RESEARCH ARTICLE

Genomics DNA Extraction from Clotted Blood of Cattle

Alisa Wilantho[1], Wanwimon Mokmak[1], Ekachai Jenwitheesuk[1,2*]

Abstract

Objective — Genomics DNA used in molecular biology research is usually extracted and purified from uncoagulated blood. Extraction of the genomics DNA from clotted blood is not preferable due to the difficulty of extraction techniques and requirement of special equipments. However, current practice in veterinary clinical pathology uses serum in monitoring and diagnosing animal diseases making the remaining clotted blood a good source of genomics DNA for molecular biology research. One of the most important steps in genomics DNA extraction from clotted blood is breaking the clot, which is usually carried out outside of the test tube, thereby increasing risk of contamination.

Methods — In this report, we demonstrated in detail the protocol for extracting cattle genomics DNA from clotted blood using basic equipments and chemical reagents.

Results — Our protocol effectively reduced contamination since the clot was physically broken in the test tube. High DNA concentration and quality in terms of intactness and purity were obtained.

Conclusion — By breaking the clot in the test tube, genomics DNA extraction can be done simply through basic equipments an chemical reagents.

KKU Vet J. 2009;19(1):16-29 *http://vet.kku.ac.th/journal/*

Keywords: Genomics DNA; Extraction; Clotted blood; Cattle

[1]National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Pahonyothin Road, Klongluang, Pathumthani, Thailand 12120

[2]Interdisciplinary Graduate Program in Genetic Engineering, Graduate School, Kasetsart University, Jatujak, Bangkok, Thailand 10900

***Corresponding author** E-mail: ekachai@biotec.or.th Tel. 02 564 6700

การสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอจากลิ่มเลือดของโค

อลิษา วิลันโท[1], วรรณวิมล หมอกมาก[1], เอกชัย เจนวิถีสุข[1,2*]

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ การสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอเพื่อใช้ในงานด้านอณูชีววิทยานั้นนิยมสกัดจากเลือดที่ผสมสารกันเลือดแข็ง ส่วนลิ่มเลือดที่ได้ภายหลังจากการปั่นแยกซีรั่มนั้นไม่เป็นที่นิยมเนื่องจากสกัดได้ยากและมีความยุ่งยากกว่า อย่างไรก็ดี การตรวจโรคสัตว์ในปัจจุบันยังนิยมตรวจจากซีรั่ม ทำให้เหลือลิ่มเลือดซึ่งอาจใช้เป็นแหล่งจีโนมิกส์ดีเอ็นเอสำหรับใช้ในงานอื่นต่อไปได้ การสกัดดีเอ็นเอจากลิ่มเลือดนั้นมีขั้นตอนสำคัญคือการทำให้ลิ่มเลือดแตกตัวโดยอาจใช้การบดในภาชนะซึ่งมีความเสี่ยงที่จะเกิดการปนเปื้อน

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ รายงานฉบับนี้แสดงรายละเอียดขั้นตอนการสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอจากลิ่มเลือดของโค โดยประยุกต์ใช้อุปกรณ์และสารเคมีที่มีราคาถูกในการละลายลิ่มเลือดในหลอดบรรจุเลือดโดยตรงเพื่อลดโอกาสในการปนเปื้อน

ผลการศึกษา ผลการทดลองพบว่าสามารถละลายลิ่มเลือดได้เป็นอย่างดี ได้จีโนมิกส์ดีเอ็นเอปริมาณสูง มีความบริสุทธิ์ และไม่มีการแตกหักของสายดีเอ็นเอ

และข้อสรุป การสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอจากลิ่มเลือดสามารถทำได้ง่ายโดยใช้อุปกรณ์พื้นฐานที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการทั่วไปและใช้สารเคมีที่เตรียมได้ง่ายและมีราคาถูก การทำให้ลิ่มเลือดละลายตัวในหลอดบรรจุเลือดจะช่วยลดโอกาสการปนเปื้อนของดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจแต่ละหลอดลงได้อย่างมาก

วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 2552;19(1):16-29 *http://vet.kku.ac.th/journal/*

คำสำคัญ : จีโนมิกส์ดีเอ็นเอ การสกัด ลิ่มเลือด โค

[1]ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ถ.พหลโยธิน ต.คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120
[2]โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษาสาขาพันธุวิศวกรรม บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร กรุงเทพ 10900
***ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ** E-mail: ekachai@biotec.or.th โทรศัพท์ 02-564-6700

บทนำ

การศึกษาเกี่ยวกับยีนหรือจีโนมของสัตว์โดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยานั้น มักจะใช้ดีเอ็นเอเป็นสารตั้งต้นในการศึกษา วิธีการและสารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจนั้นมีความสำคัญเนื่องจากปัจจัยทั้งสองนี้มีผลต่อการแตกหักของสายดีเอ็นเอและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ขั้นตอน

การสกัดดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจมักจะเป็นขั้นตอนแรกๆ ของงานวิจัย หากได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพต่ำก็จะส่งผลต่องานในขั้นตอนต่อๆ มา ดังนั้นการสกัดดีเอ็นเอจึงเป็นตัววัดที่สำคัญที่บ่งชี้ถึงความสำเร็จของการทดลองในอนาคต

สิ่งส่งตรวจจากสัตว์ที่นิยมนำมาสกัดดีเอ็นเอได้แก่เลือดที่ผสมสารป้องกันการแข็งตัวหรือเนื้อเยื่อจากอวัยวะต่างๆ ส่วนลิ่มเลือดที่ได้แยกเอาซีรั่มออกไปแล้วนั้นไม่เป็นที่นิยมเนื่องจากสกัดดีเอ็นเอได้ยากกว่า อย่างไรก็ดี การตรวจหาสารเคมีหรือสารอื่นๆ ในเลือดเพื่อตรวจโรคหรือตรวจสุขภาพสัตว์ในปัจจุบันนั้นยังนิยมตรวจจากซีรั่มอยู่ หากสามารถสกัดดีเอ็นเอได้จากลิ่มเลือดโดยได้ปริมาณดีเอ็นเอมากพอที่จะนำไปใช้ประโยชน์อื่นได้และเป็นดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์ ไม่แตกหักก็จะช่วยลดปริมาณงาน ค่าใช้จ่าย และความเสี่ยงที่สัตว์จะได้รับความบาดเจ็บจากการเจาะเลือดหลายครั้งได้

