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