การทดลองที่ 13	กรดนิวคลีอิก

อ. ชัยวัฒน์ วามวรรัตน์

วัตถุประสงค์ 1. เพื่อให้รู้จักวิธีการแยกกรดนิวคลีอิกชนิดดีเอ็นเอจากเซลล์เม็ดเลือดแดงไก่
2. เพื่อให้ทราบถึงความแตกต่างชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในกรดนิวคลีอิก

กรดนิวคลีอิกมีบทบาทเป็นสารพันธุกรรมและเป็นตัวกลางในการถ่ายทอดข้อมูลพันธุกรรม เป็นแมโครโมเลกุลที่เป็นพอลิเมอร์ของนิวคลีโอไทด์ แบ่งตามโครงสร้างได้เป็น 2 ชนิด คือ กรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (deoxyribonucleic acid) และกรดไรโบนิวคลีอิก (ribonucleic acid) หรือเรียกย่อ ๆ ว่า ดีเอ็นเอ (DNA) และอาร์เอ็นเอ (RNA) ตามลำดับ ความแตกต่างของกรดนิวคลีอิกทั้ง 2 ชนิดอยู่ที่ชนิดของน้ำตาลและเบสไพริมิดีน(pyrimidine) ที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในกรดนิวคลีอิก ในดีเอ็นเอเป็นน้ำตาลดีออกซีไรโบส(deoxyribose) และเบสไพริมิดีน ชนิดไซโทซีน (cytosine) และไธมีน (thymine) เป็นองค์ประกอบ ส่วนในอาร์เอ็นเอเป็นน้ำตาลไรโบส (ribose) และ เบสไพริมิดีน ชนิดไซโทซีนและยูราซิล (uracil) ปกติดีเอ็นเอมีบทบาทหน้าที่เป็นสารพันธุกรรม ส่วนอาร์เอ็นเอทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการถ่ายทอดข้อมูลพันธุกรรมจากดีเอ็นเอไปใช้ในการสร้างโปรตีน

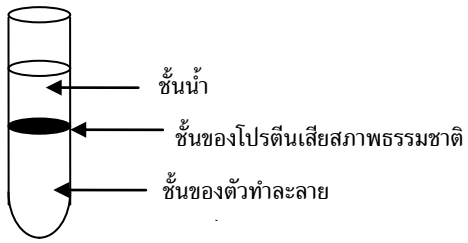
การสกัดแยกดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอของสัตว์ชั้นสูงพบอยู่ในนิวเคลียสของเซลล์และไม่อยู่ในรูปโมเลกุลอิสระ แต่รวมตัวจับอยู่กับโปรตีนพวกฮีสโทน (histone) และนอนฮีสโทน (non-histone) การแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์จึงต้องมีลำดับขั้นตอนดังนี้

1. การทำให้เยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มนิวเคลียสของเซลล์แตก เพื่อปลดปล่อยดีเอ็นเอออกมาละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ ซึ่งมีเกลือและ EDTA ผสมอยู่ด้วย เกลือช่วยให้ดีเอ็นเอมีเสถียรภาพและละลายได้ดีขึ้นกว่าการละลายในน้ำกลั่นธรรมดา ความเข้มข้นของเกลือไม่ควรต่ำกว่า 100 มิลลิโมลาร์ เพื่อให้พันธะไฮโดรเจนระหว่างสายดีเอ็นเอคู่สมมีความแข็งแรงขึ้น ส่วน EDTA จะจับกับไดวาเลนท์ไอออน เช่น แมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) และแมงกานีสไอออน (Mn^{2+}) ซึ่งจำเป็นต่อการทำงานของดีออกซีไรโบนิวคลีเอส (deoxyribonuclease) นอกจากนี้อาจเติมซิเตรท (citrate) เพื่อเป็น chelating agent ร่วมกับ EDTA ด้วย พีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์เป็นด่างเล็กน้อย (พีเอช 8) เพื่อลดแรงดึงดูดทางประจุไฟฟ้าระหว่างดีเอ็นเอกับเบสิกฮีสโทน นอกจากนี้ที่พีเอชค่อนข้างสูงนี้ยังช่วยยับยั้งการทำงานของนิวคลีเอส (nuclease) และช่วยทำให้โปรตีนบางส่วนเสียสภาพธรรมชาติไป

