

นิพนธ์ต้นฉบับ

การสกัดดีเอ็นเอจาก Buffy Coat ที่ส่งทางไปรษณีย์โดยไม่แช่น้ำแข็ง

ประกายวรรณ เกษเกษม, ศรัณยา ฤกษ์ขำ, วีระศักดิ์ ศาสนกุล และ อำไพวรรณ จวนสัมฤทธิ์*

สำนักงานวิจัย, *ภาควิชาภูมิารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล

บทคัดย่อ: ศึกษาการสกัดดีเอ็นเอจาก buffy coat ที่ส่งทางไปรษณีย์โดยไม่แช่น้ำแข็ง ใช้เวลาในการขนส่งนาน 1-5 วัน จำนวน 22 ตัวอย่างจากโรงพยาบาลในต่างจังหวัด 8 แห่ง พบว่า buffy coat 16 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 73 เป็น buffy coat ที่มีคุณภาพดี สามารถสกัดดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์ โดยแสดงจากค่าเฉลี่ย OD 260/280 เท่ากับ 1.56 และมีปริมาณดีเอ็นเอเฉลี่ย 68 ไมโครกรัม จาก buffy coat 500 ไมโครลิตร และสามารถเพิ่มจำนวนในหลอดทดลอง (amplification) เพื่อการวินิจฉัยโรคทางโลหิตวิทยาได้อย่างถูกต้อง ส่วนอีก 6 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 27 นำมาสกัดดีเอ็นเอไม่ได้ เพราะเลือดแข็งตัว หรือได้แต่พลาสมา ดังนั้นการส่ง buffy coat ของผู้ป่วยและครอบครัวมาทางไปรษณีย์เพื่อการศึกษาอณูชีววิทยาเกี่ยวกับดีเอ็นเอโดยไม่แช่น้ำแข็งเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก ราคาถูก และมีประสิทธิภาพดี

Key Words : ● DNA extraction ● Buffy coat

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2544;11:167-71.

วิทยาการทางการแพทย์ได้มีการพัฒนาอย่างรวดเร็ว การวินิจฉัยโรคทางโลหิตวิทยา สามารถทำได้แม่นยำ โดยการศึกษาอณูชีววิทยา^{1,2} อนึ่ง การศึกษาทางอณูชีววิทยาของดีเอ็นเอ สามารถทำได้ที่โรงพยาบาล มหาวิทยาลัย โรงพยาบาลศูนย์บางแห่งเท่านั้น จึงทำให้ผู้ป่วยและครอบครัวที่ต้องการรับการตรวจทางห้องปฏิบัติการ เพื่อการวินิจฉัยโรคหรือภาวะที่มีสีน้ำตาล ต้องเดินทางมาพบแพทย์ในโรงพยาบาลดังกล่าว เป็นเรื่องที่ไม่สะดวก เสียเวลา รวมทั้งเสียค่าใช้จ่ายสำหรับการเดินทาง ในต่างประเทศที่มีระบบไปรษณีย์ที่ดีสามารถส่งเลือดของผู้ป่วย

และครอบครัวแช่ในน้ำแข็งส่งมายังโรงพยาบาลที่ตรวจได้อย่างสะดวก สำหรับประเทศไทยบริการดังกล่าวมีข้อจำกัดและราคาแพง

ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะพัฒนาวิธีการส่งเลือดเพื่อนำมาตรวจดีเอ็นเอโดยไม่แช่น้ำแข็ง ซึ่งได้ริเริ่มเก็บ buffy coat จากเลือดที่ผสมกับ EDTA ในอัตราส่วนเลือดครบส่วน 10 มล. ผสมกับ 0.5 M EDTA จำนวน 0.5 มล. ที่อุณหภูมิห้องในห้องปฏิบัติการ และนำมาสกัดดีเอ็นเอหลังจากเก็บ buffy coat นาน 3, 5, 7 และ 10 วัน พบว่าสามารถสกัดดีเอ็นเอได้ดีไม่แตกต่างจากดีเอ็นเอที่สกัดจาก buffy coat ที่ทำทันทีหลังการเจาะเลือด³ ดังนั้นผู้วิจัยได้ศึกษาถึงการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด buffy coat ที่ส่งมาตรวจทางไปรษณีย์จากโรงพยาบาลต่างจังหวัดโดยไม่แช่น้ำแข็ง

ได้รับต้นฉบับ 14 พฤษภาคม 2544 และให้ตีพิมพ์ 4 มิถุนายน 2544

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ นางสาวประกายวรรณ เกษเกษม สำนักงานวิจัย คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี ถนนพระราม 6 เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

วิธีการ

1. การเตรียมอุปกรณ์การเก็บ buffy coat

ส่งอุปกรณ์การเก็บ buffy coat ให้โรงพยาบาลต่างจังหวัดประกอบด้วย หลอดพลาสติกทำด้วย polypropylene สำหรับบรรจุเลือดขนาด 15 มล. พร้อมทั้งจุกที่ปิดสนิท เติม 0.5 M EDTA จำนวน 0.5 มล. หลอด microtube ขนาด 1.5 มล. pipette tip ขนาด 1 มล. ที่ปลอดเชื้อ กระดาษ label และแผ่นพาราฟิล์ม

2. คำแนะนำการเก็บและจัดส่ง buffy coat สำหรับแพทย์และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ

เขียนพงศาวลี และชื่อผู้ป่วย สมาชิกในครอบครัวอย่างถูกต้อง พร้อมทั้งบอกชื่อโรคที่ต้องการให้การวินิจฉัยด้วยวิธีทางอนุชีววิทยา

เจาะเลือดจากผู้ป่วยและสมาชิกในครอบครัวรายละเอียด 10 มล. ใส่ในหลอดทดลองที่มี 0.5 มล. ของ 0.5 M EDTA ปิดจุกให้แน่นผสมให้เข้ากันด้วยการคว่ำหลอดขึ้นลง 5 ครั้ง นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที ดูดพลาสมาชั้นบนทิ้งไป และดูด buffy coat จำนวน 1 มล. ซึ่งอยู่บริเวณรอยต่อระหว่างเม็ดเลือดแดงกับพลาสมาด้วย pipette tip ที่ปลอดเชื้อ ใส่ในหลอด microtube ปิดจุกให้แน่น เขียนชื่อนามสกุลของผู้ป่วยบนกระดาษ ปิดบนหลอดอย่างถูกต้อง ปิดทับกระดาษเขียนชื่อด้วยสก็อตเทปใส และใช้พาราฟิล์มพันทับจุก microtube อีกครั้ง

นำหลอด microtube ใส่ซองที่มีแผ่นพลาสติกบุอยู่ด้านใน หรือใส่กล่องกระดาษแข็งของกรมไปรษณีย์ส่งมาให้แก่ผู้วิจัย ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี

3. เมื่อได้รับ buffy coat ที่ส่งมาทางไปรษณีย์ เก็บไว้ในตู้แช่แข็ง -20 °C แล้วจึงนำ buffy coat จำนวน 500 ไมโครลิตรมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี modified Nucleon⁴ โดยการเติม lysis buffer ลงในหลอดที่เก็บ buffy coat แล้วตกตะกอนโปรตีนด้วย 5 M sodium perchlorate หลังจากนั้นจึงสกัดด้วย chloroform และตกตะกอน

ดีเอ็นเอด้วย ethanol

ศึกษาความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยการวัด OD ที่ 260 และ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer เพื่อคำนวณหาอัตราส่วน OD 260/OD 280 และคำนวณปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยคำนวณจากสูตร 1 OD 260 จะเท่ากับดีเอ็นเอ 50 ไมโครกรัม/มล.

ผลการศึกษา

ผู้วิจัยได้รับตัวอย่าง buffy coat 22 ตัวอย่าง จากโรงพยาบาล 8 แห่ง ซึ่งใช้เวลาขนส่งทางไปรษณีย์ตั้งแต่ 1-5 วัน ดังแสดงในตารางที่ 1 ปรากฏว่าเป็น buffy coat ที่ใช้สกัดดีเอ็นเอได้เพียง 16 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 73 และได้สกัดดีเอ็นเอจาก buffy coat จำนวน 500 ไมโครลิตรปรากฏว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีค่า mean±SD ของ OD 260 ต่อ OD 280 เท่ากับ 1.56±0.06 (พิสัย 1.48-1.68) และมีค่า mean±SD ของปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 68.1±47.9 ไมโครกรัม (พิสัย 15.6-169) ดังแสดงในตารางที่ 2 และได้ทดลองนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จำนวน 100 นาโนกรัมไปเพิ่มจำนวนในหลอดทดลอง (amplification) ปรากฏว่าสามารถเพิ่มดีเอ็นเอบนตำแหน่งยืนเบต้า

ตารางที่ 1 จำนวนวันที่ใช้ในการขนส่งทางไปรษณีย์จากโรงพยาบาลต่างๆ มายังภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี

สถานที่	จำนวนวัน
1. คณะแพทยศาสตร์ ม.สงขลานครินทร์	5
2. คณะแพทยศาสตร์ ม.ขอนแก่น	4
3. คณะแพทยศาสตร์ ม.ธรรมศาสตร์	4
4. โรงพยาบาลประจำจังหวัดบุรีรัมย์	5
5. โรงพยาบาลประจำจังหวัดราชบุรี	2
6. โรงพยาบาลประจำจังหวัดนครปฐม	5
7. โรงพยาบาลพระปกเกล้า จังหวัดจันทบุรี	1
8. โรงพยาบาลประจำจังหวัดนครราชสีมา	4

ตารางที่ 2 ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ แสดงจาก OD 260/OD 280 และจำนวนดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัด buffy coat 500 ไมโครลิตร

ตัวอย่างที่	OD 260/OD 280	จำนวน DNA ที่ได้ (ไมโครกรัม)
1	1.53	15.6
2	1.63	104.0
3	1.50	51.0
4	1.55	107.0
5	1.60	56.0
6	1.56	125.0
7	1.60	146.0
8	1.48	37.0
9	1.65	169.0
10	1.55	17.0
11	1.55	68.0
12	1.50	55.0
13	1.68	54.0
14	1.50	22.0
15	1.50	22.0
16	1.51	41.0

โกลบินขนาด 1.4 kilobases และที่ตำแหน่ง intron 18 ของยีนฮีโมฟีเลีย เอ ขนาด 142 base pairs ได้

ส่วน buffy coat อีก 6 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 27 นำมาสกัดดีเอ็นเอไม่ได้ เพราะเป็นเลือดที่แข็งตัว 5 ตัวอย่าง และมีแต่พลาสมา 1 ตัวอย่าง

วิจารณ์

การส่งตัวอย่าง buffy coat ของผู้ป่วยและสมาชิกในครอบครัวทางไปรษณีย์โดยไม่แช่แข็งเป็นวิธีที่สะดวก ทำได้ง่าย ราคาถูก มีประสิทธิภาพดี เหมาะสำหรับการให้บริการทางการแพทย์แก่ผู้ป่วยและครอบครัว และสิ่งที่ต้องเน้นพิเศษคือการเขียนพงศาวลีที่ถูกต้อง การเจาะ

เลือดจากผู้ป่วยและสมาชิกในครอบครัวอย่างถูกต้อง เขียนชื่อบนหลอดที่เก็บตัวอย่างถูกต้อง นอกจากนี้เทคนิคการเก็บ buffy coat ต้องถูกต้อง จึงจะนำมาสกัดดีเอ็นเอในห้องปฏิบัติการได้โดยที่ผู้ป่วยและสมาชิกในครอบครัวไม่ต้องเดินทางเข้ามาในโรงพยาบาลมหาวิทยาลัย โรงพยาบาลศูนย์ที่มีความสามารถในการบริการตรวจวินิจฉัยทางอณูชีววิทยา

จากการศึกษาพบว่า ดีเอ็นเอที่สกัดจาก buffy coat ที่ส่งมาทางไปรษณีย์นี้มีความบริสุทธิ์ โดยแสดงจากค่าอัตราส่วน OD 260 ต่อ OD 280 ใกล้เคียงกับ 1.5-1.6 และปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้เพียงพอที่จะนำไปตรวจทางห้องปฏิบัติการอื่นๆ ต่อไป แม้ว่าจำนวนดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความแตกต่างกันตั้งแต่ 15.6 ถึง 169 ไมโครกรัม แต่ไม่ได้เป็นส่วนสำคัญโดยตรงกับเวลาที่ใช้ในการขนส่ง และจากการศึกษาของคณะผู้วิจัยที่เคยรายงานไว้พบว่า buffy coat ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 วัน จำนวนดีเอ็นเอที่สกัดได้ไม่แตกต่างกันและหาค่า mean $\pm$ SD ของจำนวนเม็ดเลือดขาวเท่ากับ $7.55 \pm 2.24 \times 10^3$ ไมโครลิตร ค่า mean $\pm$ SD ของจำนวนดีเอ็นเอที่สกัดจาก buffy coat จำนวน 500 ไมโครลิตร เท่ากับ 94.2 ± 38.1 ไมโครกรัม³ แต่ในการศึกษารั้งนี้ไม่สามารถนับจำนวนเม็ดเลือดขาวในตัวอย่างที่ส่งมา จึงไม่สามารถจะบอกได้ว่าจำนวนเม็ดเลือดขาวใน buffy coat ก่อนการสกัดดีเอ็นเอแตกต่างกันมากนักน้อยเพียงใด

นอกจากนี้ตัวอย่าง buffy coat ที่ดีที่นำมาสกัดดีเอ็นเอได้มีเพียง 16 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 73 อีก 6 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 27 การเตรียม buffy coat ไม่ถูกต้อง ดังนั้นจึงต้องเน้นถึงคำแนะนำในการเก็บ buffy coat ต้องผสมเลือดกับ EDTA ให้เข้ากันดีมีความสำคัญมาก เพราะมีตัวอย่าง buffy coat ถึง 5 ตัวอย่างที่เลือดแข็งตัวทำให้สกัดดีเอ็นเอไม่ได้ นอกจากนี้การที่เลือดแข็งตัวอาจเกิดจาก EDTA ในหลอดเก็บเลือดมีน้อยไป เช่น อาจหกในระหว่างทางที่ส่งหลอดทดลองไปให้แพทย์ในโรงพยาบาลต่างจังหวัด ดังนั้นจึงควรปิดจุกหลอดทดลอง

ที่มี EDTA ให้แน่นและถ้าโรงพยาบาลที่ต้องการส่ง buffy coat สามารถเตรียม 0.5 M EDTA ได้เอง ก็จะทำให้สะดวกขึ้น ซึ่ง EDTA มีในห้องปฏิบัติการในทุกโรงพยาบาลเตรียมได้ง่าย โดยการชั่ง EDTA จำนวน 372.24 กรัม เติมน้ำให้เป็น 1,000 มล. ปรับ pH ให้เป็น 8 ด้วย boric acid ใส่ขวดแล้วนำไป autoclave นอกจากนี้ควรจะมีการเขียนรูปประกอบคำแนะนำการเก็บ buffy coat ว่า buffy coat คือเม็ดเลือดขาวที่อยู่ระหว่างชั้นพลาสมากับเม็ดเลือดแดงเพราะมีหนึ่งตัวอย่างที่ดูได้แต่พลาสมา

สำหรับหลอดทดลองที่ใช้เก็บเลือด ไม่ควรเป็นหลอดที่ผ่านการใช้งานมาแล้ว (reused test tube) เพราะการล้างไม่สามารถขจัดสิ่งปนเปื้อนออกไปให้หมดได้ และอาจมีผลต่อการแปลผลทางการตรวจดูชีววิทยา โดยเฉพาะอย่างยิ่งการวินิจฉัยโรคหรือภาวะที่มีเยื่อปน ซึ่งมีความสำคัญต่อผู้ป่วยและครอบครัวอย่างมาก อย่างไรก็ตาม รายงานนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นที่มีเพียง 22 ตัวอย่าง ผู้วิจัยต้องศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

แม้ว่ามีรายงานการการหยุดเลือดบนกระดาดากรองและจัดส่งกระดาดากรองมาทางไปรษณีย์ สามารถนำไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยการตัดกระดาดากรองไปต้มในน้ำกลั่น แล้วนำของเหลวขึ้นบนมาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง² แต่จากการศึกษาในห้องปฏิบัติการของคณะผู้วิจัยพบว่ากระดาดากรองจะติดมาในการตรวจทางห้องปฏิบัติการ และมีรายงานว่าจำนวนฮีโมโกลบินจะขัดขวางการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ นอกจากนี้จำนวนดีเอ็นเอจากกระดาดากรองจะน้อยจนไม่สามารถนำไปทำ nucleotide sequencing จากเครื่องมือที่มีอยู่ในประเทศไทยขณะนี้ ดังนั้นผู้วิจัยเห็นว่าการสกัดดีเอ็นเอจาก buffy coat จะได้ดีเอ็นเอจำนวนมากกว่า และนำไปศึกษาทางห้องปฏิบัติการได้กว้างขวางขึ้น

ดังนั้นหากสามารถเตรียม buffy coat ได้ถูกต้อง จัดส่งมายังสถาบันที่สามารถศึกษาดีเอ็นเอโดยไม่แช่

น้ำแข็งสามารถนำมาศึกษาดีเอ็นเอเพื่อการวินิจฉัยโรคและภาวะที่มีเยื่อปนได้อย่างถูกต้อง เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก ราคาถูก และมีประสิทธิภาพดี

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณแพทย์ตามรายนามต่อไปนี้ที่ช่วยจัดส่ง buffy coat มาให้ศึกษา ศ.นพ.วิชัย เหล่าสมบัติ คณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ รศ.พญ.อรุณี เจตศรีสุภาพ คณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น พญ.วัลลี สัตยาศัย คณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ พญ.ศรัณญา ส่งคุณธรรม โรงพยาบาลประจำจังหวัดบุรีรัมย์ พญ.ศิริลักษณ์ ทรงสิทธิโชค โรงพยาบาลประจำจังหวัดราชบุรี พญ.อัมพร หิรัญโชติ โรงพยาบาลประจำจังหวัดนครปฐม นพ.ฉัตรชัย สวัสดิไชย โรงพยาบาลพระปกเกล้า จังหวัดจันทบุรี พญ.นิตยา วิษณุโยธิน โรงพยาบาลประจำจังหวัดนครราชสีมา

เอกสารอ้างอิง

1. Kogan SC, Doherty N, Gitschier J. An improved method for prenatal diagnosis of genetic disease by analysis of amplified DNA sequences: applicable to haemophilia A. *N Engl J Med* 1987;317:985-90.
2. Goodeve AC, Tagariello G, Chuansumrit A, Preston FE, Peake IR. A rapid and cost effective method for analysis of dinucleotide repeat polymorphisms in the factor VIII gene. *Blood Coagul Fibrinol* 1996;7:672-7.
3. Sasanakul W, Chuansumrit A, Rurghkhum S, Udomsubpayakul U, Hathirat P. DNA extraction and amplification of 10-day, room-temperature blood samples. *J Med Assoc Thai* 1999;82(suppl 1):S186-9.
4. Sasanakul W, Chuansumrit A, Katekasem P, Hathirat P. A comparison of DNA extraction between conventional phenol-chloroform and in-house modified method. *Rama Med J* 1997;20:119-24.

DNA Extraction from Buffy Coat Sent by Mail Without Ice

Praguywan Kadegasem, Saranya Rurgkhum, Werasak Sasanakul,
and Ampaiwan Chuansumrit*

Research Center, *Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University

Abstract: DNA was extracted from 22 samples of buffy coat sent by mail without ice from eight different provincial and university hospitals in Thailand. The transportation took one to five days. The results revealed that 16 samples (73%) of buffy coat could be used for DNA extraction and six samples (27%) were unqualified due to clotting ($n = 5$) and only plasma was obtained ($n = 1$). By extracting DNA from 500 μL of buffy coat, it yielded the mean ratio of OD 260/OD 280 of 1.56 and the mean amount of DNA of 68 μg . Therefore, we conclude that the buffy coat sent by mail without ice is suitable for extracting DNA. The yielded DNA can be used for further studies. It is simple, practical, efficient and of low cost.

Key Words : ● DNA extraction ● Buffy coat

Thai J Hematol Transf Med 2001;11:167-71.

