

การย่อยสลายเซลล์โฮสต์และอนุภาคไวรัส ในการสกัดกรดนิวคลีอิกของไวรัส จากตัวอย่างมนุษย์

ตรีวัฒน์ วัฒนะโชคชัย และ กิ่งกาญจน์ รักษมณี

ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร 10400

บทคัดย่อ การย่อยสลายเซลล์และทำลายโครงสร้างที่ห่อหุ้มสารพันธุกรรมเป็นขั้นตอนแรกสำหรับการสกัดกรดนิวคลีอิก ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญสำหรับกระบวนการตรวจวิเคราะห์เชื้อไวรัสก่อโรค เช่น HIV, SAR-CoV-2, MERS-CoV และ Influenza เป็นต้น ซึ่งจะช่วยควบคุม ใ้การแพร่ระบาด รวมทั้งศึกษาวิวัฒนาการสายพันธุ์ของไวรัสก่อโรค ขั้นตอนนี้มีบทบาทสำคัญในกระบวนการตรวจวิเคราะห์ทางด้านชีวโมเลกุล เช่น PCR, Real-Time PCR และ Next-Generation Sequencing (NGS) การพัฒนาวิธีการสกัดเพื่อใช้ทำลายโครงสร้างนิวคลีโอโปรตีน ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นิวคลีเอส และการกำจัดสิ่งปนเปื้อนถือเป็นสิ่งสำคัญ วิธีการเหล่านี้ช่วยให้เซลล์และอนุภาคไวรัสย่อยสลายได้อย่างมีประสิทธิภาพ ประสบการณ์ในการวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการแสดงให้เห็นว่า คุณภาพของกรดนิวคลีอิกที่สกัดได้มีผลโดยตรงต่อความแม่นยำของการวิเคราะห์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในตัวอย่างที่มีปริมาณเชื้อไวรัสต่ำๆ การพัฒนาวิธีการสกัดที่มีประสิทธิภาพจึงเป็นสิ่งสำคัญ เนื่องจากช่วยให้ได้กรดนิวคลีอิกที่มีความบริสุทธิ์และมีปริมาณเพียงพอต่อการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการและการใช้ประโยชน์ทางการแพทย์

คำสำคัญ: การย่อยสลายเซลล์, การทำลายอนุภาคไวรัส, นิวคลีโอโปรตีน, การสกัดกรดนิวคลีอิก

Corresponding author E-mail: kingvirusrama@gmail.com

Received: 29 April 2025

Revised: 24 July 2025

Accepted: 29 July 2025

บทนำ

ไวรัสก่อโรคเป็นภัยคุกคามร้ายแรงต่อสุขภาพของประชาชน โดยทั่วไปการวิเคราะห์กรดนิวคลีอิกจากตัวอย่างทางชีวภาพหรือสิ่งแวดล้อมเป็นการศึกษาเพื่อระบุสายพันธุ์และวิวัฒนาการของเชื้อไวรัส⁽¹⁾ การสกัดกรดนิวคลีอิก (nucleic acid extraction) เป็นขั้นตอนแรก และเป็นขั้นตอนสำคัญที่จะช่วยให้สามารถทำการตรวจวิเคราะห์ในระดับโมเลกุลได้⁽¹⁾ เช่น DNA Hybridization, RNA Hybridization, Polymerase Chain Reaction (PCR), Real-Time PCR, DNA หรือ DNA หรือ RNA sequencing (RNA-Seq) หรือ Whole Transcriptome Sequencing ซึ่งวิธีการเหล่านี้ได้รับความสนใจและถูกนำไปใช้ในประโยชน์ต่างๆ มากมาย รวมถึงด้านสาธารณสุข การวินิจฉัยทางคลินิก และชีววิทยา⁽²⁾

