การสกัดเมตาจีโนมิกส์ (METAGENOMICS EXTRACTION)

1

©ThaiMicrobiome.org

ชุดสกัดเมตาจีโนมิกส์

- DNeasy PowerSoil DNA Isolation kit (Qiagen)

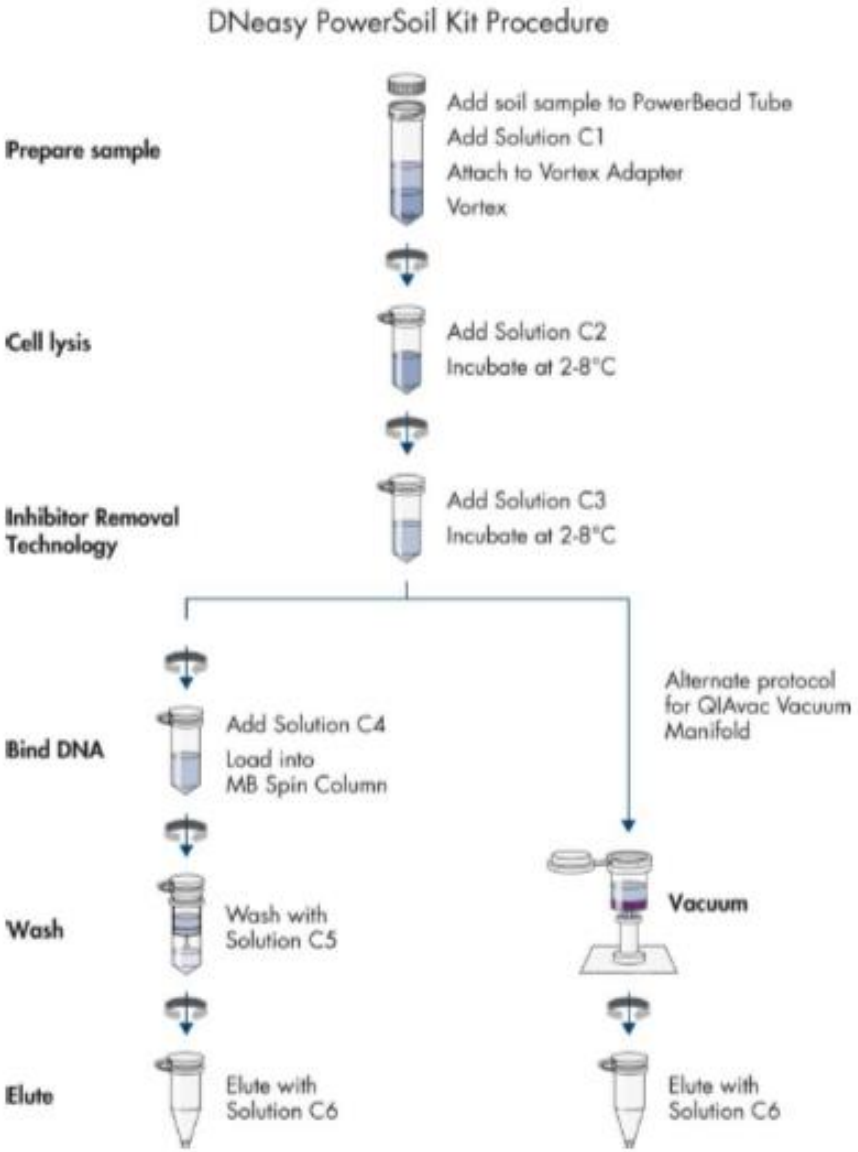


Figure 2. DNeasy PowerSoil Kit procedure.

การเตรียมตัวอย่าง

- ตัวอย่างสิ่งมีชีวิต เช่น ปลา หอย ปะการัง ฯลฯ

บดให้ละเอียดด้วยโกร่งบดยา (Mortar & Pestle)

