

การเก็บรักษาใบฝรั่งสำหรับสกัดแยกดีเอ็นเอ

Preservation of Guava Leaf for DNA Isolation

อัญชลีวรรณ เมธีนัยพร*

นฤมล ธนานันต์* และ ชีระชัย ธนานันต์*

Aunchaleewan Mayteeniyaporn ,

Narumol Thanananta* , and Theerachai Thanananta*

บทคัดย่อ

การสกัดแยกดีเอ็นเอจากใบฝรั่งที่ผ่านกระบวนการเก็บรักษา 6 วิธีเปรียบเทียบกับใบสด พบว่าใบฝรั่งที่เก็บไว้ในตู้เย็น 4-8°C ให้ดีเอ็นเอที่มีปริมาณและคุณภาพดีกว่าการเก็บรักษาโดยวิธีอื่นและให้ผลเทียบเท่ากับใบสด การเก็บรักษาใบฝรั่งโดยการทำให้แห้งด้วยการอัด herbarium อบแห้งที่อุณหภูมิ 60°C และทำให้แห้งโดยใช้ซิลิกาเจลนั้น ให้ดีเอ็นเอปริมาณน้อยและดีเอ็นเอเกิดการแตกหักเสียหายมาก รวมทั้งให้การตอบสนองต่อปฏิกิริยาพีซีอาร์แตกต่างไปจากใบสด และการเก็บรักษาใบฝรั่งด้วยการดองน้ำยาทั่วไปและการดองน้ำยาสำหรับพีซีเอ็นเอนั้น ไม่สามารถนำมาใช้ในการเก็บรักษาใบฝรั่งสำหรับสกัดแยกดีเอ็นเอ

Abstract

Preservation of guava leaf for DNA isolation, 6 methods of preservation were used and compared with the fresh leaf. The leaf which was preserved at 4-8°C gave as high concentration and quality of DNA as those of the fresh leaf. Drying leaf by herbarium, warmed at 60°C, and used silica gel gave decreases in concentration, shears, and different responded PCR products of DNA from the fresh leaf. Both preservations of leaf, 2% formalin in 12% ethyl alcohol, and 20% saturated copper acetate in glacial acetic acid could not preserve the leaf for the DNA isolation.

1. คำนำ

ปัจจุบันวิทยาการทางด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพ (Biological Sciences) พัฒนาก้าวหน้าไปอย่างไม่หยุดยั้ง

โดยเฉพาะการศึกษาทางชีววิทยาโมเลกุล (Molecular Biology) นั้น มักจะมุ่งไปสู่การศึกษาเกี่ยวกับดีเอ็นเอ

* ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

* Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Rangsit Campus, Pathumthani

(DNA) ซึ่งเป็นสารพันธุกรรม (genetic material) ในนิวเคลียสของสิ่งมีชีวิต การสกัดแยกดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตจึงเป็นขั้นตอนที่สำคัญอย่างยิ่ง สำหรับพืชนั้นมักนิยมสกัดแยกดีเอ็นเอจากใบ เพราะเป็นส่วนที่มีปริมาณมากและมีความบางมากกว่าส่วนอื่น ซึ่งทำให้ง่ายต่อการสกัดแยกดีเอ็นเอ นอกจากนั้นการเก็บใบไม้ก็ไม่ทำความเสียหายแก่ให้ดินไม้มากนัก แต่มีปัญหาเกี่ยวกับการเก็บใบไม้ เนื่องจากมีความบอบบางและเกิดการเสื่อมสภาพได้ง่าย โดยเฉพาะการเก็บใบไม้จากป่าหรือในบริเวณที่อยู่ห่างไกลจากห้องปฏิบัติการ ซึ่งไม่สามารถจะสกัดแยกดีเอ็นเอได้ทันทีนั้น จำเป็นจะต้องผ่านกระบวนการเก็บรักษา (preservation) และวิธีการเก็บรักษาที่ง่ายที่สุด คือ การแช่ในน้ำแข็ง แต่มักจะมีปัญหาเกี่ยวกับการละลายของน้ำแข็งและบางพื้นที่ที่หาน้ำแข็งได้ยากลำบากหรือไม่สามารถหาน้ำแข็งได้เลย ดังนั้นการเก็บรักษาดตัวอย่างใบพืชจึงไม่น่าง่ายและมีปัญหาเสมอ งานวิจัยนี้จึงพยายามที่จะหาวิธีแก้ไขปัญหามารักษาใบพืช คือ พยายามหาวิธีการเก็บรักษาใบพืชที่เหมาะสมสำหรับการสกัดแยก ดีเอ็นเอและสามารถนำดีเอ็นเอที่ได้ไปใช้ศึกษาต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การเตรียมตัวอย่าง

