

นิพนธ์ต้นฉบับ

Original article

การเพิ่มความเข้มข้นของ DNA และ RNA ในกระบวนการสกัดสารพันธุกรรมโดยใช้สารรีดิวซ์

ตรีวัฒน์ วัฒนะโชคชัย วท.ม. ชีวการแพทย์

กิงกาญจน์ รัชชัณณ์ วท.บ. เทคนิคการแพทย์

ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล

ติดต่อผู้เขียน: กิงกาญจน์ รัชชัณณ์ Email: kingvirusrama@gmail.com

วันรับ:	24 ม.ค. 2568
วันแก้ไข:	30 ม.ค. 2569
วันตอบรับ:	6 ก.พ. 2569

บทคัดย่อ

การสกัดสารพันธุกรรมเป็นขั้นตอนสำคัญในวิทยาศาสตร์ชีวโมเลกุล การใช้สารรีดิวซ์ (reducing agent) เช่น β -mercaptoethanol, dithiothreitol, Tris-2-carboxyethyl phosphine hydrochloride และ dithiobutylamine ในกระบวนการสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างทางการแพทย์ พบว่า ส่งผลให้ได้ deoxyribonucleic acid (DNA) และ ribonucleic acid (RNA) ที่มีความบริสุทธิ์ และความเข้มข้นสูงขึ้น การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติและประสิทธิภาพของสารรีดิวซ์ชนิดต่างๆ ที่สามารถนำมาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการสกัดสารพันธุกรรม ซึ่งสารรีดิวซ์มีบทบาทสำคัญในการทำลายพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ภายในโครงสร้างโปรตีนที่ห่อหุ้มกรดนิวคลีอิก ทำให้การปลดปล่อย DNA และ RNA มีประสิทธิภาพมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า สารรีดิวซ์สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยสลายกรดนิวคลีอิกได้ ในปัจจุบัน สารรีดิวซ์ถูกนำมาใช้บ่อยครั้งในกระบวนการสกัดกรดนิวคลีอิกแบบอัตโนมัติร่วมกับ magnetic nanoparticles ทำให้ได้ DNA และ RNA ที่มีความเข้มข้นสูง นอกจากนี้ยังสามารถลดระยะเวลาในการสกัดลงได้ โดยสรุปแล้ว การพัฒนาและประยุกต์ใช้สารรีดิวซ์ในกระบวนการสกัดสารพันธุกรรมจะช่วยปรับปรุงคุณภาพและประสิทธิภาพของการสกัดกรดนิวคลีอิก การวิเคราะห์ทางพันธุกรรม และการวินิจฉัยโรคทางการแพทย์

คำสำคัญ: การสกัดสารพันธุกรรม; กรดนิวคลีอิก; สารรีดิวซ์

บทนำ

กรดนิวคลีอิกเป็นสารประกอบอินทรีย์ประกอบด้วยหน่วยย่อยเรียกว่านิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ซึ่งเชื่อมต่อกันเป็นสายยาว ทำหน้าที่ในการเก็บข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต และถ่ายทอดการทำงานทางชีวภาพ เช่น การควบคุมการแสดงออกของยีน (regulation of gene expression) กระบวนการแปลรหัสเพื่อสังเคราะห์โปรตีน (modulation of protein translation)⁽¹⁾ การศึกษากรด-

นิวคลีอิก (nucleic acid) และปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการไขปริศนาความซับซ้อนของโมเลกุลที่มีการเปลี่ยนแปลงที่อาจก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutations) ซึ่งทำให้โครงสร้างหน้าที่ของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป⁽²⁾ และมีความสัมพันธ์กับการดำเนินของโรคทางพันธุกรรม^(1,2) จึงกล่าวได้ว่าการสกัดสารพันธุกรรมเป็นขั้นตอนสำคัญขั้นตอนหนึ่งในการตรวจวินิจฉัยโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงการระบาดของโรค

เช่น การแพร่ระบาดของโรค COVID-19⁽³⁾ เป็นต้น

การวินิจฉัยโรคทางอณูชีวโมเลกุลในห้องปฏิบัติการด้านการแพทย์ที่แม่นยำ จะช่วยให้แพทย์สามารถวินิจฉัยโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ผู้ป่วยได้รับประโยชน์จากการรักษาโรคที่ถูกต้อง⁽⁴⁾ การตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมเป้าหมายด้วย nucleic acid amplification test (NAAT) เช่น ปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) การศึกษาลำดับสารพันธุกรรม (DNA sequencing) และวิธีทางโมเลกุลอื่นๆ⁽³⁾ ต้องอาศัยการสกัดกรดนิวคลีอิกที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งเป็นกระบวนการแรกของการวินิจฉัยในระดับโมเลกุล^(5,6) ที่มักพบการปนเปื้อน สารพันธุกรรมมีความเข้มข้นต่ำ และไม่เพียงพอต่อการใช้งาน ซึ่งในการแยกสารพันธุกรรมที่ถูกห่อหุ้มด้วยโปรตีน ไขมัน และสารชีวโมเลกุลอื่นๆ จึงมีความจำเป็นต้องใช้สารรีดิวซ์เพื่อทำลายพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond)⁽⁷⁾ ของสารชีวโมเลกุลเหล่านั้น รวมทั้งยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นิวคลีเอส (nuclease) ในการย่อยสลายกรดนิวคลีอิกเพื่อให้ได้กรดนิวคลีอิกที่มีความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น

สารรีดิวซ์ หรือ “reductant” เป็นโมเลกุลที่ให้อิเล็กตรอน (electron-donating molecule) โดยอิเล็กตรอนจะถูกถ่ายโอนจากโมเลกุลหนึ่งไปยังอีกโมเลกุลหนึ่ง⁽⁸⁾ การใช้สารรีดิวซ์ในกระบวนการสกัดสารพันธุกรรม เช่น β -mercaptoethanol (BME), dithiothreitol (DTT), tris-2-carboxyethyl phosphine hydrochloride (TCEP)⁽⁷⁾ และ dithiobutylamine (DTBA) จะช่วยทำให้โครงสร้างของนิวคลีโอโซม (nucleosome) ไรบิโบนิวคลีโอโปรตีน (ribonucleoprotein) และนิวคลีโอแคปซิด (nucleocapsid) ของไวรัส เกิดความเสียหายจากการทำลายพันธะไดซัลไฟด์ ส่งผลให้ DNA หรือ RNA เป็นอิสระและหลุดออกจากโครงสร้างโปรตีนที่ห่อหุ้ม ทำให้ได้ DNA และ RNA ที่มีความเข้มข้นและความบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ สารรีดิวซ์ยังไปทำลายโครงสร้างของเอนไซม์นิวคลีเอส (nuclease) บริเวณที่มีการจับกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ ทำให้เอนไซม์สูญเสียคุณสมบัติการทำงาน เช่น การสกัด RNA ที่มีการเติม

β -mercaptoethanol ลงไป เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ribonuclease (RNase)⁽⁹⁾ เป็นต้น

อย่างไรก็ตามจากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าการศึกษาล่าสุดมุ่งเน้นการใช้สารรีดิวซ์ในกระบวนการสกัดบางรูปแบบเท่านั้น ขณะที่ข้อมูลเชิงเปรียบเทียบเกี่ยวกับสารรีดิวซ์ต่างๆ ในการสกัดกรดนิวคลีอิกจากสิ่งส่งตรวจทางการแพทย์ ยังมีรายงานค่อนข้างน้อย ซึ่งสะท้อนถึงช่องว่างขององค์ความรู้ที่ควรได้รับการศึกษาเพิ่มเติม จึงนำมาสู่วัตถุประสงค์ของการศึกษา เพื่อทบทวนและรวบรวมองค์ความรู้เกี่ยวกับสารรีดิวซ์ในกระบวนการสกัดสารพันธุกรรม และการนำไปประยุกต์ใช้ในการสกัดกรดนิวคลีอิกจากสิ่งส่งตรวจทางการแพทย์ เพื่อเพิ่มคุณภาพและประสิทธิภาพของการตรวจวิเคราะห์ทางอณูชีววิทยาโมเลกุล และการวินิจฉัยโรคทางการแพทย์

วิธีการศึกษา

บทความนี้เป็นการทบทวนวรรณกรรมอย่างเป็นระบบโดยดำเนินการสืบค้นและคัดเลือกข้อมูลตามขั้นตอนการดำเนินงานดังนี้

1. การสืบค้นข้อมูล

ดำเนินการสืบค้นบทความ งานวิจัย และสื่อสิ่งพิมพ์ที่เผยแพร่ในฐานข้อมูล เช่น Google scholar และ PubMed โดยทำการสืบค้นข้อมูลโดยไม่จำกัดปีที่ตีพิมพ์ และกำหนดคำสำคัญ (Keyword) ที่ใช้ในการสืบค้น ได้แก่ “reducing agent”, “nucleic acid extraction”, “nucleic acid”, “DNA extraction” และ “RNA extraction”

2. เกณฑ์การคัดเลือก

เกณฑ์การคัดเลือก คัดเลือกเฉพาะบทความ งานวิจัย และสื่อสิ่งพิมพ์ ที่มีการศึกษาและมีเนื้อหาเกี่ยวกับสารรีดิวซ์ การใช้สารรีดิวซ์ในกระบวนการสกัดสารพันธุกรรม หรือคุณสมบัติและกลไกของสารรีดิวซ์

เกณฑ์การคัดออก คือบทความ งานวิจัย และสื่อสิ่งพิมพ์ที่ไม่เกี่ยวข้องกับสารรีดิวซ์ บทความที่มีเนื้อหาซ้ำซ้อน บทความที่ใช้สารรีดิวซ์ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการวินิจฉัยทางการแพทย์ หรือบทความที่ไม่สามารถเข้าถึงเนื้อหาได้

3. การคัดเลือกบทความ

จากการสืบค้นพบเอกสารที่เกี่ยวข้องรวมทั้งสิ้น 23 รายการ ซึ่งได้จากการสืบค้นจาก Google scholar (พบบทความที่เกี่ยวข้องจำนวน 12 รายการ) และ PubMed (พบบทความที่เกี่ยวข้องจำนวน 11 รายการ) จากนั้นทำการคัดเลือกให้สอดคล้องกับวัตถุประสงค์ของการศึกษา ซึ่งพบว่า บทความทั้ง 23 รายการ ผ่านเกณฑ์การคัดเลือก ซึ่งครอบคลุมเนื้อหาเกี่ยวกับการสกัดสารพันธุกรรม การประยุกต์ใช้สารรีติวซ์ในกระบวนการสกัดสารพันธุกรรมจากสิ่งส่งตรวจทางการแพทย์ และมีความสมบูรณ์ของเนื้อหาครบถ้วน

4. การวิเคราะห์และสังเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลจากบทความที่ผ่านการคัดเลือกทั้ง 23 รายการ มาทำการวิเคราะห์ และสังเคราะห์เนื้อหาตามประเด็นสำคัญ ได้แก่ กระบวนการสกัดกรดนิวคลีอิก ขั้นตอนพื้นฐานในการสกัด บทบาทของสารรีติวซ์ในการสกัดกรดนิวคลีอิก คุณสมบัติของสารรีติวซ์แต่ละชนิดและกลไกการทำลายพันธะไดซัลไฟด์ในโปรตีนที่ห่อหุ้มกรดนิวคลีอิกที่ใช้ในกระบวนการสกัดสารพันธุกรรม ประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์นิวคลีเอส และการนำไปใช้งาน เพื่อนำเสนอในบทความต่อไป

ผลการศึกษา

กระบวนการสกัดกรดนิวคลีอิก

หลักการพื้นฐานของการสกัดกรดนิวคลีอิกคือการแยก DNA และ RNA ออกจากสิ่งส่งตรวจให้มีความบริสุทธิ์ และมีปริมาณเพียงพอต่อการใช้งาน ขั้นตอนแรกเป็นการทำลายโครงสร้างส่วนที่ห่อหุ้มกรดนิวคลีอิก เช่น ผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ เยื่อหุ้มนิวเคลียส⁽⁶⁾ โปรตีนที่ยึดจับกับกรดนิวคลีอิก (nucleoprotein) เช่น histone ในส่วนของอนุภาคไวรัส เริ่มจากการทำลายชั้นไขมันห่อหุ้มโครงสร้าง (lipid envelope) ชั้นโปรตีนห่อหุ้มโครงสร้าง (protein envelope) และ nucleocapsid⁽¹⁰⁾ ด้วยวิธีการทางกายภาพ ทางเคมี และทางชีวภาพ ช่วยปลดปล่อยโมเลกุลของกรดนิวคลีอิกให้เป็นอิสระออกจากโครงสร้าง

ที่ห่อหุ้ม เมื่อผ่านขั้นตอนการสกัด และการชะล้างจะได้กรดนิวคลีอิกที่มีความบริสุทธิ์และมีความเข้มข้นสูง⁽⁶⁾ ปัจจุบันได้มีการพัฒนาการสกัดสารพันธุกรรมแบบอัตโนมัติขึ้นมาเพื่อแทนวิธีการสกัดด้วยมือ ช่วยให้สามารถสกัดตัวอย่างได้จำนวนมากในระยะเวลาที่รวดเร็ว มีความบริสุทธิ์สูง สามารถสกัดตัวอย่างซ้ำได้หลายรอบ ในระยะเวลาที่สั้นกว่าเดิม⁽¹¹⁾

