

Pemurnian DNA Plasmid Puc19 Menggunakan Kolom Silika dengan Denaturan Urea

Annisa Nur Aini, Purbowatiningrum Ria S., Agustina L.N. Aminin

Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro Semarang

Email: agustina_ina@undip.ac.id

ABSTRAK

Pemurnian DNA plasmid berbasis silika didasarkan pada fakta bahwa DNA dapat dimurnikan menggunakan fase padat seperti silika dengan adanya denaturan. Adsorpsi DNA pada permukaan silika merupakan alternatif metode pemurnian yang efektif dan efisien dibandingkan metode pemurnian konvensional. Prinsip metode ini adalah pengikatan molekul air oleh denaturan dan adanya ikatan hidrogen antara gugus fosfat DNA dengan gugus silanol (SiOH) pada permukaan silika. DNA plasmid pUC19 diisolasi dari sel inang *E.coli* JM109 menggunakan metode lisis alkali dan dimurnikan dengan dua metode, yaitu ekstraksi fenol-kloroform dan kolom silika. Hasil kemurnian DNA plasmid menggunakan kolom dengan silika 5 mg pada konsentrasi urea 6 M sebesar 1,36. Nilai tersebut lebih tinggi dibandingkan hasil pemurnian dengan ekstraksi fenol:kloroform-isoamil alkohol yaitu sebesar 1,28. Variasi konsentrasi urea 5-9 M pada kolom dengan silika gel 5 mg dan 25 mg digunakan untuk mengetahui profil kapasitas urea sebagai agen denaturan pada pemurnian DNA plasmid. Hasil analisis secara spektrofotometri menunjukkan nilai kemurnian DNA plasmid pada konsentrasi urea 6-8 M berada pada kisaran 1,33 dan 1,48. Konsentrasi DNA plasmid tertinggi diperoleh pada kolom silika gel 25 mg dengan urea 8 M, sebesar 645 µg/mL.

Keywords: DNA plasmid, pemurnian, kolom silika gel, denaturan, urea

PENDAHULUAN

DNA plasmid dengan kualitas dan kuantitas tinggi sangat dibutuhkan dalam teknologi DNA rekombinan seperti teknik kloning dan terapi gen (Kotchoni dkk., 2003; Herison dkk., 2003). Dalam dua dekade terakhir, pemurnian DNA plasmid menjadi prosedur rutin di lingkungan laboratorium maupun industri. Penggunaan metode pemurnian konvensional diantaranya teknik sentrifugasi dalam gradien CsCl-EtBr (Cesium Klorida-Etidium Bromida) (Clewell dan Helinski, 1969) serta ekstraksi fenol:kloroform-isoamil alkohol yang tergolong kurang efektif dan efisien, karena membutuhkan waktu lebih lama dan prosedur kerja yang lebih rumit. Metode yang banyak diaplikasikan saat ini adalah pemurnian DNA plasmid berbasis silika (Boom dkk., 1990; Hengen, 1995) dan menjadi alternatif metode yang efektif dan efisien.

Prinsip pemurnian DNA dengan silika adalah pengikatan molekul air oleh denaturan serta adanya interaksi hidrogen antara DNA dengan permukaan silika sehingga membuat DNA dapat tertarik pada permukaan silika (Carter dan Milton, 1993). Protein dan pengotor lain tidak

terikat sehingga dapat dihilangkan melalui proses pencucian dengan larutan pencuci yang sesuai. Metode ini mudah dan cepat dilakukan serta dapat menghasilkan DNA dengan kemurnian lebih tinggi (Li dkk., 2010). Pemurnian DNA berbasis silika umumnya menggunakan denaturan dan Rabilloud (1998) melaporkan bahwa urea dapat digunakan sebagai denaturan protein pada konsentrasi 6-8 M. Bennion dan Daggett (2003) menyatakan terdapat dua kemungkinan mekanisme denaturasi protein oleh urea, yaitu mekanisme secara langsung maupun tidak langsung. Pada mekanisme secara langsung, urea berinteraksi dengan residu polar dan tulang punggung peptida, sedangkan pada mekanisme tidak langsung disebutkan bahwa urea mendenaturasi protein dengan mengikat air yang terdapat di sekitar protein. Sama seperti halnya pada protein, urea dimungkinkan dapat mengikat air yang terdapat di sekitar DNA dan permukaan silika sehingga memberikan peluang bagi DNA untuk dapat terikat pada permukaan silika.

