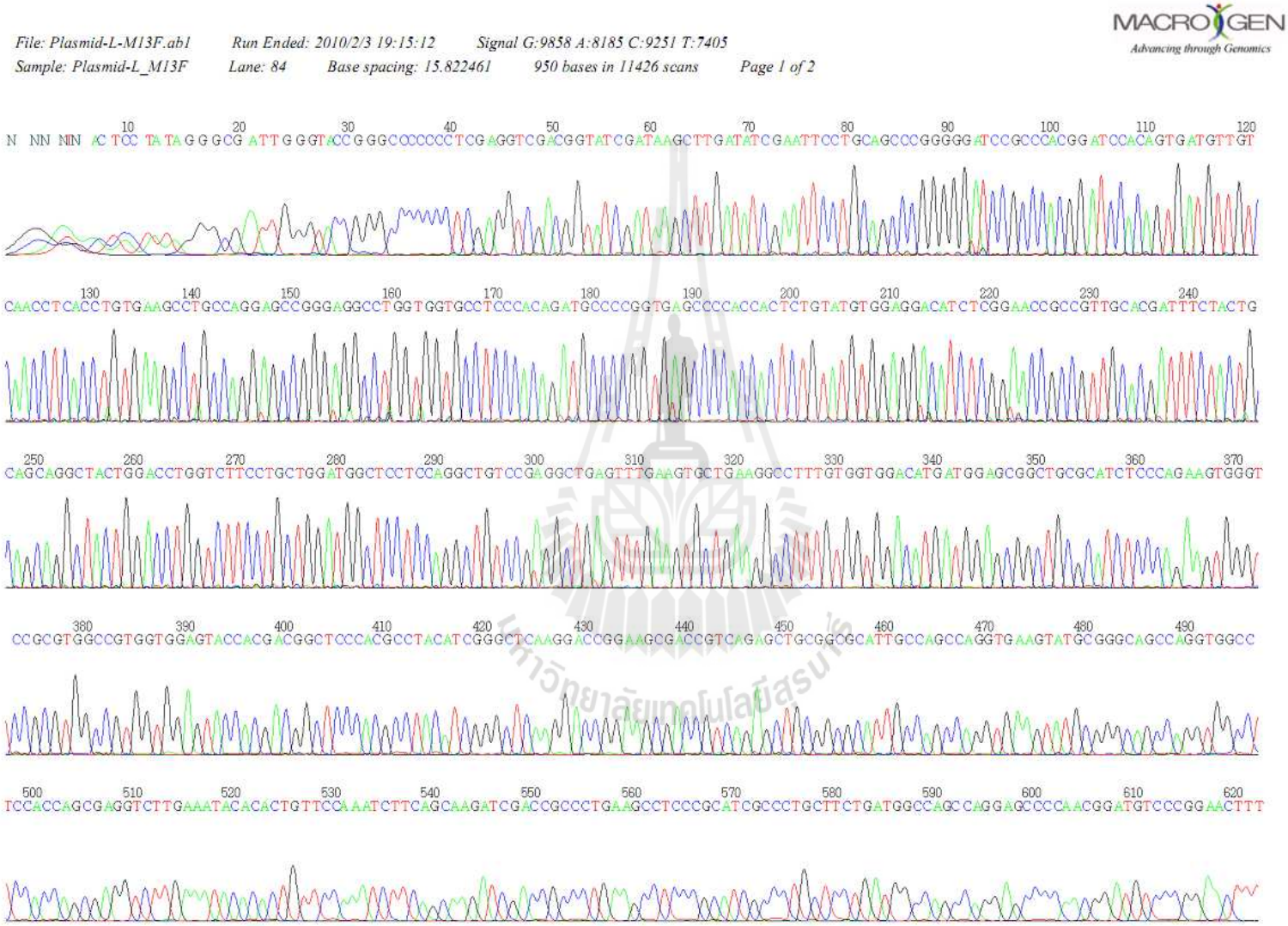
ตารางที่ 3.3 การเปรียบเทียบ yield ที่ได้ระหว่างจากการใช้คอลัมน์ใหม่กับน้ำยาของบริษัทและน้ำยาสกัด HM กับ regenerated column

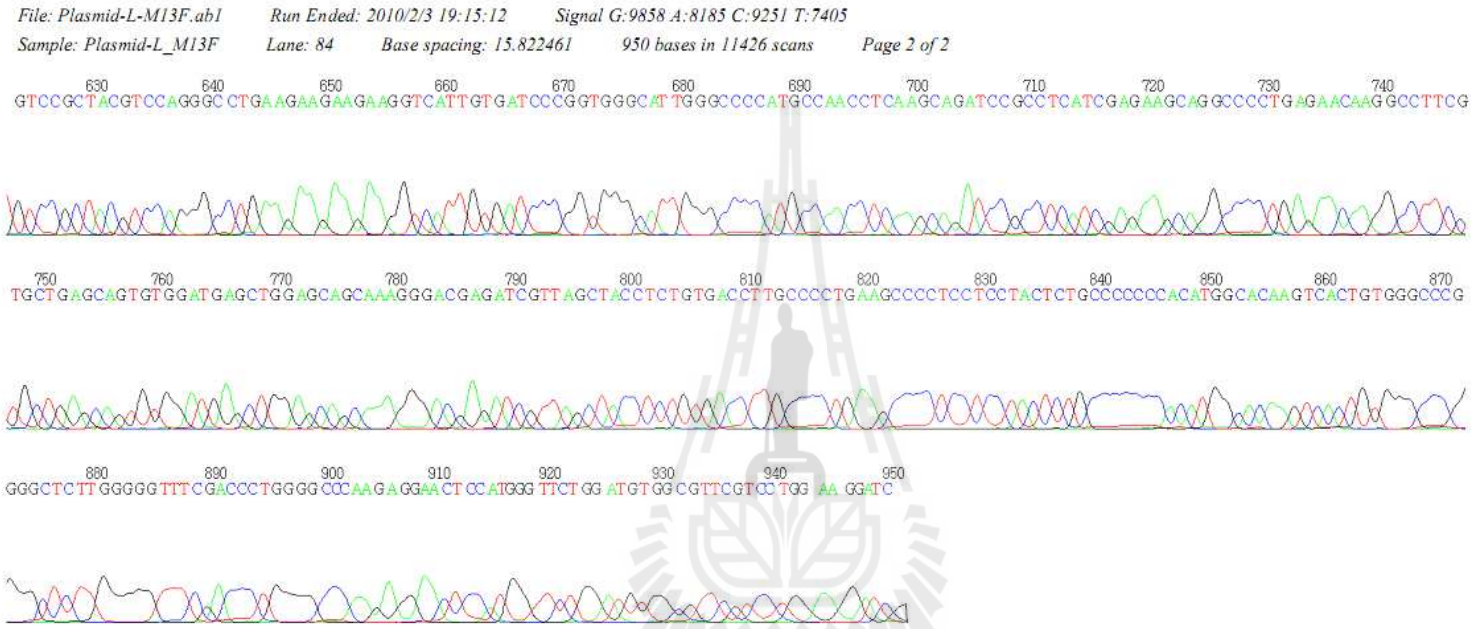
	Yield (ng/μl)	Compared % yield	260/280
Qiagen	135.22 ± 3.64		1.92 ± 0.01
HM	142.07 ± 9.40	103.52 ± 0.52	1.92 ± 0.01
GE	141.10 ± 8.08		1.87 ± 0.00
HM	146.14 ± 8.82*	110.72 ± 6.54*	1.87 ± 0.00
Fermentus	131.01 ± 3.94		1.87 ± 0.01
HM	144.36 ± 5.07	105.14 ± 6.70	1.88 ± 0.01

แสดงค่าด้วย $\bar{x} \pm$ S.D., *$p < 0.05$; n= 5

หมายเหตุ ใช้ transformed bacteria ที่มี pGAPZαA เป็น plasmid

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี


MACROGEN
Advancing through Genomics
File: Plasmid-L-M13F.ab1 Run Ended: 2010/2/3 19:15:12 Signal G:9858 A:8185 C:9251 T:7405
Sample: Plasmid-L_M13F Lane: 84 Base spacing: 15.822461 950 bases in 11426 scans Page 1 of 2
N NN NIN AC TCC TA TA G G G CG ATT G G GT ACC G GGC CCCCCCCT CG AGGT CG ACGGT ATC GATAAGCTT GATATC GAATTCCT GCAGCCC GGGGG ATCCGCCCAC GG ATCCACAGT GATGTTGT
CAACCTCACCTGTGAAGCCTGCCAGGAGCCGGGAGGCCTGGTGGTGCCTCCCACAGATGCCCCGGTGAGCCCCACCACTCTGTATGTGGAGGACATCTCGGAACCGCCGTTGCACGATTTCTACTG
CAGCAGGCTACTGGACCTGGTCTTCCTGCTGGATGGCTCCTCCAGGCTGTCCGAGGCTGAGTTTGAAGTGCTGAAGGCCTTTGTGGTGGACATGATGGAGCGGCTGCGCATCTCCCAGAAGTGGGT
CCGCGTGGCCGTGGTGGAGTACCACGACGGCTCCCACGCCTACATCGGGCTCAAGGACCGGAAGCGACCGTCAGAGCTGCGGCGCATTGCCAGCCAGGTGAAGTATGCGGGCAGCCAGGTGGCC
TCCACCAGCGAGGTCTTGAAATACACACTGTTCCAAATCTTCAGCAAGATCGACCGCCCTGAAGCCTCCCGCATCGCCCTGCTTCTGATGGCCAGCCAGGAGCCCCAACGGATGTCCCGGAACTTT



รูปที่ 3.2 Chromatogram **ที่ได้จากการวิเคราะห์การจัดเรียงลำดับ** nucleotide **ของ** A1 domain gene **ใน** pQE60 vector **ที่สกัดได้จากน้ำยาสกัดที่ผลิตขึ้น** (HM)

Nuleotide Sequence

GATGTTGTCAACCTCACCTGTGAAGCCTGCCAGGAGCCGGGAGGCCTGGTGGTGCCT
CCCACAGATGCCCCGGTGAGCCCCACCACTCTGTATGTGGAGGACATCTCGGAACCGCCG
TTGCACGATTTCTACTGCAGCAGGCTACTGGACCTGGTCTTCCTGCTGGATGGCTCCTCC
AGGCTGTCCGAGGCTGAGTTTGAAGTGCTGAAGGCCTTTGTGGTGGACATGATGGAGCGG
CTGCGCATCTCCCAGAAGTGGGTCCGCGTGGCCGTGGTGGAGTACCACGACGGCTCCCAC
GCCTACATCGGGCTCAAGGACCGGAAGCGACCGTCAGAGCTGCGGCGCATTGCCAGCCAG
GTGAAGTATGCGGGCAGCCAGGTGGCCTCCACCAGCGAGGTCTTGAAATACACACTGTTC
CAAATCTTCAGCAAGATCGACCGCCCTGAAGCCTCCCGCATCGCCCTGCTCCTGATGGCC
AGCCAGGAGCCCCAACGGATGTCCCGGAACTTTGTCCGCTACGTCCAGGGCCTGAAGAAG
AAGAAGGTCATTGTGATCCCGGTGGGCATTGGGCCCCATGCCAACCTCAAGCAGATCCGC
CTCATCGAGAAGCAGGCCCCTGAGAACAAGGCCTTCGTGCTGAGCAGTGTGGATGAGCTG
GAGCAGCAAAGGGACGAGATCGTTAGCTACCTCTGTGACCTTGCCCCTGAAGCCCCTCCT
CCTACTCTGCCCCCCCACATGGCACAAGTCACTGTGGGCCACATGGCACAA

รูปที่ 3.3 ลำดับ nucleotide ของ VWF A1 gene ที่แทรกอยู่ใน pQE-60 vector

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

แนวความคิดในการนำ commercial nucleic acid extraction column ที่ใช้แล้วกลับมาใช้อีก ก่อให้เกิดคำถามที่ว่า ยังคงมีการตกค้างของ DNA จากการสกัดในครั้งก่อนปนเปื้อนอยู่หรือไม่ ผลการทดลองจากการศึกษานี้ สรุปได้ว่า nucleic acid extraction column ที่ใช้แล้ว หากนำมาล้างด้วย 1 N HCl นาน 4 ชั่วโมง สามารถนำกลับมาใช้อีกได้ Siddappa และคณะ [5] ได้ทำการทดสอบการนำคอลัมน์กลับมาใช้ใหม่กับ purified DNA plasmid พบว่าประสิทธิภาพของ column ยังคงดีอยู่แม้จะผ่านการใช้ถึง 20 ครั้ง อย่างไรก็ตามการศึกษาวิจัยดังกล่าวไม่ได้ทดลองกับการสกัด DNA plasmid จากแบคทีเรียตามวัตถุประสงค์จริงของ extraction column ในการศึกษาวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้ทดสอบการใช้ commercial silica membrane column กับการสกัด plasmid DNA จากแบคทีเรีย โดยครั้งที่ 1 นำไปสกัด plasmid ที่มี insert gene แล้วล้าง column เพื่อขจัด plasmid ที่อาจติดค้างอยู่ออกก่อนที่จะสกัด plasmid ที่ไม่มี insert gene ผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบ plasmid ที่สกัดได้โดยการสังเกตจำนวนแถบและขนาดของ DNA บน electrophoresis gel ร่วมกับการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวน insert gene ผลการทดลองพบว่าการสกัดครั้งที่ 2 ตรวจพบ plasmid เพียงชนิดเดียวเท่านั้น และไม่สามารถเพิ่มจำนวน insert gene จากการ PCR ได้ แสดงให้เห็นว่าไม่มี DNA ตกค้างจากการสกัดครั้งก่อน (รูปที่ 3.1) ประสิทธิภาพของ regenerated column ได้รับการตรวจสอบโดยการวัดปริมาณ plasmid ที่สกัดได้เปรียบเทียบกับ column ใหม่ของ 3 บริษัท พบว่าจากการทดลองซ้ำ 5 ครั้ง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3.1)