ชั่งตัวอย่างประมาณ 0.25 - 1 กรัม

ทำตามวิธีของชุดสกัด

การเตรียมตัวอย่าง

- ตัวอย่างดิน ตะกอน

ชั่งตัวอย่างประมาณ

0.25 - 1 กรัม

ทำตามวิธีของชุดสกัด

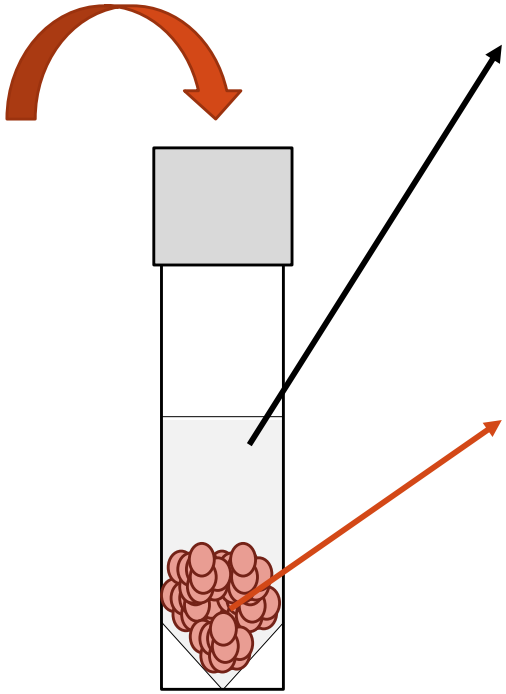
การสกัดเมตาจีโนมิกส์

การสกัดเมตาจีโนมิกส์

- ใส่ตัวอย่างที่เตรียมลงในหลอด **PowerBead tube**

หรือ

0.25-1 กรัม

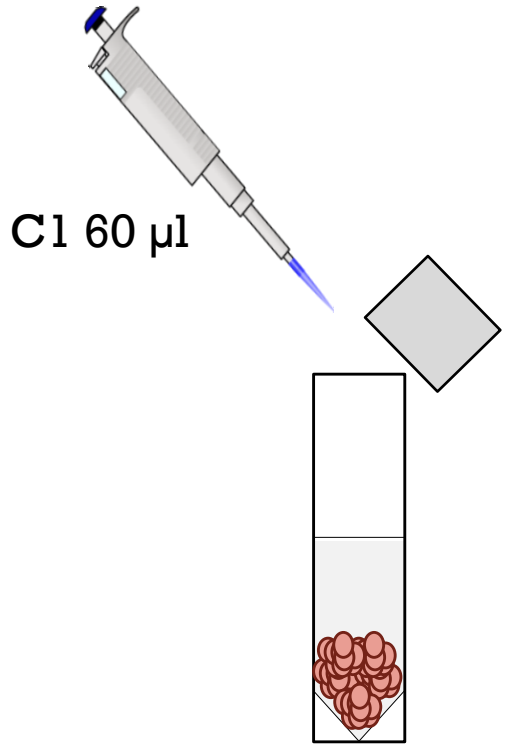


PowerBead Tube

- **Buffers**
  - ช่วยให้ตัวอย่างกระจายตัวได้ดี
  - ละลายกรดฮิวมิค (ตัวอย่างดิน)
  - ช่วยป้องกันการย่อยสลายของกรดนิวคลีอิก
- เม็ด **Beads**
  - ช่วยสำหรับการสลาย ทำให้เซลล์แตก

การสกัดเมตาจีโนมิกส์ (ต่อ)

- ใส่สารละลาย **C1**



- สารละลาย **C1** ประกอบด้วย **SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)***
- เป็น **Lysis Buffers**
  - ทำหน้าที่ทำให้เซลล์แตก เพื่อให้ดีเอ็นเอไหลออกมานอกเซลล์

*หากสารละลาย **C1** มีตะกอนให้นำไปละลายตะกอนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ก่อนใช้งาน

การสกัดเมตาจีโนมิกส์ (ต่อ)

- เขย่าด้วย **Vortex** หรือ **Bead Beater** ด้วยความเร็วสูงสุด

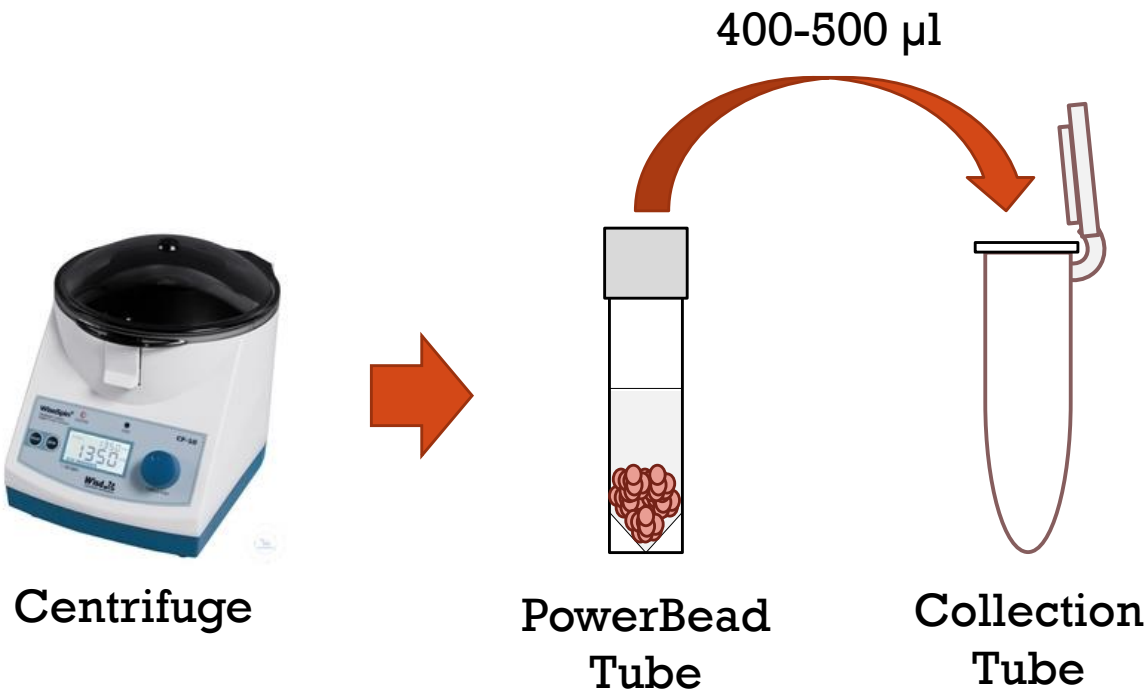
- **Homogenize and cell lysis**
  - ใช้สารละลายร่วมกับการเขย่า ช่วยทำให้เซลล์แตกได้ดีขึ้น