Studi kemampuan urea dalam denaturasi protein terus dilakukan, tetapi hingga saat ini penggunaan urea sebagai denaturan makromolekul pada umumnya diaplikasikan

dalam proses DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). Sejauh ini belum dilaporkan penggunaan urea sebagai denaturan untuk pemurnian DNA. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Boyle dan Lew (1995), 1 mg *silicon dioxide* dapat mengikat 3 - 4,5 µg DNA. Pemurnian DNA berbasis silika umumnya menggunakan konsentrasi silika 10% (Hengen, 1995; Li dkk. 2010) dan 50% (Luka, 2000).

Penelitian ini bertujuan mendapatkan informasi kemurnian DNA plasmid pada dua metode pemurnian yang berbeda dan profil kapasitas urea dalam pemurnian DNA plasmid dengan metode kolom silika gel.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan

Escherichia coli JM109 dan plasmid pUC19 diperoleh dari Lab. Biokimia, Jurusan Kimia, F-MIPA, ITB. Bahan-bahan lain diperoleh dari Sigma, seperti: Ampisilin, bacto agar, TAE (Tris-Asetat EDTA), CaCl₂.2H₂O, ekstrak ragi, EtBr (Etidium Bromida), gel agarosa, glukosa, isoamil alkohol, IPTG (Isopropil Thio-β-D-Galaktosid), kloroform, *loading dye* (0,25% *bromphenol blue*, 40% sukrosa), Natrium asetat, Natrium EDTA, SDS (Sodium Dodesil Sulfat), Kalium asetat, Fenol, Bubuk silika-gel (Kiselgel 60), Tripton, Tris-HCl, Urea, Xgal (5-Bromo,4-Kloro,3-Indolil-β-D-Galaktopiranosid).

Cara Kerja

1. Perbanyak plasmid melalui kloning pUC19 pada sel inang E.coli JM109

Kompetensi sel bakteri *E.coli* JM109 dilakukan dengan perendaman sel pada larutan CaCl₂ 100 mM selama 1 jam. Sel yang telah kompeten ditambahkan 2 µL plasmid pUC19 dan diinkubasi dalam es selama 20 menit, kemudian diberikan kejutan panas pada suhu 42 °C selama 90 detik. Suspensi sel bakteri ditambahkan media LB cair hingga volume 1 mL dan diinkubasi selama 1,5 jam. Seleksi hasil transformasi dilakukan dengan menambahkan 25 µL Xgal dan 25 µL IPTG pada 100 µL sel transforman. Suspensi sel ditumbuhkan dalam media LB agar mengandung ampisilin. Adanya sel transforman ditunjukkan dengan terbentuknya koloni berwarna biru pada media agar.

2. Isolasi dan pemurnian DNA plasmid

DNA plasmid diisolasi menggunakan metode lisis alkali (Sambrook dan Russell, 2001). Pelet sel dicampur dengan 100 µL larutan I, diresuspensi dan diinkubasi pada temperatur ruang selama 5 menit. Larutan kemudian ditambahkan 200 µL larutan II, dibolak-balik 4-6 kali dan diinkubasi pada temperatur ruang selama 5 menit. Selanjutnya ditambahkan 150 µL larutan III, dibolak-balik 4-6 kali dan diinkubasi dalam es selama 5 menit. Supernatan diperoleh dengan sentrifugasi 12000 rpm pada T ruang selama 10 menit (Faatih, 2009).

