การเปรียบเทียบวิธีการสกัดสารพันธุกรรมระหว่างวิธี Spin Column และวิธี Phenol Chloroform สำหรับไวรัสในการผลิตวัคซีนโรคนิวคาสเซิล สเตรน Lentogenic

A Comparison on RNA Extraction Methods between Spin Column Method and Phenol Chloroform Extraction Technique in Newcastle Virus Lentogenic Strain Vaccine

สุวดี อิสรายุวพร[1*] ธนพล นาคสุข[1] ณัฐภา สุมาลุย์[1] สุกัญญา พลเรือง[2]
สาริศา เวียงชนก[2] และ การันต์ ชีพนุรัตน์[1]

Suwadee Isarayuwaporn[1*] Thanaphol Naksuk[1] Nattapa Sumalu[1] Sukanya Polruang[2]
Sarisa Weangchanok[2] and Karun Cheepnurat[1]

[1]สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ปทุมธานี ประเทศไทย
[2]ศูนย์ทดสอบและวิจัยคุณภาพชีววัตถุสำหรับสัตว์ กรมปศุสัตว์ อำเภอปากช่อง นครราชสีมา ประเทศไทย
[1]Animal Health Science Division, Faculty of Agricultural Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi, Pathum Thani, Thailand
[2]Veterinary Biologics Assay and Research Center, Department of Livestock Development, Nakhon Ratchasima, Thailand
**Corresponding author, E-mail: karun_c@rmutt.ac.th*

บทคัดย่อ

วิธีการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนที่เป็นมาตรฐานโดยทั่วไปนั้นจะทำการทดสอบกับสัตว์ทดลองซึ่งจะต้องมีการใช้สัตว์เพื่อการทดสอบ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่อการตรวจสอบประสิทธิภาพของวัคซีนได้ คณะผู้วิจัยจึงมีความประสงค์ที่จะทำการศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนโรคนิวคาสเซิล สเตรน Lentogenic ซึ่งเป็นสเตรนที่มีการระบาดอยู่ในประเทศไทย ณ ขณะนี้ด้วยการเปรียบเทียบปริมาณและคุณภาพของสารพันธุกรรมในวัคซีน จากการสกัดด้วยวิธี spin column และวิธี phenol chloroform โดยใช้ตัวอย่างไวรัสจากแหล่งการผลิตต่างๆ 6 ชนิด ได้แก่ วัคซีนนิวคาสเซิล สเตรน Lentogenic , วัคซีนรวมโรคนิวคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่, น้ำไข่ไก่ฟักที่มีไวรัสนิวคาสเซิลก่อนนำไปผลิตเป็นวัคซีน, น้ำไข่ไก่ฟักที่มีไวรัสนิวคาสเซิล, น้ำไข่ไก่ฟักที่ไม่มีไวรัสนิวคาสเซิล และใช้น้ำเพื่อเป็นตัวควบคุมเปรียบเทียบผลการทดลอง พบว่าเมื่อวัดปริมาณสารพันธุกรรมด้วย UV/Vis spectrophotometer พบว่าการสกัดด้วยวิธี spin column มีค่าเท่ากับ 2.61 , 5.94 , 5.25 , 11.94 และ 31.86 ng/µl ตามลำดับ ซึ่งเป็นวิธีที่ให้สารพันธุกรรมน้อยกว่าวิธี phenol chloroform มีค่าเท่ากับ 23.67 , 18.26 , 31.53 , 57.38 และ 91.77 ng/µl ตามลำดับ สำหรับการตรวจสอบคุณภาพต่อไพรเมอร์โรคนิวคาสเซิลสเตรน Lentogenic ด้วยวิธี Real Time Polymerase Chain Reaction พบว่า วิธี spin column ให้ค่า Cycle threshold (CT) เท่ากับ 16.98, 15.41, 13.73, 13.99 ตามลำดับซึ่งเฉลี่ยต่ำกว่าวิธี phenol chloroform เท่ากับ 18.90, 17.32, 14.02, 11.82 ตามลำดับ ซึ่งผลการทดสอบแสดงให้เห็นวิธีการสกัดแบบ phenol chloroform ให้ปริมาณสารพันธุกรรมในการสกัดสูงกว่าการสกัดด้วยวิธี spin

column ซึ่งสารพันธุกรรมที่ได้จะมีทั้ง RNA และ DNA เมื่อทำการทดสอบจากทั้งสองวิธีข้อมูลจากการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาการทดสอบวัคซีนทางชีววิทยาโมเลกุลในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณในงานต่อไป

คำสำคัญ: *วิธีการสกัดสารพันธุกรรม, ไวรัสโรคนิวคาสเซิล, Real time PCR*

Abstract

The standard evaluation of vaccine qualities is generally processed in the laboratory animal. However, the molecular technique has been applied for the vaccine capacity assessment. This study of two RNA extraction methods, namely spin column method and phenol chloroform method in Newcastle disease vaccine Lentogenic strain, was progressed by comparing the quantity and quality of RNA amount from both extraction methods. The aim of this study is to evaluate the efficacy of both RNA extraction techniques that might be developed as a lutein Laboratory process in vaccine quantification protocol. Total 48 samples were from 6 RNA resource groups (ND vaccine Lentogenic strain, Combined ND and Infectious Bronchitis vaccine, Allantoic fluid Pre-Formulate, Allantoic fluid positive, Allantoic fluid negative, and water). The measurement of genetic material performance was processed by UV/Vis spectrophotometer. Phenol chloroform method showed the results at 23.67, 18.26, 31.53, 57.38 and 91.77 ng/µl., while spin column method showed the results at 2.61, 5.94, 5.25, 11.94 and 31.86 ng/µl, respectively. The highest extracted RNA volume was found in phenol chloroform from the Allantoic fluid negative group. The quality test of the 28S primers using by Real Time PCR method of spin column method were 33.76, 28.33, 29.68, 18.63, and 18.89 which averaged lower than phenol chloroform method at 29.71, 31.47, 31.62, 21.31, and 27.61 respectively. When the quality testing of ND Primer Lentogenic Strain was performed using Real Time PCR method. The results showed the cycle threshold of spin column method at 16.98, 15.41, 13.73, and 13.99 on averages lower than Phenol Chloroform at 18.90, 17.32, 14.02, and 11.82 respectively. This preliminary data can be used to develop the molecular biological testing of vaccine quantitative and qualitative in the future.

Keywords: *Extraction method, Newcastle virus, Real time PCR*

1. บทนำ

ไก่เป็นปศุสัตว์ที่ดูแลง่ายและให้ผลผลิตได้รวดเร็ว ใช้เวลาในการเลี้ยงสั้น ส่งผลให้ธุรกิจในระดับอุตสาหกรรมเพิ่มมากขึ้น การเลี้ยงไก่เป็นจำนวนมากจะต้องมีการจัดการที่ดีรวมถึงระบบการป้องกันโรค ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญโรคนิวคาสเซิล (Newcastle Disease) เป็นโรคที่ก่อให้เกิดความเสียหายเป็นอย่างมาก ทั้งในภาคอุตสาหกรรมและเกษตรกรรายย่อย ส่งผลให้การเจริญเติบโตและผลผลิตไข่ลดลง มีจำนวนไก่ตายคราวละมากๆ (สุรวัฒน์ ชะลอสันติสกุล และจารุณี เกสรพิกุล, 2558) เพื่อเป็นการป้องกันการเกิดโรคนิวคาสเซิล และให้เกิดความมั่นใจในความปลอดภัยในการส่งออกสัตว์ปีก จึงต้องใช้วัคซีนในการป้องกันการแพร่ระบาดของโรคนิวคาสเซิล

ทั้งนี้สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพในการสกัดสารพันธุกรรมโดยเทคนิคต่างๆพบว่าได้มีการศึกษาโดยจากรายงานของ Dimitrov และคณะ (2014) ที่ทำการเปรียบเทียบวิธีการสกัดสารพันธุกรรมของไวรัสนิวคาสเซิลซึ่งเปรียบเทียบทั้งหมด 3 วิธี โดยมีวิธี spin column 2 แบบ (Qiagen RNeasy mini kits และ Mag MAXTM -96 AI/ND Viral RNA Isolation Kit) และวิธี phenol chloroform 1 แบบโดยใช้สารTRIZOL ผลปรากฏว่า เมื่อเปรียบเทียบการสกัดด้วยวิธี spin column (Qiagen RNeasy mini kits) ให้ค่าเฉลี่ย CT ที่ต่ำกว่าสารพันธุกรรมวิธี Phenol Chloroform (TRIZOL) แสดงถึงให้ปริมาณสารพันธุกรรมตั้งต้นที่สูงกว่าและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างวิธี spin column (Mag MAXTM -96 AI/ND Viral RNA Isolation Kit) และวิธี phenol chloroform (TRIZOL) ผลปรากฏว่าทั้ง 2 วิธี ให้ค่าเฉลี่ยCT ที่ไม่มีความแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบการศึกษาจาก Deng และคณะ (2005) ซึ่งทำการเปรียบเทียบวิธีการสกัดสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรซึ่งเปรียบเทียบทั้งหมด 6 วิธี โดยมีวิธี spin column 5 วิธี และวิธี phenol chloroform 1 วิธี ผลปรากฏว่า มีวิธี spin column 2 วิธี ที่ให้ค่าเฉลี่ย CT ต่ำกว่าวิธี phenol chloroform แสดงถึงให้ปริมาณสารพันธุกรรมตั้งต้นที่สูงกว่า เนื่องจากวิธี spin column มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนน้อยกว่าเพราะมีตัวกรองสารพันธุกรรมและยังใช้เวลาที่สั้นกว่า วิธี phenol chloroform ที่มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนที่สูงเพราะมีวิธีการสกัดที่ซับซ้อนและทำการปรับความเป็นกรดด่างเพียงเท่านั้น

การใช้วัคซีนเพื่อควบคุมโรคนั้นจะต้องใช้วัคซีนที่มีคุณภาพ ดังนั้นจึงต้องมีการตรวจสอบคุณภาพซึ่งวัคซีนเหล่านั้นจะต้องผ่านการยืนยันประสิทธิภาพว่าสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อโรคก่อนนำไปใช้ในสัตว์ โดยทั่วไปวิธีการตรวจสอบประสิทธิภาพของวัคซีนจะใช้วิธีการที่เป็นมาตรฐาน เช่น มาตรฐานองค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศจะกระทำโดยการทดสอบในสัตว์ทดลองซึ่งจะต้องใช้สัตว์ทดลองเป็นจำนวนมากและใช้ระยะเวลานาน ดังนั้นเพื่อลดการใช้สัตว์ทดลองและระยะเวลาการทดสอบทดสอบวัคซีนจึงมีการศึกษาเทคนิคทางชีวโมเลกุลถือเป็นหนึ่งในวิธีทางเลือกที่น่าสนใจ เนื่องจากเป็นวิธีที่ให้ผลเร็วและไม่ต้องใช้สัตว์ทดลอง ซึ่งในการทดสอบดังกล่าวเริ่มต้นด้วยการสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างวัคซีนและเพื่อนำมาตรวจสอบคุณภาพของสารพันธุกรรมที่ได้ ซึ่งวิธีการสกัดสารพันธุกรรมที่เป็นเทคนิคพื้นฐานได้แก่วิธี phenol chloroform และชุดสกัดสำเร็จรูป (commercial kit) ที่ใช้วิธี spin column ซึ่งยังไม่พบว่ามีการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดสารRNA จากวัคซีนโดยสองวิธีนี้มาก่อน การศึกษาในครั้งนี้จึงได้ทำการทดลองเปรียบเทียบวิธีการสกัดสารพันธุกรรมของวัคซีนนิวคาสเซิล เพื่อให้ได้ปริมาณสารพันธุกรรมที่มากพอที่จะสามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบคุณภาพวัคซีนโรคนิวคาสเซิลเพื่อพัฒนาให้เป็นวิธีการทดสอบวัคซีนทางชีวโมเลกุลต่อไป

2. วัตถุประสงค์

การศึกษาทดลองครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อทำการเพื่อเปรียบเทียบปริมาณและคุณภาพสารพันธุกรรมของวัคซีนโรคนิวคาสเซิล สเตรน Lentogenic ที่สกัดโดยวิธี spin column และวิธี phenol chloroform เพื่อประยุกต์ใช้เป็นวิธีการตรวจพื้นในการตรวจคุณภาพการผลิตวัคซีนในห้องปฏิบัติการณ์ต่อไป

3. อุปกรณ์และวิธีการ / วิธีดำเนินการวิจัย

3.1. การสกัด RNA ด้วยวิธี spin column ขั้นตอนดังนี้

1) ใส่ตัวอย่างวัคซีน ปริมาณ 200 µl ทั้งหมด 4 ตัวอย่างและเติมสาร Binding buffer 400 µl เพื่อทำลายเซลล์จากตัวอย่างให้สารพันธุกรรมออกจากเซลล์ ผสมกันด้วยเครื่อง Vortex mixer

2) จากนั้นดึงสารที่รวมกับตัวอย่างทั้งหมดใส่ลงใน High Pure filter tube ปั่นเหวี่ยงความเร็ว 8000xg นาน 1 นาทีเพื่อทำการกรอง RNA ไว้ที่คอลัมน์

3) เปลี่ยน Collection tube ใหม่ เติมสาร Inhibitor Removal Buffer 500 µl เพื่อทำการยับยั้งพวกเอนไซม์ต่างๆที่จะมาทำการย่อย RNA จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ด้วยความเร็ว 8000xg นาน 1 นาที

4) เปลี่ยน Collection tube ใหม่ เติมสาร Wash buffer 450 µl เพื่อทำการชะล้างเศษเซลล์หรือสารอื่นๆที่ยังติดอยู่ออก จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8000xg นาน 1 นาที โดยทำทั้งหมด 2 รอบเหมือนกัน

5) เปลี่ยน Collection tube จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 13000xg นาน 1 นาที เพื่อให้สารต่างๆหลุดออกจากตัวคอลัมน์โดยการปั่นแห้งและทำการเปลี่ยน Collection tube เป็น Microcentrifuge Tubes

6) เติมสาร Elution Buffer 50 µl เพื่อทำการละลาย RNA ที่อยู่ในคอลัมน์ออกให้อยู่ในรูปแบบสารแขวนลอยในน้ำ โดยนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8000xg นาน 1 นาที จากนั้นนำ High Pure filter Tubes ทิ้ง

7) แล้วแบ่งสารสกัดที่ได้ หลอดละ 30 µl ไปเก็บที่ -80°C แล้วนำส่วนที่เหลือ 20 µl เพื่อตรวจสอบต่อไป

3.2. การสกัด RNA ด้วยวิธี Phenol Chloroform ขั้นตอนดังนี้

1) ใส่ตัวอย่างวัคซีน ปริมาณ 200 µl ทั้งหมด 4 ตัวอย่างและเติมสาร Tripure Isolation Reagent 1000 µl ผสมกันด้วยเครื่อง Vortex mixer แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

2) Centrifuge 12000 relative centrifugal force ; rcf (แรงหนีศูนย์กลางสัมพัทธ์) ที่อุณหภูมิ 4 องศา เวลา 10 นาที

3) ดึงสารส่วนที่ใสใส่ Microcentrifuge Tubes ใหม่ แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

4) เติมสาร Chloroform 200 µl ลงไป และทำการผสม ด้วยมือ15 วินาที และทิ้งไว้อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที

5) Centrifuge 12000 rcf ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นทำการเก็บสารส่วนที่ใสใส่ Microcentrifuge Tubes ใหม่

6) เติมสาร Ethanol เย็นจัด 500 µl ลงไป และทำการผสมด้วยมือ แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา10 นาที

7) Centrifuge 12000 rcf ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และค่อยๆดึงสารส่วนที่ใสทิ้ง

8) เติมสาร 75% Ethanol 1 ml ลงไป แล้วนำไป Centrifuge 12000 rcf ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีจากนั้นค่อยๆดึงสารส่วนที่ใสทิ้งและเปิดฝาของ Microcentrifuge Tubes ทิ้งไว้จนแห้ง

9) เติมสาร RNase free water 50 µl ลงไปแล้วแบ่งสารสกัดที่ได้ หลอดละ 30 µl ไปเก็บที่ -80 องศาเซลเซียส แล้วนำส่วนที่เหลือ 20 µl เพื่อตรวจสอบต่อไป

3.3. การตรวจวัดปริมาณของสารพันธุกรรมเบื้องต้น (RNA) ด้วย UV/Vis Spectrophotometer ทั้ง 2 วิธี ดังนี้

1) ใช้ Elution Buffer และ RNase free water ของแต่ละวิธี ปริมาณ 3 µl เป็น Blank ก่อนการวัดปริมาณ RNA

2) วัดค่าปริมาณ RNA จากตัวอย่างที่สกัดด้วยวิธี spin column และ วิธี Phenol Chloroform แต่ละวิธี 4 ตัวอย่าง โดยใช้ครั้งละ 3 µl ซึ่งเครื่องจะทำการคำนวณแล้วแสดงค่าปริมาณ RNA (ng/µl) และ Ratio (OD260/280)

3) จดบันทึกปริมาณของ RNA ที่ได้

3.4. การตรวจคุณภาพของความจำเพาะต่อไพรเมอร์ 28S และไพรเมอร์โรคนิวคาสเซิล สเตรน Lentogenic ด้วย Real Time Polymerase Chain Reaction ทั้ง 2 วิธีการสกัดสารพันธุกรรม ดังนี้

1) ทำการเตรียมน้ำยาปฏิกิริยา PCR โดยใช้ชุด Light Cycler Multiplex RNA Virus Master ซึ่งจะมีสารสำหรับขั้นตอน reverse transcriptase ดังตารางที่ 1

2) นำตัวอย่างไปทำปฏิกิริยาด้วยเครื่อง Real Time PCR โดยตั้งค่าอุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆในการทำปฏิกิริยามีดังนี้ Hold 1 อุณหภูมิ 50°C เวลา 15 นาที Hold 2 อุณหภูมิ 95°C เวลา 30 วินาที Cycling 95°C เวลา 15 วินาที และ อุณหภูมิ 60°C เวลา 45 วินาที จำนวน 40 รอบ

3) เมื่อครบรอบปฏิกิริยาทำการอ่านผล และบันทึกค่า Cycle threshold (CT)

ตารางที่ 1 ชุดน้ำยาปฏิกิริยา PCR LightCycler Multiplex RNA Virus Master

ลำดับที่	ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น / ปริมาตร
1	RT – qPCR Reaction Mix, 5x conc.	0.1x conc.
2	RT Enzyme Solution, 200x conc.	0.1x conc.
3	F Primer (10 µM)	5 µM
4	R Primer (10 µM)	5 µM
5	Probe (10 µM)	5 µM
6	Water, PCR grade ปรับปริมาณให้ได้	11.45 µl
7	Template	5 µl
Total reaction		**20 µl**

4.ผลการวิจัย

4.1. ผลการวัดค่าปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเครื่อง UV/Vis Spectrophotometer

จากการทดลองเปรียบเทียบปริมาณของวิธีการสกัดสารพันธุกรรม (อาร์เอ็นเอ) ด้วยวิธี spin column และวิธี Phenol Chloroform โดยการวัดปริมาณของสารพันธุกรรมเบื้องต้น พบว่าตัวอย่าง วัคซีนนิวคาสเซิล (ND) วัดค่าปริมาณอาร์เอ็นเอเฉลี่ย 2.61 ng/µl และ 23.67 ng/µl ตามลำดับ ตัวอย่างวัคซีนรวมโรคนิวคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ (ND+IB) วัดค่าปริมาณอาร์เอ็นเอเฉลี่ย 5.94 ng/µl และ 18.26 ng/µl ตามลำดับ ตัวอย่างของ Allantoic fluid Pre-formulated, Allantoic fluid Positive และ Allantoic fluid Negative โดยวัดปริมาณอาร์เอ็นเอเฉลี่ย 5.25 ng/µl, 11.94 ng/µl, 31.86 ng/µl และ31.53 ng/µl, 57.38 ng/µl, 91.77 ng/µl ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 การวัดค่าปริมาณสารพันธุกรรมเบื้องต้นด้วยเครื่อง UV/Vis Spectrophotometer

ตัวอย่าง.	วิธี spin column			วิธี phenol chloroform		
	จำนวนตัวอย่าง (A/B)	ปริมาณอาร์เอ็นเอ (ng/µl)	OD (260/280)	จำนวนตัวอย่าง (A/B)	ปริมาณอาร์เอ็นเอ (ng/µl)	OD (260/280)
วัคซีน ND	2/4	2.61 ± 3.17	0.93 ± 0.27	1/4	23.67 ± 0	1.57 ± 0
วัคซีน ND+IB	3/4	5.94 ± 1.18	1.36 ± 0.23	2/4	18.26 ± 18.24	2.31 ± 1.28
Allantoic fiuld Pre-formulated	4/4	5.25 ± 2.75	0.72 ± 0.10	4/4	31.53 ± 18.40	1.46 ± 0.17
Allantoic fiuld Positive	4/4	11.94 ± 1.47	1.83 ± 0.55	4/4	57.38 ± 53.64	1.37 ± 0.09
Allantoic fiuld Negative	4/4	31.86 ± 7.45	1.64 ± 0.15	4/4	91.77 ± 14.47	1.24 ± 0.02
น้ำ	0/4	-	-	0/4	-	-

หมายเหตุ : A=จำนวนตัวอย่างที่สกัดได้ / B=จำนวนตัวอย่างที่สกัดทั้งหมด

$\bar{X}$± SD ($\bar{X}$ =ค่าเฉลี่ยของการทดลอง, SD =ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

4.2. ผลการตรวจความจำเพาะต่อไพรเมอร์ 28S ด้วยวิธี Real time Polymerase Chain Reaction

จากการทดลองตรวจความจำเพาะต่อไพร์เมอร์ 28S เพื่อตรวจสอบปริมาณสารพันธุกรรมของกลุ่มยูคาริโอตที่มีการปนเปื้อนกับสารพันธุกรรมที่สกัดได้ซึ่งยีน28Sเป็นส่วนหนึ่งของ Large subunit (60S) ของเซลล์สิ่งมีชีวิตจำพวก Eukaryote ผลจากการตรวจสอบด้วยวิธี Real Time PCR พบว่า ตัวอย่างวัคซีนนิวคาสเซิล (ND) ที่สกัดด้วยวิธี spin column และวิธี Phenol Chloroform มีค่า Cycle threshold (CT) เฉลี่ย 33.76 และ 29.71 ตามลำดับ และตัวอย่างวัคซีน ND+IB, Allantoic fluid Pre-formulated, Allantoic fluid Positive และ Allantoic fluid Negative ที่สกัดด้วยวิธี spin column และวิธี phenol chloroform มีค่า CT เฉลี่ยคือ 28.33, 29.68, 18.63, 18.89 และ 31.47, 31.62, 21.31, 27.61 ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบสารพันธุกรรมที่มีความจำเพาะต่อไพรเมอร์ 28S ด้วยวิธี Real Time Polymerase Chain Reaction

ตัวอย่าง.	วิธี spin column			วิธี phenol chloroform		
	จำนวนตัวอย่าง (A/B)	ปริมาณ RNA (ng/µl)	Cycle threshold (CT)	จำนวนตัวอย่าง (A/B)	ปริมาณ RNA (ng/µl)	Cycle threshold (CT)
วัคซีน ND	3/4	2.61	33.76 ± 0.68	3/4	23.67	29.71 ± 5.92
วัคซีน ND+IB	4/4	5.94	28.33 ± 1.27	4/4	18.26	31.47 ± 0.38
Allantoic fiuld Pre-formulated	4/4	5.25	29.68 ± 0.54	4/4	31.53	31.62 ± 1.04
Allantoic fiuld Positive	4/4	11.94	18.63 ± 1.07	4/4	57.38	21.31 ± 0.74
Allantoic fiuld Negative	4/4	31.86	18.89 ± 0.71	4/4	91.77	27.61 ± 4.41
น้ำ	0/4	-	-	0/4	-	-

หมายเหตุ : A=จำนวนตัวอย่างที่สกัดได้ / B=จำนวนตัวอย่างที่สกัดทั้งหมด

$\bar{X}$ ± SD ($\bar{X}$ =ค่าเฉลี่ยของการทดลอง, SD =ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

4.3. ผลการตรวจความจำเพาะต่อไพรเมอร์โรคนิวคาสเซิล สเตรน Lentogenic

จากการทดลองเพื่อตรวจความจำเพาะต่อไพร์เมอร์ โรคนิวคาสเซิล สเตรน Lentogenic และวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยวิธี Real time PCR พบว่า ตัวอย่างวัคซีน ND, วัคซีน ND+IB ที่สกัดด้วยวิธี spin column และวิธี phenol chloroform มีค่า CT เฉลี่ย 16.98, 18.90 และ 15.41, 17.32 ตามลำดับ โดยอาร์เอ็นเอที่ได้จากวิธี spin column ให้ค่า CT ต่ำกว่าอาร์เอ็นเอที่ได้จากวิธี phenol chloroform ซึ่งมีค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และตัวอย่าง Allantoic fluid Pre-formulated, Allantoic fluid Positive มีค่า CT เฉลี่ย 13.73, 14.02 และ 13.99, 11.82 ตามลำดับ ซึ่งมีความจำเพาะต่อไพรเมอร์โรคนิวคาสเซิล สเตรน Lentogenic โดยให้ค่าเฉลี่ยที่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบสารพันธุกรรมที่จำเพาะต่อไพรเมอร์โรคนิวคาสเซิล สเตรน Lentogenic ด้วยวิธี Real Time Polymerase Chain Reaction

ตัวอย่าง.	วิธี spin column		วิธี phenol chloroform		*p*-value
	จำนวนตัวอย่าง (A/B)	Cycle threshold (CT)	จำนวนตัวอย่าง (A/B)	Cycle threshold (CT)	
วัคซีน ND	4/4	16.98 ± 0.23*	4/4	18.90 ± 0.42*	<0.05
วัคซีน ND+IB	4/4	15.41 ± 0.35*	4/4	17.32 ± 0.15*	<0.05
Allantoic fiuld Pre-formulated	4/4	13.73 ± 0.15^{ns}	4/4	14.02 ± 0.18^{ns}	>0.05
Allantoic fiuld Positive	4/4	13.99 ± 0.60^{ns}	4/4	11.82 ± 0.53^{ns}	>0.05
Allantoic fiuld Negative	0/4	-	0/4	-	-
น้ำ	0/4	-	0/4	-	-

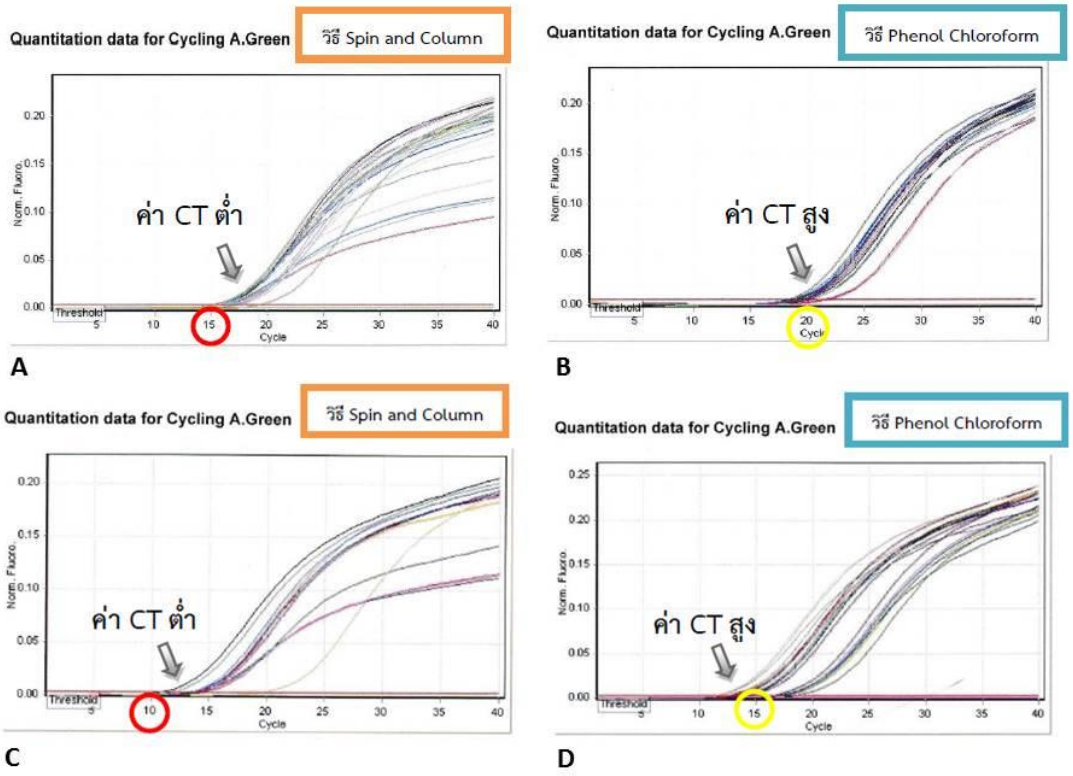
หมายเหตุ : A=จำนวนตัวอย่างที่สกัดได้ / B=จำนวนตัวอย่างที่สกัดทั้งหมด

$\bar{x}$ ± SD ($\bar{x}$ = ค่าเฉลี่ยของการทดลอง, SD =ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

* ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ns คือ ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

โดยจากการตรวจสอบการทำ real time PCR จากprimer ที่จำเพาะต่อ Newcastle LEntogenic strain พบว่าในกลุ่มสารพันธุกรรมที่สกัดจากวิธี Spin column จะให้ค่า CT ที่ต่ำกว่าการใช้สารพันธุกรรมที่สกัดจากวิธี phenol chloroform ทั้งจากตัวอย่างสกัดจากวัคซีนและตัวอย่างที่สกัดจาก allantoic fluid ทั้งสองชนิด (ดังแสดงในภาพที่ 1)



รูปที่ 1 กราฟแสดงค่า CT จากการตรวจ real time PCR ที่จำเพาะต่อเชื้อ Newcastle Lentogenic strain โดย (A) ค่า CT จากสารRNA ที่ได้จากวัคซีน ND ที่สกัดจากวิธี spin column ซึ่งเฉลี่ยที่ 16.98, (B) ค่า CT จากสาร RNA ที่ได้จากวัคซีน ND ที่สกัดจากวิธี phenol chloroform ซึ่งเฉลี่ยนที่18.90, (C) ค่าCT จากสารพันธุกรรมที่ได้จาก allantoic fluid ที่สกัดจากวิธี spin column ซึ่งเฉลี่ยที่ 13.73 และ (D) ค่าCT จากสารพันธุกรรมที่ได้จาก allantoic fluid ที่สกัดด้วยวิธี phenol chloroform ซึ่งเฉลี่ยที่ 14.02

5. อภิปรายผล

จากการศึกษาการสกัดอาร์เอ็นเอโดยวิธี Spin and Column และวิธี Phenol Chloroform จากนั้นนำมาวัดปริมาณสารพันธุกรรมด้วย UV/Vis spectrophotometer พบว่า วิธี spin column มีปริมาณอาร์เอ็นเอเฉลี่ยต่ำกว่าของวิธี phenol chloroform เนื่องจากวิธี spin column มีตัวกรองอาร์เอ็นเอที่มีความจำเพาะสูง จึงได้ปริมาณอาร์เอ็นเอที่ต่ำกว่า ซึ่งแตกต่างจากวิธี phenol chloroform ที่ใช้สารเคมีในการทำให้เยื่อหุ้มเซลล์สลายและตกตะกอนโปรตีนชนิดต่างๆ ภายในเซลล์จึงอาจได้อาร์เอ็นเอที่ไม่จำเพาะและสามารถปนเปื้อนกับสารอื่นๆได้เลยทำให้มีปริมาณสารที่ได้รับจากการสกัดที่สูงกว่า โดยผลการทดสอบนี้มีความสอดคล้องกับ Deng *et al*. (2005) ที่ทำการวัดปริมาณอาร์เอ็นเอ โดยวิธี phenol chloroform พบว่า มีปริมาณอาร์เอ็นเอสูงกว่าการสกัดสารพันธุกรรมจากวิธี spin column ที่พบว่าให้ปริมาณอาร์เอ็นเอต่ำกว่า

ทั้งนี้การตรวจความจำเพาะต่อไพร์เมอร์ 28S rRNA ด้วยเทคนิค Real time PCR เพื่อตรวจสอบคุณภาพของสารพันธุกรรมที่สกัดได้เพราะหากพบการ ซึ่งพบว่าจาการตรวจสอบRNAที่สกัดจากตัวอย่างวัคซีน ND ของวิธี Spin

and Column มีค่า CT สูงกว่าวิธี Phenol Chloroform แสดงว่ามีปริมาณสารพันธุกรรมชนิด RNA ที่สกัดโดยวิธี spin column น้อยกว่าการสกัดโดยวิธี phenol chloroform โดยพบว่าแม้วิธีการกรองสารพันธุกรรมจากการใช้ spin column จะให้ความบริสุทธิ์ของสารพันธุกรรมที่ได้จากการสกัดมากกว่าแต่ว่ามีปริมาณ RNA ที่น้อยกว่าวิธี Phenol chloroform ในการตรวจสอบยีน 28S rRNA เป็นการตรวจสอบการปนเปื้อนสารพันธุกรรมจาก Eukaryote ซึ่งไม่ควรจะพบการปนเปื้อนในตัวอย่าง RNAไวรัสที่ใช้ในการทำวัคซีนโดยในการผลิตวัคซีนที่มีคุณภาพจะต้องมีการปนเปื้อนน้อยที่สุด ซึ่งจากการตรวจสอบจะพบว่าค่าCTที่สูงที่สุดจากการทำเทคนิค Real – time PCR ในตัวอย่างทั้ง5ชนิดคือจากตัวอย่างสาร RNA ที่สกัดจากวัคซีน NDซึ่งแสดงให้เห็นว่าการปนเปื้อนสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตEukaryoteในตัวอย่างวัคซีน ND มีน้อยกว่าตัวอย่างอื่นๆในขณะที่พบค่า CT ต่อการตรวจยีน 28S ต่ำสุดจากตัวอย่าง Allantoic fluid ทั้งสองแบบ ทั้งนี้สำหรับตัวอย่างอื่นๆพบว่าสารพันธุกรรมที่สกัดได้จากวิธี spin column มีค่า CT ต่ำกว่าวิธี phenol chloroform เนื่องจากมีสารพันธุกรรมตั้งต้นของโฮสต์อยู่มากและวิธีการสกัดที่มีการปนเปื้อนน้อยกว่าจึงให้ได้ปริมาณสารพันธุกรรมที่มีปริมาณสูงและทั้งยังให้ค่า CT ที่ต่ำจึงแสดงให้เห็นมีความบริสุทธิ์มากกว่า ซึ่งผลการทดลองมีความสอดคล้องต่อการศึกษาต่อหน้าจาก Dimitrov *et al*. (2014) ที่ทำการตรวจความจำเพาะไวรัสนิวคาสเซิล ด้วยวิธี Real Time-PCR พบว่า ค่า CT ที่สกัดด้วยวิธี spin column มีค่าต่ำกว่าวิธี phenol chloroform แต่อย่างไรก็ตามปริมาณของสารพันธุกรรมที่สกัดได้จะเกี่ยวข้องกับวิธีการสกัดที่แตกต่างกันและทักษะเทคนิคการสกัดของแต่ละบุคคล เช่น ความเสี่ยงต่อการปนเปื้อน เวลาทำปฏิกิริยา

สำหรับการตรวจความจำเพาะต่อไพร์เมอร์ โรคนิวคาสเซิล สเตรน Lentogenic และวิเคราะห์ด้วยวิธี Real time PCR พบว่า การสกัดด้วยวิธี spin column มีค่า CT เฉลี่ยต่ำกว่าสารสกัด RNA ที่ได้จากวิธี phenol chloroform โดยการสกัดสาร RNA ด้วย วิธี spin column สามารถสกัด RNAของไวรัสนิวคาสเซิลได้มากกว่าและบริสุทธิ์กว่า วิธี phenol chloroform เนื่องจากการสกัดด้วยวิธี spin column มีความเสี่ยงปนเปื้อนน้อยกว่าเพราะมีตัวกรองอาร์เอ็นเอที่มีความจำเพาะสูงกว่าวิธี phenol chloroform (Deng *et al*., 2005; Dimitrov *et al*., 2014)

6. บทสรุป

จากผลการทดลองการเปรียบเทียบวิธีสกัดสารพันธุกรรมชนิด RNA ระหว่างการใช้วิธี Phenol – chloroform extraction และวิธี Spin Column สามารถสรุปได้ว่าการสกัดทั้งสองวิธีสามารถสกัดสารพันธุกรรม RNA ออกจากตัวอย่างทดลองได้ทั้งสองวิธี หากแต่การสกัดด้วยวิธี Phenol Chloroform extraction จะทำให้มีการปริมาณการปนเปื้อนสารชนิดอื่นๆในผลผลิตการสกัดสูงกว่าวิธีสกัดด้วย Spin and Column อย่างไรก็ตามหากตัวอย่างที่ใช้ในการสกัดมีความบริสุทธิ์ค่อนข้างสูงเช่น จากวัคซีนโดยตรงจะพบว่าการสกัดโดยวิธี Phenol Chloroform จะให้ปริมาณสารพันธุกรรม RNA จากการสกัดได้มากกว่าการสกัดด้วยวิธี Spin and Column ดังนั้นการเลือกวิธีการสกัดแบบใดควรเลือกตามลักษณะตัวอย่างที่จะนำมาสกัด นอกจากนี้ยังทำให้ทราบได้ว่าเทคนิคทางโมเลกุลลาร์สามารถนำมาใช้ทดแทนการใช้หนูทดลองในการตรวจสอบประสิทธิภาพในการผลิตวัคซีนได้ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการลดการใช้สัตว์ทดลองต่อไปในอนาคต

7. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ นายฐิตวัฒน์ จันทวร นายสัตวแพทย์ชำนาญการพิเศษ ผู้เชี่ยวชาญด้านการตรวจสอบคุณภาพชีววัตถุสำหรับสัตว์ ผู้อำนวยการศูนย์ทดสอบและวิจัยคุณภาพชีววัตถุสำหรับสัตว์ จังหวัดนครราชสีมา, นางวิลาสินี ท้าวเพชร นายสัตวแพทย์ชำนาญการพิเศษ หัวหน้าฝ่ายไวรัส, นางสาริศา เวียงชนก นายสัตวแพทย์ชำนาญการพิเศษ หัวหน้าฝ่ายอณูวิทยา และ นางสาวสุกัญญา พลเรือง นักวิทยาศาสตร์ประจำศูนย์ทดสอบและวิจัยคุณภาพชีววัตถุสำหรับสัตว์ จังหวัดนครราชสีมา และบุคคลากรทุกท่านในการอำนวยความสะดวกและสนับสนุนการศึกษาครั้งนี้

8. เอกสารอ้างอิง

สุรวัฒน์ ชะลอสันติสกุล และ จารุณี เกสรพิกุล. (2558). โรคไก่ (Common Chicken Diseases). เพชรบุรี: คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี. ประเทศไทย.

Deng M.Y., H. Wang, G.B. Ward, T.R. Beckham, & T.S. McKenna. (2005). Comparison of six RNA extraction methods for the detection of classical swine fever virus by real-time and conventional reverse transcription-PCR. J Vet Diagn Invest. 17: 574-578

Dimitrov K., A. Clavijo and L. Sneed. (2014). RNA extraction for molecular detection of Newcastle disease virus – comparative study of three methods. Revue Med. Vet. 165: 172-175