การสลายลิ่มเลือดเพื่อนำไปสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอในปัจจุบันมีหลายวิธีด้วยกัน เช่น การใช้ใบมีดผ่าตัดสับลิ่มเลือดเป็นชิ้นๆ บนแผ่นแก้วที่สะอาด แล้วนำไปสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีปกติ [1,2] หรือการใช้ cotton tip swab บดให้ลิ่มเลือดแตกตัว [3] วิธีเหล่านี้มีความเสี่ยงที่จะทำให้เกิดการปนเปื้อนของเลือดแต่ละหลอด และยังมีความเสี่ยงที่ผู้ปฏิบัติงานจะติดเชื้อจากเลือดหรือได้รับอันตรายจากการใช้มีด นอกจากนี้มีการพัฒนาอุปกรณ์การสลายลิ่มเลือด โดยใช้ serum separator tube (CLOTSPIN, Gentra Systems Inc.) ซึ่งมีลักษณะเป็นหลอดบรรจุลิ่มเลือด ภายในมีอุปกรณ์พิเศษทำให้ลิ่มเลือดแตกตัวเมื่อนำหลอดไปปั่น อุปกรณ์ชนิดนี้จึงช่วยลดโอกาสในการปนเปื้อนของดีเอ็นเอระหว่างสิ่งส่งตรวจแต่ละหลอดได้เป็นอย่างดี [4,5] แต่อย่างไรก็ตาม อุปกรณ์นี้เป็นชุดสำเร็จรูปของบริษัทเอกชน บางชนิดถูกออกแบบมาให้ใช้ได้เพียงครั้งเดียวและมีราคาแพง

รายงานฉบับนี้แสดงรายละเอียดขั้นตอนการสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอจากลิ่มเลือดของโค โดยประยุกต์ใช้อุปกรณ์และสารเคมีที่มีราคาถูกสลายลิ่มเลือดในหลอดบรรจุเลือดโดยตรงและใช้สารฟีนอล-คลอโรฟอร์มในการสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของโค

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

การเตรียมลิ่มเลือด

ทำการเจาะเลือดโค 10 ตัว ตัวละ 10 มิลลิลิตร นำเลือดจากโคแต่ละตัวแบ่งใส่ในหลอดเก็บเลือดซึ่งไม่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ขนาด 15 มิลลิลิตร 2 หลอด หลอดละ 5 มิลลิลิตร นำหลอดไปปั่นที่ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งซีรั่มและนำหลอดบรรจุลิ่มเลือดไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาสองสัปดาห์ จากนั้นนำลิ่มเลือดที่ได้ไปผ่านขบวนการสลายลิ่มเลือดแล้วทำการสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ โดยหลอดแรกนำไปสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอด้วยวิธีฟีนอล-คลอโรฟอร์ม ส่วนหลอดที่สองสกัดด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA) โดยใช้วิธีการทดลองและสารเคมีตามเอกสารคำแนะนำที่แนบมากับชุดสกัดสำเร็จรูป

การสลายลิ่มเลือด

นำหลอดบรรจุเลือดแช่ในน้ำอุ่นอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที **(Figure 1A)** เติมสารละลาย Red Blood Cell (RBC) Lysis Buffer ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดบรรจุเลือด เพื่อทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (RBC Lysis Buffer ประกอบไปด้วย แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ความเข้มข้น 155 มิลลิโมลาร์, โพแทสเซียมไบคาร์บอเนต ($KHCO_3$) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และเอทธิลีนไดเอมีนเตตระอะซิติคเอซิด (EDTA) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ นำสารละลายดังกล่าวมาปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เป็น 7.4 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) จากนั้นใช้แท่งไม้ความยาว 10 นิ้ว ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 4 ก้าน นำปลายด้านแหลมแทงลงไปในลิ่มเลือดแล้วเขี่ยให้ลิ่มเลือดแตก **(Figure 1B)** หากยังมีลิ่มเลือดเหลืออยู่ในหลอด ให้เติมบัฟเฟอร์ RBC ลงไปอีกครั้งละ 1 มิลลิลิตรและใช้ไม้เขี่ยจนกระทั่งลิ่มเลือดกลายเป็นสารละลายสีแดงทั้งหมด ทิ้งไม้ในภาชนะที่เหมาะสมและนำไปทำลายด้วยการเผาเมื่อเสร็จงานแล้ว

นำหลอดบรรจุเลือดไปปั่นที่ 5,300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทน้ำด้านบนทิ้ง จะสังเกตเห็นเม็ดเลือดขาวตกตะกอนเป็นก้อนสีขาวขุ่นอยู่ที่ก้นหลอด **(Figure 1C)** พับกระดาษชำระทบกันหลายๆ ชั้นจนหนาแล้วคว่ำหลอดลงบนกระดาษชำระเพื่อซับน้ำเลือดที่ปากหลอดออก (หากยังมีตะกอนลิ่มเลือดสีแดงอยู่จำนวนมากที่ก้นหลอด ให้ล้างตะกอนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ RBC ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วปั่นซ้ำเพื่อแยกให้ได้เฉพาะเม็ดเลือดขาว) เติมบัฟเฟอร์ RBC ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใช้นิ้วดีดหลอดเบาๆ เพื่อให้ตะกอนเม็ดเลือดขาวแตกกระจายจนกลายเป็นสารละลาย นำสารละลายที่ได้ไปใส่ในหลอดใหม่ที่สะอาดและนำไปสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอด้วยวิธีฟีนอล-คลอโรฟอร์มตามขั้นตอนที่ 3 ถึง 5 หรือสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป QIAamp DNA Mini Kit ตามเอกสารคำแนะนำที่แนบมากับชุดสกัดสำเร็จรูป