Pemurnian dengan fenol:kloroform-isoamil alkohol dilakukan dengan menambahkan 1x vol. phenol:kloroform-isoamil alkohol ke dalam supernatan hasil isolasi, divortex dan disentrifugasi pada 12000 rpm selama 5 menit. Lapisan atas diambil dan ditambahkan kloroform isoamil alkohol 1:1 (v/v), divortex dan disentrifugasi pada 12000 rpm selama 5 menit. Lapisan atas kembali diambil dan ditambahkan 1/10 volume Natrium asetat 3 M dan 2x volume etanol absolut dingin, dicampur lalu diinkubasi pada freezer selama 30 menit. Pelet DNA diperoleh dengan sentrifugasi pada 12000 rpm selama 5 menit, kemudian dicuci dengan etanol 70% lalu disentrifugasi kembali. Selanjutnya pelet diangin-anginkan selama 10 menit dan ditambahkan larutan TE sebanyak 50 µL (Faatih, 2009).

Pemurnian dengan kolom silika gel dilakukan dengan menambahkan 50 µL suspensi silika gel 5 mg ke dalam kolom dan supernatan hasil isolasi dimasukkan ke dalam kolom tersebut. Selanjutnya, ditambahkan 500 µL larutan urea dengan konsentrasi 6 M, diresuspensi dan didiamkan selama 2 menit. Tabung disentrifugasi pada 12000 rpm selama 30 detik. Supernatan yang melawati kolom dibuang dan ke dalam pelet ditambahkan 500 µL larutan pencuci (20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, etanol 50%) serta divortex. Pelet DNA diperoleh kembali dengan sentrifugasi 12000 rpm 30 detik. Proses pencucian dilakukan dua kali dan setelah sentrifugasi ketiga, sisa supernatan diambil menggunakan pipet. Pelet DNA diangin-anginkan selama beberapa menit kemudian ditambahkan 50 µL larutan TE. Tabung selanjutnya diinkubasi pada suhu 50 °C selama 2 menit dan larutan DNA plasmid diperoleh dengan sentrifugasi pada 12000

rpm selama 2 menit (Li dkk., 2010). Perlakuan yang sama diterapkan pada variasi konsentrasi urea 5-9 M pada kolom dengan silika gel 5 mg dan 25 mg dilakukan untuk mendapatkan profil kapasitas urea dalam pemurnian DNA plasmid.

3. Elektroforesis gel agarosa

Gel agarosa (1%) dibuat dengan melarutkan 0,3 gram agarosa ke dalam larutan TAE 1X hingga volume 30 mL. Larutan agarosa dididihkan hingga larut sempurna. Suhu larutan agarosa diperiksa, jika suhunya sudah turun sekitar 50-60°C, ditambahkan 1 µL EtBr. Larutan agarosa dituangkan ke dalam baki gel agarosa, dibiarkan hingga larutan berubah menjadi gel yang padat. Baki yang telah berisi gel agarosa dimasukkan ke dalam tangki elektroforesis dan tambahkan buffer TAE hingga gel terendam seluruhnya. Sejumlah 10 µL unit DNA hasil isolasi yang telah dicampur dengan *loading dye* (0,25% *bromphenol blue*, 40% sukrosa) dimasukkan ke dalam sumur gel. Waktu *running* 45-60 menit dengan voltase 100 V. Gel hasil elektroforesis diamati di bawah sinar *UV* menggunakan *UV* Transiluminator.