Vortex mixer

Bead Beater

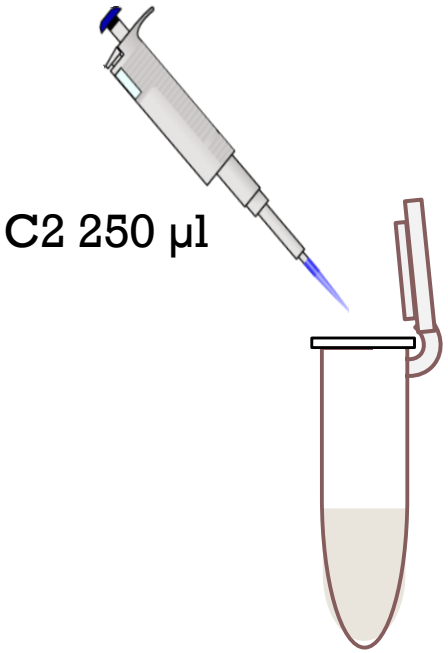
การสกัดเมตาจีโนมิกส์ (ต่อ)

- นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยง และถ่ายส่วนใสลงในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร



การสกัดเมตาจีโนมิกส์ (ต่อ)

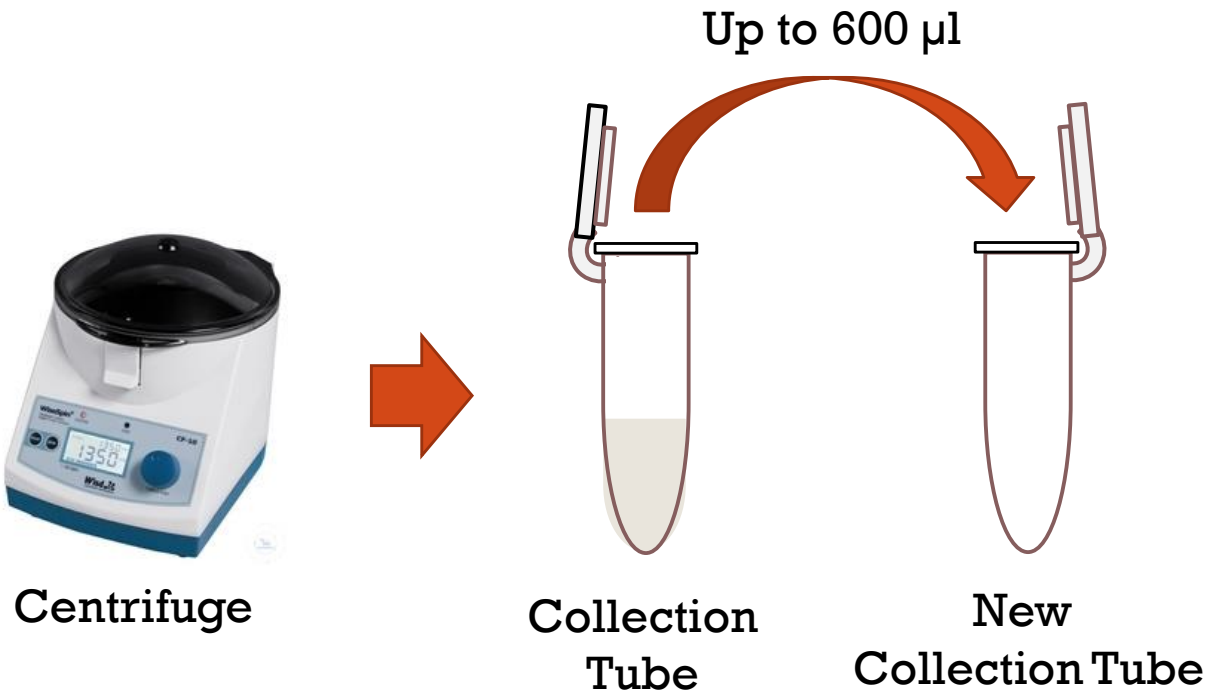
- ใส่สารละลาย **C2** และบ่มที่อุณหภูมิ **2-8** องศาเซลเซียส



- **Inhibitor Removal Technology (IRT)**
  - ช่วยตกตะกอนสารอินทรีย์ที่ไม่ใช่ดีเอ็นเอ **(non-DNA)** สารอนินทรีย์ เศษเซลล์ และโปรตีนต่าง ๆ ที่จะมีผลต่อความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ

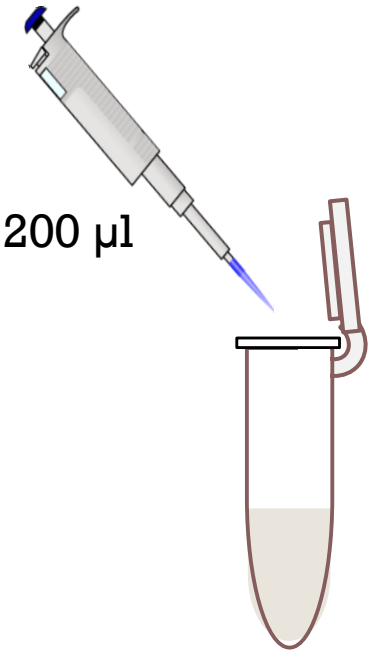
การสกัดเมตาจีโนมิกส์ (ต่อ)

- นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงและถ่ายส่วนใสโดยหลีกเลี่ยงตะกอน ลงในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร



การสกัดเมตาจีโนมิกส์ (ต่อ)

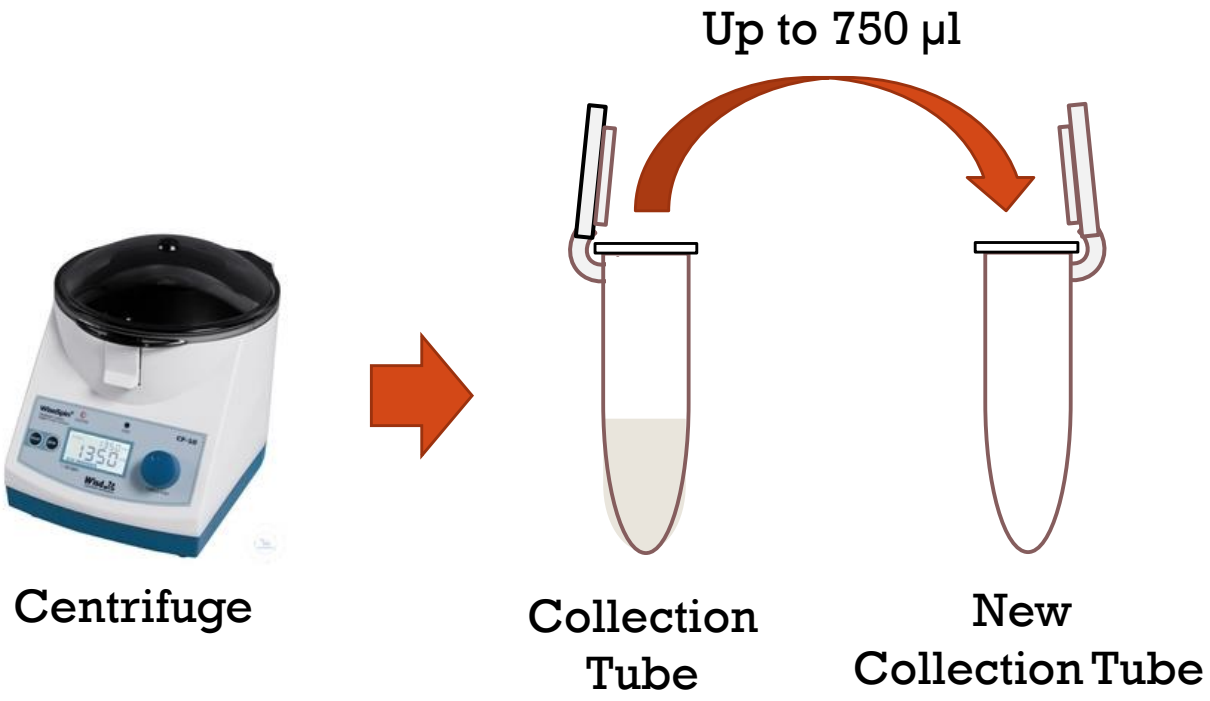
- ใส่สารละลาย C3 และบ่มที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส



- **Inhibitor Removal Technology (IRT)**
  - น้ำยาตัวที่สองที่ช่วยตกตะกอนสารอินทรีย์ที่ไม่ใช่ดีเอ็นเอ (**non-DNA**) สารอนินทรีย์ เศษเซลล์ และโปรตีนอื่น ๆ เพิ่มเติม ที่จะมีผลต่อความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ

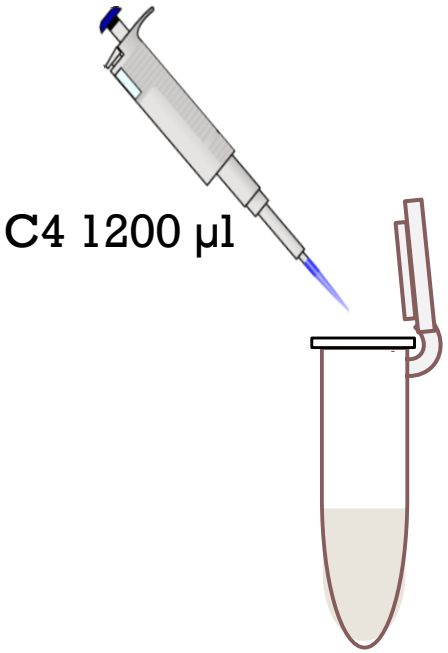
การสกัดเมตาจีโนมิกส์ (ต่อ)

- นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงและถ่ายส่วนใสโดยหลีกเลี่ยงตะกอน ลงในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร



การสกัดเมตาจีโนมิกส์ (ต่อ)

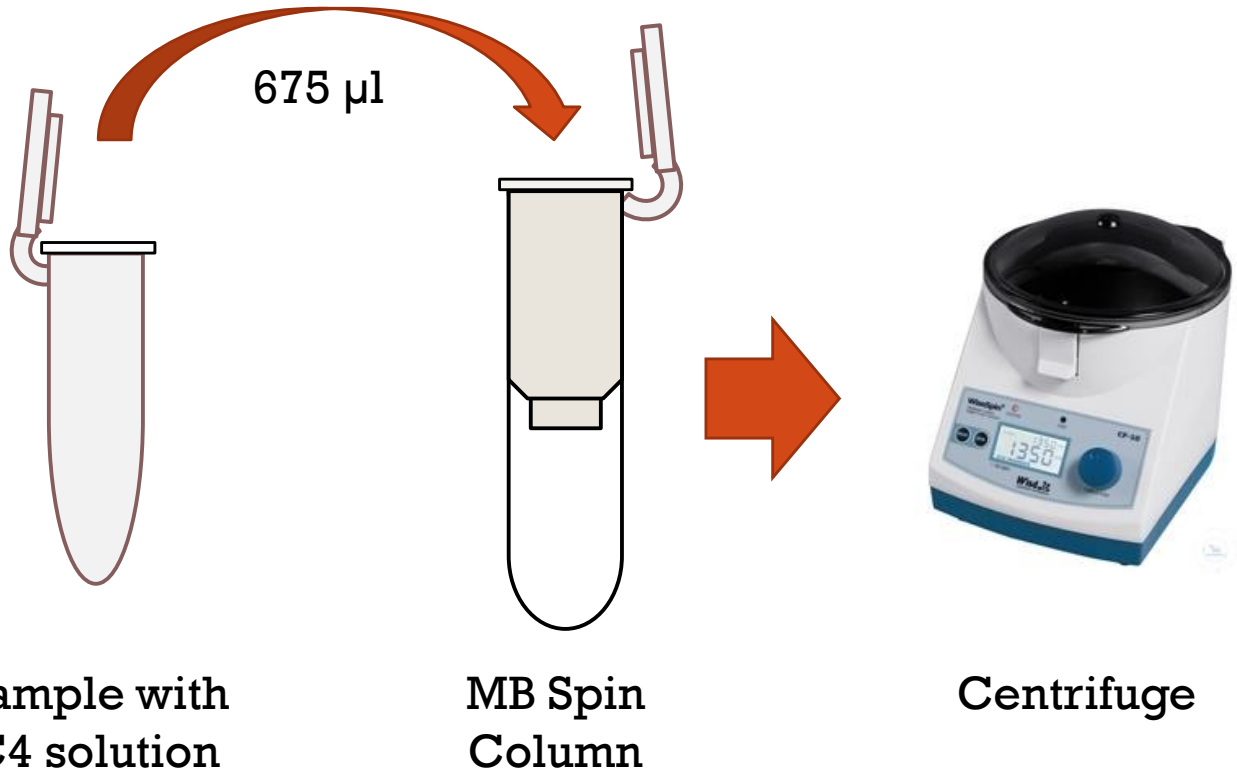
- ใส่สารละลาย **C4**



- สารละลายเกลือความเข้มข้นสูง
  - ช่วยทำให้ดีเอ็นเอสามารถจับกับซิลิกาเมมเบรน (**silica membrane**)
  - ไม่มีผลกับสารอื่น ๆ ที่ไม่ใช่ดีเอ็นเอ