2. การแยกโปรตีนที่จับกับดีเอ็นเอออกมา โดยการใช้สารซักฟอก เช่น SDS (**s**odium **d**odecyl **s**ulfate) ทำลายพันธะที่จับกันระหว่างดีเอ็นเอและโปรตีน และทำให้ดีออกซีไรโบนิวคลีเอสและโปรตีนอื่น ๆ เสียสภาพธรรมชาติ อาจเติมโปรติเอสลงไปเพื่อช่วยในการย่อยสลายโปรตีน

3. การแยกดีเอ็นเอออกจากชีวโมเลกุลอื่น ๆ โปรตีนถูกกำจัดออกโดยเติมตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น ฟีนอล (phenol) คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (chloroform-isoamyl alcohol) หลังการปั่นเหวี่ยงเสร็จสิ้น สารละลายในหลอดทดลองจะแยกตัวเป็น 3 ชั้นดังรูป โปรตีนที่เสียสภาพธรรมชาติแล้วรวมตัวอยู่ระหว่างชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์และชั้นน้ำ คลอโรฟอร์มทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติ ส่วนไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ลดการเกิดฟองและช่วยทำให้เกิดชั้นขึ้นระหว่างชั้นน้ำกับชั้นตัวทำละลายอินทรีย์

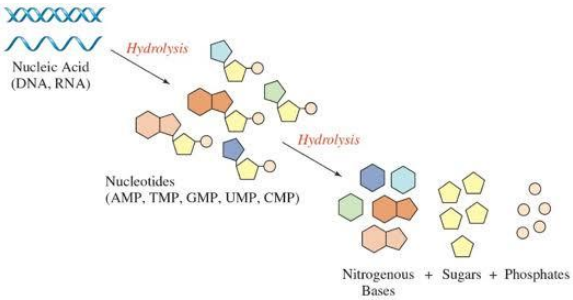


ดีเอ็นเอที่ละลายอยู่ในชั้นน้ำถูกแยกออกมาได้โดยการตกตะกอนด้วย 95% เอธานอล เนื่องจากดีเอ็นเอเป็นโมเลกุลที่มีประจุ การผสมตัวทำละลายอินทรีย์ลงไปในสารละลายที่ดีเอ็นเอละลายอยู่ จะลดความมีขั้วของสารละลาย ทำให้การละลายของดีเอ็นเอลดลงมาก ดีเอ็นเอจะตกตะกอนอยู่ในรูปของเส้นใย ซึ่งเก็บได้โดยใช้แท่งแก้วหมุนวนช้า ๆ สายดีเอ็นเอจะพันติดกับแท่งแก้วขึ้นมา นำดีเอ็นเอที่ได้ไปละลายในน้ำกลั่นหรือ TE บัฟเฟอร์ (10 mM Tris-HCl pH 7.6 1 mM EDTA) ในกรณีที่ต้องการดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์มากขึ้น อาจนำดีเอ็นเอที่ละลายได้นี้ กลับไปกำจัดโปรตีนที่ยังคงเหลืออยู่ด้วยการใช้คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์อีก ทำซ้ำจนพบว่าไม่มีชั้นโปรตีนเสียสภาพธรรมชาติเกิดขึ้นระหว่างชั้นน้ำและชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ ดีเอ็น-เอที่บริสุทธิ์ต้องมีอัตราส่วนค่าการดูดแสงที่ 260 นาโนเมตรและที่ 280 นาโนเมตร (A_{260}/A_{280}) ไม่น้อยกว่า 1.8 - 1.9 ในกรณีที่ต่ำกว่า 1.8 แสดงว่าดีเอ็นเอยังคงมีโปรตีนหรือฟีนอลที่ใช้ในขั้นตอนการสกัดปนเปื้อนอยู่

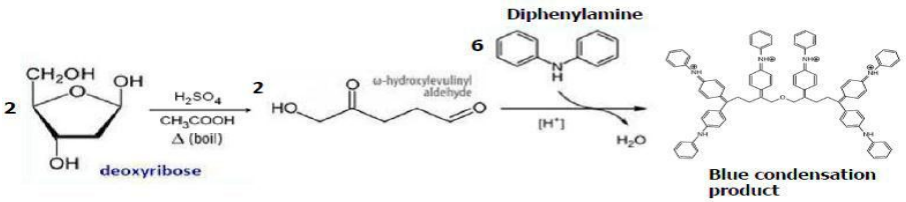
การหาปริมาณของกรดนิวคลีอิก กระทำได้ 2 วิธีคือ

1. การวัดค่าการดูดแสงที่ 260 นาโนเมตร เบสที่เป็นองค์ประกอบในดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอสามารถดูดกลืนแสงช่วงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่นประมาณ 260 นาโนเมตร สารละลายดีเอ็นเอที่วัดค่าการดูดแสงที่ 260 นาโนเมตรได้เท่ากับ 1 มีความเข้มข้นเป็น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. การวัดค่าการดูดแสงของสารประกอบที่มีสีซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาของน้ำตาลในกรดนิวคลีอิกกับสารทำให้เกิดสี ในภาวะที่เป็นกรดและมีอุณหภูมิสูง กรดนิวคลีอิกถูกไฮโดรไลซ์จนได้องค์ประกอบย่อย ๆ ได้แก่ น้ำตาล เบส และกรดฟอสฟอริก

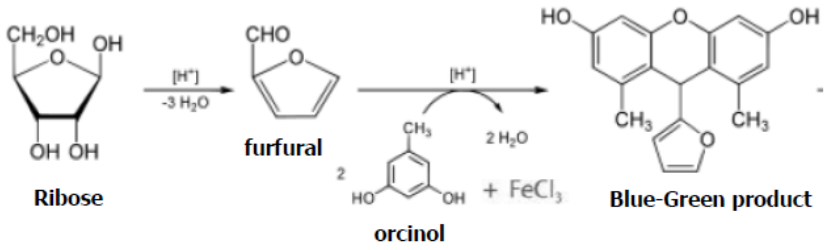


น้ำตาลจะเกิดปฏิกิริยาต่อกับสารทำให้เกิดสี ซึ่งในการหาปริมาณดีเอ็นเอ ใช้ปฏิกิริยาของดิชเก้ (Dische reaction) ดังสมการต่อไปนี้



น้ำตาลดีออกซีไรโบสที่ได้จากการย่อยสลายดีเอ็นเอเกิดการสูญเสียน้ำออกจากโมเลกุลในภาวะที่เป็นกรด เกิดเป็น ω-hydroxylevulinyl aldehyde ซึ่งไปรวมตัวกับ diphenylamine ให้สารประกอบที่มีสีน้ำเงิน ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดแสงที่ 610 นาโนเมตร ความเข้มของสีน้ำเงินของสารประกอบ ω- hydroxylevulinyl aldehyde diphenylamine ที่เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณดีเอ็นเอที่มีอยู่

ส่วนการหาปริมาณอาร์เอ็นเอใช้ปฏิกิริยาไบอัล ดังสมการต่อไปนี้



น้ำตาลไรโบสที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายอาร์เอ็นเอ ถูกดึงน้ำออกจากโมเลกุลในภาวะที่เป็นกรดให้ได้สารประกอบเฟอฟิวรัล ซึ่งไปทำปฏิกิริยากับออร์ซินอลโดยมีเฟอริกไอออน (Fe^{3+}) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้สารประกอบที่มีน้ำเงินแกมเขียวที่สามารถวัดค่าการดูดแสงสูงสุดได้ที่ 660 นาโนเมตร

สารเคมีที่ใช้

1. เม็ดเลือดแดงไก่
2. สารละลาย acid citrate dextrose (ACD) เตรียมโดยละลาย trisodium citrate. $2H_2O$ 2.2 กรัม citric acid. H_2O 0.8 กรัม และกลูโคส 2.45 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร และปรับพีเอชให้ได้ $\simeq$ 5.0
3. สารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 8.2 ประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl 400 mM NaCl 2 mM Na_2 EDTA
4. 10% SDS (sodium dodecyl sulfate)
5. สารละลายโปรตีเอส เตรียมโดยชั่งโปรตีเอสจาก *Aspergillus oryzae* 1 กรัม ละลายในสารละลาย 1% SDS 2 mM Na_2EDTA 10 มิลลิลิตร นำไปอุ่น 37°ซ 30 นาทีก่อนใช้ เพื่อกำจัดเอนไซม์นิวคลีเอส
6. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 5 โมลาร์
7. 95% เอธานอล
8. สารละลาย diphenylamine เตรียมโดยละลาย diphenylamine 0.3 กรัมในกรดแอซีติกล้วน 20 มิลลิลิตร แล้วเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เตรียมแล้วใช้ทันที
9. น้ำยาไบอัล เตรียมโดยละลาย $FeCl_3.6H_2O$ 0.1 กรัม และออร์ซินอล 0.1 กรัม ใน 100 มิลลิลิตร กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น แล้วเติมสารละลายนี้ลงในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
10. สารละลายผสมคลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24 : 1 โดยปริมาตร)
11. สารละลายอาร์เอ็นเอ