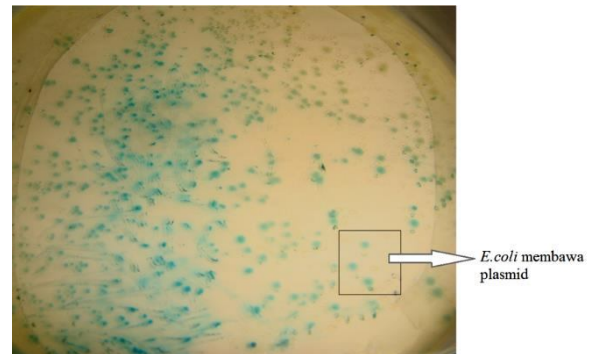
4. Pengukuran konsentrasi DNA dan Protein

Sejumlah 50 µL larutan DNA plasmid diencerkan menggunakan larutan TE hingga 5 ml dan diukur serapannya pada panjang gelombang 260 nm untuk menentukan konsentrasi DNA dan 280 nm untuk menentukan konsentrasi protein, dengan larutan TE sebagai blanko. Data yang diperoleh dicatat sebagai absorbansi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Kloning Plasmid pUC19 dengan sel inang *E.coli* JM109

Hasil transformasi ditunjukkan dengan adanya koloni-koloni biru seperti tampak pada gambar 1.

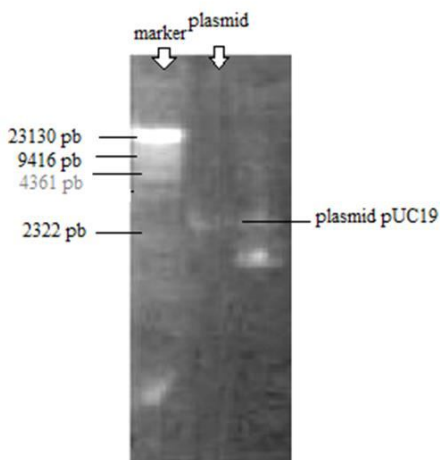


Gambar 1. Hasil transformasi *E. coli* JM109 pembawa plasmid pUC19

Bakteri *Escherichia coli* JM109 dapat menerima plasmid karena selnya telah dibuat kompeten. Kompetensi sel dilakukan menggunakan larutan garam CaCl_2 . Proses masuknya plasmid dalam sel bakteri terjadi pada saat perlakuan kejutan panas (*heat shock*) (Sambrook dan Russell, 2001). Bakteri yang telah ditransformasi ditumbuhkan dalam media agar mengandung ampicilin dan Xgal (suatu analog laktosa)/IPTG (isopropiltiogalaktosid). Transformasi berhasil ditunjukkan dengan tumbuhnya koloni-koloni berwarna biru (gambar 1.1), yakni bakteri *Escherichia coli* JM109 yang mengandung plasmid. Koloni biru muncul karena bakteri mengekspresikan gen *Lac Z* pada plasmid pUC19 yang merupakan gen pengkode β -galaktosidase.

2. Perbandingan Dua Metode Pemurnian DNA Plasmid

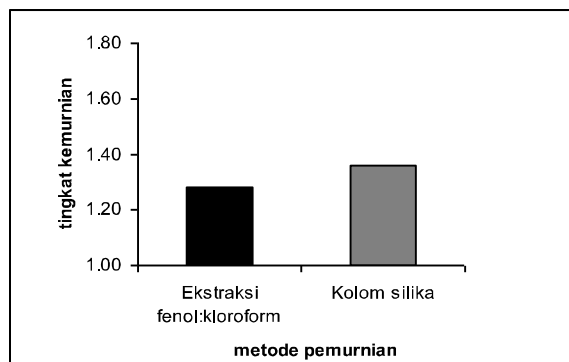
DNA plasmid diisolasi dengan metode lisis alkali (Sambrook dan Russell, 2001) sedangkan pemurnian DNA plasmid dilakukan dengan dua cara, yaitu ekstraksi fenol:kloroform-isoamil alkohol (Sambrook dan Russell, 2001) dan kolom silika gel (Li dkk., 2010). Identifikasi secara kualitatif dilakukan dengan elektroforesis gel agarosa. Dari elektroforegram pada gambar 2, tampak pita DNA plasmid terletak di antara pita berukuran 4361 pb dan 2322 pb, sebagaimana yang terdapat pada marker DNA λ . Dari ukuran tersebut dapat diperkirakan bahwa ukuran pita DNA plasmid yang diperoleh sekitar 2686 pb.