ปัจจุบันมีการวิเคราะห์หาเชื้อไวรัสที่ยังไม่ทราบสายพันธุ์ (unknown virus) หรือไวรัสหลายชนิดในสิ่งส่งตรวจเดียวกันโดยใช้เทคนิค Viral Metagenomics ร่วมกับ Next-Generation Sequencing นั้น การเลือกวิธีการสกัดมีผลต่อความแม่นยำในการตรวจวิเคราะห์ รวมทั้งการสกัดสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสที่อาศัยในมนุษย์ (Human Virome) เนื่องจากวิธีการสกัดที่เหมาะสมจะช่วยเพิ่ม DNA หรือ RNA จากตัวอย่าง หากวิธีการไม่เหมาะสมอาจทำให้สูญเสียสารพันธุกรรมของไวรัสบางส่วนทำให้ปริมาณไม่เพียงพอต่อการวิเคราะห์หรืออาจมีการปนเปื้อนสารอื่นๆ ในสิ่งส่งตรวจได้⁽³⁾ เช่น การสกัดแบบฟีนอล-คลอโรฟอร์ม (phenol-chloroform extraction) และการปั่นเหวี่ยงแบบไล่ระดับความหนาแน่น (density gradient centrifugation) หากมีสารเคมีที่ใช้ตกค้างหลงเหลืออยู่อาจส่งผลรบกวนหรือยับยั้งปฏิกิริยา PCR ได้⁽²⁾

การสกัดกรดนิวคลีอิก โดยทั่วไปประกอบด้วย 4 ขั้นตอน ได้แก่ การทำให้เซลล์แตก (cell disruption) การทำลายโครงสร้างระหว่างโปรตีนและกรดนิวคลีอิก (nucleoprotein complex denaturation) การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นิวคลีเอส (nuclease inactivation) และการกำจัดสารปนเปื้อน (contaminant removal)⁽¹⁾ ในช่วงสถานการณ์การแพร่ระบาด

COVID-19 ทั่วโลกต่างขาดแคลนอุปกรณ์ที่จำเป็นสำหรับกระบวนการตรวจวิเคราะห์รวมทั้งชุดสกัด จึงมีการพัฒนาและประยุกต์ใช้วิธีการสกัดแบบ Precipitation-Enhanced Analyte Retrieval โดยใช้สารละลาย lysis solution ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มไวรัส จากนั้นจึงตกตะกอน RNA, DNA และโปรตีนโดยใช้แอลกอฮอล์ สามารถสกัดสารพันธุกรรมได้อย่างรวดเร็ว ต้นทุนต่ำ และมีประสิทธิภาพเทียบเท่าชุดสกัดในเชิงพาณิชย์ต่าง ๆ⁽⁴⁾

แม้ว่าข้อมูลเกี่ยวกับการย่อยสลายเซลล์และอนุภาคไวรัสจะมีหลากหลาย แต่ข้อมูลเหล่านี้ยังไม่ได้มีการรวบรวมเพื่อประโยชน์ต่อการใช้ในการตรวจวิเคราะห์และการศึกษาทางชีวโมเลกุล ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับคุณสมบัติของสารที่ใช้ในการย่อยสลายเซลล์และอนุภาคไวรัส เพื่อสนับสนุนการพัฒนาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับนำไปประยุกต์ใช้ในงานการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการด้านการแพทย์และด้านชีวโมเลกุล

วิธีการสืบค้น

สืบค้นข้อมูลทางวิชาการจากบทความ งานวิจัย เอกสารที่ตีพิมพ์ และแหล่งข้อมูลทางวิชาการอื่นๆ จากฐานข้อมูล PubMed และ Google Scholar โดยเน้นเนื้อหาที่เกี่ยวข้องกับการสกัดกรดนิวคลีอิก คำสำคัญที่ใช้ในการค้นหา ได้แก่ nucleic acid extraction, cell lysis, viral particle disruption และ nucleoprotein เป็นต้น

เนื้อหา

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์โฮสต์และไวรัส

เซลล์ร่างกายมนุษย์มีเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีฟอสโฟลิปิด (phospholipid) เป็นองค์ประกอบพื้นฐาน⁽⁵⁾ เป็นเยื่อหุ้ม (cell membrane) ซึ่งเป็นโมเลกุล amphipathic โดยฟอสโฟลิปิดจะจัดเรียงตัวกันเป็นไบเลเยอร์ (bilayer) ในน้ำ มีส่วนหัวที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และส่วนหางที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) โดยส่วนหัวที่มีฟอสเฟตอยู่ด้านนอก (phosphate-containing head group) จะสัมผัสกับน้ำและหางไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon tail)

