บทความสั้น
การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ ในการเก็บรักษาสารพันธุกรรมของ *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม* ที่อุณหภูมิและเวลาแตกต่างกัน

วรินตรา ยอดไธสง[1] แสงแข พงษ์ธเนศ[1] อำไพรินทร์ มุ่งมาตร[1]
วิษณุ วรรณแสวง[1] และนิวัตร จันทร์ศิริพรชัย[2*]

[1]ฝ่ายวิเคราะห์สุขภาพสัตว์ บริษัท สหฟาร์ม จำกัด
[2]ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

*ผู้รับผิดชอบบทความ

บทคัดย่อ

การเก็บและการวิเคราะห์ตัวอย่างเชื้อ *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม* จากวัคซีน เสตรน 6/85 เสตรน เอฟ และเสตรน ทีเอส-11 เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีเทมเพลท ด้วยกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ที่อุณหภูมิ 8°C 25°C และ 41°C และเวลา 2 ชั่วโมง 2 วัน 10 วัน และ 35 วัน แล้วนำมาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ เพื่อตรวจหาการคงอยู่ของสารพันธุกรรมของมัยโคพลาสมา พบว่าสามารถตรวจพบสารพันธุกรรมจากตัวอย่างมัยโคพลาสมา ของวัคซีนทั้ง 3 เสตรนได้ โดยพบความการปรากฏของแถบสารพันธุกรรมในทุกตัวอย่างของวัคซีนและทุกสภาพที่ทำการทดสอบ แต่ไม่สามารถตรวจพบสารพันธุกรรมจากตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีเทมเพลท ดังนั้นกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์สามารถเก็บรักษาตัวอย่างสารพันธุกรรมได้ แม้มีความแตกต่างของอุณหภูมิระหว่าง 8-41°C และระยะเวลาการเก็บรักษาตัวอย่างเปลี่ยนแปลงไปอย่างน้อย 35 วัน นอกจากนี้ยังไม่พบการปนเปื้อนระหว่างตัวอย่างที่เก็บบนกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ โดยการสังเกตจากการตรวจไม่พบสารพันธุกรรมจากตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีเทมเพลท

คำสำคัญ: กระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ เสตรน 6/85 เสตรน เอฟ เสตรน ทีเอส-11 *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม*

ปัจจุบันวิธีการชันสูตรโรคสัตว์ มีการพัฒนาไปในทิศทางของการใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาในการชันสูตรโรคมากขึ้น ปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่งของการใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา ในการชันสูตรโรคสัตว์ จากตัวอย่างที่เก็บจากภาคสนามหรือในท้องที่ที่มีการเกิดโรคนั้น คือ การเก็บรักษาตัวอย่างซึ่งการรักษาตัวอย่างเพื่อนำส่งยังห้องปฏิบัติการ จากชิ้นเนื้อสดของสัตว์ป่วยที่เกิดโรคนั้น ต้องอาศัยอุปกรณ์ที่เฉพาะเพื่อให้ความเย็น ซึ่งบางครั้งอาจหาได้ยากในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรค ดังนั้นการศึกษาวิธีการเก็บรักษาตัวอย่างเพื่อคงสภาพสารพันธุกรรม (ดีเอ็นเอ) จึงถือเป็นทางเลือกหนึ่งในการเพิ่มความสะดวกและประสิทธิภาพในการเก็บรักษาสารพันธุกรรมให้คงสภาพเดิม ซึ่งวิธีการเก็บรักษาสารพันธุกรรมวิธีการหนึ่งที่ได้รับการพัฒนาขึ้น คือ การเก็บตัวอย่างสารพันธุกรรมบนกระดาษ (cards) โดยในระยะแรกนั้นได้เก็บบนกระดาษที่เรียกว่า Guthrie card (Guthrie and Susi, 1963) แต่ขั้นตอนการนำสารพันธุกรรมออกจาก Guthrie cards มาใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction) ค่อนข้างจะใช้เวลาและมีขั้นตอนมาก โดยต้องบ่มการ์ดกับสารทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) เป็นเวลานานและต้องใช้เครื่องมืออื่นเข้ามาเกี่ยวข้อง

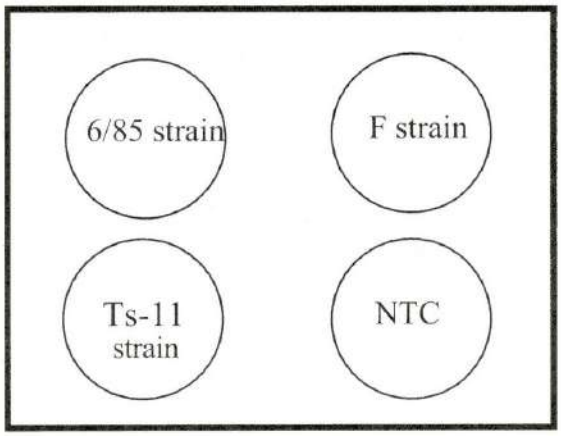
ปัจจุบันได้มีการพัฒนาคุณสมบัติของการ์ดและขั้นตอนการทำสารพันธุกรรมให้บริสุทธิ์โดยอาศัยกระบวนการทางอินทรีย์ (organic method) ซึ่งเป็นวิธีใหม่ โดยใช้กระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ (FTA® card) เป็นกระดาษซึ่งเคลือบด้วยบัฟเฟอร์เข้มข้น physical denaturants และสารสำหรับจับอนุมูลอิสระในปริมาณที่เหมาะสม (Burgoyne, 1996) สำหรับย่อยสลายเมนเบรนของเซลล์ ทำให้โปรตีนเสื่อมสภาพและสามารถป้องกันและรักษากรดนิวคลิอิกที่ติดอยู่บนกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์จากเอนไซม์นิวคลิเอส (nuclease) ปฏิกิริยาออกซิเดส (oxidase) และแสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet) ได้ นอกจากนั้นยังพบว่ากระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์นี้ มีคุณสมบัติในการป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อราแบคทีเรีย และเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ซึ่งกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ สามารถถูกทำลายได้ง่ายโดยกระบวนการธรรมชาติ กระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ มีประโยชน์ในการจับและยึดกรดนิวคลิอิกอย่างง่ายดายเพียงขั้นตอนเดียว โดยกรดนิวคลิอิกที่เก็บบนกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ สามารถคงสภาพที่อุณหภูมิห้องได้นานเป็นเวลาหลายปีและไม่จำเป็นต้องเก็บตัวอย่างในอุปกรณ์ทำความเย็นจึงเป็นการลดพื้นที่การใช้งาน ส่งผลให้เกิดความสะดวกในการขนส่งตัวอย่างและเป็นการลดการปนเปื้อนระหว่างขนส่ง โดยไม่ต้องแช่เย็น เพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของตัวอย่าง ลดเวลาและขั้นตอนในการทดสอบ สามารถเก็บรักษาสารพันธุกรรมได้จากตัวอย่างหลายชนิด เช่น เลือด เซลล์เพาะเลี้ยง แบคทีเรียและไวรัส เป็นต้น

การทดลองครั้งนี้ใช้กระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ เพื่อเก็บตัวอย่าง *Mycoplasma gallisepticum* จากวัคซีนจำนวน 3 สายพันธุ์ คือ ts-11, F และ 6/85 เพื่อทำการทดสอบปฏิกิริยาพีซีอาร์และทำการเปรียบเทียบการปรากฏของแถบสารพันธุกรรมจากตัวอย่างซึ่งเก็บที่อุณหภูมิและระยะเวลาแตกต่างกัน

วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้ คือ ศึกษาประสิทธิภาพในการเก็บตัวอย่างของ *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม* จากวัคซีนจำนวน 3 สายพันธุ์บนกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ที่ระยะเวลาและอุณหภูมิที่แตกต่างกัน คือ 2 ชั่วโมง ณ อุณหภูมิ 25°C และ 2 วัน 10 วัน และ 35 วัน ณ อุณหภูมิ 8°C 25°C และ 41°C

วัคซีน *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม* (*Mycoplasma gallisepticum*)

วัคซีน *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม* ชนิดเชื้อเป็นที่ใช้มี 3 เสตรน คือ เสตรน ts-11 เสตรน F และ เสตรน 6/85 โดยนำวัคซีนแต่ละเสตรนมาละลายในน้ำยาละลายวัคซีน แล้วหยดวัคซีนแต่ละเสตรนลงบน กระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ปริมาตร 100 µl (รูปที่ 1)



รูปที่ 1. แสดงแผนผังการเก็บตัวอย่างด้วยกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ของ *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม* จากวัคซีนเสตรน 6/85, F และ Ts-11
NTC = No template control

กระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์

กระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ (FTA® (Flinder Technology Associates) card) ออกแบบและพัฒนา โดย Dr. Leigh Burgoyne (Flinders university) เป็นกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ซึ่งเคลือบด้วยบัฟเฟอร์ เข้มข้น physical denaturants และสารสำหรับจับอนุมูลอิสระในปริมาณที่เหมาะสม (Burgoyne, 1996)

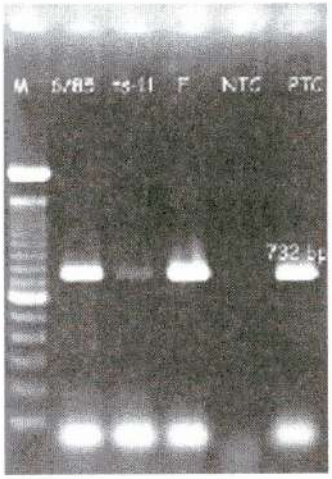
การสกัดสารพันธุกรรม (ดีเอ็นเอ)

เมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมง ณ อุณหภูมิ 25°C และ 2 วัน 10 วัน และ 35 วัน ณ อุณหภูมิ 8°C 25°C และ 41°C ภายใต้เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerator, Sharp, Thailand และ Incubator, DAI KI SCIENCES, Korea) และเทอร์โมมิเตอร์ (liquid in glass thermometer, Brannan, England) ในการตรวจสอบ อุณหภูมิตลอดเวลา ภายหลังจากหยอดวัคซีน *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม* เสตรนต่างๆ ลงบนกระดาษ เซลลูโลสเมทริกซ์ ทำการล้างสารเคมีและสิ่งปนเปื้อนต่างๆ ออกจากสารพันธุกรรม ที่จับอยู่บนกระดาษ เซลลูโลสเมทริกซ์ โดยตัดกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ ที่ผ่านการเก็บตัวอย่างแล้ว ขนาดประมาณ 0.2 mm ใส่ลงในหลอดพีซีอาร์ขนาด 0.2 ml ทำการล้างกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ โดยเติม 200 µl distilled water DNA/RNA free ลงไปในหลอดพีซีอาร์ขนาด 0.2 ml ที่มีกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ พักไว้เป็น เวลา 5 นาที จากนั้น pipette น้ำออก (ซ้ำ 3 ครั้ง) ต่อมาเติม 200 ml TE buffer ลงไปในหลอดพีซีอาร์ ขนาด 0.2 ml ที่มีกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ แล้วพักไว้เป็นเวลา 5 นาที pipette น้ำออก (ซ้ำ 2 ครั้ง) จากนั้นนำหลอดพีซีอาร์ขนาด 0.2 ml ที่มีกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ วางบนแผ่นความร้อนจนกระดาษ แห้งสนิท ส่วนการสกัดสารพันธุกรรมโดยตรงจากวัคซีน *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม* เพื่อใช้เป็น ตัวอย่างควบคุมบวก (positive control) ทำตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต (DNA trap, Biotech, Thailand) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาผ่านกระบวนการ PCR เช่นเดียวกับสารพันธุกรรมที่สกัดจากกระดาษ เซลลูโลสเมทริกซ์

ปฏิกิริยา polymerase chain reaction

นำ PCR tube ที่มีกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ มาทำปฏิกิริยา PCR กับ Primer MG1 5'-GGA TCC CAT CTC GAC CAC GAG AAA A-3' และ Primer MG2 5'-CTT TCA ATC AGT GAG TAA CTG ATG A-3' (Proligo Primer Probes, Singapore) (Nascimento *et al.* 1991) ที่มีความจำเพาะกับ *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม* ทุกสายพันธุ์ โดยให้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 732 bp ส่วนประกอบในปฏิกิริยาประกอบด้วย 1.0 µM Primer MG1, 1.0 µM Primer MG2, 0.2 mM dNTPS mixed, 1.5 U Taq DNA polymerase, 2.5 mM $MgCl_2$, 1X PCR buffer และเติม distilled water จนมีปริมาตร ครบ 20 µl นำปฏิกิริยา PCR ที่เตรียมได้เข้าสู่กระบวนการ polymerase chain reaction จำนวน 35 รอบ ในเครื่อง Thermocycler (Thermo Electron Corporation, USA) ตามขั้นตอนดังนี้ Predenature 95°C 5 นาที Denature 95°C 1 นาที Annealing 55 °C 2 นาที Extension 72°C 1 นาที Final Extension 72°C 7 นาที Hold temp. 4°C หลังสิ้นสุดปฏิกิริยา นำผลิตภัณฑ์ PCR มาวิเคราะห์ด้วย electrophoresis (GelMate™, Osaka-city, Japan) ใน 1.5% agarose gel โดยใช้ 5 µl ผลิตภัณฑ์ PCR ผสมกับ 2 µl 6X loading buffer (Sambrook *et al.*, 1989) โดยใช้กระแสไฟ 100 โวล์ต เวลา 40 นาที ใน 0.5X TBE buffer จากนั้นนำเจล ที่ผ่านขั้นตอน electrophoresis แช่ในสารละลาย ethidium bromide 20 นาที ล้างเจลด้วย 0.5X TBE buffer ตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยาจากแผ่นเจลภายใต้แสง UV ของเครื่อง Gel Documents (UVI tec, Cambridge, UK) และวัดขนาดผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยโปรแกรม UVI gelstart MW (UVI tec, Cambridge, UK)

หลังจากเก็บตัวอย่างวัคซีนด้วยกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25°C จากนั้นมาทำการล้างกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ และนำมาทำปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจสอบสารพันธุกรรมของ *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม* และนำผลิตภัณฑ์ PCR มาทำการตรวจสอบด้วยวิธี electrophoresis ให้ผลดังรูปที่ 2. และหลังจากวัดขนาดของผลิตภัณฑ์ด้วยโปรแกรม UVI gelstarMW (UVI tec, Cambridge, UK) ปรากฏว่าผลิตภัณฑ์ PCR จากการเก็บตัวอย่างด้วยกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์และตัวอย่างที่สกัดด้วยชุดสกัดแบบเชิงพาณิชย์ทุกตัวอย่างมีขนาด 732 bp เท่ากัน ส่วนตัวอย่าง no template control ไม่ปรากฏแถบสว่างของผลิตภัณฑ์ PCR



รูปที่ 2. ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการทดลองเก็บตัวอย่างวัคซีน *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม* ด้วยกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 25 °C และทดสอบด้วยวิธี PCR

Lane 1 = DNA Marker (100 bp DNA ladder (invitrogen))

Lane 2 = strain 6/85

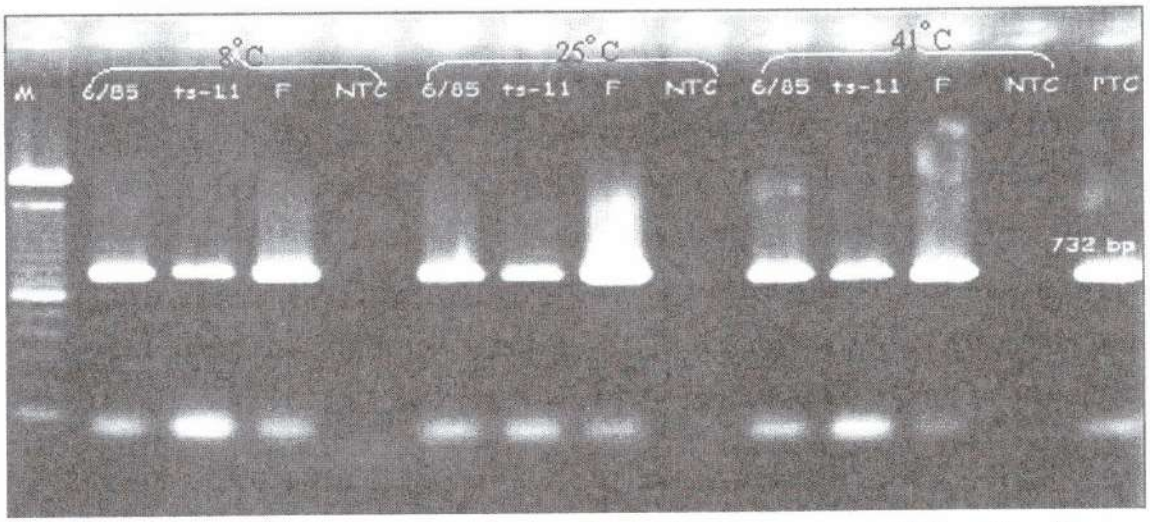
Lane 3 = strain ts-11

Lane 4 = strain F

Lane 5 = No template control

Lane 6 = Positive control: DNA extracted by commercial kit

หลังจากเก็บตัวอย่างวัคซีนด้วยกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ เป็นเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิ 8°C 25°C และ 41°C จากนั้นทำการล้างกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ และทำการตรวจหาสารพันธุกรรมของ *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม* จากกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ ด้วยวิธี PCR และนำผลิตภัณฑ์ PCR มาตรวจสอบด้วยวิธี electrophoresis ให้ผลดังรูปที่ 3. และหลังจากวัดขนาดของผลิตภัณฑ์ ด้วยโปรแกรม UVI gelstarMW (UVI tec, Cambridge, UK) ปรากฏว่าผลิตภัณฑ์ PCR จากการเก็บตัวอย่างด้วยกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์และตัวอย่างที่สกัดด้วยชุดสกัดเชิงพาณิชย์ ทุกตัวอย่างมีขนาด 732 bp เท่ากัน ส่วนตัวอย่าง no template control ไม่ปรากฏแถบสว่างของผลิตภัณฑ์ PCR



รูปที่ 3. ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการทดลองเก็บตัวอย่างวัคซีน *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม* ด้วยกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ เป็นเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิ 8°C, 25°C, 41°C

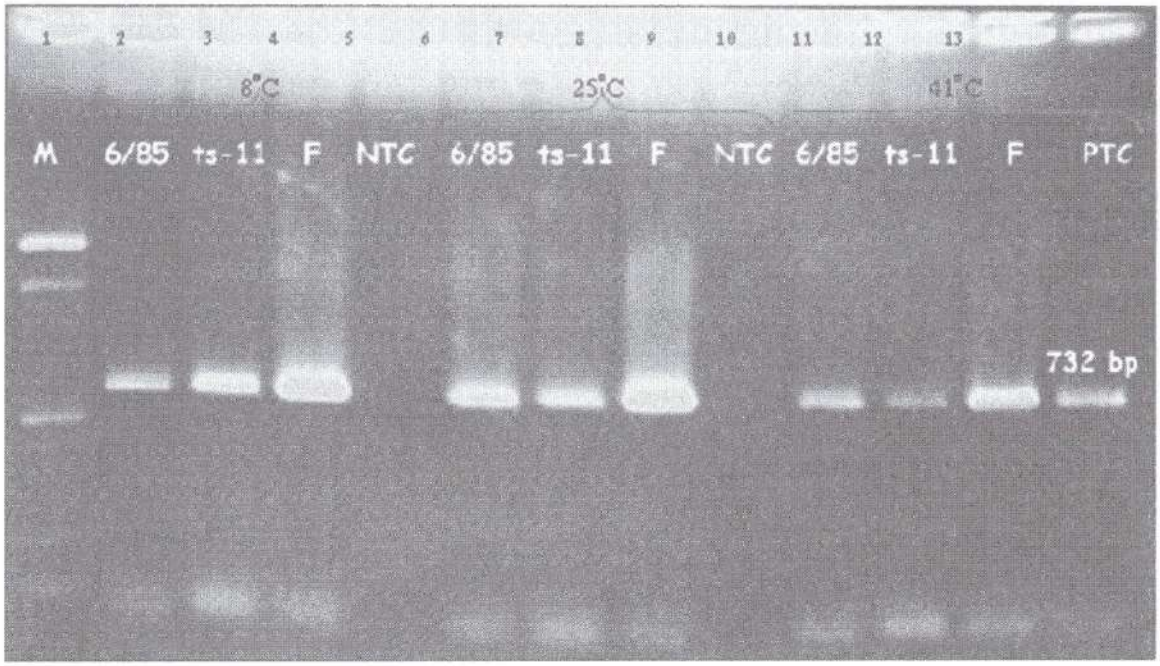
Lane 1 = DNA Marker (100 bp DNA ladder (invitrogen)),
Lane 2 = strain 6/85,
Lane 3 = strain ts-11,
Lane 4 = strain F,
Lane 5 = No template control,
Lane 6 = strain 6/85,
Lane 7 = strain ts-11,
Lane 8 = strain F,
Lane 9 = No template control,
Lane 10 = strain 6/85,
Lane 11 = strain ts-11,
Lane 12 = strain F,
Lane 13 = No template control,
Lane 14 = Positive control: DNA extracted by commercial kit

หลังจากเก็บตัวอย่างวัคซีนด้วยกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ เป็นเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิ 8°C, 25°C และ 41°C ทำการล้างกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ และทำการตรวจหาสารพันธุกรรมของ *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม* จากกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ ด้วยวิธี PCR และนำผลิตภัณฑ์ PCR มาตรวจสอบด้วยวิธี electrophoresis ให้ผลดังรูปที่ 4. และหลังจากวัดขนาดของผลิตภัณฑ์ ด้วยโปรแกรม UVI gelstarMW (UVI tec, Cambridge, UK) ปรากฏว่าผลิตภัณฑ์ PCR จากการเก็บตัวอย่างด้วยกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ ทุกตัวอย่างมีขนาด 732 bp เท่ากัน ส่วนตัวอย่าง no template control ไม่ปรากฏแถบสว่างของผลิตภัณฑ์ PCR

รูปที่ 4. ผลิตภัณฑ์ PCR หลังจากการทดลองเก็บตัวอย่างวัคซีน *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม* ด้วยกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ เป็นเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิ 8°C, 25°C, 41°C

Lane 1 = DNA Marker (100 bp DNA ladder (invitrogen)),
Lane 2 = strain 6/85,
Lane 3 = strain ts-11,
Lane 4 = strain F,
Lane 5 = No template control,
Lane 6 = strain 6/85,
Lane 7 = strain ts-11,
Lane 8 = strain F,
Lane 9 = No template control,
Lane 10 = strain 6/85,
Lane 11 = strain ts-11,
Lane 12 = strain F

หลังจากเก็บตัวอย่างวัคซีนด้วยกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ เป็นเวลา 35 วัน ที่อุณหภูมิ 8°C, 25°C และ 41°C จากนั้นทำการล้างกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ และทำการตรวจหาสารพันธุกรรมของ *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม* จากกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ ด้วยวิธี PCR และนำผลิตภัณฑ์ PCR มาตรวจสอบด้วยวิธี electrophoresis ให้ผลดังรูปที่ 5. หลังจากวัดขนาดของผลิตภัณฑ์ ด้วยโปรแกรม UVI gelstarMW (UVI tec, Cambridge, UK) ปรากฏว่าผลิตภัณฑ์ PCR จากการเก็บตัวอย่างด้วยกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ และตัวอย่างที่สกัดด้วยชุดสกัดแบบเชิงพาณิชย์ ทุกตัวอย่างมีขนาด 732 bp เท่ากัน ส่วนตัวอย่าง no template control ไม่ปรากฏแถบสว่างของผลิตภัณฑ์ PCR



รูปที่ 5. ผลิตภัณฑ์ PCR หลังจากการทดลองเก็บตัวอย่างวัคซีน *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม* ด้วยกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ เป็นเวลา 35 วัน ที่อุณหภูมิ 8°C, 25°C, 41°C

Lane 1 = DNA Marker (100 bp DNA ladder (invitrogen)),
Lane 2 = strain 6/85,
Lane 3 = strain ts-11,
Lane 4 = strain F,
Lane 5 = No template control,
Lane 6 = strain 6/85,
Lane 7 = strain ts-11,
Lane 8 = strain F,
Lane 9 = No template control,
Lane 10 = strain 6/85,
Lane 11 = strain ts-11,
Lane 12 = strain F,
Lane 13 = Positive control: DNA extracted by commercial kit

การศึกษาวิธีการที่มีประสิทธิภาพ สะดวก รวดเร็วและประหยัด ในการเก็บรักษาตัวอย่างที่ได้จากภาคสนามเพื่อนำมาวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ นับเป็นการศึกษาที่มีประโยชน์ โดยเฉพาะการเก็บรักษาตัวอย่างสารพันธุกรรม ซึ่งนับวันจะเพิ่มความสำคัญมากขึ้นในด้านการชันสูตรโรคสัตว์ จากการทดลองโดยการใช้กระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ (FTA® card) ซึ่งเป็นกระดาษกรองที่มีคุณสมบัติในการจับกับเซลล์ของสิ่งมีชีวิตและทำการย่อยสลายเซลล์และจับสารพันธุกรรมของเซลล์เหล่านี้บนแผ่นกระดาษกรอง (Burgoyne, 1996; Devost and Choy, 2000; Lampel *et al.*, 2000) ส่งผลให้ลดเวลาในการจัดการกับตัวอย่างบนกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ โดยมีขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมที่ใช้เวลาน้อย ซึ่งตรงข้ามกับวิธีสกัดสารพันธุกรรมมาตรฐาน คือ phenol/chloroform ซึ่งเป็นวิธีการสกัดสารพันธุกรรม ด้วยกระบวนการที่ค่อนข้างซับซ้อน ใช้เวลานานและใช้สารเคมีที่มีอันตราย จากการทดลองเก็บตัวอย่าง *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม* จากวัคซีน จำนวน 3 เสตรน

ที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่แตกต่างกัน คือ 8°C 25°C และ 41°C เมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมง 2 วัน 10 วัน และ 35 วัน โดยการใช้เทคนิคทาง PCR ในการพิสูจน์การคงอยู่ของ *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม* พบว่ากระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์มีความสามารถในการเก็บตัวอย่างสารพันธุกรรมของตัวอย่างที่ส่งตรวจได้เป็นอย่างดี ณ อุณหภูมิที่แตกต่างกัน จาก 8°C - 41°C ในระยะเวลาจาก 2 ชั่วโมง จนถึงระยะเวลามากกว่า 1 เดือน และจากปฏิกิริยา PCR พบว่าการเก็บตัวอย่างด้วยกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ พบการปรากฏของแถบสารพันธุกรรมไม่แตกต่างจากการเก็บตัวอย่างจากวัคซีนโดยตรง และทำการสกัดสารพันธุกรรมด้วยชุดสกัดเชิงพาณิชย์ และที่สำคัญการเก็บตัวอย่างโดยใช้กระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ ไม่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนระหว่างตัวอย่าง สามารถสังเกตได้จากตัวอย่างที่เป็น negative control ซึ่งเป็นตัวอย่างที่อยู่ใกล้กับตัวอย่างอื่นๆ เมื่อนำมาทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้สารเคมีและสภาวะเช่นเดียวกับตัวอย่างอื่นๆ พบว่าไม่สามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของ *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม* จากตัวอย่าง negative control ได้ จากการทดสอบความไวและความจำเพาะของการเก็บตัวอย่างวัคซีน *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม* บนกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ ด้วยวิธีพีซีอาร์ พบว่าให้ผลเช่นเดียวกันกับการสกัดสารพันธุกรรมของ *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม* โดยตรงจากวัคซีนด้วยวิธีชุดทดสอบเชิงพาณิชย์และวิธีพีซีอาร์มาตรฐาน แต่กระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ทำได้ง่ายและ รวดเร็ว เพราะไม่ต้องผ่านขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรม ใช้เวลาน้อยในการล้างสิ่งปนเปื้อนออกจากสารพันธุกรรมบนกระดาษ และสามารถนำกระดาษไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้โดยไม่ต้องเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารเคมี อุณหภูมิและจำนวนรอบในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ให้แตกต่างไปจากวิธีพีซีอาร์มาตรฐาน นอกจากนั้นกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ พบว่ามีความสามารถในการเก็บสารพันธุกรรมให้มีความเสถียรได้เป็นเวลานาน และเก็บไว้ได้ที่อุณหภูมิค่อนข้างกว้าง ดังนั้นจึงเป็นทางเลือกที่ดีในการเก็บรักษาสารพันธุกรรมเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ด้านโมเลกุลในลำดับต่อไปที่ต้องการเวลาและขั้นตอนจำนวนมาก เช่น การทำ RFLP หรือ nucleotide sequencing (Moscoso *et al*., 2004) ดังนั้นการใช้กระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ ในการเก็บตัวอย่างนับว่ามีประโยชน์ สะดวกและประหยัด (ราคาแผ่นละ 120 บาท) โดยกระดาษ 1 แผ่นสามารถตรวจได้ 4 ตัวอย่าง คิดเป็นตัวอย่างละ 30 บาท ส่วนค่าสารเคมีที่ใช้ทำ PCR คิดเป็นตัวอย่างละ 120 บาท รวมค่าใช้จ่ายทั้งสิ้น 150 บาท/ตัวอย่าง ส่วนการตรวจด้วยชุดทดสอบเชิงพาณิชย์ ราคาประมาณ 250-300 บาท ดังนั้นประหยัดกว่าประมาณ 100-150 บาท และให้ผลดีโดยเฉพาะเมื่อเปรียบเทียบวิธีการเก็บตัวอย่างแบบดั้งเดิมที่ต้องทำการเก็บรักษาตัวอย่างในที่เย็น

เอกสารอ้างอิง

Burgoyne, L.A. 1996. Solid medium and method for DNA storage. US patent 5, 496, 562.

Devost, N.C. and Choy, F.Y.M. 2000. Mutation analysis of Gaucher disease using dot-blood samples on FTA filter paper. Am. *J. Med. Genet.* 94:417-420.

Guthrie, R. and Susi, A. 1963. A simple phenylalanine method for the detecting phenyl ketone urine in large population of new born infants. *J. Pediatr.* 32: 338-3343.

Lampel, K.A., Orlandi, P.A. and Kornegay, L. 2000. Improved template preparation for PCR-based assays for detection of food borne bacterial pathogens. Appl. Environ. Microbiol. 66:4539-4542.

Moscoso, H., Stephan, G., Thayer, S.G., Hafacre, C.L. and Kleven, S.H. 2004. Inactivation, Storage, and PCR Detection of Mycoplasma on FTA Filter® Paper. Avian Disease. 48:841-850.

Nascimento, E.R., Yamamoto, R., Herrick, K.R. and Tait, R.C. 1991. Polymerase chain reaction for detection of Mycoplasma gallisepticum. Avian Disease. 35:62-69.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning : A Laboratory Manual. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY,USA, chapter 6.

Short communication : Efficacy of cellulose matrix card for preserving DNA of *Mycoplasma gallisepticum* at various temperatures and times

Warintra Yotthaisong[1], Saengkhae Phongthanes[1], Ampairin Mungmad[1], Wisanu Wanasawaeng[1] and Niwat Chansiripornchai[2,*]

[1]Division of animal health analysis, Sahafarm Company Ltd.

[2]Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn university

*Corresponding author

Abstract

The *Mycoplasma gallisepticum* (MG) vaccines strain 6/85, F and ts-11 were dropped and preserved on cellulose matrix cards at various temperatures of 8°C, 25°C and 41°C and times of 2 hr, 2 days, 10 days and 35 days, and analyzed comparing with no template controls for the presence of MG by PCR techniques. The results revealed the presence of DNA of all MG from the vaccine strains keeping at the various temperatures and times of experiments. No DNA of MG had been found on the any template control of cellulose matrix card. The cellulose matrix cards give advantages for preserving the DNA samples at the various temperatures and times without contamination between the samples by observing the absence of DNA on the non-template samples.

Keywords : cellulose matrix card strain 6/85 strain F strain ts-11 *Mycoplasma gallisepticum*