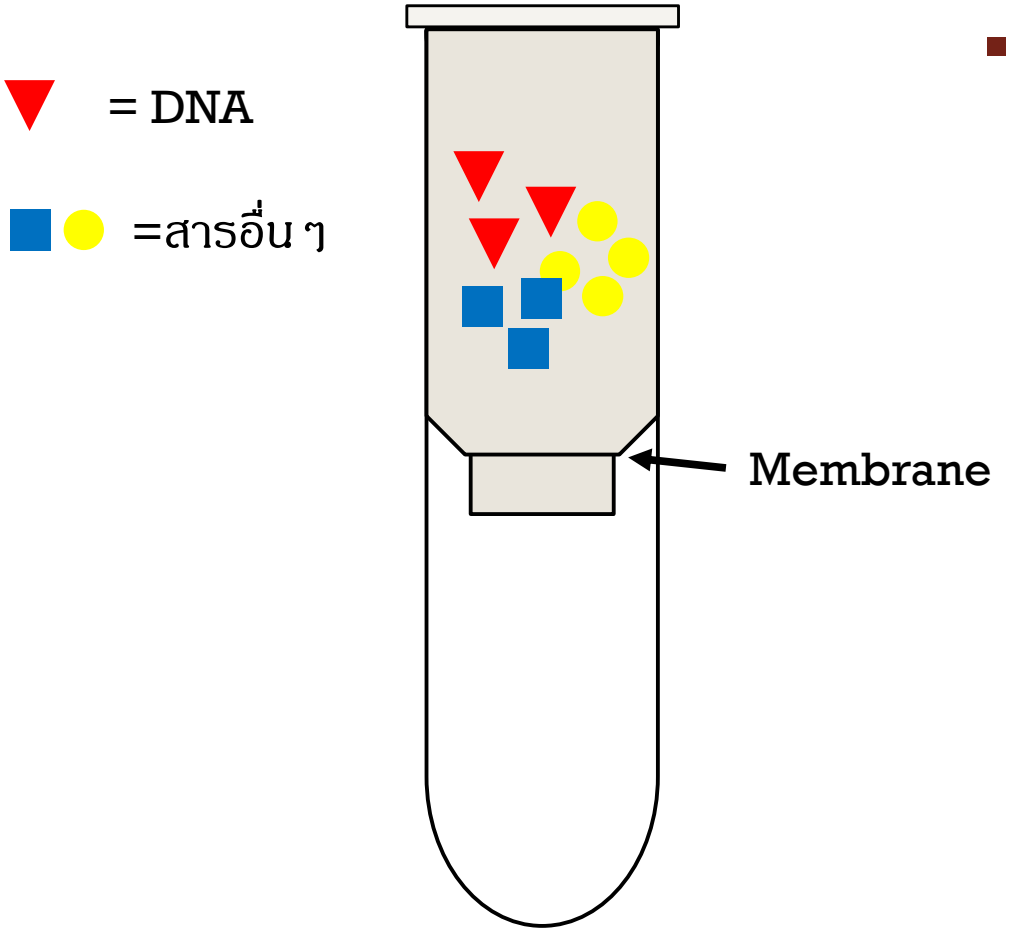
การสกัดเมตาจีโนมิกส์ (ต่อ)

- ใส่ตัวอย่างที่ผสมกับสารละลาย **C4** ลงในคอลัมน์ และนำไปปั่นเหวี่ยง



การสกัดเมตาจีโนมิกส์ (ต่อ)

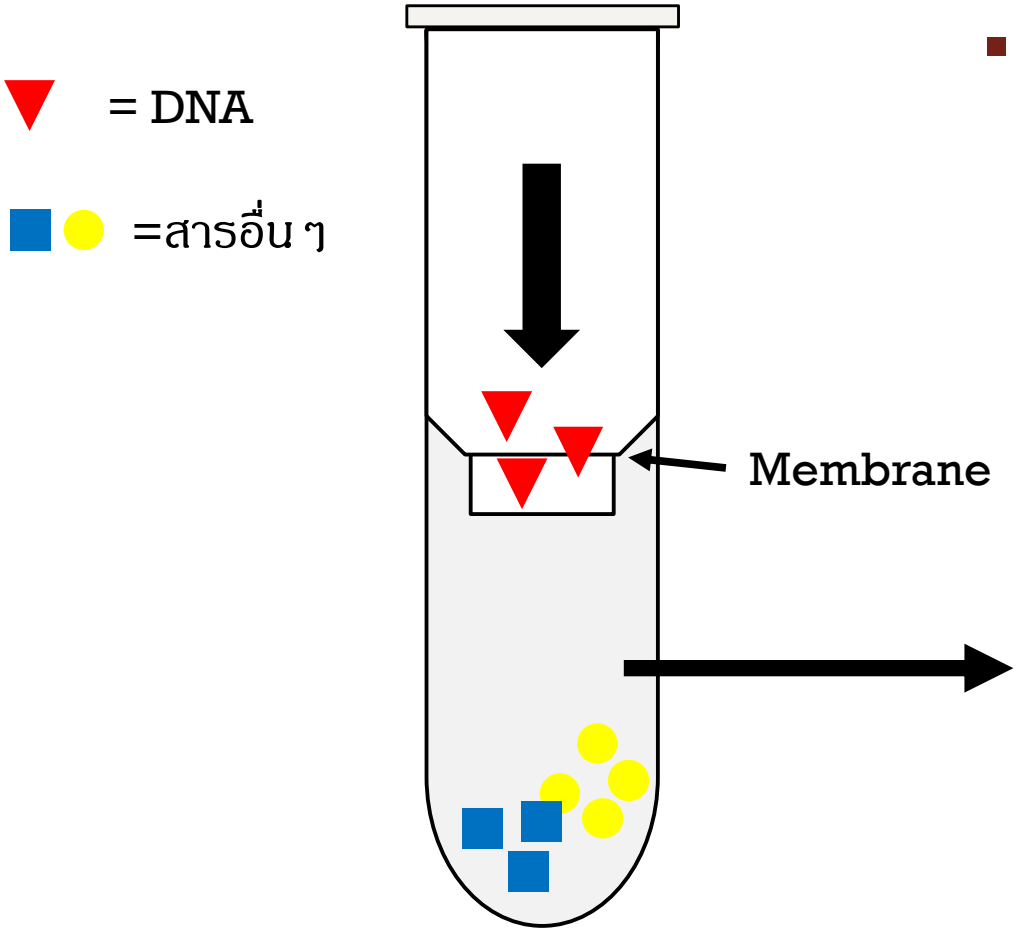
- ใส่ตัวอย่างที่ผสมกับสารละลาย **C4** ลงในคอลัมน์ และนำไปปั่นเหวี่ยง



- สารละลาย **C4** มีความเข้มข้นเกลือสูง จะช่วยให้ดีเอ็นเอสามารถจับกับแผ่นเมมเบรนได้ โดยที่สารอื่น ๆ จะไหลผ่านแผ่นเมมเบรนลงไปที่ก้นหลอด

การสกัดเมตาจีโนมิกส์ (ต่อ)

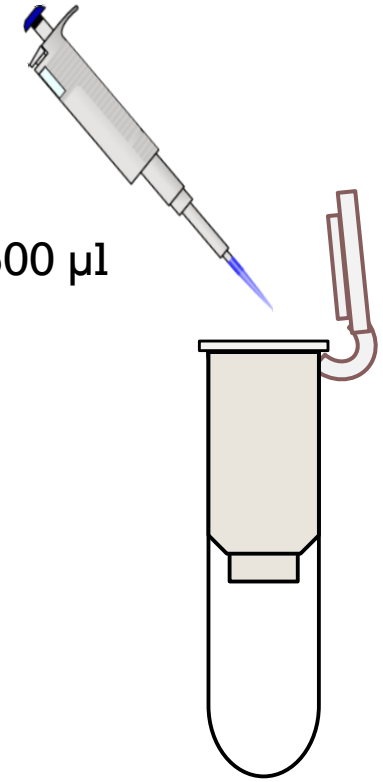
- ใส่ตัวอย่างที่ผสมกับสารละลาย C4 ลงในคอลัมน์ และนำไปปั่นเหวี่ยง



- สารละลาย C4 มีความเข้มข้นเกลือสูง จะช่วยให้ดีเอ็นเอสามารถจับกับแผ่นเมมเบรนได้ โดยที่สารอื่น ๆ จะไหลผ่านแผ่นเมมเบรนลงไปที่ก้นหลอด

การสกัดเมตาจีโนมิกส์ (ต่อ)

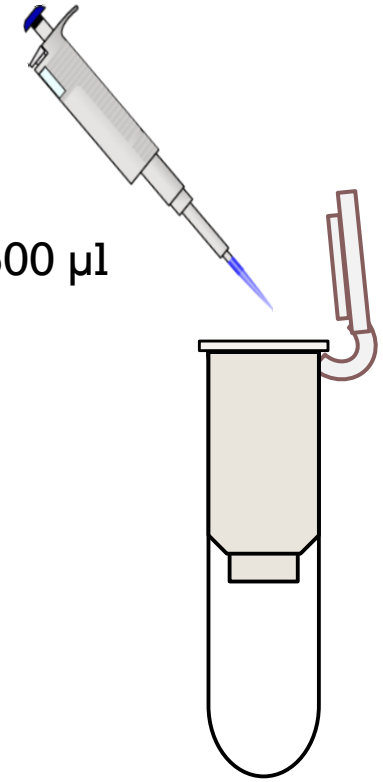
- ใส่สารละลาย **C5**



- **Ethanol based wash solution**
  - ทำหน้าที่ล้างเกลือ กรดฮิวมิค และสารอื่น ๆ ที่ยังอาจปนเปื้อนอยู่ออกจากดีเอ็นเอที่เกาะอยู่บนเมมเบรน

การสกัดเมตาจีโนมิกส์ (ต่อ)

- ใส่สารละลาย **C5**



C5 500 µl

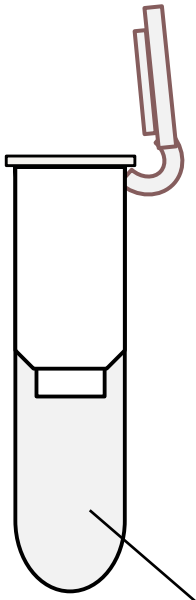
MB Spin Column

- **Ethanol based wash solution**
  - ทำหน้าที่ล้างเกลือ กรดฮิวมิค และสารอื่น ๆ ที่ยังอาจปนเปื้อนอยู่ออกจากดีเอ็นเอที่เกาะอยู่บนเมมเบรน

Centrifuge

การสกัดเมตาจีโนมิกส์ (ต่อ)

- เทส่วนใสที่ผ่านเมมเบรนทิ้ง และปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกรอบ



MB Spin Column

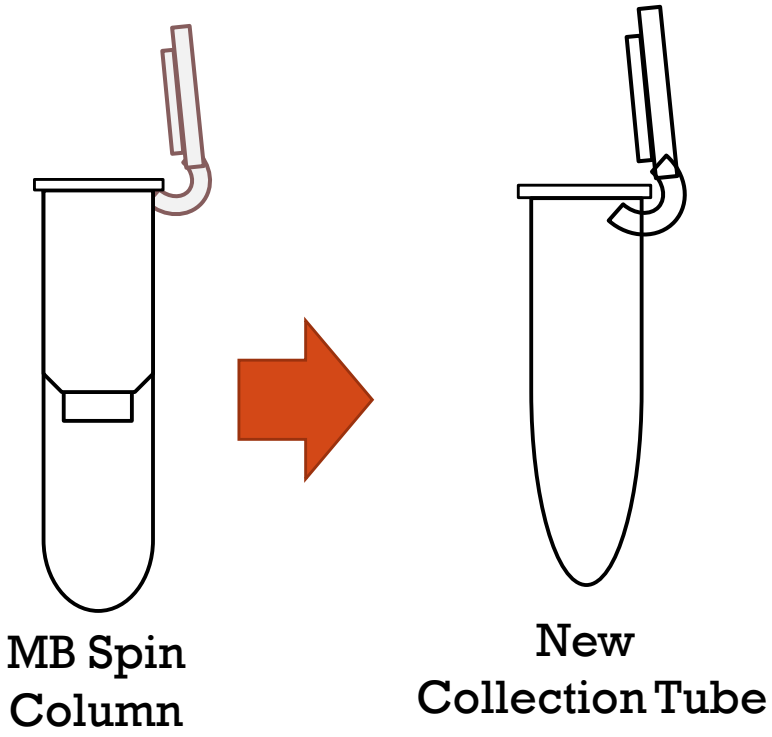
Centrifuge

ประกอบด้วยสารอินทรีย์อนินทรีย์อื่น ๆ ที่ล้างออกจากเมมเบรน

- เพื่อกำจัดสารละลาย **C5** ที่ยังอาจตกค้าง ออกให้หมด
  - เพราะเอทานอลในสารละลาย **C5** อาจไปรบกวนกระบวนการอื่น ๆ ภายหลังการสกัดดีเอ็นเอได้ เช่น **PCR**

การสกัดเมตาจีโนมิกส์ (ต่อ)

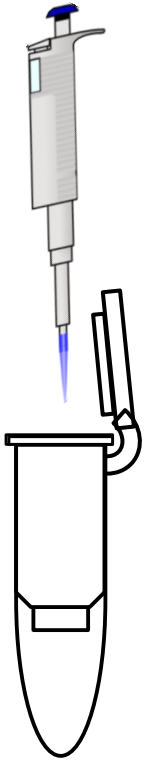
- ย้ายคอลัมน์ไปใส่ในหลอดใหม่ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร



การสกัดเมตาจีโนมิกส์ (ต่อ)

- ใส่สารละลาย **C6** และนำไปปั่นเหวี่ยง

C6 100 µl



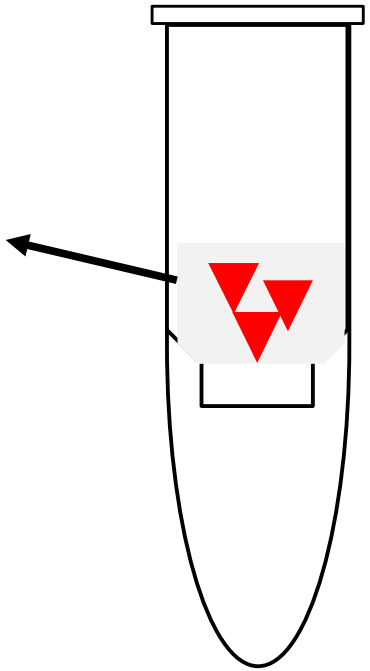
Collection Tube
with Filter Column

- **Elution buffer** ทำหน้าที่นำพาดีเอ็นเอให้ไหลผ่านซิลิกาเมมเบรน

การสกัดเมตาจีโนมิกส์ (ต่อ)

- ใส่สารละลาย **C6** และนำไปปั่นเหวี่ยง

▼ = DNA



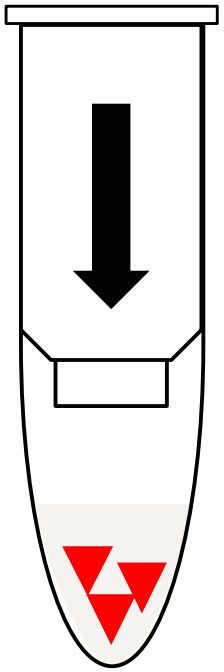
Collection Tube
with Filter Column

- **Elution buffer** ทำหน้าที่นำพาดีเอ็นเอให้ไหลผ่านซิลิกาเมมเบรน

การสกัดเมตาจีโนมิกส์ (ต่อ)

- ใส่สารละลาย **C6** และนำไปปั่นเหวี่ยง

▼ = DNA

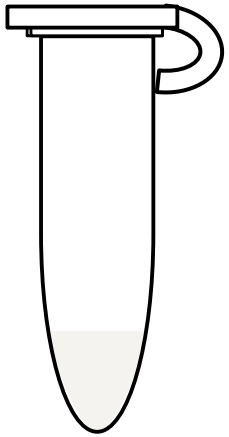


Collection Tube
with Filter Column

- **Elution buffer** ทำหน้าที่นำพาดีเอ็นเอให้ไหลผ่านซิลิกาเมมเบรน

การสกัดเมตาจีโนมิกส์ (ต่อ)

- นำเมมเบรนออก และเก็บรักษาตัวอย่างที่สกัดเสร็จแล้วที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสหรือต่ำกว่า



Extracted DNA