จะอยู่ด้านใน การก่อตัวเป็นโครงสร้างของ phospholipid bilayer เพื่อสร้างเกราะป้องกันและแยกส่วนภายในเซลล์ออกจากสภาพแวดล้อมภายนอก⁽⁵⁾

โครงสร้างของเซลล์ ประกอบด้วย เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ไซโทพลาซึม (cytoplasm) ไลโซโซม (lysosome) เวสิเคิลและแควิวโอล (vesicle and vacuole) ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) ไรโบโซม (ribosome) เซนทริโอลและเซนโทรโซม (centriole and centrosome) กอลจิแอปพาราตัส (golgi apparatus) เอนโดพลาสมิกเรติคูลัมแบบหยาบ (rough endoplasmic reticulum) เอนโดพลาสมิกเรติคูลัมแบบเรียบ (smooth endoplasmic reticulum) และนิวเคลียส (nucleus)^(6,7) ภายในนิวเคลียส ประกอบด้วย เยื่อหุ้มนิวเคลียส (nuclear membrane) โครมาติน (chromatin) และ นิวคลีโอลัส (nucleolus)⁽⁸⁾ นิวเคลียสเป็นที่เก็บข้อมูลทางพันธุกรรมและศูนย์ควบคุมการแสดงออกของเซลล์ ในการจำลองดีเอ็นเอ (DNA replication) การถอดรหัส (transcription) ซึ่งกระบวนการอาร์เอ็นเอทั้งหมดเกิดขึ้นภายในนิวเคลียสและกระบวนการแปลรหัส (translation) ซึ่งเป็นขั้นตอนสุดท้ายในการแสดงออกของยีนเกิดขึ้นในไซโทพลาซึม⁽⁸⁾

ฮิสโตน (histone) เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่จัดเก็บและบรรจุ DNA ในโครงสร้างที่เรียกว่าโครมาติน (chromatin) ทำให้ DNA ที่มีความยาวมากบรรจุอยู่ในนิวเคลียสได้อย่างมีระบบ มี 4 หน่วยย่อย ได้แก่ H2A, H2B, H3 และ H1 โดย DNA จะพันรอบฮิสโตน เรียกโครงสร้างนี้ว่า นิวคลีโอโซม (nucleosome)⁽⁹⁾ เป็นส่วนหนึ่งของโครงสร้างดีออกซีไรโบนิวคลีโอโปรตีน (deoxyribonucleoprotein) ที่พบมากที่สุด ในมนุษย์⁽¹⁰⁾

ไวรัสจำเป็นต้องอาศัยอยู่ในสิ่งมีชีวิตเพื่อขยายพันธุ์ สารพันธุกรรมทั้งหมดของไวรัส (viral genome) ประกอบด้วย DNA หรือ RNA ทำหน้าที่ในการควบคุมการจำลองตัวเอง โดยจะสังเคราะห์ส่วนประกอบของไวรัสโดยใช้ระบบของเซลล์โฮสต์ที่เหมาะสม อนุภาคของไวรัสหรือเรียกว่า ไวริออน (virion) ถูกสร้างขึ้นจากส่วนประกอบที่สังเคราะห์ใหม่ในเซลล์โฮสต์ทำหน้าที่เป็นพาหะในการถ่ายทอดสารพันธุกรรมทั้งหมด (genome)

ไปยังเซลล์โฮสต์ถัดไปเพื่อเริ่มกระบวนการติดเชื้อใหม่ของไวรัส⁽¹¹⁾ องค์ประกอบชิ้นสำคัญของไวรัส ประกอบด้วย viral genome สำหรับจำลองตัวเองและแคปซิด (capsid) ซึ่งเป็นชั้นโปรตีนที่ห่อหุ้มสารพันธุกรรมสำหรับไวรัสที่มีเยื่อหุ้ม (envelope virus) แคปซิดจะถูกล้อมรอบด้วย lipid bilayer ที่ได้มาจากเซลล์โฮสต์ โดยมีไกลโคโปรตีน (glycoprotein) เฉพาะของไวรัส (virus-specific glycoproteins) แทรกอยู่ ไวรัสต้องพึ่งพาเซลล์โฮสต์ในการสังเคราะห์โปรตีนและโมเลกุลที่จำเป็นในการจำลองตัวเอง⁽¹¹⁾ โปรตีนเยื่อหุ้ม (membrane protein) เป็นโปรตีนที่พบมากที่สุด ในไวรัสและเป็นองค์ประกอบสำคัญของโครงสร้างในการกำหนดรูปร่างของไวรัส โดยจะเชื่อมโยงระหว่างนิวคลีโอแคปซิด (nucleocapsid) กับเยื่อหุ้มไวรัสทำให้โครงสร้างไวรัสมีความเสถียร เช่น ในเชื้อไวรัส Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) มีลักษณะเป็นเกลียวสามสาย (triple helix bundle)⁽¹²⁾ เป็นต้น

Nucleocapsid เป็นไกลโคโปรตีนที่จับกับ viral genome ทำหน้าที่เป็นแกนกลางของไวรัส ปกป้องกรดนิวคลีอิกจากสภาพแวดล้อมภายนอกและเป็นส่วนสำคัญในโครงสร้างไวรัส⁽¹²⁾ ซึ่งโปรตีนที่จับกับ DNA หรือ RNA จะถูกบรรจุใน capsid อย่างแน่นหนา เรียกว่า นิวคลีโอโปรตีน (nucleoprotein) โดยโปรตีนที่จับกับ DNA เรียกว่า ดีออกซีไรโบนิวคลีโอโปรตีน (deoxyribonucleoprotein) และโปรตีนที่จับกับ RNA เรียกว่า ไรโบนิวคลีโอโปรตีน (ribonucleoprotein) ซึ่งทำหน้าที่ในการปกป้องกรดนิวคลีอิกและช่วยในกระบวนการจำลองตัวเองของไวรัส⁽¹⁰⁾ เช่น ไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์เอ (Influenza A Virus)⁽¹³⁾ กล่าวได้ว่า nucleoprotein มีส่วนสำคัญในกระบวนการต่างๆ มากมายในวงจรชีวิตของไวรัส ได้แก่ การห่อหุ้ม (coating) การปกป้อง (protection) RNA ของไวรัส การควบคุมกระบวนการถอดรหัส (regulation of transcription) การควบคุมกระบวนการจำลองตัวเอง (regulation of replication) และการกระตุ้นให้เกิดการยับยั้งภูมิคุ้มกัน (induction of immunosuppression) ในร่างกายของโฮสต์⁽¹⁴⁾

การย่อยสลายเซลล์โฮสต์และการทำลายโครงสร้างไวรัส

ในการสกัดเซลล์ การเลือกวิธีการทำลายเซลล์ที่เหมาะสมเป็นขั้นตอนที่สำคัญ สามารถแบ่งตามกระบวนการออกเป็นหลายประเภท ได้แก่ กระบวนการทางเคมี เช่น การใช้สารเคมีทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ กระบวนการทางฟิสิกส์ เช่น การใช้แสงเลเซอร์ คลื่นเสียง เครื่องกล และไฟฟ้า กระบวนการทางชีววิทยา เช่น การใช้เอนไซม์ย่อยสลายเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดีและข้อจำกัดต่างกัน ทั้งนี้ความเหมาะสมของแต่ละวิธีขึ้นกับลักษณะของการศึกษา เช่น เซลล์อยู่ในสารละลายหรือยึดติดกับพื้นผิวและต้องการโปรตีนที่คงสภาพตามธรรมชาติหรือยอมให้เสียสภาพธรรมชาติ เป็นต้น ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ล้วนมีผลต่อวิธีการทำลายเซลล์ให้เหมาะสมกับวัตถุประสงค์ของการศึกษา⁽¹⁵⁾ ดังนี้