เมื่อเป็นที่แน่ชัดแล้วว่า extraction column ที่ผ่านการสกัด plasmid จากแบคทีเรียและทำการล้างด้วย 1 N HCl นาน 4 ชั่วโมง สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ อย่างไรก็ตามปัญหาที่เกิดขึ้นต่อไปหากต้องการใช้คอลัมน์ซ้ำ คือ น้ำยาที่ใช้ในการสกัดนั้นบริษัทให้มานั้นมีจำกัด ดังนั้นเพื่อให้การนำคอลัมน์มาใช้ซ้ำอีกมีความเป็นไปได้จริง ผู้ใช้จำเป็นต้องปรุงน้ำยาเหล่าขึ้นเอง เมื่อพิจารณาตามหลักการ alkaline lysis และความสามารถในการจับของ DNA (adsorption) บน silica [6] ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง ๆ น้ำยาที่จำเป็นในการสกัดประกอบด้วย buffer 5 ชนิด ได้แก่ (1) Resuspension buffer (2) Lysis buffer (3) Neutralization buffer (4) Washing buffer และ (5) Elution buffer สารละลายทั้ง 5 ชนิดที่กล่าวมานั้น ส่วนประกอบของ buffer ชนิดที่ 3 ซึ่งจะทำให้ DNA จับกับ silica membrane ได้นั้นมักจะไม่เป็นที่เปิดเผยและถูกเก็บเป็นความลับของบริษัทผู้ผลิต ตามหลักการพบว่า buffer ชนิดที่ 3 นั้นประกอบด้วย chaotropic salt เช่น sodium iodide, sodium perchlorate, lithium perchlorate, urea, guanidium thiocyanate หรือ guanidium

hydrochloride สารเหล่านี้ทำหน้าที่ช่วยทำลายพันธะเคมีต่าง ๆ ได้แก่ hydrogen bond, van der Waals force และ hydrophobic interaction เกิดทำให้เกิดการทำลายโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีนต่าง ๆ ภายในเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ nuclease อีกทั้งยังทำให้ nucleic acids หรือ DNA แยกตัวจากน้ำเข้าไปจับกับ silica membrane ได้ดี ในการศึกษานี้ได้เลือกใช้ guanidine HCL มาใช้เพื่อทำหน้าที่เป็น chaotropic salt โดยมีส่วนผสมดังที่แจ้งไว้ในวิธีดำเนินการวิจัย หน้า 4 หน้าที่ของสารละลายชนิดที่ 3 นี้คือช่วย renature plasmid หลังจากการถูก denature ในขั้นตอนการ lysis ข้อควรระวังในการสกัดทำเช่นเดียวกับที่แต่ละบริษัทแนะนำไว้ เช่น ไม่ควรใช้เวลานานเกินไปในขั้นตอน lysis หรือไม่ใช้เครื่องปั่นผสมในขั้นตอนการ renature เพื่อป้องกันไม่ให้ genomic DNA แตกออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ เพราะ DNA สายสั้น ๆ จะสามารถเกิดการ re–anneal ได้ง่าย พร้อมที่จะละลายกลับคืนมาใน supernatant ร่วมกับ plasmid DNA ที่ต้องการแยกสกัด สิ่งที่จำเป็นจะต้องกล่าวเพิ่มเติมในการเตรียม neutralization buffer คือ ให้เตรียม 2 M acetic acid เพื่อใช้เป็นตัวทำละลาย potassium acetate ก่อนแล้วปรับ pH ให้ได้ 4.5 จากนั้นจึงเติม guanidium HCl ให้ได้ความเข้มข้น 5.5 M จะได้ neutralization buffer ที่มีส่วนประกอบตามสูตรหน้า 4 และมี pH เท่ากับ 6.0 พอดี

ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ HM buffer โดยในรอบแรกทำการเปรียบเทียบโดยใช้คอลัมน์ใหม่ของแต่ละบริษัท เพื่อตัดปัจจัยเรื่องคอลัมน์เก่า/ใหม่ พบว่าน้ำยา HM ที่ปรุงขึ้นสกัด plasmid จากแบคทีเรียได้ไม่แตกต่างจากน้ำยาของบริษัท Qiagen และ Fermentus แต่มากกว่าบริษัท GE Healthcare อย่างมีนัยสำคัญ จากนั้นผู้วิจัยถึงได้ทำการเปรียบเทียบ yield ที่สกัดได้ระหว่างจากการใช้คอลัมน์ใหม่กับน้ำยาของบริษัทและน้ำยาสกัด HM กับคอลัมน์ที่ผ่านการล้างพบว่าปริมาณ plasmid DNA ที่ได้จากการใช้ HM buffer ยังคงมากกว่าน้ำยาของบริษัท GE Healthcare อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่แตกต่างจากของ บริษัท Qiagen และ Fermentus

สรุป

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อต้องการสนับสนุนให้มีการนำ nucleic acid extraction column ที่ผ่านการใช้งานแล้วกลับมาใช้ใหม่ อันจะช่วยให้เกิดการใช้ทรัพยากรอย่างคุ้มค่า ผู้วิจัยได้แนะนำการผลิตสารละลายสิ้นเปลืองที่จำเป็นต้องใช้ในการสกัด เพื่อให้ผู้ใช้สามารถปรุงขึ้นเองได้ นอกจากนั้นผู้วิจัยได้แสดงหลักฐานสนับสนุนความเป็นไปได้ในการนำคอลัมน์กลับมาใช้อีก แต่การจะนำกลับมาใช้ได้สูงสุดกี่ครั้งนั้น ผู้ใช้อาจต้องเป็นผู้สังเกตเองจากการตรวจสอบคุณสมบัติของ plasmid ซึ่งมักจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของ plasmid ที่สกัดได้ว่าจะนำไปใช้ต่อในงานประเภทใด ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการทดลองแต่เฉพาะวิธีสกัด plasmid จากแบคทีเรียเท่านั้น

แต่ผู้วิจัยเชื่อว่าหลักฐานที่แสดงในการศึกษาครั้งนี้น่าจะสามารถใช้กับวิธีสกัด DNA แบบอื่น ๆ จากแบคทีเรียได้ในทำนองเดียวกัน

เอกสารอ้างอิง

1. Sambrook J and Russel DW (2001). Molecular cloning: A laboratory Manual. CSH Laboratory Press. Coldspring Harbor, NY; 1.31–1.64.
2. Boyle JS and Lew AM (1995). An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. Trends Genet. 11:8.
3. Carter MJ and Milton ID (1993). An inexpensive and simple method for DNA purifications on silica particles. Nucleic Acids Res. 21:1044.
4. Lakshmi R Baskar RV and Ranga U (1999). Extraction of superior–quality plasmid DNA by a combination of modified alkaline lysis and silica matrix. Anal Biochem. 272:109–112.
5. Siddappa NB, Avinash A, Venkatramanan M and Ranga U (2007). Regeneration of commercial nucleic acid extraction columns without the risk of carryover contamination. Biotechniques. 42:186–92.
6. QIAprep Miniprep Handbook for purification of molecular biology grade DNA 2nd ed. (2006). Qiagen company.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

EB 2013: LATE-BREAKING ABSTRACT INFORMATION

EB 2013 [EB2013@mirasmart.com]

Sent: Saturday, March 09, 2013 12:31 AM

To: Nuannoi Runghirunwiroj

Cc: Nuannoi Runghirunwiroj

EXPERIMENTAL BIOLOGY 2013
ABSTRACT CONFIRMATION OF LATE-BREAKING POSTER PRESENTATION
Boston Convention and Exhibition Center – 415 Summer Street, Boston, Massachusetts 02210

Late-breaking abstracts will be presented in poster sessions on Wednesday, April 24 in the Boston Convention and Exhibition Center, Hall C in Boston, MA. Please review the information below for further details. It is the responsibility of the first author to advise co-authors of the time and place of the presentation as they will not receive a separate notification. A copy of this email will be sent to your sponsor. **You are required to be present at the poster board at the time noted below.**

Late-Breaking Abstract Poster Presentation Information (read carefully):

Abstract Number: 9730
Abstract Title: Efficiency of homemade buffers and regenerated silica spin-columns for plasmid DNA purification
First Author: Nuannoi Chudapongse
Poster Session Title: Methods
Day of Presentation: Wednesday, April 24, 2013
Poster Board Number / Program Number: LB155
Authors must be present at their posters from: 12:15 PM - 1:30 PM
Location: Boston Convention and Exhibition Center, Hall C

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี