วิทยาสาร
ทันตแพทยศาสตร์มหิดล
MAHIDOL DENTAL JOURNAL

บทวิทยาการ

ว ทันต มหิดล ปีที่ 32 เล่มที่ 1-2, 2555

การเปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอและรูปแบบของแถบบนเจลอะคริลาไมด์ในเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอร์เรสร่วมกับดีจีจีอีโดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากคราบจุลินทรีย์เหนือเหงือกโดยวิธีการสกัด 3 วิธี

เข็มทอง มิตรกูล
ท.บ., Cert. in Pediatric Dentistry (CAGS), D. Sc. D
ภาควิชาทันตกรรมเด็ก
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

อังสุมา ชลออยู่
ท.บ., M. Sc. (Dentistry, Major: Pediatric)
ทันตแพทย์เอกชน

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: เพื่อเปรียบเทียบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอของแบคทีเรียในแผ่นคราบจุลินทรีย์ตัวอย่าง ที่ได้จากวิธีการสกัด 3 วิธีและเพื่อประเมินว่าดีเอ็นเอหลังสกัดด้วยวิธีที่ต่างกันนั้นมีผลต่อรูปแบบและจำนวนแถบบนเจลอะคริลาไมด์เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิคดีจีจีอีหรือไม่

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา: เก็บแผ่นคราบจุลินทรีย์เหนือเหงือกในกลุ่มเด็กที่มีรอยโรคฟันผุในเด็กเล็กอย่างรุนแรงและกลุ่มที่ไม่มีฟันผุ จำนวนทั้งหมด 30 คน โดยแบ่งเป็นกลุ่มละ 15 คน แล้วสกัดดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีการสกัด 3 วิธี ได้แก่ การสกัดด้วยสารฟีนอล คลอโรฟอร์ม ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ และด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป 2 ชุด คือ ชุดสกัดไคแอมป์ (QIAmp Micro Kit, Qiagen, U.S.A.) และชุดสกัดนิวคลีโอสปิน (Nucleospin Genomic Extraction kit, Macherey-Nagel, Germany) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้ไปเพิ่มปริมาณด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอร์เรสโดยใช้ไพร์เมอร์สากลที่จับกับ 16S rRNA ของเชื้อแบคทีเรีย 25 สายพันธุ์ที่สัมพันธ์กับโรคฟันผุ วิเคราะห์ผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอร์เรสบนเจลอะกาโรสเข้มข้นร้อยละ 1 จากนั้นวิเคราะห์แถบบนเจลอะคริลาไมด์ด้วยเทคนิคดีจีจีอี โดยมีสัดส่วนความเข้มข้นของเจลตั้งแต่ร้อยละ 30 ถึง 70 (ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 60 โวลต์, อุณหภูมิ 50°C นาน 16 ชั่วโมง) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอหลังสกัด จำนวนแถบบนเจลอะคริลาไมด์วิเคราะห์ทางสถิติด้วยไคร์สแควร์ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ผลการศึกษา: เมื่อตรวจสอบผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอร์เรสเมื่อใช้ดีเอ็นเอหลังสกัดจากต่างวิธีกันบนอะกาโรสเจลพบว่าไม่แตกต่างกัน ทั้งนี้ ชุดสกัดไคแอมป์ ชุดสกัดนิวคลีโอสปินและการสกัดด้วยสารฟีนอล คลอโรฟอร์ม ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ให้ปริมาณดีเอ็นเอหลังสกัดตามลำดับ ดังนี้ 4.27±0.1, 3.57±0.5, 2.97±0.02 สำหรับจำนวนแถบบนเจลอะคริลาไมด์ให้ผลจากสูงสุดไปต่ำสุด ตามลำดับ ดังนี้ 30.77±0.7, 29.37±0.9, 22.67±2.0 โดยปริมาณดีเอ็นเอหลังสกัดและจำนวนแถบที่ปรากฏบนเจลอะคริลาไมด์ นั้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ระหว่างดีเอ็นเอหลังสกัดด้วยชุดสกัดไคแอมป์และด้วยสารฟีนอล คลอโรฟอร์ม ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

บทสรุป: ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอของแบคทีเรียและจำนวนแถบที่ขึ้นบนเจลอะคริลาไมด์ด้วยเทคนิคดีจีจีอีนั้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากชุดสกัดไคแอมป์และสกัดด้วยสารฟีนอล คลอโรฟอร์ม ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

คำสำคัญ: ปริมาณดีเอ็นเอ, ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอร์เรส, เทคนิคดีจีจีอี, แผ่นคราบจุลินทรีย์เหนือเหงือก, รอยโรคฟันผุในเด็กเล็กอย่างรุนแรง

ติดต่อเกี่ยวกับบทความ:
เข็มทอง มิตรกูล
ภาควิชาทันตกรรมเด็ก
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
6 ถ. โยธี เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400
โทรศัพท์: 02-200-7821-23
โทรสาร: 02-200-7820
โทรศัพท์มือถือ: 085-256-2922
อีเมล์: mkemthong@yahoo.com
แหล่งเงินทุน: คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
วันรับเรื่อง: 26 มิถุนายน 2555
วันยอมรับการตีพิมพ์: 17 กันยายน 2555

วิทยสาร
ทันตแพทยศาสตร์มหิดล
MAHIDOL DENTAL JOURNAL
Original article

Comparison of DNA yield and band pattern in acrylamide gel in PCR-DGGE technique using extracted DNA from supra gingival plaque using three extraction methods

Kemthong Mitrakul
D.D.S., Cert. in Pediatric Dentistry (CAGS), D. Sc. D
Department of Pediatric Dentistry,
Faculty of Dentistry, Mahidol University

Aungsuma Chaloryoo
D.D.S., M. Sc. (Dentistry, Major: Pediatric)
Private practice

Correspondence author:
Kemthong Mitrakul
Department of Pediatric Dentistry
Faculty of Dentistry, Mahidol University
6 Yothi Street, Ratchathewi,
Bangkok 10400, Thailand.
Tel: 02-200-7821-23
Fax: 02-200-7820
Mobile phone: 085-256-2922
E-mail: mkemthong@yahoo.com
Research grant: Faculty of Dentistry, Mahidol University
Received: 26 June 2012
Accepted: 17 September 2012

Abstract

Objectives: To compare the bacterial DNA yields extracted from three methods and to evaluate whether the different extraction protocols could affect bacterial composition in dental biofilms as shown in acrylamide gel using PCR-DGGE technique.

Materials and methods: Supra gingiva plaque samples from both severe early childhood caries and caries free groups were collected and divided equally to provide replicates for each extraction protocol; phenol-chloroform isoamyl alcohol methods and two commercially available extraction kits which were QIAmp Micro Kit (Qiagen, USA) and Nucleospin Genomic Extraction kit (Macherey-Nagel, Germany). PCR was performed using extracted DNA from three methods as a template using the universal primers which based on 16S rRNA of 25 species associated with dental caries. All PCR products were visually examined on 1% agarose gel. After that, PCR-DGGE technique was performed with the range of denaturing gradient on acrylamide gel from 35 to 70% (V=60, tem=50°C running time = 16 hr). DNA yield and amount of bands on acrylamide gel was analyzed statistically using Chi-square test ($p<0.05$).

Results: PCR products on 1% agarose gel were not different when used extracted DNA from three methods as a template. However, extracted DNA by the phenol-chloroform isoamyl alcohol, QIAmp Micro Kit and Nucleospin Genomic Extraction kit gave DNA yields from 4.27±0.1>3.57±0.5>2.97±0.02, and amount of bands from 30.77±0.7>29.37±0.9>22.67±2.0, respectively. There were significant differences in both DNA yield and the amount of bands between extracted DNA from phenol-chloroform isoamyl alcohol and QIAmp Micro Kit ($p<0.05$).

Conclusion: DNA quanlity efficiency and number of bands using extracted DNA from QIAmp Micro Kit were significantly higher ($p<0.05$) than those from phenol-chloroform isoamyl alcohol.

Keywords: DNA yield, PCR-DGGE, supra gingival plaque, severe early childhood caries