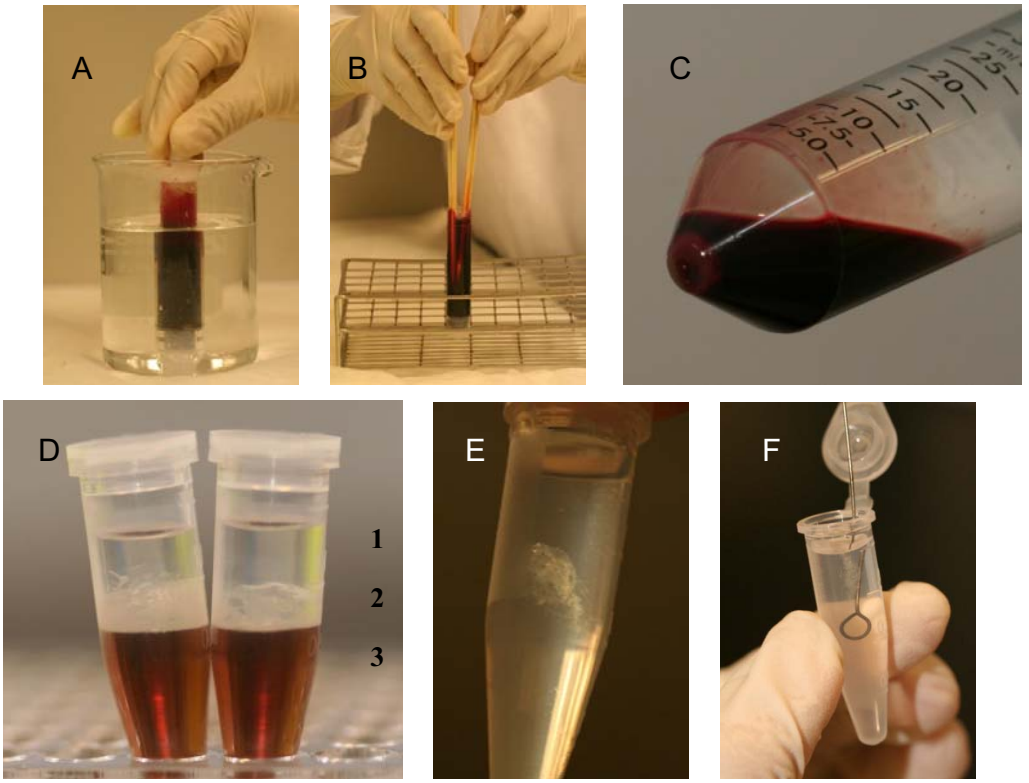
การทำให้เม็ดเลือดขาวแตก

เติมสารละลาย Cell Lysis Buffer (CLB) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เพื่อทำให้เซลล์แตก (CLB ประกอบไปด้วย เอทธิลีนไดเอมีนเตตระอะซิติคเอซิด (EDTA) ที่มีความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์, โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ และ ทริส ไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ และปรับค่าความเป็นกรดด่างของสารละลายสุดท้ายเป็น 7.8) และเติม 0.5% สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ปิเปตดูดสารละลายขึ้นลงเบาๆ เพื่อให้สารผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งหลอดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นเติมเอนไซม์โปรตีเนสเค (Proteinase K) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 75 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาเบาๆ เพื่อให้สารผสมเป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำไปวางไว้ในกล่องให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำหลอดขึ้นมาพลิกไปมาเบาๆ ทุก 3 นาที สารที่ได้จากขั้นตอนนี้ประกอบไปด้วยเศษเซลล์ โปรตีน ไขมัน ฯลฯ รวมทั้งจีโนมิกส์ดีเอ็นเอซึ่งพร้อมที่จะนำไปผ่านขบวนการทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

การสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ

ใช้สารละลายปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นสารผสมระหว่างฟีนอล (C6H5OH) คลอโรฟอร์ม (CHCl3) และไอโซเอมิลอัลกอฮอล์ ($C_5H_{12}O$) สัดส่วน 25 ต่อ 24 ต่อ 1 เติมลงในสารละลายที่ได้จากข้อ 3 เขย่าเบาๆ 1 นาที เพื่อให้สารผสมเป็นเนื้อเดียวกัน นำสารละลายไปปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จะเห็นสารละลายแยกเป็นสามชั้น **(Figure 1D)** ดูดเฉพาะส่วนใสด้านบน (ชั้นที่ 1) ไปใส่ในหลอดที่สะอาดหลอดใหม่ จากนั้นเติม 100% เอธิลอัลกอฮอล์ ที่เย็นจัด ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดแล้วพลิกหลอดไปมาเบาๆ จนเห็นดีเอ็นเอจับตัวกันเป็นสายสีขาวขุ่น **(Figure 1E)**

Figure 1. Genomic DNA Extraction from Clotted Blood



Frozen clotted blood was thawed in warm water for five minutes (A). After adding RBC lysis buffer, the clot was broken down directly in the test tube by using sterilized wood sticks (B). White blood cells were then separated by brief centrifugation and could be seen at the bottom of the tube (C). The genomic DNA was subsequently isolated from proteins and lipid after adding a mixture of phenol-chloroform-isoamyl alcohol. The DNA was in the middle layer (layer 2) of the solution (D). Finally, the DNA was precipitated and purified in 100% ethyl alcohol (E) and 70% ethyl alcohol (F).

การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

นำลูปที่ใช้ในงานเพาะเชื้อแบคทีเรียมาเผาไฟจนแดง รอให้ลูปเย็นแล้วจึงนำปลายลูปช้อนเอาก้อนดีเอ็นเอ **(Figure 1F)** มาใส่ในหลอดที่บรรจุ 70% เอธิลอัลกอฮอล์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร พลิกหลอดไปมาเพื่อล้างดีเอ็นเอ นำหลอดไปปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จนเห็นดีเอ็นเอตกตะกอนเป็นก้อนสีขาวขุ่นอยู่ที่ก้นหลอด จากนั้นเทเอธิลอัลกอฮอล์ทิ้ง แล้วนำหลอดไปวางไว้ในกล่องให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 นาที จนกระทั่งเอธิลอัลกอฮอล์ระเหยหมด เติมน้ำกลั่นที่ผลิตมาสำหรับใช้ในงานพีซีอาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใช้นิ้วเขี่ยหลอดเบาๆ จนดีเอ็นเอละลายในน้ำกลายเป็นสารละลาย ทำลายเอนไซม์โปรตีเนสเค โดยนำหลอดไปวางไว้ในกล่องให้ความร้อนที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

การตรวจคุณภาพของดีเอ็นเอ

นำจีโนมิกส์ดีเอ็นเอมาทำ electrophoresis โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 0.8% ใช้กระแสไฟฟ้า 135 โวลต์ นาน 20 นาที เพื่อดูว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้นั้นมีการแตกหักหรือไม่ และวัดปริมาณจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธี spectrophotometry โดยใช้เครื่อง NanoDrop (ND-1000 version 3.2.1, Coleman Technologies Inc.) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 nm แล้วหาค่าอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นทั้งสอง (A_{260}/A_{280})

การทำพีซีอาร์และหาลำดับเบส

นำจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่ได้ไปทำพีซีอาร์ โดยใช้สารต่างๆ ดังต่อไปนี้ จีโนมิกส์ดีเอ็นเอ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, 2x reaction mix (ประกอบไปด้วย dNTPs, Mg^{2+} และ สารอื่นๆ ที่จำเป็นต่อขบวนการพีซีอาร์) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร, น้ำนาโนบริสุทธิ์ ปริมาตร 15 ไมโครลิตร, forward primer (5′ TCACCAAGCACCTCCCACAT 3′) และ reverse primer (5′ CAAGATCCAGCATCCCCAACC 3′) ปริมาตรอย่างละ 3 ไมโครลิตร, และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ปริมาตร 2 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันและนำหลอดบรรจุสารดังกล่าวใส่ลงในเครื่องพีซีอาร์ โดยสั่งให้เครื่องทำการปรับอุณหภูมิอัตโนมัติ ดังนี้ ขั้นที่ 1 hot-start ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที ขั้นที่ 2 PCR amplification 35 รอบ ประกอบด้วย 3 อุณหภูมิ คือ 95 องศาเซลเซียส 15 วินาที, 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที 30 วินาที และขั้นที่ 3 final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นนำสารละลายที่ได้จากขบวนการพีซีอาร์ไปผ่านขบวนการ gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 0.8% ใช้กระแสไฟฟ้า 135 โวลต์ นาน 20 นาที จากนั้นตัดเจลบริเวณที่ต้องการเพื่อนำไปหาลำดับเบสของยีน PRM1 ด้วยวิธี dye-terminator cycle sequencing ด้วยเครื่อง ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems) เพื่อยืนยันว่าสกัดได้ดีเอ็นเอของโคจริง

ผลการศึกษา

ความเข้มข้นของจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ

อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสง A_{260}/A_{280} ของสารละลายจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดโดยใช้ชุดสกัด QIAamp และวิธีฟีนอล-คลอโรฟอร์มมีค่าอยู่ในช่วง 1.92-2.03 และ 1.84-1.94 ตามลำดับ บ่งชี้ว่าจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากทั้งสองวิธีมีความบริสุทธิ์ เมื่อนำค่า A_{260}/A_{280} ไปคำนวณหาปริมาณจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ พบว่าจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่ได้จากวิธีฟีนอลและคลอโรฟอร์มมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.31-0.59 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร สูงกว่าการใช้ชุดสกัด QIAamp DNA Mini Kit ซึ่งได้จีโนมิกส์ดีเอ็นเอความเข้มข้นในช่วง 0.09-0.15 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ถึง 5 เท่า **(Table 1 และ 2)**

Table 1. Absorbance and Concentration of Genomics DNA Obtained by QIAamp DNA Mini Kit

Sample No.	Absorbance			DNA Concentration (μg/μl)
	260 nm	280 nm	A_{260}/A_{280}	
1	2.24	1.13	1.98	0.11
2	2.20	1.08	2.03	0.11
3	2.16	1.13	1.92	0.11
4	2.35	1.20	1.96	0.12
5	2.27	1.13	2.02	0.15
6	1.93	0.98	1.96	0.13
7	2.09	1.05	1.99	0.11
8	2.19	1.10	1.98	0.10
9	1.73	0.88	1.97	0.09
10	1.73	0.86	2.00	0.09