ปลูกต้นฝรั่ง (*Psidium guajava*) 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์กลมสาลีและแป้นสีทอง นำใบฝรั่งมาผ่านกระบวนการเก็บรักษา 6 วิธี ได้แก่

- 1.1 เก็บไว้ในตู้เย็น 4-8°ซ. 7 วัน
- 1.2 ดองน้ำยาทั่วไป 7 วัน (2% formalin in 12% ethyl alcohol)
- 1.3 ดองน้ำยาสำหรับพืชสีเขียว 7 วัน (20% saturated copper acetate in glacial acetic acid)
- 1.4 ทำให้แห้งโดยการอัด herbarium
- 1.5 อบแห้งที่อุณหภูมิ 60°ซ.
- 1.6 ทำให้แห้งโดยใช้ซิลิกาเจล (silica gel)

2.2 การสกัดแยกดีเอ็นเอ

นำใบฝรั่งที่ผ่านกระบวนการเก็บรักษาทั้ง 6 วิธี และใบฝรั่งสดซึ่งใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (control) มาสกัดแยกดีเอ็นเอโดยวิธีประยุกต์จาก Agrawal และคณะ (1992) โดยแต่ละวิธีจะทำ 3 ซ้ำ

2.3 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ

การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอนั้นใช้วิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (nm) [1] ส่วนการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอใช้วิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในอะกาโรสเจล (agarose gel) 0.8% [1] และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR; polymerase chain reaction) โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Gibco BRL®) และ ไพรมเมอร์ (primer) ขนาด 12 นิวคลีโอไทด์ (mer) ชุด A-2 จำนวน 12 ชนิด [2,3]

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการสกัดแยกดีเอ็นเอจากใบฝรั่งที่ผ่านกระบวนการเก็บรักษาทั้ง 6 วิธีและใบฝรั่งสด แล้วนำไปตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดแยกได้โดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายดีเอ็นเอและคำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ พบว่าใบฝรั่งสดและใบฝรั่งที่เก็บไว้ในตู้เย็น 4-8°ซ. 7 วันให้ปริมาณดีเอ็นเอสูงกว่าใบฝรั่งที่ผ่านกระบวนการเก็บรักษาโดยวิธีอื่นอย่างชัดเจนและมีความแตกต่างทางด้านสถิติ ($P=0.01$) (ตารางที่ 1) เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดแยกได้ไปตรวจสอบคุณภาพด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสพบว่าใบฝรั่งสดและใบฝรั่งที่เก็บไว้ในตู้เย็น 4-8°ซ. 7 วันให้แถบดีเอ็นเอที่มีความเข้มสูงอย่างชัดเจน ซึ่ง สอดคล้องกับผลการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายดีเอ็นเอ โดยมีค่า OD_{260}/OD_{280} ประมาณ 1.7-1.8 ซึ่งแสดงว่าสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง นอกจากนั้นยังพบว่าได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดี คือ ดีเอ็นเอส่วนใหญ่ไม่แตกหักเสียหาย (ภาพที่ 1)

ส่วนใบฝรั่งที่ผ่านการคองน้ำยาทั่วไปและคองน้ำยาสำหรับพืชสีเขียว นั้น เมื่อสกัดแยกดีเอ็นเอและนำไปตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดแยกได้โดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายดีเอ็นเอและคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ พบว่าได้ปริมาณดีเอ็นเอจำนวนหนึ่ง (ตารางที่ 1) มีค่า OD_{260}/OD_{280} ประมาณ 1.5-1.6 ซึ่งแสดง

ว่าสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มีการปนเปื้อนจากสารอื่น แต่เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดแยกได้ไปตรวจสอบคุณภาพด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิส พบว่าไม่มีแถบดีเอ็นเอปรากฏขึ้นเลย จึงทดลองเอาน้ำยาที่ใช้ในการเก็บรักษาใบฝรั่งทั้ง 2 ชนิด ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

