

นิพนธ์ต้นฉบับ

Original article

การเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดดีเอ็นเอ/อาร์เอ็นเอ ในตัวอย่างที่ขุ่นหนืดด้วยสารลดความขุ่นหนืด

กิงกาญจน์ รักษ์มณี วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)

ตรีวัฒน์ วัฒนะโชคชัย วท.ม. (ชีวการแพทย์)

ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล

ติดต่อผู้เขียน: ตรีวัฒน์ วัฒนะโชคชัย Email: treevirusrama@gmail.com

วันรับ:	23 ม.ค. 2568
วันแก้ไข:	20 ม.ค. 2569
วันตอบรับ:	2 ก.พ. 2569

บทคัดย่อ ความสำคัญและการประยุกต์ใช้สารลดความขุ่นหนืด (mucolytic agent) ในการเตรียมตัวอย่าง ซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญในกระบวนการสกัดกรดนิวคลีอิก (nucleic acid extraction) ทั้ง deoxyribonucleic acid (DNA) และ ribonucleic acid (RNA) ให้มีความบริสุทธิ์และมีคุณภาพสูงขึ้น สารลดความหนืด เช่น dithiothreitol, N-acetyl-L-cysteine หรือการใช้เอนไซม์ proteinase K ถูกนำมาใช้เพื่อลดความหนืดหรือเพิ่มความสม่ำเสมอของตัวอย่างที่มีความหนืดสูง เช่น เสมหะ น้ำลาย และของเหลวจากการล้างหลอดลมและถุงลมปอด วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้คือ การรวบรวมและนำเสนอข้อมูลเกี่ยวกับสารละลายเมือกที่ใช้กันทั่วไป รวมถึงหลักการในการเลือกใช้ให้เหมาะสมกับตัวอย่างทาง-การแพทย์ประเภทต่างๆ เพื่อป้องกันการสูญเสีย และรักษาสภาพ DNA และ RNA ระหว่างการสกัดกรดนิวคลีอิก วิธีการศึกษาใช้การสืบค้นและรวบรวมวรรณกรรมจากฐานข้อมูล PubMed และแหล่งข้อมูลทางวิชาการอื่นที่มีการศึกษาเกี่ยวกับการใช้สารลดความขุ่นหนืดในกระบวนการทางชีวโมเลกุล หรือส่งผลต่อประสิทธิภาพของกระบวนการสกัดสารพันธุกรรม หรือการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม จากนั้นวิเคราะห์และสังเคราะห์เปรียบเทียบประเด็นสำคัญ ได้แก่ คุณสมบัติ กลไกการลดความขุ่นหนืด ข้อดีและข้อจำกัดของสารแต่ละชนิด การนำไปประยุกต์ใช้ ผลการศึกษาพบว่า สารลดความขุ่นหนืดช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเตรียมตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน ลดผลลบปลอมจากการจับตัวเป็นก้อนของตัวอย่าง และเพิ่มความแม่นยำของการวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุลด้วยวิธี nucleic acid amplification test (NAAT) สารเหล่านี้มีกลไกที่หลากหลายทั้งการทำลายพันธะเคมีและใช้เอนไซม์ย่อยสลาย เพื่อเปลี่ยนสภาพตัวอย่างให้มีความเหมาะสมต่อการสกัด DNA และ RNA ให้มีความบริสุทธิ์สูง โดยต้องคำนึงถึงความเข้มข้น ระยะเวลา และอุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อป้องกันการยับยั้งปฏิกิริยาในขั้นตอนการวิเคราะห์ระดับโมเลกุล ทั้งนี้ การประยุกต์ใช้ร่วมกับวิธีการทางกายภาพและการกำจัดสารตกค้างอย่างถูกต้อง จะช่วยเพิ่มความแม่นยำและประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยโรคได้อย่างมีนัยสำคัญ

คำสำคัญ: การสกัดสารพันธุกรรม; การสกัด DNA/RNA; กรดนิวคลีอิก; สารลดความขุ่นหนืด

บทนำ

การสกัดกรดนิวคลีอิก (nucleic acid extraction) เป็นขั้นตอนที่สำคัญในการตรวจวิเคราะห์และการวินิจฉัยทาง

ด้านชีวโมเลกุล⁽¹⁾ เนื่องจากความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) ส่งผลกระทบโดยตรงต่อกระบวนการตรวจวินิจฉัยทางด้านการแพทย์ อย่างไร

ก็ตามปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) อาจถูกยับยั้งได้จากหลายปัจจัย และมีแหล่งที่มาที่แตกต่างกัน⁽²⁾ โดยสารเหล่านี้สามารถขัดขวางการย่อยสลายเซลล์หรือการแตกตัวของโครงสร้างที่ห่อหุ้มกรดนิวคลีอิกซึ่งมีผลต่อการสกัด DNA และ RNA การยึดจับของกรดนิวคลีอิก (nucleic acid binding) รวมถึงการรบกวนกระบวนการเพิ่มปริมาณของ DNA เป้าหมาย⁽²⁾ เมื่อ (mucus) หรือสารคัดหลั่งที่มีความหนืดจะถูกสร้างขึ้นในร่างกายมนุษย์ เพื่อใช้หล่อลื่น ปกป้องเนื้อเยื่อ รักษาสมดุล และป้องกันเชื้อก่อโรค⁽³⁾ อย่างไรก็ตามเมือกหรือสารคัดหลั่งที่มีความหนืดอาจเป็นอุปสรรคสำคัญในกระบวนการสกัดสารพันธุกรรม การพัฒนาวิธีการสกัดกรดนิวคลีอิกที่มีประสิทธิภาพจึงเป็นกุญแจสำคัญในการตรวจหาสาเหตุและแหล่งที่มาของโรค ทำให้ได้ DNA และ RNA ที่มีความบริสุทธิ์สูง และเพียงพอต่อการใช้งาน ช่วยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่จะไปย่อยสลาย DNA และ RNA ในขั้นตอนการสกัดลงได้⁽¹⁾

ในการตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา PCR จากตัวอย่างที่มีความหนืด หรือมีความหนืดสูง เช่น ตัวอย่างจากเสมหะ (sputum) เมื่อสกัดสารพันธุกรรมด้วยวิธีปกติมักมีความเข้มข้นต่ำ เนื่องจากการทำให้ยากที่ใช้สกัดกับตัวอย่างเสมหะผสมเป็นเนื้อเดียวกันทำได้ยาก และตัวอย่างที่สกัดในขั้นตอนนี้จะมีความหนืด (lysate) จะขัดขวางทำให้สารสกัดไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยาได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้เครื่องสกัดสารพันธุกรรมแบบอัตโนมัติ (automate nucleic acid extraction system)⁽⁴⁾ การเตรียมตัวอย่างก่อนกระบวนการสกัดสารพันธุกรรม (pre-treatment) เป็นทางเลือกที่ดีจะช่วยให้สามารถสกัดสารพันธุกรรม (genetic material extraction) ที่มีความบริสุทธิ์ และเพียงพอต่อการใช้งาน นอกจากนี้ยังช่วยป้องกันการยับยั้งปฏิกิริยา PCR ที่อาจเกิดขึ้นจากสารชีวเคมีที่ตกค้างในตัวอย่าง⁽⁵⁾ ดังนั้นจึงควรทำให้ตัวอย่างที่มีความหนืด (เช่น เสมหะ) ละลายจนเป็นเนื้อเดียวกัน⁽⁴⁾ ไม่มีความหนืด (non-viscous) หรือทำให้เป็นของเหลว (liquefaction) เช่น N-acetyl-L-

cysteine หรือ dithiothreitol⁽⁶⁾

ปัจจุบันการตรวจหาเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจ (respiratory tract infection) จากน้ำลาย (saliva) และเสมหะที่มีความข้นหนืด เช่น การตรวจหาเชื้อ severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) ในน้ำลายได้รับการศึกษาอย่างหลากหลายที่แสดงให้เห็นถึงความสอดคล้อง และความไวทางคลินิกของการใช้น้ำลายเมื่อเทียบกับการใช้ตัวอย่างทางคลินิกที่ป้ายจากหลังโพรงจมูก (nasopharyngeal swab: NPS) พบว่า ความสอดคล้องโดยรวมของน้ำลายกับ NPS อยู่ในช่วง 89.7% ถึง 99% และความไวทางคลินิกโดยรวมอยู่ในช่วง 83% ถึง 88%⁽⁷⁾ ตัวอย่างที่มีความข้นหนืดสูงเป็นอุปสรรคสำคัญในการเตรียมตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกันก่อนการตรวจวิเคราะห์ เนื่องจากมีผลต่อประสิทธิภาพของกระบวนการสกัดสาร จากการดูดจ่าย หรือผสมสารละลายให้ได้อย่างสม่ำเสมอ ซึ่งอาจนำไปสู่ความคลาดเคลื่อนของผลการตรวจวิเคราะห์ได้

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติของสารกลุ่ม mucolytic agent ที่นำมาใช้ลดความหนืดของสิ่งส่งตรวจทางการแพทย์ในกระบวนการสกัดสารพันธุกรรม เพื่อนำมาใช้เป็นแนวทางในการเตรียมตัวอย่างที่มีความข้นหนืดสูง และลดความคลาดเคลื่อนในกระบวนการตรวจวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุล

วิธีการศึกษา

การสืบค้นและรวบรวมข้อมูลในการจัดทำบทความฉบับนี้ มีกระบวนการดำเนินงานเป็นขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

1. ขอบเขตการศึกษา

เป็นการศึกษาจากปัญหาที่พบในห้องปฏิบัติการทางชีวโมเลกุล เกี่ยวกับข้อจำกัดในกระบวนการสกัดสารพันธุกรรมจากสิ่งส่งตรวจทางการแพทย์ที่มีความหนืดสูง เช่น น้ำลาย และเสมหะ โดยมีขอบเขตเนื้อหาเพื่อศึกษาถึงคุณสมบัติ กลไกการทำงาน และประสิทธิภาพของสารลดความข้นหนืด ที่มีผลต่อคุณภาพและปริมาณของ DNA และ RNA ที่ได้จากระบบการสกัดสารพันธุกรรม

2. การสืบค้นข้อมูล

ทำการสืบค้นข้อมูลจากฐานข้อมูลทางวิชาการ เช่น PubMed และแหล่งข้อมูลทางวิชาการ เช่น เอกสารงานวิจัย บทความ สื่อสิ่งพิมพ์ และแหล่งข้อมูลทางวิชาการอื่นๆ จาก Google Search โดยทำการสืบค้นข้อมูลโดยไม่จำกัดปีที่ตีพิมพ์ เพื่อให้ได้ข้อมูลครอบคลุมมาจนถึงปัจจุบัน ทั้งนี้ได้กำหนดคำสำคัญในการสืบค้นทั้งภาษาไทย และภาษาอังกฤษ เช่น ชนิดของตัวอย่างทางชีวภาพที่มีความข้นหนืด, Nucleic acid extraction, DNA/RNA extraction, Nucleic acid และ Mucolytic agent เป็นต้น

3. เกณฑ์การคัดเลือก

บทความ และงานวิจัยที่ได้ทำการสืบค้นจะถูกนำมาคัดกรองตามเกณฑ์ที่กำหนด โดยเกณฑ์การคัดเลือกจะเลือกเฉพาะบทความ งานวิจัย และสื่อสิ่งพิมพ์ ที่มีการศึกษาเกี่ยวกับการใช้สารลดความข้นหนืดในกระบวนการทางชีวโมเลกุล หรือส่งผลต่อประสิทธิภาพของกระบวนการสกัดสารพันธุกรรม หรือการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ส่วนเกณฑ์การคัดออก คือบทความที่ไม่เกี่ยวข้องกับสารลดความข้นหนืด บทความที่ไม่เกี่ยวข้องกับขั้นตอนการการสกัดสารพันธุกรรม และการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม หรือบทความที่ไม่สามารถเข้าถึงเนื้อหาได้

4. การวิเคราะห์ สังเคราะห์ และเรียบเรียงข้อมูล

ข้อมูลจากการทบทวนวรรณกรรมที่ผ่านการคัดเลือกจะถูกนำมาวิเคราะห์ และเปรียบเทียบประเด็นสำคัญ ได้แก่ คุณสมบัติ กลไกการลดความข้นหนืด ข้อดีและข้อจำกัดของสารแต่ละชนิด การนำไปประยุกต์ใช้ และข้อคิดเห็นในการใช้สารลดความข้นหนืด จากนั้นนำมาสังเคราะห์และเรียบเรียงเนื้อหา เพื่อนำเสนอแนวทางการนำไปใช้ให้เหมาะสมกับชนิดของสิ่งส่งตรวจทาง-การแพทย์