Gambar 2. Elektroforegram DNA plasmid

Isolasi DNA plasmid dengan metode lisis alkali meliputi proses resuspensi sel, lisis sel, dan netralisasi (Sambrook dan Russell, 2001). Pelet sel diresuspendi dengan larutan yang terdiri dari Tris-EDTA dan glukosa. Dinding sel dan membran sel bakteri pecah karena proses pelisisan sel. Larutan pelisis dinding sel mengandung SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*) dan NaOH. Natrium hidroksida berfungsi membuat kondisi menjadi alkali ($\text{pH} < 12,5$) (Kenrick dkk., 2007) sehingga dinding sel akan pecah dan menyebabkan DNA kromosom dan plasmid terdenaturasi. Proses netralisasi dengan larutan kalium asetat ($\text{pH} 4,8$) dan asam asetat glasial menyebabkan DNA kromosom dan plasmid mengalami renaturasi.

Analisis kuantitatif dilakukan dengan metode spektrofotometri *UV* dan hasilnya tampak pada Gambar 3. Pada Gambar 3, tampak bahwa nilai kemurnian DNA plasmid dengan kolom silika gel lebih besar dibandingkan kemurnian DNA plasmid hasil ekstraksi fenol:kloroform-isoamil alkohol. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa urea memiliki kapasitas untuk digunakan sebagai alternatif agen denaturan dalam pemurnian DNA menggantikan guanidin HCl atau guanidin tiosianat yang umum digunakan. Selain itu, secara ekonomi urea jauh lebih murah dibanding kedua agen tersebut.



Gambar 3. Perbandingan kemurnian DNA plasmid pada dua metode

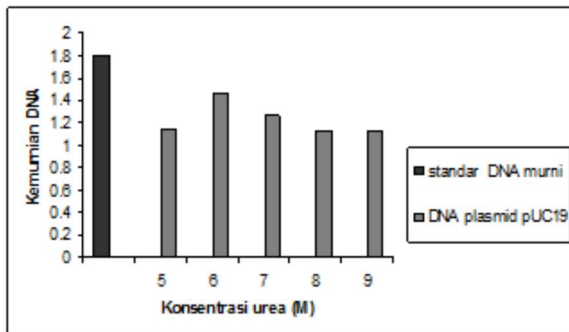
Prinsip metode pemurnian DNA plasmid menggunakan ekstraksi fenol:kloroform-isoamil alkohol didasarkan pada perbedaan kelarutan DNA dan protein di dalam pelarut organik (Sambrook dan Russell, 2001). DNA plasmid akan terlarut dalam lapisan yang lebih polar (lapisan *aqueous*), protein berada di antara lapisan atas dan bawah sedangkan lapisan bawah merupakan fase organik (Sambrook dan Russell, 2001); (Kurien dan Scofield, 1994). Purifikasi menggunakan kolom silika-gel dengan garam berkonsentrasi tinggi dilakukan berdasarkan kemampuan silika dalam mengikat DNA. Urea sebagai agen *chaotropic* (denaturan) memiliki kemampuan mendenaturasi makromolekul. Dalam lingkungan garam *chaotropic* yang tinggi, senyawa silika dapat berikatan dengan molekul DNA, kontaminan lain hanya mempunyai afinitas yang rendah terhadap silika sehingga dapat dihilangkan dari silika tersebut. Dalam hal ini, secara teknik metode kolom silika menggunakan agen denaturan urea jauh lebih mudah dan aman karena tidak melibatkan penggunaan senyawa organik yang berpotensi merusak struktur DNA.

3. Profil Kapasitas Urea dalam Pemurnian DNA Plasmid

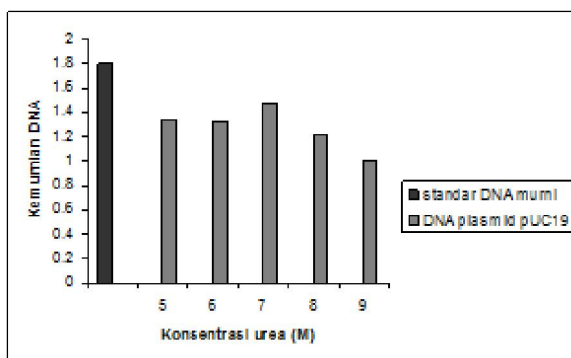
Studi kapasitas urea sebagai agen denaturan dalam pemurnian DNA pada kolom silika, dilakukan menggunakan variasi konsentrasi urea 5-9 M dengan variasi silika 5 dan 25 mg. Profil kapasitas urea dalam pemurnian DNA plasmid baik pada silika 5 mg maupun 25 mg menunjukkan nilai kemurnian pada kisaran 1,3 dan 1,4 (Gambar 4 dan 5). Nilai tersebut menunjukkan kemurnian DNA plasmid yang diperoleh masih belum optimal dibandingkan

dengan nilai standar DNA murni yaitu 1,8-2,0 (Sambrook dan Russell, 2001). Kemurnian yang belum optimal menandakan masih terdapat protein yang terjebak dalam kolom. Secara umum, profil tingkat kemurnian DNA plasmid baik pada kolom dengan silika 5 mg maupun 25 mg mirip satu sama lain, dimana kemurnian tertinggi diperoleh pada kadar urea 6 atau 7 M.

Secara umum nilai kemurnian DNA plasmid yang diperoleh pada penggunaan kolom dengan silika gel 5 mg dan 25 mg pada konsentrasi urea 5-9 M relatif belum memenuhi nilai standar DNA murni, tetapi konsentrasi DNA plasmid yang dihasilkan terlihat mencolok pada beberapa variasi. Pada konsentrasi urea 5-7 M, kemurnian relatif lebih tinggi tetapi konsentrasi DNA plasmid yang diperoleh tidak begitu besar. Ini disebabkan pada konsentrasi urea 5-7 M, kapasitas urea dalam mengikat air di sekitar DNA masih rendah sehingga membuat DNA yang terikat pada permukaan silika gel juga lebih sedikit. Akan tetapi, pada konsentrasi urea 8-9 M, walaupun kapasitas pengikatan urea terhadap air di sekitar protein juga masih relatif rendah, namun urea sudah mulai merusak protein dan membuat protein teragregasi.

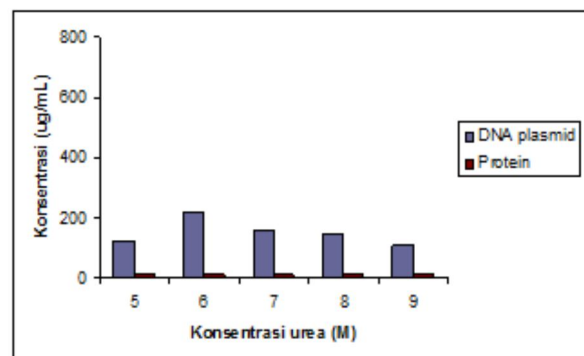


Gambar 4. Grafik profil kemurnian DNA plasmid pada kolom dengan silika gel 5 mg pada variasi konsentrasi urea 5-9 M

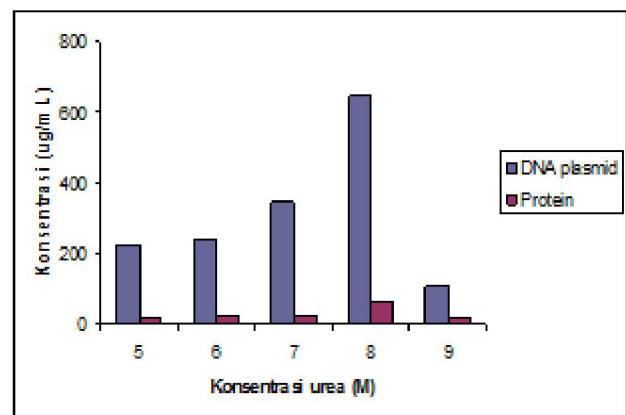


Gambar 5. Grafik profil kemurnian DNA plasmid pada kolom dengan silika gel 25 mg pada variasi konsentrasi urea 5-9 M