Table 1 Concentration of DNA from guava leaf with non- and preservation

Preparation of guava leaf for DNA isolation	Averaged concentration of DNA ($\mu\text{g/ml}$)	
	Cultivar 1 (Klomsalee)	Cultivar 2 (Panseetong)
fresh leaf	399.2	429.2
4-8°C, 7 days	364.6	380.4
2% formalin with 12% ethyl alcohol, 7 days	107.9	102.9
20% saturated copper acetate in glacial acetic acid, 7 days	254.6	280.3
dry by herbarium	131.3	208.8
dry by warm at 60°C	159.6	130.0
dry by silica gel	142.9	156.7

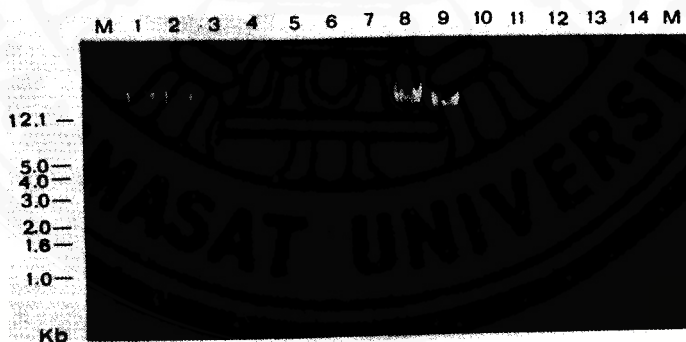


Figure 1 DNA bands of guava (lane 1-7 = Klomsalee and lane 8-14 = Panseetong) showed: concentration and quality of DNA from non- and preservation leaf (M = marker DNA, 1&8 = fresh leaf, 2&9 = preservation at 4-8°C, 3&10 = preservation in 2% formalin with 12% ethyl alcohol, 4&11 = preservation in 20% saturated copper acetate in glacial acetic acid, 5&12 = dry by herbarium, 6&13 = dry by warm at 60°C, 7&14 = dry by silica gel)

พบว่าน้ำยาทั้ง 2 ชนิดสามารถดูดกลืนแสงได้ ดังนั้นเมื่อพิจารณาผลการทดลองประกอบกันจึงสรุปว่าใบฝรั่งที่ผ่านการคองน้ำยาทั่วไปและคองน้ำยาสำหรับพืชสีเขียวทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์น้อยมากและสารที่เป็นส่วนประกอบของน้ำยาไม่สามารถแยกออกได้โดยวิธีประยุกต์จาก [4] ส่วนใบฝรั่งที่ผ่านการทำให้แห้งโดยการอัด herbanium อบแห้งที่อุณหภูมิ 60°ซ. และโดยใช้ซิลิกาเจลนั้น พบว่าให้คลอโรฟิลล์ที่มีปริมาณและคุณภาพด้อยกว่าใบฝรั่งสดและใบฝรั่งที่เก็บไว้ในตู้เย็น 4-8°ซ. 7 วัน แต่มีค่า OD_{260}/OD_{280} ประมาณ 1.7-1.8 เท่ากัน

เมื่อนำคลอโรฟิลล์ที่สกัดแยกได้จากใบฝรั่งสดไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase

และไพรเมอร์ขนาด 12 นิวคลีโอไทด์ชุด A-2 จำนวน 12 ชนิด พบว่ามีไพรเมอร์ 9 ชนิดให้การตอบสนองต่อปฏิกิริยาพีซีอาร์ คือ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ จากนั้นได้เลือกไพรเมอร์ A21 ซึ่งให้ผลการตรวจสอบที่ชัดเจนไปใช้ในการทำปฏิกิริยากับคลอโรฟิลล์ที่สกัดแยกได้จากใบฝรั่งที่ผ่านกระบวนการเก็บรักษาทั้ง 6 วิธี พบว่าคลอโรฟิลล์ที่สกัดแยกได้จากใบฝรั่งสดและใบฝรั่งที่เก็บไว้ในตู้เย็น 4-8°ซ. 7 วันให้ผลการตอบสนองต่อปฏิกิริยาพีซีอาร์เหมือนกันทุกประการทั้งในสายพันธุ์กลมสาเล่และ เป็นสีทอง (ภาพที่ 2)