กระบวนการทางเคมี

ใช้สารละลาย lysis buffer ในการสกัดกรดนิวคลีอิก เพื่อแยกและทำลายองค์ประกอบของเซลล์หรืออนุภาคไวรัสออกจากกัน lysis buffer ส่วนใหญ่มีเกลือบัฟเฟอร์ (buffering salt) เช่น Tris-HCl เพื่อควบคุมค่า pH และเกลือไอออนิก (ionic salt) เช่น NaCl เพื่อควบคุมความเข้มข้นของสารละลาย (osmolality) ในการสกัดกรดนิวคลีอิก มีการเติมสารซักฟอก (detergent) เช่น Triton X-100 หรือ Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) เพื่อทำลายโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์⁽¹⁶⁾

สารซักฟอก คือ สารลดแรงตึงผิว (surfactant) ใช้ในห้องปฏิบัติการชีววิทยาโมเลกุลในกระบวนการสกัดสารพันธุกรรม เพื่อทำลาย cell membrane และไขมันในรูปแบบ lipid bilayer ทำให้โครงสร้างเยื่อหุ้มเหล่านั้นเสียหายส่งผลให้ DNA และ RNA หลุดออกจากโครงสร้างที่ห่อหุ้มภายในเซลล์ ซึ่งโปรตีนและเยื่อหุ้มมีอยู่หลายชนิดและมีความคงตัวในสารละลายบัฟเฟอร์ที่แตกต่างกัน ดังนั้นการเลือกใช้สารซักฟอกจึงควรเลือกให้เหมาะสมกับโปรตีนและเยื่อหุ้มชนิดต่าง ๆ⁽¹⁷⁾ สารซักฟอกที่นิยมใช้ในกระบวนการสกัดสารพันธุกรรมเช่น SDS, Triton X-100, Tween-20⁽¹⁶⁾ และ Cetyltrimethylammonium Bromide (CTAB)⁽¹⁸⁾ เป็นต้น

การเลือกใช้ lysis buffer เพื่อแยก DNA และ RNA จากโครงสร้างโปรตีนและเยื่อหุ้มสารพันธุกรรมด้วยสารซักฟอกเพื่อย่อยสลายเยื่อหุ้มเซลล์และโปรตีนที่ห่อหุ้มกรดนิวคลีอิกช่วยให้ DNA และ RNA หลุดออกมา ซึ่งมีอยู่ด้วยกันหลายชนิด ได้แก่ Tergitol-type NP-40 (NP-40) lysis buffer, SDS lysis buffer, Ammonium-Chloride-Potassium (ACK) lysis buffer และ Gentle lysis buffer⁽¹⁶⁾

กระบวนการทางกายภาพ

การทำลายเซลล์โดยใช้แรงกล (mechanical disruption) เป็นการบดหรือทำให้เซลล์แตกด้วยแรงกล เช่น การบดตัวอย่างด้วยโกร่งและลูกโกร่งสำหรับเซลล์ที่มีความแข็ง⁽¹⁹⁾ หรือการใช้โฮโมจีไนเซอร์ (homogenizer) เช่น Dounce Homogenizer ใช้บดตัวอย่างในสารละลายบัฟเฟอร์⁽²⁰⁾ ได้แก่

การบดด้วยมือ (manual grinding) การใช้เครื่องมือ ครก และสาก (mortar and pestle) หรือ โกร่งและลูกโกร่งในการบด เช่น ตัวอย่างจากหมอนรองกระดูกสันหลังของมนุษย์ (human intervertebral disc)⁽¹⁹⁾

การใช้แรงกระแทก (impact force) เป็นการบดหรือกระแทกตัวอย่างเซลล์ด้วยมือโดยใช้ลูกสูบ (pestle) ในกระบอกแก้ว เช่น อุปกรณ์ Dounce Homogenizer ร่วมกับสารละลายบัฟเฟอร์ไฮโปโทนิก (hypotonic buffer) ช่วยให้เซลล์แตกสลายได้ง่ายด้วยแรงกล ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยไม่ต้องใช้สารซักฟอก⁽²⁰⁾ เช่น การใช้ Potter-Elvehjem Tissue Grinder และ Dounce Homogenizer เพื่อสกัดเนื้อเยื่อจากสมอง^(20,21)

การใช้แรงเฉือนสูง (high-shearing homogenizer) เป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับสลายเซลล์โดยใช้หลักการ Rotor-Stator เช่น เครื่อง Polytron Homogenizer ที่ใช้สกัด RNA จากหัวใจ⁽²²⁾

การใช้แรงดัน (high-pressure homogenization) การใช้แรงดันสูงหรือระบบแรงดันอื่น ๆ โดยใช้แรงดันจากลูกสูบ (piston) โดยการบีบอัดตัวอย่างผ่านช่องขนาดเล็ก (orifice) เพื่อให้เกิดแรงเฉือน (shearing force) และแรงอัด (compressive force) เพื่อทำลายเซลล์ เช่น การใช้เครื่อง French Press ทำลายโครงสร้างเซลล์เม็ดเลือดแดงของมนุษย์⁽²³⁾ หรือ

การใช้เครื่อง Gaulin Homogenizer ที่สร้างแรงดันสูงมากกว่า French Press ทำให้เกิดการสร้างฟองอากาศ (cavitation) ในสภาวะสุญญากาศ (vacuum condition) และเคลื่อนที่ด้วยความเร็วสูงเหมือนเครื่องบินเจ็ต (high-speed jet) ทำให้เกิดแรงเฉือนด้วยของเหลว (fluid shear) ขึ้น⁽²⁴⁾

การใช้ลูกปัดขนาดเล็ก (bead) เพื่อทำลายเยื่อหุ้มเซลล์และปลดปล่อยสารพันธุกรรมออกจากเซลล์มีอยู่ด้วยกัน 2 แบบ ได้แก่ อาศัยกลไกการหมุน (rotating mechanism) เป็นการปั่นตัวอย่างพร้อมกับลูกปัดขนาดเล็กในของเหลว ซึ่งจะทำให้เซลล์ที่ถูกเหวี่ยงภายใน grinding chamber แตก เช่น เครื่อง Bead Mill Homogenizer ในการสกัดตัวอย่างสมอง⁽²⁵⁾ และอาศัยแรงชน (collision force) เป็นการสกัดตัวอย่างโดยใส่ลงไปในหลอดตัวอย่างร่วมกับสารละลาย จากนั้นใส่ลูกปัดแล้วนำไปปั่นด้วยความเร็วสูงจะทำให้เกิดแรงเฉือน (shearing force) แรงกระแทก (impact force) และแรงตี (hitting force) ของลูกปัดขนาดเล็กกับเซลล์ ทำให้โครงสร้างเซลล์ถูกทำลาย⁽²⁶⁾ เช่น การใช้ลูกปัด (bead beating) ในการสกัด DNA จากตัวอย่างอุจจาระของมนุษย์⁽²⁷⁾

ละอองของเหลวเคลื่อนที่ด้วยความเร็วสูง (Liquid Aerosol-High-Velocity Stream) อาศัยกระบวนการ nebulization ในการสร้างละอองของเหลว (liquid aerosol) ที่มีความเร็วสูงในการทำลายเซลล์ เช่น BioNeb Cell Disruption เป็นเครื่อง nebulizer ที่พ่นละอองของเหลวขนาดเล็กที่มีความละเอียดเพื่อสร้างแรงที่สม่ำเสมอในการทำลายเซลล์และโมเลกุล⁽²⁸⁾

การทำลายเซลล์โดยใช้อุณหภูมิ (thermal disruption) เป็นการใช้อุณหภูมิที่มีความร้อนและความเย็น เพื่อทำให้ผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์เกิดการแตกหักและเสียสภาพทางโครงสร้าง ได้แก่

การใช้ความร้อน (heat lysis) ในการสกัดสารพันธุกรรมด้วยการต้มหรือบ่มที่อุณหภูมิสูงเพียงอย่างเดียว พบว่ามีประสิทธิภาพต่ำจึงต้องเติมสารเข้าไปเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัด เช่น การสกัดสารพันธุกรรมด้วย chelating resin หรือเรียกว่า Chelex พบว่าช่วยเพิ่มความไวในการตรวจเชื้อไวรัส

SARS-CoV-2 เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ความร้อนเพียงอย่างเดียว ซึ่งสามารถลดระยะเวลาและขั้นตอนการสกัดที่มีความซับซ้อนหลายขั้นตอนลงได้ นอกจากนี้ขั้นตอนการต้มหรือการบ่มที่อุณหภูมิสูงจะช่วยยับยั้งการติดเชื้อ เช่น SARS-CoV-2 ทำให้ขั้นตอนการทำงานมีความปลอดภัยขึ้น⁽²⁹⁾

การสลับระหว่างแช่แข็งและทำละลาย (freeze-thaw cycle) เป็นการแช่ตัวอย่างในไนโตรเจนเหลวหรือแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C และทำให้ละลายแบบรวดเร็ว โดยการทำให้ตัวอย่างรอบเพื่อให้ผนังเซลล์แตกออก เหมาะสำหรับเซลล์ที่มีผนังบาง เช่น การใช้วิธีผสมผสานระหว่างวิธีทำให้เซลล์บวมด้วยน้ำ (hypotonic burst) ร่วมกับการแช่แข็ง-ทำละลายหลายๆ รอบ และโซนิเคชัน (sonication) ในการสกัดเชื้อ Lymphocytic Choriomeningitis Virus วิธีการย่อยสลายนี้เป็นวิธีที่เร็วและมีประสิทธิภาพสูงสุดในการปล่อยอนุภาคไวรัสที่ติดเชื้อ สามารถนำไปใช้กับไวรัสอื่นๆ ที่มีวงจรชีวิตแบบฟังพาเซลล์ที่ยากต่อการปลดปล่อยเชื้อไวรัสปริมาณมาก ๆ ออกจากเซลล์โฮสต์ได้⁽³⁰⁾

การสลับระหว่างความร้อนและความเย็น (cycling heating and cooling) เป็นวิธีการที่ทำลายโครงสร้างของเซลล์และอนุภาคไวรัส โดยอาศัยการสลับกันของอุณหภูมิไปมาระหว่างความร้อนและความเย็น เช่น การให้ความร้อนกับตัวอย่างที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยการทำให้เย็น 6°C เป็นเวลา 5 นาที เป็นวิธีการทำลายโครงสร้างที่ห่อหุ้มสารพันธุกรรมในกระบวนการสกัดกรดนิวคลีอิกได้อย่างรวดเร็ว เหมาะสำหรับสถานการณ์การระบาดใหญ่หรือโรคที่มีการระบาดสูง เช่น การระบาดของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2⁽³¹⁾

การทำลายเซลล์ที่เกิดจากคลื่นความถี่ (wave-induced cell disruption) การใช้คลื่นเสียงและคลื่นความถี่เพื่อทำลายผนังเซลล์หรือเยื่อหุ้มเซลล์ คลื่นความถี่ทำให้โครงสร้างเซลล์ระเบิดหรือแตกออกแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ การทำลายเซลล์โดยใช้คลื่นเสียง (Sound Wave-Based Cell Disruption) และการทำลายเซลล์โดยใช้คลื่นความถี่ (Frequency-Based Cell Disruption) ได้แก่

การทำลายเซลล์โดยใช้คลื่นเสียง (Sound Wave-Based Cell Disruption) เช่น การใช้คลื่นเสียง (sonication) ที่อยู่ในช่วงความถี่สูงในการสั่นสะเทือนทำให้เกิดแรงเฉือนทำลายโครงสร้างทางกายภาพของผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของตัวอย่าง เช่น การสกัดกรดนิวคลีอิกจากเลือดที่แข็งตัว โดยใช้คลื่นเสียงความถี่ 100 Hz อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง⁽³²⁾ และการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงมาก (ultrasonication) ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ที่รวดเร็ว⁽²⁹⁾ การใช้ความถี่สูงจะเกิดโพรงอากาศจากกระบวนการ cavitation ในของเหลว ซึ่งจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตามความถี่ คาดว่าเกิน 1,000 W/cm² ที่ 1 MHz การก่อตัวของฟองอากาศในระดับจุลภาคและระเบิดออกจะสร้างแรงกระแทกและแรงเฉือนสูง ซึ่งจะไปทำลายโครงสร้างของเซลล์ทำให้เซลล์แตก⁽³³⁾