Gambar 6 dan 7 menunjukkan konsentrasi DNA plasmid dan konsentrasi protein yang diperoleh. Konsentrasi DNA plasmid yang diperoleh menggunakan kolom dengan silika gel 25 mg relatif lebih besar dibandingkan pada kolom dengan silika gel 5 mg. Hal ini mengindikasikan bahwa penggunaan silika dalam jumlah lebih besar, lebih optimal mengikat DNA atau dengan kata lain sebagian besar DNA hilang bersama larutan pada silika 5 mg akibat tidak sepadannya jumlah gugus silanol yang tersedia untuk mengikat DNA.



Gambar 6. Grafik perbandingan konsentrasi DNA plasmid dan protein pada kolom dengan silika gel 5 mg pada variasi konsentrasi urea 5-9 M



Gambar 7. Grafik perbandingan konsentrasi DNA plasmid dan protein pada kolom dengan silika gel 25 mg pada variasi konsentrasi urea 5-9 M

Urea mendenaturasi protein dengan merusak ikatan hidrogen pada molekul air di sekitar gugus hidrofobik yang menyebabkan terjadinya penurunan interaksi hidrofobik antara air dan molekul protein (Nandel dkk, 1998). Kestabilan protein menurun dan protein menjadi teragregasi. Protein yang teragregasi akan mengendap dan terjebak di antara partikel silika gel sehingga menyebabkan kemurnian yang diperoleh belum optimal.

Pada konsentrasi urea 8 M (Gambar 7) konsentrasi DNA yang diperoleh sangat tinggi. Pada konsentrasi tersebut dimungkinkan molekul urea dapat mengikat sebagian besar molekul air yang terdapat di sekitar DNA sehingga jumlah DNA yang terikat pada permukaan silika gel menjadi bertambah. Namun di sisi lain, urea dimungkinkan juga mulai merusak struktur protein secara lebih menyeluruh sehingga membuat protein semakin kehilangan kestabilan (Nandel dkk., 1998). Jumlah protein yang teragregasi dan mengendap dalam kolom semakin banyak sehingga mengurangi kemurnian DNA plasmid yang diperoleh. Ini ditunjukkan bahwa pada konsentrasi urea 8 M, konsentrasi protein yang diperoleh juga paling besar.

Pada konsentrasi urea 9 M, selain menyerang protein, urea juga mulai menyerang DNA. Ini menyebabkan nilai kemurnian dan konsentrasi DNA plasmid yang diperoleh semakin rendah. DNA yang terdegradasi menjadi untai tunggal atau nukleotida bebas mempunyai afinitas yang lebih rendah terhadap permukaan silika gel dan dapat larut oleh etanol pada saat proses pencucian (Padhye dkk., 1998) sehingga mengurangi konsentrasi DNA yang diperoleh.

Secara umum, kemurnian DNA plasmid yang diperoleh pada penelitian ini masih belum optimal, namun hasil yang diperoleh relatif lebih baik dibandingkan dengan pemurnian menggunakan ekstraksi fenol:kloroform-isoamil alkohol. Pada pemurnian menggunakan kolom dengan silika gel 25 mg pada konsentrasi urea 8 M dihasilkan DNA plasmid dengan konsentrasi paling besar. Ini menandakan bahwa konsentrasi urea 8 M mempunyai potensi yang cukup baik untuk digunakan dalam pemurnian DNA plasmid.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa nilai kemurnian DNA