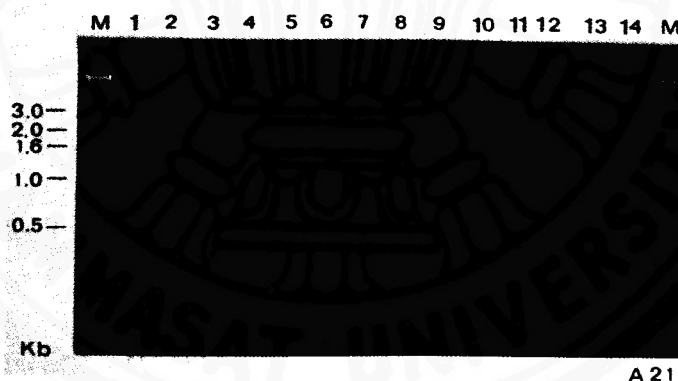


Figure 2 Pattern of DNA from PCR product by primer A21; lane 1-7 : Klomsalee and lane 8-14 :

Panseetong, M = marker DNA, 1&8 = fresh leaf, 2&9 = preservation at 4-8° C, 3&10 = preservation in 2% formalin with 12% ethyl alcohol, 4&11 = preservation in 20% saturated copper acetate in glacial acetic acid, 5&12 = dry by herbarium, 6&13 = dry by warm at 60° C, 7&14 = dry by silica gel

ส่วนดีเอ็นเอที่สกัดแยกจากใบฝรั่งที่ผ่านการคองน้ำยาทั่วไปและคองน้ำยาสำหรับพืชสีเขียวไม่ตอบสนองต่อการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ เพราะสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบของน้ำยาซึ่งไม่สามารถแยกออกได้ โดยวิธีประยุกต์จาก Agrawal และคณะอาจรบกวนปฏิกิริยาพีซีอาร์ อย่างไรก็ตามได้ทดลองทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ขึ้นโดยใช้น้ำยาสำเร็จรูป GeneClean® Spin ของ BIO 101 แต่ก็ยังไม่สามารถตอบสนองต่อปฏิกิริยาพีซีอาร์ ส่วนดีเอ็นเอที่สกัดแยกจากใบฝรั่งที่ผ่านการทำให้แห้งโดยการอัด herbanium อบแห้งที่อุณหภูมิ 60°ซ. และโดยใช้ซิลิกาเจลนั้น พบว่าสามารถให้การตอบสนองต่อปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ แต่ให้ผลการตอบสนองไม่เหมือนกับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบฝรั่งสด (ภาพที่ 2) ทั้งนี้เนื่องจากดีเอ็นเอที่สกัดแยกได้จากใบฝรั่งที่ผ่านการทำให้แห้งทั้ง 3 วิธีมีการแตกหักเสียหายเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งคุณภาพไม่ดี และเมื่อนำดีเอ็นเอที่แตกหักไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ random primer หรือทำอาร์เอพีดี (RAPD; random amplified polymorphic DNA) จะได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่และเล็กปนกัน จึงทำให้ได้จำนวนแถบดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น

4. สรุปผลการทดลอง

วิธีการเก็บรักษาใบฝรั่งที่ให้ผลดีที่สุดสำหรับการสกัดแยกดีเอ็นเอ คือ การเก็บไว้ในตู้เย็น 4-8°ซ. ซึ่งให้ผลเทียบเท่ากับใบฝรั่งสด ส่วนการเก็บรักษาใบฝรั่งโดยการทำให้แห้งด้วยวิธีการต่าง ๆ นั้น สามารถทำได้ในกรณีที่จำเป็น แต่จะให้ปริมาณดีเอ็นเอน้อยมากเมื่อเทียบกับใบสด และอาจให้ผลการตอบสนองต่อปฏิกิริยาพีซีอาร์แตกต่างไปจากใบสดได้

5. คำนิยาม

ขอขอบคุณ คณะกรรมการส่งเสริมการวิจัยเสริมหลักสูตร มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนโครงการวิจัยนี้

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- [2] Wu, W., M.J. Welsh, P.B. Kaufman, and H.H. Zhang. 1997. Method in Gene Biotechnology. CRC Press, New York. 406 p.
- [3] ชีระชัย ชนานันต์. 2541. การพัฒนาเทคนิคอาร์เอพีดี เพื่อการจำแนกและรับรองสายพันธุ์ส้มโอ. รายงานการวิจัย. ภาค วิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, กรุงเทพฯ. 59 น
- [4] Agrawal, G.K., R.N. Pandey, and V.P. Agrawal. 1992. Isolation of DNA from *Choerospondias axillaris* leaves. B iotech. Biodiv. Lett. 2:19-24.
- [5] Wilkie, S.E., P.G. Isaac and R.J. Slater. 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. Theor. Appl. Genet. 86:497-504.