

สารพันธุกรรม (Genetic material)

สารพันธุกรรม คือ สารชีวโมเลกุลที่ทำหน้าที่เก็บข้อมูลสำหรับการทำงานของสิ่งมีชีวิตต่างๆ เอาไว้ เมื่อสิ่งมีชีวิตมีการสืบพันธุ์ จะมีการแบ่งสารพันธุกรรมไปยังเซลล์ที่แบ่งตัวไป โดยยังคงมีข้อมูลครบถ้วน

สารพันธุกรรมในเซลล์สิ่งมีชีวิตเรียกรวมกันว่า กรดนิวคลีอิก แบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ ดีเอ็นเอ (Deoxyribonucleic acid : DNA) และ อาร์เอ็นเอ (Ribonucleic acid : RNA)

ปัจจุบันการสกัดสารพันธุกรรมมีประโยชน์หลายด้าน ทั้งทางวิทยาศาสตร์ ทางการแพทย์ หรือ ทางนิติวิทยาศาสตร์ ตัวอย่างเช่น เพื่อการทำให้สารพันธุกรรมบริสุทธิ์แล้วนำไปเพิ่มปริมาณก่อนที่จะนำไปใช้ในงานชีวโมเลกุล เพื่อตรวจหาความสัมพันธ์ทางสายเลือดหรือหาความสมบูรณ์ของร่างกาย เพื่อแยกเชื้อโรคชนิดต่างๆ ก่อนหาแนวทางการรักษา และเพื่อตรวจระบุตัวบุคคล เป็นต้น

การสกัดสารพันธุกรรม

ขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน คือ การแยกสารพันธุกรรม (Isolation) การทำให้บริสุทธิ์ (Purification) และการทำให้ได้สารพันธุกรรมที่เข้มข้น (Concentration) โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. การแยกสารพันธุกรรม (Isolation) หรือ การทำให้เซลล์แตก (Cell lysis)

ขั้นตอนแรกในการแยกกรดนิวคลีอิกคือการแยกผนังเซลล์ และ/หรือ เยื่อหุ้มเซลล์ออกเพื่อให้สารพันธุกรรมหลุดออกมา สามารถทำได้ด้วยการใช้ lysis buffer homogenizer ลูกบิด (bead mill) การแช่แข็งสลับละลาย (freeze thaw cycles) หรือการใช้คลื่นเสียง (sonication)

Lysis buffer ประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิวที่จะไปสลายเยื่อหุ้มเซลล์ และมีเอนไซม์ เช่น protease K สำหรับย่อยส่วนประกอบโปรตีน ส่วนเครื่องบด homogenizer และ bead mill ทำให้เนื้อเยื่อและเซลล์ถูกทำลาย การสลายตัวของเซลล์ทำให้ทุกส่วนของเซลล์ปนกันในรูปแบบสารละลาย ดังนั้นเอนไซม์ที่ย่อย DNA (DNase) และ RNA (RNase) ที่มีอยู่จะเริ่มย่อยสารพันธุกรรม ซึ่งเราใช้สาร EDTA ในการยับยั้งการทำงานของ DNase โดยการเข้าไปจับไอออน (chelating divalent ions) ที่จำเป็นต่อการทำงานของเอนไซม์ DNase ส่วน RNase จะถูกทำลายด้วย beta-mercaptoethanol สุดท้ายเพื่อลดโอกาสของการปนเปื้อนด้วย RNase หรือ DNase ในกระบวนการ สิ่งสำคัญคือต้องใช้น้ำและบัฟเฟอร์ที่ได้รับการลดความรุนแรงด้วยสาร DEPC โดยผู้ปฏิบัติงานจะต้องสวมถุงมือและต้องรักษาพื้นที่ทำงานให้สะอาด

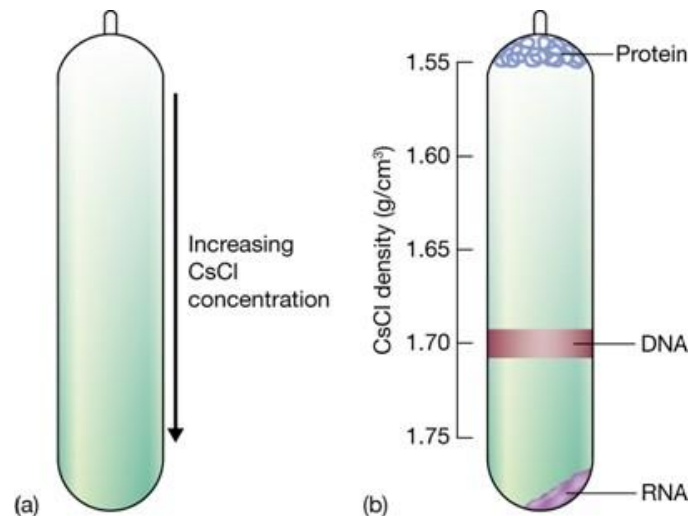
2. การทำให้บริสุทธิ์ (Purification)