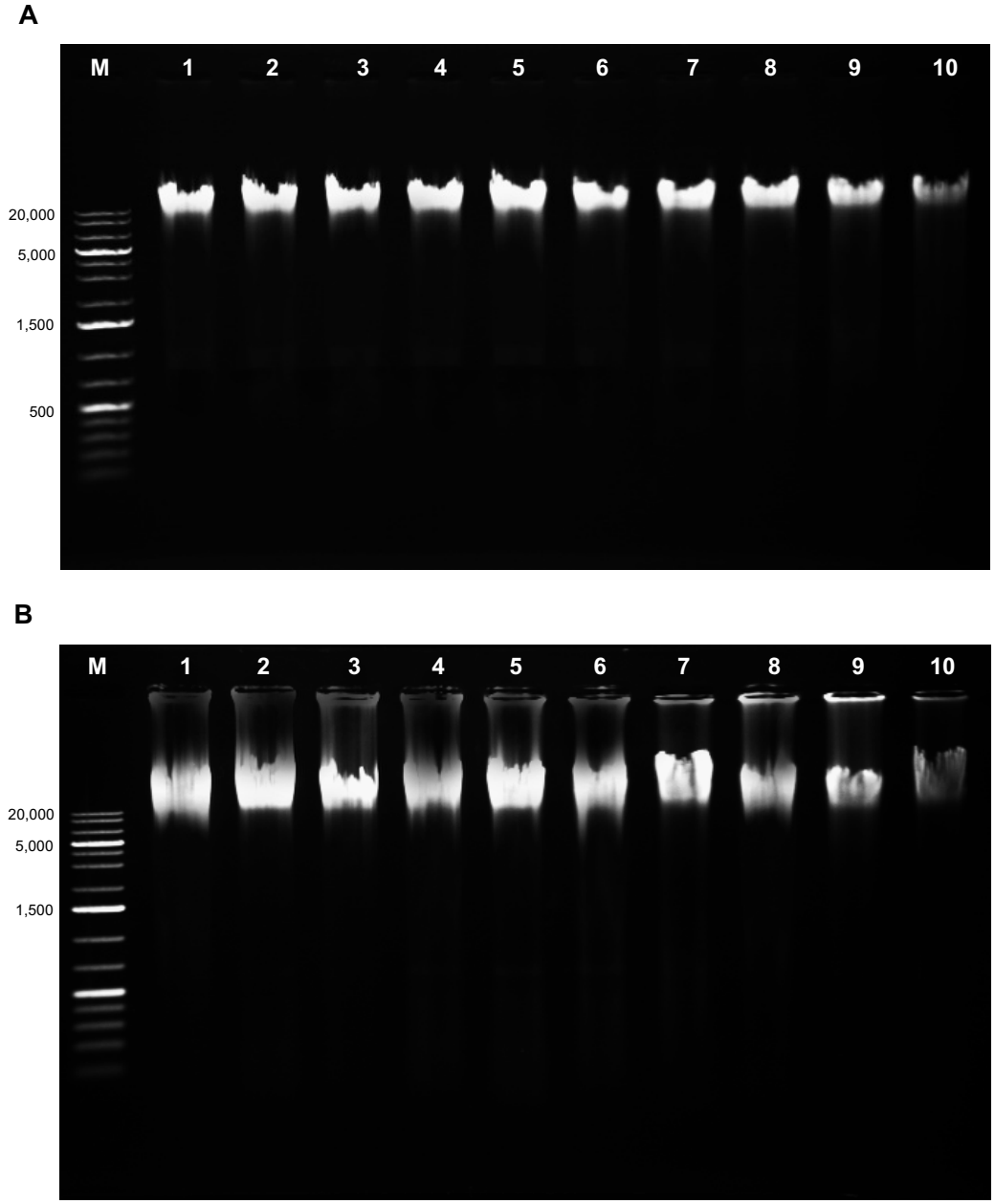
Table 2 Absorbance and Concentration of Genomics DNA Obtained by Phenol-Chloroform Techniques

Sample No.	Absorbance			DNA Concentration (μg/μl)
	260 nm	280 nm	A_{260}/A_{280}	
1	8.96	4.87	1.84	0.45
2	9.06	4.85	1.87	0.45
3	9.76	5.05	1.93	0.49
4	10.35	5.61	1.85	0.52
5	11.74	6.24	1.88	0.59
6	7.93	4.27	1.86	0.40
7	9.77	5.03	1.94	0.49
8	7.58	4.12	1.84	0.38
9	9.76	5.05	1.93	0.36
10	6.12	3.17	1.93	0.31

การแตกหักของจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ

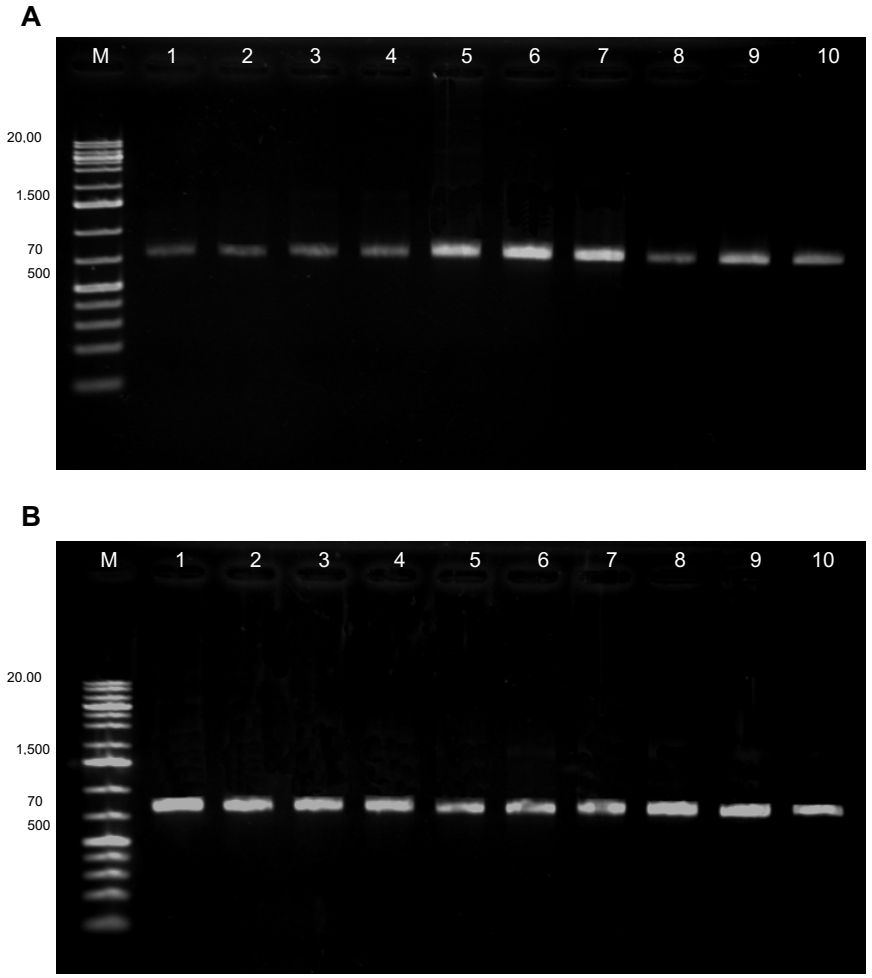
ผล gel electrophoresis แสดงแถบดีเอ็นเอซึ่งเป็นสายดีเอ็นเอที่มีความยาวโดยไม่พบลักษณะการถูกย่อยหรือการแตกหักของดีเอ็นเอ แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีฟีนอลและคลอโรฟอร์มมีความหนามากกว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดโดยใช้ชุดสกัด QIAamp DNA Mini Kit สอดคล้องกับผลที่ได้จากการวัดปริมาณความเข้มข้นโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยวิธี spectrophotometry **(Figure 2A และ 2B)**

Figure 2. Gel Electrophoresis of Genomics DNA



The clotted blood was extracted by QIAamp (A) and by phenol-chloroform (B).

Figure 3. Gel Electrophoresis of PCR Product



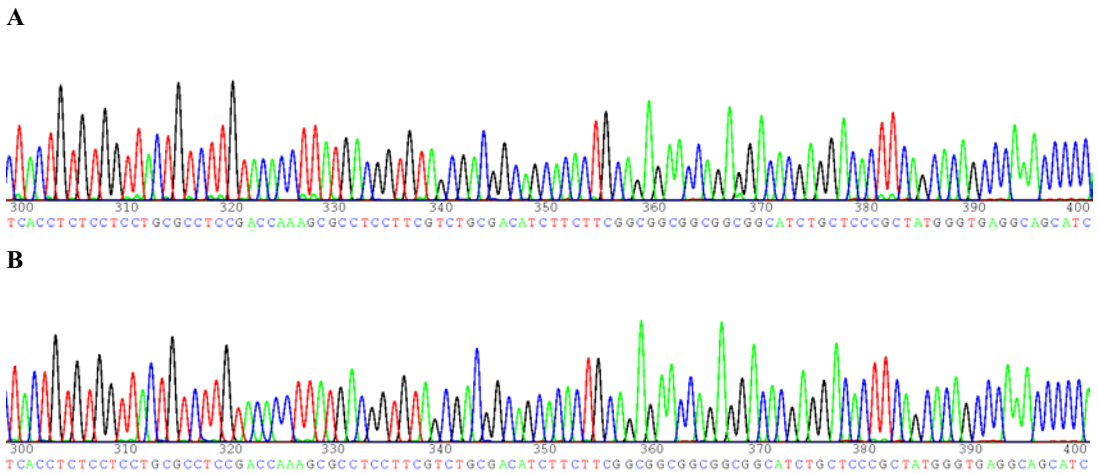
Fragment of Bos taurus PRM1 Gene was amplified from genomics DNA that were extracted from clotted blood by QIAamp DNA Mini Kit (A) and by phenol-chloroform (B).

ผลการหาลำดับเบส

นำจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะส่วนยีน PRM1 ด้วยวิธีพีซีอาร์ พบว่าได้ท่อนดีเอ็นเอที่มีความยาว 732 เบส เห็นเป็นแถบดีเอ็นเอแถบเดี่ยวเมื่อทดสอบด้วยวิธี gel electrophoresis **(Figure 3A และ 3B)** แสดงว่าจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดทั้งสองวิธีมีความบริสุทธิ์และไม่มีการแตกหัก เมื่อนำเอาแถบดีเอ็นเอนี้ไปผ่านขบวนการ cycle sequencing เพื่อหาลำดับเบสของยีน PRM1 พบว่าได้โครมาโตแกรมที่มีคุณภาพดี ไม่มีสัญญาณรบกวน **(Figure 4)** โดยโครมาโตแกรมและลำดับเบสของดีเอ็นเอของยีน PRM1 ที่ได้จากการสกัดด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Mini Kit และวิธีฟีนอล-คลอโรฟอร์มนั้นมีความเหมือนกัน 100% และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับลำดับ

เบสในฐานข้อมูล GenBank พบว่าเป็นลำดับเบสของยีน PRM1 ของ Bos taurus ซึ่งบ่งชี้ว่าจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่สกัดได้นี้เป็นจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของโคจริง ข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ได้จากการทดลองนี้อยู่ในฐานข้อมูล GenBank โดยมี accession number FJ493625 และ FJ493626.

Figure 4. The Chromatogram of Bos taurus PRM1 Gene Determined by Short-Gun Sequencing



The genomic DNA used for sequencing was extracted by QIAamp DNA Mini Kit (A) and by phenol-chloroform (B).

วิจารณ์

การละลายลิ่มเลือด โดยการทำให้ลิ่มเลือดแตกตัวในหลอดบรรจุเลือดช่วยลดโอกาสการเกิดการปนเปื้อนระหว่างตัวอย่างเลือด การใช้ไม้เป็นอุปกรณ์ในการเขี่ยให้ลิ่มเลือดแตกตัวมีข้อดีเนื่องจากหาซื้อไม้ได้ทั่วไป มีราคาถูก สามารถนำไปเข้าเครื่องอบเพื่อฆ่าเชื้อได้ง่ายและเมื่อใช้เสร็จแล้วสามารถทำลายได้ด้วยการเผา การใช้ไม้ในการทดลองนี้ยังสามารถประยุกต์ได้กับหลอดบรรจุเลือดที่มีลิ่มเลือดปริมาณน้อยโดยใช้ปลายไม้ด้านทู่เพียงหนึ่งหรือสองก้านบดลิ่มเลือดในหลอด เมื่อลิ่มเลือดแตกตัวแล้วจึงใช้ RBC ทีละน้อย ค่อยๆ ชะล้างให้เลือดที่ติดอยู่บริเวณปลายไม้ไหลลงสู่หลอดบรรจุเลือดก่อนนำไปปั่นเพื่อแยกเม็ดเลือดขาว

ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่สกัดได้ ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าแทบทุกขั้น ตอนมีผลต่อปริมาณจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่สกัดได้ ในขั้นตอนการสลายลิ่มเลือด หากเติม RBC น้อยเกินไปหรือสารมีความเข้มข้นต่ำเกินไป จะทำให้น้ำเลือดมีความหนืดข้น ลิ่มเลือดบางส่วนไม่สลายตัว เมื่อนำหลอดไปปั่นเพื่อแยกทิ้งน้ำเลือด เม็ดเลือดขาวส่วนที่ถูกปลดปล่อยออกจากลิ่มเลือดที่สลายตัวไปแล้วจะถูกเหวี่ยงไปอยู่ที่ก้นหลอดและกลับเข้าไปฝังตัวอยู่ในเศษลิ่มเลือดที่สลายตัวไม่หมด ส่วนขั้นตอน

การทำให้เม็ดเลือดขาวแตก หากเติม CLB หรือเอนไซม์โปรตีเนสเคปริมาณน้อยเกินไปหรือสารมีความเข้มข้นต่ำเกินไป จะทำให้เซลล์แตกไม่สมบูรณ์และจีโนมิกส์ดีเอ็นเอบางส่วนยังติดอยู่กับเซลล์หรือผนังนิวเคลียสหรืออาจยังมีโปรตีนเกาะอยู่ เมื่อนำหลอดไปปั่นในขั้นตอนการแยกชั้นภายหลังการเติมสารฟีนอล-คลอโรฟอร์มหรือในขั้นตอนการตกตะกอนหรือขั้นตอนการล้างดีเอ็นเอก็จะทำให้สายดีเอ็นเอขาดหรือแตกหักเป็นท่อนได้ ซึ่งมีผลให้ได้ปริมาณจีโนมิกส์ดีเอ็นเอน้อยกว่าปกติ ปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่งที่มีผลต่อปริมาณจีโนมิกส์ดีเอ็นเอคือเทคนิคการปิเปตต์สารของผู้ปฏิบัติงานในขั้นตอนการปั่นหลอดเพื่อตกตะกอนเม็ดเลือดหรือดีเอ็นเอและต้องใช้ปิเปตต์ดูดน้ำส่วนบนทิ้ง หากไม่ระวังก็อาจจะทำให้จีโนมิกส์ดีเอ็นเอถูกดูดทิ้งไปจนหมด

จีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ชุดสกัด QIAamp DNA Mini Kit ในการศึกษาครั้งนี้มีปริมาณน้อยกว่าการสกัดด้วยวิธีฟีนอล-คลอโรฟอร์มมาก ทั้งนี้อาจมีสาเหตุเนื่องจากชุดสกัด QIAamp DNA Mini Kit ใช้แถบกรองที่ทำจากซิลิกาในการกักสายดีเอ็นเอไว้ในขั้นตอนการปั่นเพื่อกำจัดโปรตีน ไขมันและสิ่งปนเปื้อนอื่นๆ อาจมีดีเอ็นเอบางส่วนหลุดจากแถบกรองออกไปพร้อมกับสารอื่นๆ ได้ นอกจากนี้ ในขั้นตอนสุดท้าย เมื่อได้ดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์แล้ว ต้องเติมสารละลายเพื่อล้างให้ดีเอ็นเอที่เกาะอยู่กับแถบกรองหลุดออกมา อาจมีดีเอ็นเอบางส่วนยังถูกกักอยู่กับแถบกรองไม่ถูกล้างออกมา ทำให้จีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณต่ำ

ปัจจัยที่มีผลต่อการแตกหักของจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ เนื่องจากจีโนมิกส์ดีเอ็นเอในนิวเคลียสจะถูกปล่อยออกมาเป็นอิสระภายหลังการเติม CLB ร่วมกับเอนไซม์โปรตีเนสเค โดยจีโนมิกส์ดีเอ็นเอมีลักษณะเป็นสายยาว สามารถฉีกขาดได้ง่าย ดังนั้นการใช้ปิเปตต์ดูดสารขึ้นลงหรือการเขย่าหลอดแรงๆ จะทำให้จีโนมิกส์ดีเอ็นเอฉีกขาดและแตกหักเป็นท่อนได้ ในการศึกษาครั้งนี้ ใช้การเคาะที่หลอดเบาๆ หรือพลิกหลอดไปมาอย่างช้าๆ เมื่อต้องการผสมให้สารในหลอดรวมเป็นเนื้อเดียวกัน ส่วนการนำหลอดไปปั่นด้วยความเร็วรอบต่ำนั้นไม่มีผลต่อการแตกหักของดีเอ็นเอ นอกจากนี้การปนเปื้อนของเอนไซม์ DNase จากแหล่งต่างๆ เช่น จากสิ่งส่งตรวจ, จากจุลชีพ, จากอุปกรณ์หรือจากผิวหนังของผู้ปฏิบัติงานมีผลทำให้จีโนมิกส์ดีเอ็นเอถูกย่อยกลายเป็นท่อนเล็กๆ ได้ ดังนั้นการรักษาความสะอาดอย่างเข้มงวดจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง [6-8]

เปรียบเทียบความเข้มข้นของจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้เทคนิคอื่น การสกัดดีเอ็นเอจากลิ่มเลือดโดยใช้หลอด CLOTSPIN ในการสลายลิ่มเลือดซึ่งได้จากเลือดปริมาตร 5 มิลลิลิตร จำนวน 15 ตัวอย่าง ร่วมกับชุดสกัดดีเอ็นเอ PUREGENE พบว่าได้ปริมาณจีโนมิกส์ดีเอ็นเอเฉลี่ย 66.33 ไมโครกรัม (ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน = 16.83) และมีค่าอัตราส่วนการดูดกลืนแสง A_{260}/A_{280} อยู่ในช่วง 1.77-1.88 [9] ส่วนการทดลองสลายลิ่มเลือดด้วยการใช้ไม้ก้านลำลี (cotton tip swab) ความยาวขนาด 6 นิ้ว ร่วมกับการสกัดดีเอ็นเอจากลิ่มเลือดด้วยการใช้ MasterPure DNA Purification Kit โดยใช้ตัวอย่างเลือดจำนวน 20 ตัวอย่าง พบว่า ปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอเฉลี่ย 36 ไมโครกรัม [3] สำหรับการทดลองนี้ ใช้เลือดโคปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วปล่อยให้เลือดแข็งตัว จากนั้นใช้แท่งไม้บดลิ่มเลือดในหลอดทดลองและสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอด้วยวิธีฟีนอล-คลอโรฟอร์ม พบว่าได้ปริมาณจีโนมิกส์ดีเอ็นเอโดยเฉลี่ย 22.09 ไมโครกรัม (ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน = 0.08) และจากการ

สกัดด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Mini Kit ได้ปริมาณจีโนมิกส์ดีเอ็นเอโดยเฉลี่ย 5.62 ไมโครกรัม (ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน = 0.02)

การสลายลิ่มเลือดและการสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอในการศึกษาครั้งนี้ได้ปริมาณจีโนมิกส์ดีเอ็นเอน้อยกว่าวิธีอื่น ทั้งนี้ อาจมีสาเหตุจาก ชนิดของเลือดที่ใช้ในการทดลอง การศึกษานี้ใช้เลือดโคในขณะที่การศึกษาอื่นใช้เลือดจากมนุษย์ซึ่งทั้งสองสปีชีส์นี้มีปริมาณเม็ดเลือดขาวในกระแสเลือดไม่เท่ากัน สาเหตุที่สำคัญอีกประการหนึ่งคือ วิธีการสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอแต่ละวิธีมีประสิทธิภาพต่างกัน อย่างไรก็ดี วิธีการสลายลิ่มเลือดและการสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอในการศึกษานี้ ให้ปริมาณจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่สม่ำเสมอจากตัวอย่างเลือดทั้ง 10 ตัวอย่าง ในขณะที่การสลายลิ่มเลือดด้วย CLOTSPIN และสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอด้วย PUREGENE นั้น ให้ปริมาณจีโนมิกส์ดีเอ็นเอไม่สม่ำเสมอ นอกจากนี้ วิธีการที่ใช้ประมาณปริมาณจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่สกัดได้ในแต่ละการทดลองมีความแตกต่างกัน การศึกษานี้ประมาณปริมาณจีโนมิกส์ดีเอ็นเอโดยการคำนวณอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 nm ในขณะที่อีกสองการทดลองนั้นใช้วิธีอื่น ดังนั้นจึงยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดว่าวิธีใดมีประสิทธิภาพที่ดีกว่า

การสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอจากลิ่มเลือดสามารถทำได้ง่ายโดยใช้อุปกรณ์พื้นฐานที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการทั่วไปและใช้สารเคมีที่เตรียมได้ง่ายและมีราคาถูก การทำให้ลิ่มเลือดละลายตัวในหลอดบรรจุเลือดจะช่วยลดโอกาสการปนเปื้อนของดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจ รายงานนี้แสดงให้เห็นว่าจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากลิ่มเลือดซึ่งได้จากการเจาะเลือดโคปริมาตร 5 มิลลิลิตร มีปริมาณเพียงพอที่จะนำไปใช้ในงานอื่น เช่น พีซีอาร์ ยีนโคลนนิ่ง การหาลำดับเบส ฯลฯ โดยความบริสุทธิ์และการแตกหักของจีโนมิกส์ดีเอ็นเอนั้นขึ้นอยู่กับสารเคมี เทคนิคที่ใช้และการรักษาความสะอาดในการปฏิบัติงาน หากผู้ปฏิบัติงานกระทำได้อย่างถูกต้องและมีความชำนาญก็จะสามารถสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอได้โดยไม่จำเป็นต้องเจาะเลือดจากสัตว์เพิ่ม

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณสุพจน์ สร้อยสังวาลย์ ปศุสัตว์อำเภอ อ.เมือง จ.ปทุมธานี ที่ได้อนุเคราะห์ตัวอย่างเลือดโคเพื่อใช้ในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Tas S. Purification of DNA from clotted blood. *Clin Chem.* 1990;36(10):1851.
2. Siafakas N, Burnett L, Bennetts B, Proos A. Nonenzymatic extraction of DNA from blood collected into serum separator tubes. *Clin Chem.* 1995;41(7):1045-1046.
3. Iovannisci DM, Ha TT, Shaw GM. Recovery of genomic DNA from residual frozen archival blood clots suitable for amplification and use in genotyping assays. *Genet Test.* 2006;10(1):44-49.

4. Basuni AA, Butterworth LA, Cooksley G, Locarnini S, Carman WF. An efficient extraction method from blood clots for studies requiring both host and viral DNA. *J Viral Hepat.* 2000;7(3):241-243.
5. Se Fum Wong S, Kuei JJ, Prasad N, Agonafer E, Mendoza GA, Pemberton TJ, et al. A simple method for DNA isolation from clotted blood extricated rapidly from serum separator tubes. *Clin Chem.* 2007;53(3):522-524.
6. Millar BC, Xu J, Moore JE. Risk assessment models and contamination management: implications for broad-range ribosomal DNA PCR as a diagnostic tool in medical bacteriology. *J Clin Microbiol.* 2002;40(5):1575-1580.
7. Madisen L, Hoar DI, Holroyd CD, Crisp M, Hodes ME. DNA banking: the effects of storage of blood and isolated DNA on the integrity of DNA. *Am J Med Genet.* 1987;27(2):379-390.
8. Polakova H, Kadasi L, Zelinkova M. The yield and quality of DNA extracted from blood samples stored under various conditions. *Bratisl Lek Listy.* 1989;90(11):844-847.
9. Adkins KK, Strom DA, Jacobson TE, Seemann CR, O'Brien DP, Heath EM. Utilizing genomic DNA purified from clotted blood samples for single nucleotide polymorphism genotyping. *Arch Pathol Lab Med.* 2002;126(3):266-270.