ผลการศึกษา

ชนิดของตัวอย่างทางชีวภาพที่มีความข้นหนืด

Mucin เป็นส่วนประกอบของ glycoprotein ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเมือกที่เคลือบผิวเซลล์เยื่อในระบบ

ทางเดินหายใจ ระบบย่อยอาหาร ระบบสืบพันธุ์ และระบบทางเดินปัสสาวะ⁽⁸⁾ การสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างที่มีความหนืด เช่น เมือกเลือดจากทวารหนัก เยื่อเมือกจากช่องคลอด น้ำล้างหลอดลมและถุงลมปอด เสมหะ และน้ำลาย มีความสำคัญสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคในระดับโมเลกุล เนื่องจากความหนืดและองค์ประกอบในตัวอย่างเหล่านี้อาจรบกวนกระบวนการสกัด และลดคุณภาพสารพันธุกรรมที่ได้ การปรับปรุงกระบวนการสกัดสารพันธุกรรมโดยนำสารลดความข้นหนืดมาประยุกต์ใช้ในการเตรียมตัวอย่างก่อนเข้าสู่กระบวนการสกัด จะช่วยลดความข้นหนืด และปรับปรุงประสิทธิภาพการสกัดให้มีคุณภาพดีขึ้น

กลไกการทำงานของสารลดความข้นหนืด

สารลดความข้นหนืดเป็นสารที่มีคุณสมบัติช่วยลดความหนืดของเมือกทำให้โครงสร้างแตกตัวและง่ายต่อกระบวนการสกัดสารพันธุกรรมตัวอย่างของสารกลุ่มนี้แบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ สารลดความข้นหนืดแบบดั้งเดิม (classical mucolytic agent) และ สารลดความข้นหนืดแบบเปปไทด์ (peptide mucolytic)⁽⁹⁾

สารลดความข้นหนืดแบบดั้งเดิมมีบทบาทสำคัญในการลดความหนืด โดยสารเหล่านี้จะทำงานผ่านกลไกการทำลายพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในโครงสร้างเมือก อาทิเช่น dithiothreitol และ N-acetyl-L-cysteine เป็นต้น⁽⁹⁾ ช่วยให้เมือกหรือสารที่มีความข้นหนืดที่มีลักษณะก่อตัวเป็นเจลโพลิเมอร์ยาว (long polymeric gel-forming mucin) เช่น MUC5AC และ MUC5B อ่อนตัวลง⁽³⁾ การปรับสภาพตัวอย่างด้วยสารเหล่านี้จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดกรดนิวคลีอิกจากสารคัดหลั่งที่มีความหนืด เช่น เสมหะ และน้ำลายได้ดียิ่งขึ้น อย่างไรก็ตาม การใช้ในปริมาณสูงเช่น dithiothreitol อาจยับยั้งกระบวนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (DNA amplification) ซึ่งจำเป็นต้องปรับความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration) ให้เหมาะสม⁽⁶⁾

สารลดความข้นหนืดแบบเปปไทด์ เป็นสารอีกกลุ่มหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูงทำให้เมือกและสารคัดหลั่งที่มี

ความเข้มข้นและมีความหนืดสูง มีความหนืดลดลง โดยอาศัยกลไกผ่านกระบวนการแยกสาย actin ที่เชื่อมกันอยู่ในรูปฟิลาเมนต์ (filament หรือ F-actin) ให้กลับมาเป็นหน่วยย่อยในรูปแอกตินเดี่ยว (globular actin หรือ G-actin)⁽⁹⁾ ช่วยให้สามารถกำจัดสารสำคัญอื่นๆ ในกระบวนการสกัดตัวอย่างได้ง่ายขึ้น สารในกลุ่มนี้ เช่น เอนไซม์ dornase alfa (หรือชื่อทางการค้า sputolysin)^(5,9) และ thymosin β ⁽⁷⁾ เป็นต้น

การเปรียบเทียบคุณสมบัติของสารลดความข้นหนืดชนิดต่างๆ

การเลือกใช้สารลดความข้นหนืดควรพิจารณา

คุณสมบัติให้เหมาะสมกับตัวอย่างสิ่งส่งตรวจทางการแพทย์ และกระบวนการสกัดสารพันธุกรรมโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้สามารถสกัด DNA และ RNA ได้ ความเข้มข้นและมีความบริสุทธิ์สูง ลดการเสื่อมสภาพของกรดนิวคลีอิกจากสารตกค้างจากกระบวนการสกัด เช่น เอนไซม์ DNase และ RNase (ตารางที่ 1)

การประยุกต์ใช้สารลดความข้นหนืดในกระบวนการสกัดสารพันธุกรรม

การประยุกต์ใช้สารลดความข้นหนืดในกระบวนการสกัดสารพันธุกรรมมีบทบาทสำคัญในการลดความข้นหนืดของตัวอย่างและละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จะช่วยทำให้

ตารางที่ 1 คุณสมบัติของสารที่นำมาใช้ลดความหนืดในกระบวนการสกัดสารพันธุกรรม

ชื่อสาร	ประเภท	กลไกและการทำปฏิกิริยา	ชนิดของส่งตรวจ	กระบวนการสกัดสารพันธุกรรม	ข้อดี/ข้อเสีย	การนำไปประยุกต์ใช้
Dithiothreitol ⁽¹⁰⁾ (C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂)	classical mucolytic agent	รีดิวซ์ (reduce) พันธะ-ไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ในไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ช่วยลดความหนืดของเมือก และยับยั้งเอนไซม์ DNase/RNase ในการย่อยสลาย DNA/RNA จากกระบวนการสกัด	เสมหะ น้ำลายเยื่อเมือกจากช่องคลอด	DNA/RNA extraction (pre-treatment/lysis step)	ข้อดี: ลดความหนืดได้อย่างมีประสิทธิภาพ, ป้องกันการย่อยสลายของ DNA และ RNA ข้อเสีย: มีกลิ่นแรง หากกำจัดไม่หมด อาจรบกวนปฏิกิริยาอย่างต่อเนื่อง	ใช้ในการเตรียมตัวอย่างที่มีความหนืดสำหรับกระบวนการสกัด DNA/RNA ให้มีความเข้มข้นสูง แนะนำให้ใช้ ความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration ranging) 0.5 g/L – 1.0 g/L (3.25–6.5 mmol/L) ⁽²⁾
Dornase alfa ⁽¹¹⁾	peptide mucolytic agent	เอนไซม์ย่อยสลาย DNA ในสารคัดหลั่ง ช่วยลดความหนืดในตัวอย่างที่มีความหนืดสูงที่มี DNA polymer ทำลายโครงสร้างของมิวซิน	เสมหะ สารคัดหลั่งจากผู้ป่วยโรคซิสติกไฟโบรซิส (cystic fibrosis)	RNA extraction (pre-treatment)	ข้อดี: กำจัด DNA ในตัวอย่างที่มีความหนืดได้อย่างจำเพาะ ข้อเสีย: ราคาสูงกว่าสารเคมี กำจัดเฉพาะ DNA เท่านั้น	ใช้ในการเตรียมตัวอย่างผู้ป่วยสำหรับสกัด RNA ให้มีความบริสุทธิ์ จากตัวอย่างเสมหะที่มีความข้นหนืด โดยใช้ dornase alfa เพื่อย่อยสลาย DNA และลดการปนเปื้อนของ DNA
N-acetyl-L-cysteine ⁽¹²⁾ (C ₅ H ₉ NO ₃ S)	classical mucolytic agent	ลดความหนืดของเมือกโดยการทำลายพันธะ-ไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ในมิวซิน (mucin) ทำให้เมือกเหลวขึ้น	น้ำลาย น้ำล้างปอด ตัวอย่างสารคัดหลั่งที่มีความหนืดสูง เช่น เสมหะ น้ำมูก เมือกเลือด	DNA/RNA extraction (pre-treatment/lysis step)	ข้อดี: ลดความหนืดได้ดี มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ข้อเสีย: อาจทำให้ตัวอย่างมีค่า pH ลดลง ซึ่งจะทำให้เกิดความเป็นกรด	ใช้สกัด DNA/RNA จากตัวอย่างที่มีความข้นหนืด เช่น เสมหะ แนะนำให้ใช้ ความเข้มข้นสุดท้าย 2.5 g/L (15.3 mmol/L) ⁽²⁾

การเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดดีเอ็นเอ/อาร์เอ็นเอในตัวอย่างที่ขุ่นหนืดด้วยสารลดความขุ่นหนืด

ตารางที่ 1 คุณสมบัติของสารที่นำมาใช้ลดความหนืดในกระบวนการสกัดสารพันธุกรรม (ต่อ)

ชื่อสาร	ประเภท	กลไกและการทำปฏิกิริยา	ชนิดของสิ่งตรวจ	กระบวนการสกัดสารพันธุกรรม	ข้อดี/ข้อเสีย	การนำไปประยุกต์ใช้
Normal saline ⁽¹³⁾ (NaCl)	diluent/ isotonic buffer	เป็นสารละลายที่มี pH เป็นกลาง ช่วยในการเจือจางตัวอย่าง ลดการจับกันของเมือก ลดแรงไฟฟ้าสถิตระหว่างโมเลกุล ทำให้โปรตีนและเมือกไม่จับตัวเป็นก้อน ทำให้ DNA/RNA ถูกแยกออกมาได้ดีขึ้น	สารคัดหลั่งจากระบบทางเดินหายใจ ตัวอย่างที่ป้ายจากช่องคลอด เสมหะ เนื้อเยื่อที่ผ่านการบดแล้ว	DNA/RNA extraction (washing/dilution/resuspension)	ข้อดี: ราคาถูก หาซื้อง่าย มีความเป็นกลาง ข้อเสีย: ใช้ในการเจือจางเพื่อให้ความขุ่นหนืดลดลงเท่านั้น ไม่ได้ละลายเมือกโดยตรง	ใช้ในการสกัด DNA/RNA จากตัวอย่างที่มีเมือก หรือเนื้อเยื่อที่ขุ่นหนืด ช่วยละลายสารปนเปื้อนทำให้ DNA/RNA ถูกดึงออกมาง่ายขึ้น
Phosphate-buffered saline ⁽¹⁴⁾ (Na ₂ HPO ₄)	isotonic buffer	มีค่า pH ประมาณ 7.4 ป้องกันการจับตัวกันของโปรตีนและสารชีวภาพอื่น ๆ ในตัวอย่างขุ่นหนืด ลดแรงไฟฟ้าสถิตระหว่างโมเลกุล	ตัวอย่างจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ เยื่อเมือก	DNA/RNA extraction (washing/dilution/resuspension)	ข้อดี: รักษาความสมดุลของกรด-ด่าง เหมาะสำหรับงานด้าน cell culture ข้อเสีย: ไม่ได้ทำลายโครงสร้างเมือกโดยตรง	เจือจางตัวอย่างโปรตีนหรือเมือกที่หนาแน่น ลดความหนืดและทำให้ตัวอย่างง่ายต่อการดูดผสม บางสูตรใช้ KH ₂ PO ₄
Proteinase K ⁽¹⁵⁾	enzyme (serine protease)	เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับความหนืดในตัวอย่าง กำจัดโปรตีนที่ปนเปื้อนในตัวอย่าง และช่วยทำให้เมือกเหลวขึ้น	เลือด เนื้อเยื่อ ตัวอย่างที่มีโปรตีนและเมือกสูง	DNA/RNA extraction (lysis step)	ข้อดี: ย่อยสลายโปรตีนในสารละลายที่มีความขุ่นก่ดหนดได้อย่างมีประสิทธิภาพ ข้อเสีย: ใช้ร่วมกับสารลดแรงตึงผิวและใช้งานได้ดีในช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมเท่านั้น	ใช้ทำให้ตัวอย่างที่มีความหนืด ให้ความบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้น ในกระบวนการสกัด DNA/RNA
Recombinant DNase I ⁽¹⁶⁾	peptide mucolytic agent	ช่วยลดความหนืดของเมือกที่มีความหนาแน่น ลดการพันกันของโครงสร้างเมือกให้แตกออก อ่อนตัวลง และทำลาย DNA ที่อยู่ในสารคัดหลั่ง	เสมหะ สารคัดหลั่งที่มี DNA ในปริมาณสูง	RNA extraction (DNA digestion step)	ข้อดี: ย่อยสลาย DNA ได้อย่างจำเพาะ ข้อเสีย: ทำปฏิกิริยาเฉพาะ DNA เท่านั้น มีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานที่จำเพาะ	ใช้ในการเตรียมตัวอย่างที่มีการสะสม DNA ในเสมหะ เช่น ตัวอย่างจากผู้ป่วยโรคซิสต์ไฟโบรซิส
Sodium citrate ⁽¹⁷⁾ (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇)	chelating agent/ anticoagulant	ทำลายแรงยึดเหนี่ยวของโปรตีน ลดความหนืดของตัวอย่างที่มีส่วนประกอบของโปรตีนเป็นหลัก	เลือด ตัวอย่างที่มีโปรตีน และเมือก ตัวอย่างที่ต้องการกันเลือดแข็ง	DNA/RNA extraction (pre-treatment/storage)	ข้อดี: ใช้ป้องกันการแข็งตัวของเลือด ลดความหนืดในตัวอย่างเมือก ข้อเสีย: หากมีการใช้เอนไซม์อาจถูกรบกวน โดยเฉพาะเอนไซม์ที่ต้องใช้ Mg ²⁺ หรือ Ca ²⁺ เป็น co-factor	ใช้เป็นสารกันเลือดแข็ง (anticoagulant) ลดความหนืดในตัวอย่างเมือก ป้องกันการย่อยสลาย DNA/RNA

ตารางที่ 1 คุณสมบัติของสารที่นำมาใช้ลดความหนืดในกระบวนการสกัดสารพันธุกรรม (ต่อ)

ชื่อสาร	ประเภท	กลไกและการทำปฏิกิริยา	ชนิดของส่งตรวจ	กระบวนการสกัดสารพันธุกรรม	ข้อดี/ข้อเสีย	การนำไปประยุกต์ใช้
Thioglycolic acid ⁽¹⁸⁾	reducing agent	เป็นสารรีดิวซ์ ช่วยทำลายโครงสร้างเมือกโดยทำลาย disulfide bond	ตัวอย่างที่มีความหนืดสูง เสมหะ	DNA/RNA extraction (pre-treatment)	ข้อดี: ลดความหนืดได้ดี ข้อเสีย: มีกลิ่นเหม็น	ใช้เตรียมตัวอย่างสำหรับการตรวจวิเคราะห์ที่เกี่ยวข้องกับโปรตีน หรือ DNA ในตัวอย่างที่มีความหนืด
Thymosin β ⁽¹⁹⁾	peptide mucolytic agent	จับกับโมโนเมอร์แอคติน (G-actin) ป้องกันการเกิดโพลีเมอร์แอคติน (F-actin) ซึ่งเป็นปัจจัยที่ทำให้ตัวอย่างมีความข้นหนืด	ตัวอย่างเนื้อเยื่อที่มีเมือก (mucus-rich tissue) ตัวอย่างที่มี actin สูง	DNA/RNA extraction (lysis/homogenization step)	ข้อดี: มีความจำเพาะต่อโครงสร้าง Actin ข้อเสีย: มีราคาสูง	ใช้เตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อที่มีเมือก หรือการสกัดตัวอย่างที่แอคตินสูง

การสกัดมีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้น ทั้งสารลดความข้นหนืดแบบดั้งเดิม เช่น dithiothreitol^(4,5), N-acetyl-L-cysteine⁽⁶⁾ และ สารลดความข้นหนืดแบบเปปไทด์ เช่น เอนไซม์ proteinase K^(4,5) ถูกนำมาใช้ในการย่อยสลายโครงสร้างโปรตีนและมิวซินที่ทำให้ตัวอย่างมีความหนืดลดลง นอกจากนี้ในปัจจุบันนิยมใช้ normal saline ในการเตรียมตัวอย่าง เนื่องจากมีราคาถูก เตรียมง่าย สามารถช่วยเจือจางและลดความหนืดได้อีกด้วย

การลดความข้นหนืดของตัวอย่างก่อนการสกัดสามารถทำได้โดยใช้ 3 วิธีร่วมกัน ได้แก่ วิธีทางเคมี เช่น dithiothreitol ร่วมกับวิธีทางชีวภาพ เช่น การใช้เอนไซม์ proteinase K และเสริมด้วยวิธีการทางกายภาพ เช่น การปั่นผสม จะช่วยให้สารลดความข้นหนืดกระจายตัวและทำปฏิกิริยาได้ดีขึ้น ทำให้ได้สารพันธุกรรมที่มีทั้งปริมาณและคุณภาพดีกว่าใช้วิธีใดวิธีหนึ่งเพียงอย่างเดียว⁽²⁰⁾ ซึ่งปัจจุบันถูกพัฒนาและนำมาประยุกต์ใช้ในรูปแบบของการสกัด DNA และ RNA ด้วยเครื่องสกัดสารพันธุกรรมแบบอัตโนมัติ (automate nucleic acid extraction system)⁽⁵⁾ อย่างไรก็ตาม การใช้สารลดความหนืดในความเข้มข้นสูง อาจก่อให้เกิดสารตกค้างจากกระบวนการสกัด ส่งผลให้เกิดการรบกวนปฏิกิริยา PCR ซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในการตรวจวิเคราะห์

DNA และ RNA⁽⁶⁾

ข้อคิดเห็นในการใช้สารลดความข้นหนืด

เพื่อให้กระบวนการทดลองเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ และลดผลกระทบที่อาจเกิดจากการใช้สารลดความข้นหนืดในขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรม และในปฏิกิริยา PCR ควรปฏิบัติดังนี้

1. การใช้สารลดความหนืดที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม (concentration) เช่น การปรับความเข้มข้นของ N-acetyl-L-cysteine ให้เหมาะสมจะสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจากกระบวนการสกัด หลีกเลี่ยงการใช้สารในปริมาณที่มากเกินไป ซึ่งอาจก่อให้เกิดสารตกค้างและยับยั้งปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมทำการทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมก่อนนำไปใช้งานในสิ่งส่งตรวจทางคลินิกแต่ละชนิด⁽²¹⁾

2. กำหนดระยะเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาของสารลดความข้นหนืด (exposure time) เป็นการทดสอบการใช้สารลดความหนืดโดยใช้ระยะเวลาการบ่ม (incubation) ที่เหมาะสมกับตัวอย่างทางคลินิกแต่ละชนิด เพื่อให้การทำปฏิกิริยาของสารเหล่านี้ทำได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ หลีกเลี่ยงการบ่มตัวอย่างที่ใช้ระยะเวลานานจนเกินไป เพราะอาจจะเพิ่มความเสี่ยงในการเสื่อมสลายของ DNA และ RNA^(22,23)

3. กำหนดอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาของสารลดความخنหด (temperature) ควรทำการทดสอบการใช้สารลดความخنหดในช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสม ตามคำแนะนำของคู่มือการใช้งาน หากใช้อุณหภูมิที่สูง หรือต่ำเกินไป อาจทำให้สารเสื่อมสภาพ หรือการทำปฏิกิริยาเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ เกิดการสูญเสีย DNA และ RNA ในระหว่างการทดสอบ ทำให้ได้ DNA และ RNA ที่มีความบริสุทธิ์และความเข้มข้นลดลง^(22,23)

4. การกำจัดสารยับยั้ง (inhibitor) โดยการล้างเพื่อกำจัดสารตกค้างที่จะไปยับยั้งการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในปฏิกิริยา PCR การกำจัดสิ่งปนเปื้อนสารเคมี และสิ่งตกค้างอย่างเหมาะสม เช่นการล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (washing buffer) หลาย ๆ ครั้ง จะช่วยลดปริมาณเอนไซม์ และสารเคมีตกค้าง ที่จะไปยับยั้งปฏิกิริยา PCR ลงได้⁽²⁴⁾

5. การป้องกันการปนเปื้อน (decontamination) สามารถทำได้โดยควบคุมความสะอาดของอุปกรณ์ที่ใช้ในกระบวนการสกัดสารพันธุกรรม โดยการเลือกใช้สาร วัสดุ หรืออุปกรณ์ที่ไม่มีการปนเปื้อนของ DNase และ RNase (DNase–RNase free) ทำความสะอาดวัสดุ อุปกรณ์ และพื้นที่ ทั้งก่อนและหลังการใช้งาน ด้วยการใช้สารเติมแต่ง เช่น sodium hypochlorite เพื่อทำลาย DNA ที่ปนเปื้อน และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DNase (DNase inhibitors) และ RNase (RNase inhibitors)⁽²⁵⁾

6. การประเมินคุณภาพ (evaluation) ควรทำการประเมินคุณภาพ DNA และ RNA ที่สกัดได้ เพื่อตรวจสอบความเข้มข้น และความบริสุทธิ์ของกรดนิวคลีอิกโดยใช้เครื่องมือเช่น เครื่อง NanoDrop spectrophotometer หากพบสารตกค้าง หรือมีการปนเปื้อนของโปรตีน ให้ปรับปรุงกระบวนการสกัด เช่น เพิ่มขั้นตอนการล้าง⁽²⁶⁾

7. ควรมีการทดสอบก่อนการใช้งาน โดยทำการทดสอบกับตัวอย่างที่มีความخنหด เช่น ตัวอย่างจากเสมหะ ด้วยวิธีการสกัดสารพันธุกรรมแบบดั้งเดิม (conventional genetic material extraction) หลังจากนั้นนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีการทางด้านชีวโมเลกุล เช่น PCR,

real-time PCR หรือ next-generation sequencing (NGS) เพื่อประเมินประสิทธิภาพการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งการใช้สารลดความخنหดก่อนการสกัดจะช่วยละลายเมือกและลดความخنหดได้ดีขึ้น ทำให้การสกัดสารพันธุกรรมได้ปริมาณ DNA และ RNA สูงขึ้น ส่งผลให้ PCR มีความไวเพิ่มมากขึ้นตามลำดับ⁽²⁷⁾

วิจารณ์

การใช้สารลดความخنหดร่วมกับเอนไซม์ กระบวนการทางเคมี และกระบวนการเชิงกล แม้จะมีรายงานว่าสามารถช่วยให้ตัวอย่างมีความเป็นเนื้อเดียวกัน ช่วยให้สามารถสกัดกรดนิวคลีอิกมีคุณภาพที่สูงขึ้น และเพิ่มอัตราการตรวจพบสารพันธุกรรมได้ แต่ผลลัพธ์มักขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างตามเงื่อนไขที่ใช้จริงในห้องปฏิบัติการแต่ละแห่ง เช่น การเตรียมตัวอย่างเสมหะด้วย dithiothreitol และเอนไซม์ proteinase K พบว่าสามารถทำให้ตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกัน เพิ่มอัตราการตรวจพบสารพันธุกรรมเชื้อก่อโรคได้สูงกว่าการใช้ normal saline อยู่ในช่วง 5.53% ถึง 6.91%⁽⁴⁾ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการลดความخنหดช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัด อย่างไรก็ตาม การใช้สารเคมีที่มีความเข้มข้นสูงอาจเพิ่มความเสี่ยงต่อสารตกค้างที่จะไปรบกวนปฏิกิริยา PCR หากทำการล้างไม่เพียงพอ จึงต้องพิจารณาความสมดุลระหว่างประสิทธิภาพ และความเสี่ยงของสารตกค้างควบคู่กัน

แม้ว่าการใช้เอนไซม์ proteinase K และ DNase I จะให้ผลการละลายเสมหะและการสกัด RNA ดีกว่าสารชนิดอื่นเมื่อเทียบกับการใช้ phosphate-buffered saline, N-acetyl-L-cysteine และ sodium citrate สำหรับการนำไปใช้ในการตรวจหาเชื้อ Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV)⁽²⁸⁾ แต่ข้อจำกัดด้านต้นทุน ความยุ่งยากของกระบวนการ การควบคุมอุณหภูมิ และการควบคุมระยะเวลาอย่างเข้มงวด ก็เป็นปัจจัยที่ต้องนำมาพิจารณาเมื่อนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการ โดยเฉพาะห้องปฏิบัติการที่มีทรัพยากรจำกัด ดังนั้น

การใช้สารลดความข้นหนืดจึงช่วยลดเวลาในการเตรียมตัวอย่าง และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในตัวอย่างได้หลากหลายชนิด แม้สารลดความหนืดจะมีศักยภาพในการลดเวลาการ-เตรียมตัวอย่าง และเพิ่มคุณภาพของกรดนิวคลีอิก แต่การนำไปใช้ต้องพิจารณาจากปัจจัยอื่นเพิ่มเติมด้วย เช่น บุคลากร วัสดุอุปกรณ์ เครื่องมือ และขั้นตอนการควบคุมคุณภาพ เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดในการนำไปใช้กับตัวอย่างที่มีความข้นหนืดสูง

สารลดความข้นหนืดมีบทบาทสำคัญต่อประสิทธิภาพของเครื่องสกัดสารพันธุกรรมแบบอัตโนมัติ เนื่องจากตัวอย่างทางชีวภาพบางประเภท เช่น สารคัดหลั่งที่มีมิวซินสูง มักมีความหนืดมากกว่าปกติ ส่งผลให้ขั้นตอนการดูด-จ่ายด้วยปิเปตแบบอัตโนมัติเกิดความคลาดเคลื่อน มีปริมาตรที่ไม่ถูกต้อง หรือเกิดการตกค้างของตัวอย่างในปิเปตทิป รวมทั้งสารยับยั้งปฏิกิริยา PCR^(29,30) เนื่องจากเครื่องสกัดสารพันธุกรรมแบบอัตโนมัติที่ใช้หลักการ magnetic bead หรือ silica-based extraction อาศัยหลักการผสมและการเคลื่อนที่ของสารละลาย ตัวอย่างที่มีความสม่ำเสมอ สารลดความหนืด เช่น dithiothreitol หรือ proteinase K ถูกนำมาใช้ลดแรงยึดเหนี่ยวภายในสารคัดหลั่ง ทำให้สารพันธุกรรมถูกปลดปล่อยออกจากโครงสร้างของโปรตีน หรือเมทริกซ์ที่ซับซ้อนได้ดีขึ้น อีกทั้งยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการจับของสารพันธุกรรมบนพื้นผิว magnetic bead หรือ silica^(31,32) นอกจากนี้ยังพบว่า สารลดความหนืดช่วยลดความเสี่ยงการอุดตันของทิป และข้อผิดพลาดระหว่างขั้นตอนการทำงานของเครื่องสกัดสารพันธุกรรมแบบอัตโนมัติ เช่น liquid detection error หรือ tip-clogging

ข้อควรระวังการใช้สารลดความข้นหนืดหากใช้ความเข้มข้นที่สูงเกินไปอาจส่งผลกระทบต่อสารตกค้างหากกำจัดออกไม่หมดในขั้นตอนการล้าง ทำให้เกิดการยับยั้งปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม^(29,30) หากใช้ความเข้มข้นน้อยเกินไปอาจมีผลต่อความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของกรดนิวคลีอิกเพิ่มความเสี่ยงต่อ

การสูญเสีย DNA และ RNA จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ DNase และ RNase ที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างที่ไม่สามารถกำจัดหรือยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เหล่านี้ได้อย่างสมบูรณ์ ดังนั้น การเลือกใช้สารลดความข้นหนืดควรพิจารณาถึงคุณสมบัติของสารลดความข้นหนืด ความเข้มข้นที่เหมาะสม ชนิดสิ่งส่งตรวจ กระบวนการสกัด และกระบวนการตรวจวิเคราะห์ นอกจากนี้ควรคำนึงถึงความปลอดภัยในการใช้งาน และผลกระทบที่อาจเกิดจากการใช้งาน เช่น ระบายเคื่องต่อผิวหนัง ระบายเคื่องต่อระบบทางเดินหายใจ ควรปฏิบัติตามคู่มือ และคำแนะนำของผู้ผลิตอย่างเคร่งครัด

สำหรับข้อเสนอแนะการใช้สารลดความข้นหนืด ควรตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ DNA และ RNA ที่สกัดได้ โดยเลือกใช้เครื่องมือที่เหมาะสม เช่น เครื่อง NanoDrop หรือเครื่องมือที่ใช้วัดปริมาณ DNA และ RNA อื่นๆ เพื่อประเมินคุณภาพก่อนนำไปใช้งาน การกำจัดเอนไซม์หรือสารเคมีตกค้างจากกระบวนการสกัดควรเลือกใช้วิธีการที่เหมาะสม เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการรบกวน หรือยับยั้งปฏิกิริยา PCR ขึ้นในกระบวนการทดสอบ

สรุป

การใช้สารลดความข้นหนืดในกระบวนการสกัดสารพันธุกรรมช่วยให้ตัวอย่างมีความหนืดลดลงและละลายจนเป็นเนื้อเดียวกัน ทำให้การสกัดมีปริมาณ ความเข้มข้น และความบริสุทธิ์เพิ่มสูงขึ้น อย่างไรก็ตามควรพิจารณาคุณสมบัติและความเข้มข้นของสารที่จะใช้เพื่อลดผลกระทบต่อการปฏิกิริยา PCR และป้องกันการสูญเสียกรดนิวคลีอิกจากเอนไซม์ DNase และ RNase จากกระบวนการสกัด ดังนั้นการตรวจสอบคุณภาพของ DNA และ RNA ด้วยเครื่องมือที่เหมาะสม และการกำจัดสารเคมีตกค้างและเอนไซม์ที่ปนเปื้อน เป็นสิ่งสำคัญที่จะทำให้ได้ผลลัพธ์ที่ถูกต้องและมีคุณภาพสูง

เอกสารอ้างอิง

1. Goyani KH, Mukhopadhyaya PN. Evolution of nucleic acid extraction methods and its role in development of complex human diagnostic solutions with special reference to tuberculosis. *Magna Scientia Advanced Research and Reviews* 2023;9(2):115–46.
2. Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol* 1997;63(10):3741–51.
3. Rubin BK. Mucolytics, expectorants, and mucokinetic medications. *Respir Care* 2007;52(7):859–65.
4. Yu F, Qiu T, Zeng Y, Wang Y, Zheng S, Chen X, et al. Comparative evaluation of three preprocessing methods for extraction and detection of influenza A virus nucleic acids from sputum. *Front Med (Lausanne)* 2018;5:56.
5. Bencini MA, van den Brule AJ, Claas EC, Hermans MH, Melchers WJ, Noordhoek GT, et al. Multicenter comparison of molecular methods for detection of *Legionella* spp. in sputum samples. *J Clin Microbiol* 2007;45(10):3390–2.
6. Deneer HG, Knight I. Inhibition of the polymerase chain reaction by mucolytic agents. *Clinical Chemistry* 1994;40(1):171–2.
7. Liu Y, Kumblathan T, Tao J, Xu J, Feng W, Xiao H, et al. Recent advances in RNA sample preparation techniques for the detection of SARS-CoV-2 in saliva and gargle. *Trends Analyt Chem* 2023;165:117107.
8. Perez-Vilar J, Hill RL. The structure and assembly of secreted mucins. *Journal of Biological Chemistry* 1999;274(45):31751–4.
9. Gupta R, Wadhwa R. Mucolytic medications. [Internet]. 2024 [cited 2025 Nov 22]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/books/NBK559163/>
10. Lukesh JC, Palte MJ, Raines RT. A potent, versatile disulfide-reducing agent from aspartic acid. *J Am Chem Soc* 2012;134(9):4057–9.
11. Hodson ME. Aerosolized dornase alfa (rhDNase) for therapy of cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151(3 Pt 2):S70–4.
12. Aldini G, Altomare A, Baron G, Vistoli G, Carini M, Borsani L, et al. N-acetyl-L-cysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why. *Free Radical Research* 2018;52(7):751–62.
13. Hill DB, Button B, Rubinstein M, Boucher RC. Physiology and pathophysiology of human airway mucus. *Physiol Rev* 2022;102(4):1757–836.
14. Witten J, Samad T, Ribbeck K. Molecular characterization of mucus binding. *Biomacromolecules* 2019;20(4):1505–13.
15. Helland R, Larsen AN, Smalås AO, Willassen NP. The 1.8 Å crystal structure of a proteinase K-like enzyme from a psychrotroph *Serratia* species. *The FEBS Journal* 2006;273(1):61–71.
16. Guérout M, Picot D, Abi-Ghanem J, Hartmann B, Baaden M. How cations can assist DNase I in DNA binding and hydrolysis. *PLoS Comput Biol* 2010;6(11):e1001000.
17. Ye X, Zhang S, Tang M. Effect of sodium citrate anticoagulant solution in continuous veno-venous hemofiltration in critically ill children. *BMC Pediatr* 2025;25(1):496.
18. National Center for Biotechnology Information. Thioglycolic acid. [Internet]. 2024 [cited 2025 Nov. 22]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Thioglycolic-Acid>
19. Yu FX, Lin SC, Morrison-Bogorad M, Atkinson MA, Yin HL. Thymosin beta 10 and thymosin beta 4 are both actin monomer sequestering proteins. *J Biol Chem* 1993;268(1):502–9.

20. ตริวัฒน์ วัฒนะโชคชัย, กิ่งกาญจน์ รักษ์มณี. การย่อยสลายเซลล์โฮสต์และอนุภาคไวรัสในการสกัดกรดนิวคลีอิกของไวรัสจากตัวอย่างมนุษย์. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2568; 67(3): 541-56.
21. Faverio P, Rebora P, Rossi E, Del Giudice S, Montanelli F, Garzillo L, et al. Impact of N-acetyl-L-cysteine on SARS-CoV-2 pneumonia and its sequelae: results from a large cohort study. *ERJ Open Res* 2022;8(1).
22. Frazer Z, Yoo C, Sroya M, Bellora C, DeWitt BL, Sanchez I, et al. Effect of different proteinase K digest protocols and deparaffinization methods on yield and integrity of DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J Histochem Cytochem* 2020; 68(3):171-84.
23. Brisco MJ, Morley AA. Quantification of RNA integrity and its use for measurement of transcript number. *Nucleic Acids Res* 2012;40(18):e144.
24. Jue E, Witters D, Ismagilov RF. Two-phase wash to solve the ubiquitous contaminant-carryover problem in commercial nucleic-acid extraction kits. *Sci Rep* 2020; 10(1):1940.
25. Fischer M, Renevey N, Thür B, Hoffmann D, Beer M, Hoffmann B. Efficacy assessment of nucleic acid decontamination reagents used in molecular diagnostic laboratories. *PLOS One* 2016;11(7):e0159274.
26. Qamar W, Khan MR, Arafah A. Optimization of conditions to extract high quality DNA for PCR analysis from whole blood using SDS-proteinase K method. *Saudi J Biol Sci* 2017;24(7):1465-9.
27. Chang Y, Li T, Niu Y, Guan X, Xie Y. Comparative evaluation of proteinase K and dithiothreitol as pretreatments for extracting nucleic acids from respiratory samples for multiplex PCR. *BMC Microbiol* 2025;25(1):233.
28. Sung H, Yong D, Ki CS, Kim JS, Seong MW, Lee H, et al. Comparative evaluation of three homogenization methods for isolating Middle East respiratory syndrome coronavirus nucleic acids from sputum samples for real-time reverse transcription PCR. *Ann Lab Med* 2016; 36(5):457-62.
29. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol* 2012;113(5):1014-26.
30. Huggett JF, Novak T, Garson JA, Green C, Morris-Jones SD, Miller RF, et al. Differential susceptibility of PCR reactions to inhibitors: an important and unrecognised phenomenon. *BMC Res Notes* 2008;1:70.
31. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990;28(3):495-503.
32. Qiagen. QIAamp Viral RNA mini handbook [Internet]. 2020 [cited 2025 Nov 22]. Available from: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=c80685c0-4103-49ea-aa72-8989420e3018&lang=en>

Enhancing DNA/RNA Extraction Efficiency in Viscous Samples Using Mucolytic Agents

Kingkan Rakmanee, B.S. (Medical Technology); Treewat Watthanachockchai, M.Sc. (Biomedical Sciences)

Department of Pathology, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Thailand

Journal of Health Science of Thailand 2026;35(4):737-47.

Corresponding author: Treewat Watthanachockchai, Email: treevirusrama@gmail.com

Abstract: The importance and application of mucus solutions in sample preparation, a crucial step in genetic material extraction. This enables the extraction of both deoxyribonucleic acid (DNA) and ribonucleic acid (RNA) to higher purity and quality. Mucolytic agents, including dithiothreitol, N-acetyl-L-cysteine, and proteinase K, have been employed to reduce the viscosity or enhance the homogeneity of highly viscous samples, such as sputum, saliva, and bronchial lavage fluid. The objective of this study was to collate and present information on commonly used mucolytic agents, including the principles for their appropriate selection for various types of medical samples, to prevent loss and preserve DNA and RNA during nucleic acid extraction. The research methodology involved searching and collecting literature from the PubMed database and other academic sources concerning the use of mucolytic agents in molecular processes, specifically focusing on their impact on nucleic acid extraction efficiency and amplification. The collected literature was analyzed and synthesized to compare key aspects, including properties, mechanisms of action, advantages, limitations, and practical applications of each agent. The findings demonstrated that viscosity-reducing agents significantly enhanced sample homogeneity, reduced false negatives due to sample agglutination, and enhanced the accuracy of biomolecular analysis using the nucleic acid amplification test (NAAT). These agents employed diverse mechanisms, including chemical bond disruption and enzymatic degradation, to optimize samples for the extraction of high-purity DNA and RNA. Crucially, the study highlights that factors such as concentration, exposure time, and temperature must be carefully optimized to prevent inhibition of downstream molecular reactions. Furthermore, integrating these agents with physical methods and rigorous residual removal protocols is essential for significantly increasing the accuracy and efficiency of diagnostic testing.

Keywords: nucleic acid extraction; DNA/RNA extraction; nucleic acid; mucolytic agents