plasmid menggunakan kolom silika gel sebesar 1,36; nilai tersebut lebih besar dibandingkan pemurnian dengan ekstraksi fenol:kloroform-isoamil alkohol sebesar 1,28. Nilai kemurnian DNA plasmid pada konsentrasi urea 5-8 M berada pada kisaran 1,33 dan 1,48 sementara untuk konsentrasi urea 5 M dan 9 M nilai kemurnian turun menjadi sekitar 1,01 dan 0,98. Konsentrasi DNA plasmid paling tinggi diperoleh menggunakan konsentrasi urea 8 M pada kolom dengan silika gel 25 mg, yaitu sebesar 645 $\mu\text{g/mL}$, sehingga larutan urea 8 M dianggap potensial sebagai agen denaturasi alternatif dalam pemurnian DNA pada sistem kolom silika.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Bennion, B.J., and Vallerie, Daggett, The Molecular Basis for The Chemical Denaturation of Proteins by Urea, *National Academy of Sciences*, University of Cambridge.
- [2] Boom, R., Sol, C.A., Salimans, M.M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M.E., and van der Noorda, J., 1990, Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids., *J. clin. Microbial*, 28: 495-503.
- [3] Brown, T.A., 1991, Pengantar Kloning Gen, alih bahasa: S.A. Muhammad dan Praseno, Yayasan Esensia Medika, Yogyakarta.
- [4] Carter, M.J., and Milton, I.D., 1993, An Inexpensive and Simple Method for DNA Purifications on Silica Particles, *Nucleic Acids Res.*, 21: 1044.
- [5] Clewell and Helinski, 1969, Supercoiled Circular DNA-Protein Complex in *Escherichia coli*: Purification and Induced Conversion to an Open Circular DNA Form, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 62: 1159-1166.
- [6] Hengen, P.N., 1995, Mini-prep Plasmid DNA Isolation and Purification Using Silica-Based Resin, *Current Innovation and Future Trends*, Horizon Scientific Press, England.
- [7] Herison, C., Rustikawati, dan Eliyanti, 2003, Penentuan Protokol yang Tepat untuk Menyiapkan DNA Genom Cabai (*Capsicum sp.*), *Jurnal Akta Agrosia*, 6(2): 38-43.
- [8] Kenrick, M.K., Christopher, J., Malcolm, J.H., Alison, H., Peter, J.T., and David, W., 2007, Modified Spin Column for Simple and Rapid Plasmid DNA Extraction, *Patent No.* 60/941032.

- [9] Kotchoni, S.O., Gachomo, E.W., Betiku, E., Shonukan, and Olusola, O., 2003, A Home Made Kit for Plasmid DNA Mini-Preparation, *African Journal of Biotechnology*, 2(4): 88-90.
- [10] Kurien, B.T., and Scofield, R.H., 1994, A Short, Small-scale Preparation of Plasmid DNA from *E.coli* Using Organic Solvents, *B. R. L. Focus*, Vol. 6, No. 113.
- [11] Li, Feng, Jian, Li, Li, and Sheen, Jen, 2010, Protocol: A Rapid and Economical Procedure for Purification of Plasmid or Plant DNA with Diverse Applications in Plant Biology, *Plant Methods*, Vol. 6, No. 1.
- [12] Luka, J., 2000, DNA Purifications from Various Sources, *Department of Pathology Eastern Virginia, Medical School, Virginia*.
- [13] Nandel, F.S., Verma, R., Singh, B., and Jain, D.V.S., 1998, Mechanism of Hydration of Urea and Guanidium Ion: A model Study of Denaturation of Proteins, *Pure & Appl. Chem.*, 70(3): 659-664.
- [14] Padhye, V., York, C., and Burkiewicz, A., 1998, Nucleic Acid Purification Using Silica Gel and Glass Particles, *United States Patent 5808041*, Promega Corporation.
- [15] Rabilloud, T., 1998, Use of Thiourea to Increase The Solubility of Membrane proteins in Two-Dimensional Electrophoresis, *Electrophoresis*, 19: 756-760.
- [16] Sambrook, J., Russell, David, W., 2001, "*Molecular Cloning: A laboratory Manual, third edition*". Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.