ขั้นตอนพื้นฐานในการสกัด

เทคนิคการสกัดกรดนิวคลีอิกช่วยให้สามารถแยกโมเลกุลของ DNA และ RNA จากตัวอย่างชนิดต่าง ๆ ได้⁽¹⁹⁾ ปัจจุบันกระบวนการสกัดและการทำให้กรดนิวคลีอิกมีความบริสุทธิ์ ได้พัฒนาไปมากในช่วงระยะเวลาที่ผ่านมา การสกัดสารพันธุกรรมด้วยวิธีการแบบดั้งเดิมโดยใช้สารละลายในการสกัดแบบ chemical method เช่น phenol-chloroform extraction⁽¹¹⁾ CTAB-chloroform-isoamyl alcohol extraction⁽¹²⁾ และ alkaline extraction⁽¹¹⁾ มีขั้นตอนการสกัดกรดนิวคลีอิกที่ซับซ้อน ประกอบด้วย การแตกสลายอนุภาคหรือการแตกสลายโครงสร้างของเซลล์ ทำให้เข้มข้นด้วยการแยก และการตกตะกอน หลังจากการทำให้บริสุทธิ์แล้วจึงจะได้โมเลกุลกรดนิวคลีอิกที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น⁽⁶⁾ ด้วยข้อจำกัดของกระบวนการแบบดั้งเดิม ที่ใช้ระยะเวลานาน มีปัญหาเกี่ยวกับการปนเปื้อน และการเสื่อมสภาพของ DNA และ RNA จนนำมาสู่การพัฒนาวิธีการสกัดด้วย solid-phase extraction แบบ silica column⁽¹¹⁾ และ magnetic beads ขึ้น ซึ่งประกอบด้วย 4 ขั้นตอนได้แก่ ขั้นตอนการทำลายโครงสร้างเปลือกนอก (lysis) ขั้นตอนการจับกรดนิวคลีอิกหรือการดูดซับ (nucleic acid binding or adsorption) ขั้นตอนการชะล้าง (washing) และ ขั้นตอนการละลายสารพันธุกรรม (elution)⁽⁶⁾ ซึ่งระบบการสกัดสารพันธุกรรมโดยใช้วิธีการทางกายภาพ และ ทางเคมีร่วมกัน พบว่า มีประสิทธิภาพดีกว่าวิธีการสกัดสารพันธุกรรมแบบดั้งเดิม ที่ใช้ CTAB/chloroform/isoamyl alcohol based method อย่างชัดเจน⁽¹²⁾

บทบาทของสารรีดิวซ์ในการสกัดกรดนิวคลีอิก
การนำสารรีดิวซ์มาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ

กระบวนการสกัดสารพันธุกรรม ทำให้ได้ปริมาณกรดนิวคลีอิกที่มีความเข้มข้นและมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น โดยอาศัยกลไกการทำงานของสารรีดิวซ์ (reducing agents) เช่น β -mercaptoethanol, dithiothreitol, tris(2-chloroethyl) phosphate และ dithiobutylamine ในการทำลายโครงสร้างโปรตีนที่ห่อหุ้มสารพันธุกรรม และช่วยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ ที่จะย่อยสลายกรดนิวคลีอิกโดยการให้และรับอิเล็กตรอน (electron transfer) ด้วยปฏิกิริยารีดอกซ์ (redox reaction) ในการทำลายโครงสร้างของโปรตีน และเอนไซม์ บริเวณที่มีการจับกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ ซึ่งจะทำให้โปรตีนที่ห่อหุ้มกรดนิวคลีอิกสูญเสียโครงสร้าง และยับยั้งการทำงานของ

เอนไซม์ทั้งหมดที่มีอยู่ในกระบวนการสกัด⁽¹³⁻¹⁶⁾ (ตารางที่ 1)

การเลือกใช้สารรีดิวซ์ในกระบวนการสกัดสารพันธุกรรม (genetic material extraction) ควรพิจารณาให้เหมาะสมสำหรับการใช้งาน เช่น ราคา ขั้นตอนการเตรียมสาร ความคงตัว ความสามารถในการละลายน้ำ ความแรงในการรีดิวซ์ เช่น β -mercaptoethanol ใช้ลดพันธะไดซัลไฟด์ แต่มีข้อเสียคือกลิ่นแรง มีความเป็นพิษและระเหยง่าย ในขณะที่ dithiothreitol มีความสามารถในการรีดิวซ์สูงใช้ได้ดีในสภาวะที่มี pH สูงกว่า 7 แต่ก็มีควมไวต่อการออกซิไดซ์เช่นกัน ส่วน tris(2-chloroethyl) phosphate ละลายน้ำได้ดีมีความเสถียรสูง และ dithiobutylamine ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกลาง มีกลิ่นเบากว่า β -mercaptoethanol เป็นต้น⁽¹³⁻¹⁶⁾ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 ลักษณะปฏิกิริยาของสารรีดิวซ์แต่ละชนิดในกระบวนการสกัดสารพันธุกรรม

ชนิดของสารรีดิวซ์	ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในกระบวนการสกัดสารพันธุกรรม
β -mercaptoethanol (BME) ⁽¹³⁾	$RS-SR + 2 HOCH_2CH_2SH \rightleftharpoons 2 RSH + HOCH_2CH_2S-SCH_2CH_2OH$
Dithiothreitol (DTT) ⁽¹⁴⁾	$R-S-S-R + DTT-R-SH + R-SH + oxidized DTT$
Tris(2-chloroethyl) phosphate (TCEP) ⁽¹⁵⁾	$R-S-S-R + TCEP \rightarrow R-SH + R-SH + oxidized TCEP \text{ (phosphine oxide)}$
Dithiobutylamine (DTBA) ⁽¹⁶⁾	$R-S-S-R + DTBA \rightarrow R-SH + R-SH + oxidized DTBA$

ตารางที่ 2 คุณสมบัติทั่วไปของสารรีดิวซ์ที่ใช้ในกระบวนการสกัดสารพันธุกรรม

คุณสมบัติ	β -mercaptoethanol ⁽¹³⁾	dithiothreitol ⁽¹⁴⁾	tris(2-chloroethyl) phosphate (TCEP) ⁽¹⁵⁾	dithiobutylamine ⁽¹⁶⁾
สูตรทางเคมี	C_2H_6OS	$C_4H_{10}O_2S_2$	$C_6H_{12}Cl_3O_4P$	$C_4H_{11}NS_2$
มวลโมลาร์ (molar mass)	78.13 กรัม/โมล (g/mol)	154.25 กรัม/โมล (g/mol)	285.48 กรัม/โมล (g/mol)	137.26 กรัม/โมล (g/mol)
ความสามารถในการรีดิวซ์ (reducing power)	มีประสิทธิภาพ แต่น้อยกว่าตัวอื่น	มีความสามารถในการรีดิวซ์สูง ศักย์ไฟฟ้ารีดอกซ์ -0.33 โวลต์ที่ค่า pH เท่ากับ 7	มีความสามารถในการรีดิวซ์สูง มีความคงตัวเมื่อสัมผัสกับอากาศ	มีประสิทธิภาพสูงในการทำปฏิกิริยารีดอกซ์ และมี pKa ต่ำ ช่วยให้สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีในสภาวะที่ pH เป็นกลาง
ความสามารถในการละลายน้ำ	สามารถละลายน้ำได้	สามารถละลายน้ำได้ดี	สามารถละลายน้ำได้ดีมาก	สามารถละลายน้ำได้

การเพิ่มความเข้มข้นของ DNA และ RNA ในกระบวนการสกัดสารพันธุกรรมโดยใช้สารรีดิวซ์

ตารางที่ 2 คุณสมบัติทั่วไปของสารรีดิวซ์ที่ใช้ในกระบวนการสกัดสารพันธุกรรม (ต่อ)

คุณสมบัติ	β -mercaptoethanol ⁽¹³⁾	dithiothreitol ⁽¹⁴⁾	tris(2-chloroethyl) phosphate (TCEP) ⁽¹⁵⁾	dithiobutylamine ⁽¹⁶⁾
ความเสถียร (stability)	ไวต่อการเกิดออกซิเดชัน ต้องเก็บรักษาในสภาวะที่มีไนโตรเจน	มีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเมื่อสัมผัสกับออกซิเจนในอากาศ มีความเสถียร ต้องดำเนินการด้วยความระมัดระวัง เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาได้ง่าย	คงคุณสมบัติได้ดีเมื่อสัมผัสกับอากาศ	มีศักยภาพรีดิวซ์ไดซัลไฟด์ต่ำ ซึ่งช่วยลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทำให้มีความเสถียรสูง
การใช้งาน (applications)	ทำให้โปรตีนเสื่อมสภาพและลดพันธะไดซัลไฟด์	ลดพันธะไดซัลไฟด์ มักใช้ร่วมกับสารที่ทำให้โปรตีนเสื่อมสภาพ เช่น sodium dodecylsulfate (SDS)	ลดพันธะไดซัลไฟด์ โดยเฉพาะในการใช้งานกับ DNA และโปรตีน	พัฒนาขึ้นเพื่อใช้เป็นทางเลือกแทน dithiothreitol โดยมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าในสภาวะที่มีค่า pH เป็นกลาง
จุดหลอมเหลว/จุดเดือด	จุดหลอมเหลว $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($-148\text{ }^{\circ}\text{F}$; 173 K); จุดเดือด $157\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($314\text{ }^{\circ}\text{F}$; 430 K)	จุดหลอมเหลว $42\text{--}43\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($108\text{--}109\text{ }^{\circ}\text{F}$; $315\text{--}316\text{ K}$); จุดเดือด $125\text{--}130\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($257\text{--}266\text{ }^{\circ}\text{F}$; $398\text{--}403\text{ K}$) ที่ 2 mmHg	จุดเดือด $192\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($378\text{ }^{\circ}\text{F}$; 465 K) ที่ 10 mmHg	ไม่มีการระบุอย่างชัดเจนสังเคราะห์เพื่อความสะดวกในการใช้งาน
กลิ่น	มีกลิ่นไม่พึงประสงค์ มีกลิ่นรุนแรงเฉพาะตัว	ไม่มีกลิ่น	ไม่มีกลิ่น	มีกลิ่นเล็กน้อย

วิจารณ์

การสกัดกรดนิวคลีอิก (nucleic acid extraction) เป็นจุดเริ่มต้นของการทดลองทั้งหมดในการวิจัยทางชีวการแพทย์⁽¹⁷⁾ แนวทางพัฒนาเทคนิคใหม่ๆ ร่วมกับการใช้สารรีดิวซ์ในกระบวนการสกัดสารพันธุกรรมจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์ทางด้านโมเลกุลด้วยเทคนิคต่างๆ เช่น การสกัดกรดนิวคลีอิก ด้วยอนุภาคแม่เหล็กนาโน (magnetic nanoparticle) โดยใช้ Pasteur pipette ซึ่งไม่ต้องใช้เครื่องมือไฟฟ้าใดๆ⁽¹⁸⁾ การสกัดแบบ bead-beating ร่วมกับ coagulation and proteolysis method โดยใช้ magnetic bead สำหรับสกัด DNA และ RNA จากตัวอย่างที่ซับซ้อน จะทำให้ได้สารพันธุกรรมที่มีคุณภาพสูงในระยะเวลาที่รวดเร็ว⁽¹⁹⁾ หรือการนำสารรีดิวซ์มาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงกระบวนการสกัดสำหรับการตรวจวิเคราะห์ทางพันธุกรรม จะช่วยลดปัญหาและอุปสรรคในเรื่องข้อจำกัดของปริมาณสารพันธุกรรมตั้งต้นในกระบวนการตรวจวิเคราะห์ลงได้

การทดสอบที่ต้องการปริมาณสารพันธุกรรมตั้งต้นที่มีความเข้มข้นสูง เช่น การทำ high-throughput sequencing แบบ long-read sequencing (LRS) ซึ่งเป็นวิธีการศึกษาทางด้านโมเลกุลวิธีหนึ่งที่สามารถวินิจฉัยข้อมูลทางพันธุกรรมได้อย่างครอบคลุม และเป็นวิธีการที่ช่วยลดระยะเวลาการทดสอบด้วยวิธีการทดสอบทางด้านโมเลกุลอื่นๆ⁽²⁾ หรือแม้กระทั่งการวิเคราะห์ mass spectrometry analysis ซึ่งถือเป็นการทดสอบที่สำคัญทางด้าน genomic และ transcriptomic ที่ช่วยให้สามารถวิเคราะห์ข้อมูลเชิงลึกเกี่ยวกับ epigenetic และ epitranscriptomic⁽¹⁾ ได้ หากมีสารพันธุกรรมตั้งต้นที่มีปริมาณความเข้มข้นต่ำกว่าข้อจำกัดการตรวจวินิจฉัย (limit of detection) อาจจะไม่สามารถทำการทดสอบด้วยวิธีการเหล่านี้ได้ ดังนั้น การใช้สารรีดิวซ์จะช่วยเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของสารพันธุกรรมจากกระบวนการสกัดสารพันธุกรรม และลดการสูญเสีย DNA และ RNA จากการถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ในขั้นตอนการสกัด เช่น ป้องกัน RNA จากการ

ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ RNase และการย่อยสลาย DNA จากเอนไซม์ DNase โดยการเติมสารละลาย β -mercaptoethanol ลงไปในกระบวนการสกัดสารพันธุกรรม เป็นต้น⁽¹³⁾

การบูรณาการเพื่อใช้สารรีดิวซ์ในกระบวนการสกัดสารพันธุกรรม เช่น จากตัวอย่างชิ้นเนื้อในบล็อกพาราฟิน ซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งที่น่าสนใจในการเก็บรักษาตัวอย่างชิ้นเนื้อ ได้เป็นระยะเวลานาน สามารถนำมาใช้ในงานวิเคราะห์ทางโมเลกุลได้ภายหลัง⁽²⁰⁾ การสกัดกรดนิวคลีอิกให้ได้คุณภาพสูงจากเนื้อเยื่อทางชีวภาพเหล่านี้ให้ประสบความสำเร็จได้นั้น ต้องอาศัยปัจจัยต่างๆ เช่น การทำลายเนื้อเยื่อและโครงสร้างเซลล์อย่างเพียงพอ การทำลายโครงสร้างเชิงซ้อนที่ประกอบด้วยนิวคลีโอโปรตีน (nucleoprotein complex) การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นิวคลีเอส (inactivation of nucleases) การทำให้กรดนิวคลีอิกมีความบริสุทธิ์ และการเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดตัวอย่างทางชีวภาพจากแหล่งต่าง ๆ⁽¹⁷⁾ ได้โดยใช้สารรีดิวซ์ (reducing agent) ร่วมกับเอนไซม์ proteinase K ซึ่งเป็นขั้นตอนการสกัด DNA ที่มีประสิทธิภาพที่สุดสำหรับเนื้อเยื่อสด ส่วนตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ฝังอยู่ในซีฟิงพาราฟิน โดยปกติอาจต้องใช้เวลานานเป็นเวลา 5 วันด้วยเอนไซม์ proteinase K จึงจะได้ DNA จำนวนมาก⁽²¹⁾ ดังนั้น การนำสารรีดิวซ์มาใช้จะช่วยลดระยะเวลาการสกัดสารพันธุกรรมลงได้ และ ยังช่วยเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของสารพันธุกรรม จึงควรนำมาพิจารณาสำหรับนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ทางด้านพันธุศาสตร์ และการตรวจวินิจฉัยโรคทางการแพทย์

ข้อเสนอแนะ

การพัฒนาวิธีการสกัดสารพันธุกรรมด้วยการใช้สารรีดิวซ์สำหรับห้องปฏิบัติการ (in-house nucleic acid extraction) ควรทำการประเมินประสิทธิภาพการใช้งาน (performance evaluation) การควบคุมคุณภาพการตรวจสอบและยืนยันวิธีการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการทางคลินิก (validation and verification of analytical methods)^(22,23) เพื่อศึกษาความไว ความจำเพาะ ความถูกต้อง

ข้อจำกัดการใช้งาน ความเข้มข้นที่เหมาะสมๆ โดยการเปรียบเทียบกับวิธีการแบบดั้งเดิมหรือวิธีมาตรฐาน รวมทั้งการทดสอบความชำนาญทางห้องปฏิบัติการ (external quality assessment: EQA) หรือ proficiency testing (PT) เพื่อให้มั่นใจได้ว่าการนำสารรีดิวซ์มาใช้ในกระบวนการสกัดสารพันธุกรรม มีคุณภาพ ตรงตามมาตรฐาน และสามารถใช้งานได้จริงในห้องปฏิบัติการ⁽²³⁾

สรุป

การใช้สารรีดิวซ์จะช่วยเพิ่มปริมาณความเข้มข้น ความเสถียร ทำให้คุณภาพของ DNA และ RNA จากกระบวนการสกัดสารพันธุกรรมดีขึ้น ในการพัฒนาวิธีการสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างทางการแพทย์โดยใช้สารรีดิวซ์เช่น ตัวอย่างชิ้นเนื้อจากพาราฟิน เนื้อเยื่อที่มีไขมันสูง ร่วมกับตัวทำลายที่เหมาะสมจะช่วยลดการปนเปื้อน ความซับซ้อนของกระบวนการทำงาน และลดระยะเวลาการสกัดสารพันธุกรรมลงได้

เอกสารอ้างอิง

1. Xie Y, Brás-Costa C, Lin Z, Garcia BA. Mass Spectrometry Analysis of nucleic acid modifications: from beginning to future [Internet]. 2024 [cited 2024 Nov 28] Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39308031/>
2. Peixoto ML, Madan E. Unraveling the complexity: advanced methods in analyzing DNA, RNA, and protein interactions. *Adv Cancer Res* 2024;163:251–302.
3. Huggett JF, O'Sullivan DM, Cowen S, Cleveland MH, Davies K, Harris K, et al. Ensuring accuracy in the development and application of nucleic acid amplification tests (NAATs) for infectious disease. *Mol Aspects Med* 2024;97:101275.
4. Damaraju N, Miller AL, Miller DE. Long-read DNA and RNA sequencing to streamline clinical genetic testing and

- reduce barriers to comprehensive genetic testing. J Appl Lab Med 2024;9(1):138–50.
5. Shin JH. Nucleic Acid Extraction and Enrichment. advanced techniques in diagnostic microbiology 2018; 10:273–92.
6. Rocker Scientific. Nucleic acid extraction [Internet]. 2023 [cited 2024 Nov 28]. Available from: https://www.rocker.com.tw/en/application/nucleic_acid_extraction/
7. Aiba Y, Komiyama M. Introduction of disulfide bond to the main chain of PNA to switch its hybridization and invasion activity. Org Biomol Chem 2009;7(24):5078–83.
8. National Library of Medicine (US). Oxidation – reduction [Internet]. 1982 [cited 2026 Jan 14]. Available from: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh?Db=mesh&Term=%22Oxidation-Reduction%20%22\[MESH\]](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh?Db=mesh&Term=%22Oxidation-Reduction%20%22[MESH])
9. Mommaerts K, Sanchez I, Betsou F, Mathieson W. Replacing β -mercaptoethanol in RNA extractions. Anal Biochem 2015;479:51–3.
10. Gelderblom HR. Structure and classification of viruses. In: Baron S, editor. Medical microbiology. 4th ed. Galveston, TX: University of Texas Medical Branch; 1996.
11. Tan SC, Yiap BC. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. J Biomed Biotechnol 2009; 2009:574398.
12. Lebuhn M, Derenkó J, Rademacher A, Helbig S, Munk B, Pechtl A, et al. DNA and RNA extraction and quantitative real-time PCR-based assays for biogas biocenoses in an interlaboratory comparison. Bioengineering (Basel) 2016;3(1): 1–24.
13. Wikipedia Contributors. 2-mercaptoethanol [Internet]. 2024 [cited 2024 Nov 28]. Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/2-Mercaptoethanol#Reducing_proteins
14. Wikipedia Contributors. Dithiothreitol [Internet]. 2024 [cited 2024 Nov 28]. Available from: <https://en.wikipedia.org/wiki/Dithiothreitol>
15. Wikipedia Contributors. TCEP [Internet]. 2024 [cited 2024 Nov 28]. Available from: <https://en.wikipedia.org/wiki/TCEP>
16. Wikipedia contributors. Dithiobutylamine [Internet]. 2024 [cited 2024 Nov 28]. Available from: <https://en.wikipedia.org/wiki/Dithiobutylamine>
17. Mullegama SV, Alberti MO, Au C, Li Y, Toy T, Tomasian V, et al. Nucleic acid extraction from human biological samples. Methods Mol Biol 2019;1897:359–83.
18. Kang J, Li Y, Zhao Y, Wang Y, Ma C, Shi C. Nucleic acid extraction without electrical equipment via magnetic nanoparticles in Pasteur pipettes for pathogen detection. Anal Biochem 2021;635:114445.
19. Katayama YA, Hayase S, Iwamoto R, Kuroita T, Okuda T, Kitajima M, et al. Simultaneous extraction and detection of DNA and RNA from viruses, prokaryotes, and eukaryotes in wastewater using a modified COPMAN. Sci Total Environ 2024;907:167866.
20. Turashvili G, Yang W, McKinney S, Kalloger S, Gale N, Ng Y, et al. Nucleic acid quantity and quality from paraffin blocks: defining optimal fixation, processing and DNA/RNA extraction techniques. Exp Mol Pathol 2012;92(1):33–43.
21. Jackson DP, Lewis FA, Taylor GR, Boylston AW, Quirke P. Tissue extraction of DNA and RNA and analysis by the polymerase chain reaction. J Clin Pathol 1990;43(6): 499–504.
22. Pum J. A practical guide to validation and verification of analytical methods in the clinical laboratory. Adv Clin Chem 2019;90:215–81.

23. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. คู่มือเครือข่ายห้องปฏิบัติการโรคติดต่ออุบัติใหม่ ฉบับ 2564 [อินเทอร์เน็ต]. 2564 [สืบค้นเมื่อ 5 ธ.ค. 2567]. แหล่งข้อมูล: https://www3.dmsc.moph.go.th/download/files/dmsc_recurrence.pdf

High Yield of DNA and RNA in Nucleic Acid Extraction Using Reducing Agents

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

Department of Pathology, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Thailand
Journal of Health Science of Thailand 2026;35(5):923-30.

Corresponding author: Kingkan Rakmanee, Email: kingvirusrama@gmail.com

Abstract: Genetic extraction constitutes a pivotal step in biomolecular science. The utilization of reducing agents, such as β -mercaptoethanol, dithiothreitol, tris-2-carboxyethyl phosphine hydrochloride, and dithiobutylamine, in the extraction of genetic material from medical specimens has been shown to result in higher purity and concentration of deoxyribonucleic acid (DNA) and ribonucleic acid (RNA). The objective of this study is to investigate the properties and efficacy of various reducing agents that can be utilized to enhance the process of genetic extraction. Reducing agents play a vital role in the process of disrupting disulfide bonds within the protein structures that encapsulate nucleic acids, thereby facilitating the efficient release of DNA and RNA. In addition, reducing agents have been shown to inhibit the activity of enzymes responsible for the breakdown of nucleic acids. At present, reducing agents are frequently utilized in automated nucleic acid extraction processes in conjunction with magnetic nanoparticles, thereby yielding highly concentrated DNA and RNA. Furthermore, it has been demonstrated to exhibit reduced extraction times. In summary, the development and application of reducing agents in the genetic material extraction process will improve the quality and efficiency of nucleic acid extraction, genetic analysis, and medical disease diagnosis.

Keywords: nucleic acid extraction; nucleic acid; reducing agents