ทำสารพันธุกรรมให้บริสุทธิ์โดยการกำจัดโปรตีน กรดนิวคลีอิกประเภทอื่นๆ เกลือ และเอนไซม์ DNase และ RNase ที่ปนเปื้อนออก

3. การทำให้ได้สารพันธุกรรมที่เข้มข้น (Concentration) โดยการชะ DNA หรือ RNA ที่จับคอลัมน์หรือแม่เหล็กอยู่กลับมา (Recovery)

ในปัจจุบันมีเทคนิคการสกัดสารพันธุกรรมทั้งหมด 4 ขั้นตอนดังนี้

1. การปั่นแยกแบบเกรเดียนต์ของความหนาแน่นโดยใช้ซีเซียมคลอไรด์ (CsCl) / เอทิลเดียมโบรไมด์ (EtBr) หลักการพื้นฐานของวิธีนี้คือการใช้ความแตกต่างของความหนาแน่นระหว่างซีเซียมไอออนกับน้ำ และการแทรกแซงของ EtBr ซึ่งแสดงผลลัพธ์ที่ดีในการแยก DNA ต่างๆ ซึ่งสามารถสกัด DNA ได้เป็นปริมาณมาก มีข้อจำกัดคือ ต้องใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบอัลตราโซนิกที่มีราคาแพงและใช้เวลานาน ดำเนินการได้ยาก และ EtBr เป็นอันตราย

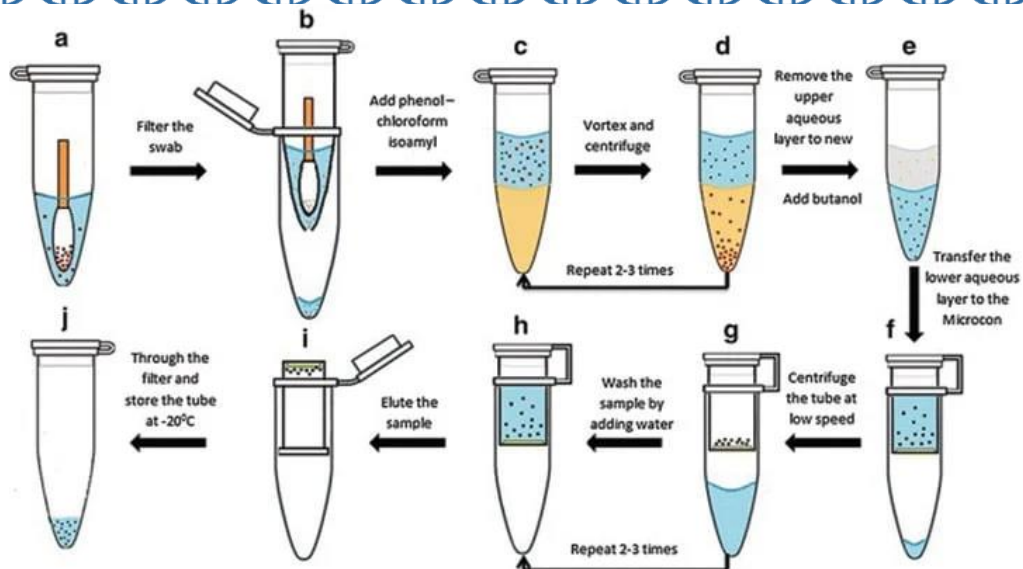


รูปภาพที่ 1 การปั่นแยกแบบเกรเดียนต์ของความหนาแน่นโดยใช้ซีเซียมคลอไรด์

ที่มา : <https://slideplayer.com/slide/6829320/>

2. การสกัดโดยใช้ฟีนอล-คลอโรฟอร์ม

กระบวนการนี้มีวิธีการสกัดโดยการผสมสารละลายฟีนอล-คลอโรฟอร์มเข้มข้นกับตัวอย่าง แล้วทำการปั่นเหวี่ยง หลังจากการปั่นเหวี่ยงมีการแยกชั้นบน (น้ำ) ที่มี DNA แยกออกจากชั้นล่าง (สารอินทรีย์) ที่มีโปรตีนที่เสถียรภาพ และ DNA บางส่วน แล้วทำให้ตกตะกอนโดยการเติมเอทานอลหรือไอโซโพรพานอล หลังจากการล้างด้วยเอทานอล 70% เพื่อกำจัดเอทานอลหรือไอโซโพรพานอลที่เหลืออยู่ ละลาย DNA ด้วย TE buffer หรือน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ วิธีนี้ยังใช้สำหรับการสกัด RNA โดยใช้ guanidinium isothiocyanate ร่วมกับโดยสาร guanidinium isothiocyanate เป็นสารขัดขวางการเกิดพันธะไฮโดรเจน จึงทำให้เกิดการแยก RNA และ DNA ออกจากกัน เมื่อตกตะกอนด้วยไอโซโพรพานอล จะแยกชั้นบนที่มี RNA ออกจากชั้นล่างที่มี DNA และโปรตีน แม้ว่าวิธีฟีนอล-คลอโรฟอร์มจะค่อนข้างง่ายเมื่อเทียบกับวิธี CsCl/EtBr แต่มีข้อจำกัดที่สำคัญคือ ฟีนอลมีความเป็นพิษ มีฤทธิ์กัดกร่อน และติดไฟได้



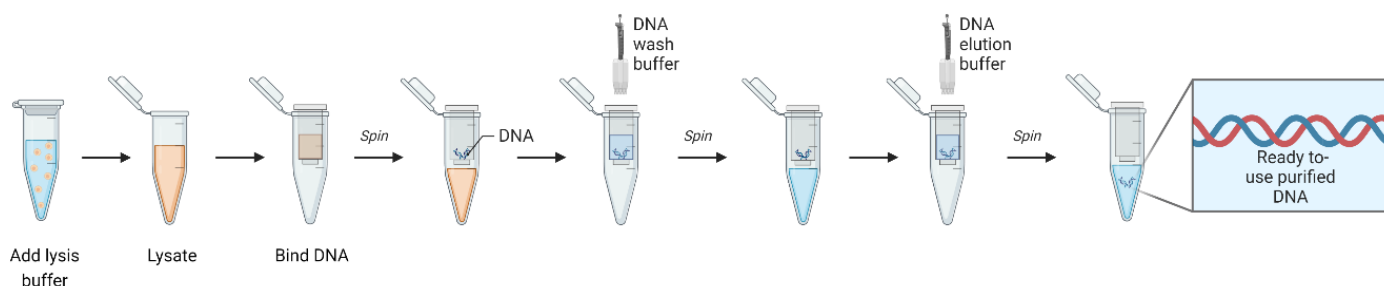
รูปภาพที่ 2 ขั้นตอนการสกัดโดยใช้ฟีนอล-คลอโรฟอร์ม

ที่มา : <https://microbenotes.com/protocol-phenol-chloroform-extraction-of-prokaryotic-dna/>

3. การตกตะกอนด้วยเอทานอลและคอลัมน์ซิลิกาเฟส (Solid phase column)

การสกัดแบบซิลิกาเฟส มีหลักการคล้ายกับการสกัดแบบฟีนอล ต่างกันที่ใช้ซิลิกา แทนที่ ฟีนอลซึ่งมีความเป็นพิษ โดยซิลิกามีข้อดี คือมีความปลอดภัยกว่า และลดการปนเปื้อนได้ อีกทั้งลดการสูญเสีย DNA ได้ดีกว่าวิธี ฟีนอล/คลอโรฟอร์ม ซึ่งสามารถแยกกรดนิวคลีอิกออกมาได้โดยวิธีการตกตะกอนด้วยเอทานอล โดยใช้ระบบ spin column ซึ่งเป็นระบบที่ใช้ คอลัมน์เป็นแบบคงที่ แล้วสารละลายจะถูกเทลงไป ภายใต้ความเข้มข้นของเกลือและค่า pH ที่เหมาะสม กรดนิวคลีอิกจะจับกับคอลัมน์ขณะที่สารปนเปื้อนอื่นไหลผ่าน หลังจากนั้นทำการชะล้างสิ่งปนเปื้อนโดยใช้ wash buffer หลายครั้ง และใช้การปั่นเหวี่ยงเพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนก่อนที่จะทำการชะ DNA หรือ RNA ที่ต้องการในตอนท้ายด้วย TE buffer

ในปัจจุบันมีการใช้ชุดสกัดสำเร็จทางการค้าแบบ Solid phase column โดยการใช่วัตถุหลายชนิดที่มีคุณสมบัติในการจับกับสารพันธุกรรมได้ดีและมีความจำเพาะสูง เช่น สารประกอบซิลิกา สารประกอบเหล่านี้ อาจผลิตให้อยู่ในรูปผงหรือบรรจุอยู่ในคอลัมน์ จำหน่ายพร้อมสารละลายที่จำเป็นในการสกัดสารพันธุกรรม ชุดสกัดสำเร็จแต่ละแบบจะผลิตเพื่องานสกัดพันธุกรรมที่แตกต่างกัน

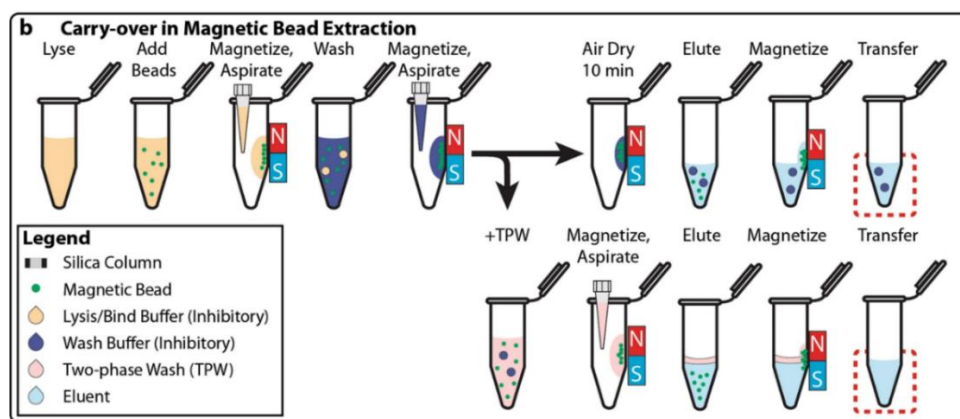


รูปภาพที่ 3 การสกัด DNA เฟสซิลิกาโดยใช้คอลัมน์หมุนของซิลิกาเจล DNA จะจับกับซิลิกาเรซินในขณะที่ส่วนประกอบอื่นๆ ของเซลล์จะถูกชะล้างออกไป

ที่มา : <https://www.aatbio.com/resources/assaywise/2022-11-1/overview-of-dna-extraction-methods>

4. การสกัดกรดนิวคลีอิกด้วยแม่เหล็ก (Magnetic nucleic acid purification)

การสกัด DNA หรือ RNA ด้วยแม่เหล็กให้บริสุทธิ์ ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของอนุภาคซูเปอร์พาราแมกเนติกในระดับไมโครหรือนาโน อนุภาคเหล่านี้มักจะสังเคราะห์จาก iron oxide กับสารแม่เหล็ก (magnetite) (Fe_3O_4) ที่นิยมใช้กันมากคือ magnetite (Fe_2O_3) การใช้อนุภาคซูเปอร์พาราแมกเนติก ในการสกัดกรดนิวคลีอิก คือ กระบวนการทำการสกัดนิวคลีอิกให้บริสุทธิ์โดยใช้อนุภาคแม่เหล็กจับ DNA หรือ RNA จากนั้นบ่มอนุภาคแม่เหล็กด้วยสารละลายเซลล์ทำให้เซลล์แตก กรดนิวคลีอิกจะจับกับอนุภาคแม่เหล็กเท่านั้น ในขณะที่สารอื่นเช่น โปรตีนและโพลีแซคคาไรด์จะไม่จับ กรดนิวคลีอิกที่จับกับแม่เหล็กจะถูกสนามแม่เหล็กภายนอกและถูกดึงไปรวมกันที่ด้านข้างของภาชนะ สิ่งปนเปื้อนอื่นที่ไม่ต้องการจะถูกชะล้าง และแทนที่ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ สนามแม่เหล็กที่ใช้จะถูกดึงออกและปลดปล่อย DNA หรือ RNA ออกจากอนุภาคแม่เหล็ก โดยการใช้อุปกรณ์ที่เหมาะสม กระบวนการทำให้บริสุทธิ์ทั้งหมดสามารถเกิดขึ้นได้โดยไม่ต้องใช้คอลัมน์หรือการปั่นเหวี่ยง ความบริสุทธิ์ของสารพันธุกรรมที่สกัดนั้น ขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพในการจับและประสิทธิภาพการแยกสาร ซึ่งเกี่ยวกับกระบวนการเคลือบอนุภาคแม่เหล็กและสารเคมี



รูปภาพที่ 4 ขั้นตอนการสกัดกรดนิวคลีอิกด้วยแม่เหล็ก

ที่มา : <https://www.nature.com/articles/s41598-020-58586-3/figures/1>

จากเทคนิคการสกัดสารพันธุกรรมทั้งหมดที่กล่าวมา สามารถสรุปได้ว่าเทคนิค การสกัดแบบการปั่นแยกแบบเกรเดียนต์ของความหนาแน่นโดยใช้ซีเซียมคลอไรด์ ใช้สกัด DNA เป็นปริมาณมากแต่อาจจะมีควมบริสุทธิ์ต่ำ เทคนิคการสกัดโดยใช้ฟินอล-คลอโรฟอร์ม นิยมใช้สกัดพลาสมิดของแบคทีเรีย โดยให้สารพันธุกรรมที่มีความบริสุทธิ์แต่ยังคงมีการปนเปื้อนจากโปรตีนอื่นๆเล็กน้อย และให้สารพันธุกรรมที่มีปริมาณน้อย เทคนิคการตกตะกอนด้วยเอทานอลและคอลัมน์ซิลิกาเฟส มีความนิยมมากที่สุดในปัจจุบันโดยมักจะพบในชุดสกัดสำเร็จ โดยจะมีการจำเพาะในการสกัดสารพันธุกรรมที่แตกต่างกัน สามารถเก็บตัวอย่างได้อย่างหลากหลายมากยิ่งขึ้น ให้สารพันธุกรรมที่มีความบริสุทธิ์สูง และ เทคนิคการสกัดกรดนิวคลีอิกด้วยแม่เหล็ก สามารถใช้สำหรับการจับกรดนิวคลีอิกแบบเฉพาะเจาะจง การทำให้บริสุทธิ์ด้วยแม่เหล็กไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง และสามารถทำให้เสร็จได้ด้วยหลอดทดลองหลอดเดียว



- สุภาวดี จ้อเหรียญ. 2563. ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับดีเอ็นเอและการสกัดดีเอ็นเอจากพืช. ใน *การพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบดีเอ็นเอพืชอย่างรวดเร็ว*. กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ. หน้า 3-6.
- สุนันทา ภิณูวาร์ณ. 2547. การสังเคราะห์ DNA หรือกระบวนการเรพลิเคชัน. ใน *ชีวเคมี 2 BIOCHEMISTRY 2 CH 352*. พิมพ์ครั้งที่ 7. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง. หน้า 291-345.
- สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ. 2551. สารพันธุกรรมและโรคทางกรรมพันธุ์. *ก้าวหน้าโลกวิทยาศาสตร์*. 8 (2) : 82-95.
- Bioentist. 2567. พื้นฐานการสกัด DNA ด้วย Magnetic DNA Purification ตอนที่ 2. แหล่งที่มา: <https://bioentist.com/blog/พื้นฐานการสกัด-dna-ด้วย-magnetic-dna-purification-3/>. [วันที่ 16 กุมภาพันธ์ 2567].
- AAT Bioquest. 2022. Overview of DNA Extraction Methods. *AssayWise Letters* 2022. 11; 5.
- Brett Phillips. 2016. *GENE CLONING AND DNA ANALYSIS 基因工程與原理 Chapter 3 Purification of DNA from Living Cells*. [Online]. Available: <https://slideplayer.com/slide/6829320/>. Accessed March 1, 2024.
- Jeong Hwan Shin. 2012. Nucleic Acid Extraction Techniques. *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*. 5 : 209-214.
- Jue, E., Witters, D. and Ismagilov, R.F.. 2020. Two-phase wash to solve the ubiquitous contaminant-carryover problem in commercial nucleic-acid extraction kits. *Scientific Reports*. 10 (1940): 5.
- Morales, C. and Mantri, S. 2023. RNA plays a newly discovered role in the development of cancer. [Online]. Available: <https://sitn.hms.harvard.edu/flash/2023/rna-plays-a-newly-discovered-role-in-the-development-of-cancer/>. Accessed September 20, 2024.
- Sagar Aryal. (2023). Protocol: Phenol-chloroform extraction of prokaryotic DNA. [Online]. Available: <https://microbenotes.com/protocol-phenol-chloroform-extraction-of-prokaryotic-dna/>. Accessed March 1, 2024.