การทดลองที่ 13.1 การแยกดีเอ็นเอจากเลือดไก่

วิธีทดลอง

1. ผสมเลือดไก่สด ๆ กับสารละลาย acid citrate dextrose (ACD) ในอัตราส่วนเลือดไก่สด 10 มิลลิลิตรต่อ ACD 1.5 มิลลิลิตร เพื่อป้องกันไม่ให้เลือดแข็งตัว
2. นำเลือดไก่ที่เตรียมได้ในข้อ 1 ไปปั่นที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกส่วนที่เป็นน้ำเลือดออก และเก็บส่วนที่เป็นเม็ดเลือดแดงไว้
3. นำเม็ดเลือดแดงที่ได้จากข้อ 2 มา 1 มิลลิลิตรใส่ลงใน conical tube ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 8.2 ลงไป 13 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
4. เติมสารละลาย 10% SDS 1 มิลลิลิตรอย่างช้า ๆ พร้อมกับเขย่าขวดไปด้วยขณะที่เติม แล้วเขย่าแรง ๆ ต่ออีก 10 นาที
5. เติมสารละลายโปรตีเอส 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเป็นระยะ ๆ ในระหว่างที่แช่ในอ่างน้ำที่ปรับอุณหภูมิไว้ที่ 37°ซ เป็นเวลา 30 นาที
6. เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 5 โมลาร์ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วถ่ายสารละลายในขวดทั้งหมดลงในหลอดปั่น แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที
7. ใช้ pasteur pipette ค่อย ๆ ดูดส่วนใสลงในกระบอกตวง (ระวังอย่าให้เศษเลือดปะปนลงไป) ทิ้งตะกอนส่วนที่เหลือ
8. วัดปริมาตรส่วนใสที่ได้ทั้งหมด แล้วเทลงในบีกเกอร์ เติม 95% เอธานอลจำนวนประมาณ 2 เท่าปริมาตรส่วนใสที่วัดได้
9. ใช้แท่งแก้วคนกวนเป็นวงอย่างช้า ๆ เพื่อเก็บเส้นดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมด ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นใยให้ติดพันอยู่บนแท่งแก้ว กดเส้นใยกับบีกเกอร์ด้านในเพื่อไล่เอธานอลออกให้มากที่สุด โดยให้รีบทำอย่างรวดเร็วและละลายเส้นใยดีเอ็นเอที่ได้ในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตรทันที
10. เติมสารละลายผสมคลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ด้วยปริมาตรที่เท่ากันคือ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
11. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายส่วนบนไว้ด้วย pasteur pipette ที่มีปลายเปิดที่ใช้ดูดกว้างกว่าปกติ เพื่อลดการขาดของเส้นดีเอ็นเอที่ทำการแยก
12. ทำการทดลองซ้ำในข้อ 8-9 เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไปทำการทดลองต่อในการทดลองที่ 13.2

การทดลองที่ 13.2 การวิเคราะห์ชนิดน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในกรดนิวคลีอิก

วิธีทดลอง ก. การวิเคราะห์ชนิดน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในดีเอ็นเอ

1. ใส่สารละลายดีเอ็นเอจากเลือดไก่ 0.5 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย diphenylamine 2.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในอ่างน้ำเดือด 10 นาที สังเกตสีของสารละลาย
2. ทำการทดลองซ้ำในข้อ 1 แต่ให้ใช้สารละลายอาร์เอ็นเอ 0.5 มิลลิลิตรแทนแล้วเปรียบเทียบผลที่ได้จากหลอดทดลองทั้งสอง

ข. การวิเคราะห์ชนิดน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในอาร์เอ็นเอ

วิธีทดลอง

1. ใส่สารละลายอาร์เอ็นเอลงในหลอดทดลอง 0.5 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำยาไบอัลลงไป 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำหลอดทดลองไปต้มในอ่างน้ำเดือด 10 นาที สังเกตสีของสารละลาย
2. ทำการทดลองซ้ำในข้อ 2-4 แต่ให้ใช้สารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ 0.5 มิลลิลิตร แทนแล้วเปรียบเทียบผลที่ได้จากหลอดทดลองทั้งสอง

ผลการทดลองและสรุปผลการทดลองที่ 13.1 – 13.2

คำถาม

สารละลายดีเอ็นเอให้ค่าการดูดแสงที่ 260 นาโนเมตร เท่ากับ 0.65 จงคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอในสารละลายเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร