

การสกัดพลาสมิดจากเซลล์ของแบคทีเรียสามารถทำได้โดยการใช้วิธีมาตรฐาน (วิธี alkaline lysis) ซึ่งเป็นวิธีที่ประหยัดค่าใช้จ่าย แต่มีขั้นตอนมาก และต้องใช้เวลาานาน หรืออาจใช้ชุดทดสอบในการสกัดพลาสมิด (plasmid isolation kit) ซึ่งมีขั้นตอนไม่มาก และใช้เวลาสั้น แต่ต้องเสียค่าใช้จ่ายมาก ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้ทำการพัฒนาวิธีการในการสกัดพลาสมิดจากเซลล์ของแบคทีเรียที่ประหยัดค่าใช้จ่าย และมีขั้นตอนที่รวดเร็ว ทั้งยังสามารถสกัดพลาสมิดได้โดยตรงจากโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นมีขั้นตอนดังนี้ หลังจากที่ใช้ไม้จิ้มฟันที่ปลอดเชื้อ (sterile toothpick) ทำการย้ายโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปใส่ในหลอด microcentrifuge แล้ว ให้เติมสารละลาย 0.1 N NaOH, 0.5% SDS ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในหลอด microcentrifuge ดังกล่าว จากนั้นทำให้โคโลนีของแบคทีเรียผสมได้ดีกับสารละลาย 0.1 N NaOH, 0.5% SDS โดยการ vortex เป็นเวลาประมาณ 5 วินาที จากนั้นวางส่วนผสมที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 5 นาที ก่อนที่จะนำไปศึกษาด้วยวิธี agarose gel electrophoresis จากการเปรียบเทียบ การสกัดพลาสมิดโดยตรงจากโคโลนีของแบคทีเรียโดยใช้วิธีการที่พัฒนาขึ้นในการศึกษานี้ กับ การสกัดพลาสมิดโดยตรงจากโคโลนีของแบคทีเรีย โดยใช้วิธีของ Barnes และโดยใช้ชุดทดสอบจากต่างประเทศ พบว่าวิธีการที่พัฒนาขึ้นในการศึกษานี้มีค่าใช้จ่ายน้อยที่สุด (ประมาณห้าสิบบาทต่อการสกัดพลาสมิดจากโคโลนีของแบคทีเรียจำนวน 100 โคโลนี) ใช้เวลาค่อนข้างน้อยในการสกัดพลาสมิดแต่ละครั้ง (ประมาณ 5 นาที) และไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์เพิ่มเติมในการสกัดพลาสมิด

Bacterial plasmid isolation can be done by using standard method (alkaline lysis method) which is inexpensive but time-consuming or by using plasmid isolation kits which are rapid and simple but costly. In this study, a rapid and inexpensive plasmid isolation method was developed. It could be used to isolate plasmid DNA directly from bacterial colonies. The optimized protocol was found as follow. Bacterial colonies were transferred using sterile toothpicks from an agar plate to a microcentrifuge tube. The bacterial colonies were mixed well with 50  $\mu$ l of 0.1 N NaOH, 0.5% SDS by vortexing for 5 sec. After the mixture was incubated at room temperature for 5 min, it was subjected to agarose gel electrophoresis. Comparison of plasmid isolation using the newly developed method to that using the method of Barnes and using plasmid isolation kits showed that the newly developed method was the most inexpensive (about half a baht per 100 reactions), rapid (about 5 min) and required no additional equipment.