การทำลายเซลล์โดยใช้คลื่นความถี่ (Frequency-Based Cell Disruption) เช่นการใช้คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (electromagnetic wave) เกิดจากการสั่นแบบประสานกัน (synchronized oscillation) ของสนามไฟฟ้า (electric field) และสนามแม่เหล็ก (magnetic field) ทำให้เกิดคลื่นความถี่ เช่น คลื่นวิทยุ (radio wave) คลื่นไมโครเวฟ (microwave) คลื่นอินฟราเรด (infrared) เป็นต้น⁽³⁴⁾ การใช้คลื่นไมโครเวฟ (Microwave-Assisted Lysis) อาศัยพลังงานไมโครเวฟที่ส่งไปยังตัวอย่าง ซึ่งปริมาตร ตำแหน่ง และปริมาณตัวอย่าง สารเจือจางที่ใช้ ประเภทของหลอด และการตั้งค่าพลังงานที่แตกต่างกันส่งผลต่อประสิทธิภาพในการสกัดกรดนิวคลีอิก ถ้าให้พลังงานที่มากเกินไปอาจส่งผลให้ DNA เสื่อมสภาพ วิธีนี้มีต้นทุนต่ำ ซึ่งเตาไมโครเวฟมีอยู่ทั่วไป ผลลัพธ์ที่ดีที่สุดในการสกัดใช้คลื่นไมโครเวฟที่ 300 วัตต์ เป็นเวลา 40 วินาที⁽³⁵⁾

การทำลายเซลล์ด้วยกระแสไฟฟ้า (Electric-Induced Cell Disruption) เช่น การสลายเซลล์ด้วยไฟฟ้าเคมี (electrochemical cell lysis) อาศัยขั้วไฟฟ้าที่รับอิเล็กตรอน (cathode) หรือขั้วบวก และขั้วไฟฟ้าที่ให้อิเล็กตรอน (anode) หรือขั้วลบในการแลกเปลี่ยนไอออนโดยใช้สารละลายน้ำเกลือ (saline solution) ในภาวะ cathode and anode chamber เพื่อสร้างไอออนไฮดรอกไซด์ (hydroxide ions; OH⁻) ที่ขั้วลบทำให้เกิดด่างในการทำลายเซลล์ (alkaline lytic agent)⁽³⁶⁾

กระบวนการทางชีวภาพ

การใช้เอนไซม์โปรตีนเนสเค (Proteinase K) เอนไซม์ Proteinase K เป็นเอนไซม์เซอรีนโปรตีเอส (serine protease) ซึ่งเอนไซม์นี้ผลิตจากเชื้อรา *Tritirachium album* Limber มีลักษณะเฉพาะโดยจะแยกพันธะเปปไทด์ (peptide bond) ที่ปลาย carbon terminal ออกจากกรดอะมิโนหลายชนิด ใช้ในการย่อยสลายเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและโปรตีนเปลือกหุ้มไวรัส เอนไซม์ Proteinase K ช่วยย่อยสลายเซลล์ส่งผลให้เอนไซม์นิวคลีเอสภายในเซลล์ที่ปลดปล่อยออกมาสลายตัวได้อย่างรวดเร็ว และสามารถแยกกรดนิวคลีอิกที่สมบูรณ์ได้ในขั้นตอนการสกัด⁽³⁷⁾ เช่น การใช้เอนไซม์ Proteinase K ที่อุณหภูมิ 25°C ในการสกัดสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 โดยตรงจาก Viral Transport Medium (VTM) นอกจากนี้การสกัดกรดนิวคลีอิกยังถูกนำมาใช้ในการลดความหนืดของเมือกให้เป็นสารละลายเนื้อเดียวกัน เพื่อให้ตัวอย่างเหมาะสมสำหรับการสกัดกรดนิวคลีอิก เช่น การตรวจไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์เอ (Influenza A Virus) จากตัวอย่างเสมหะ⁽³⁸⁾

การใช้เอนไซม์ไลเปส (Lipase) เอนไซม์ Lipase เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ของไขมัน (fat) ใช้ย่อยเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ⁽³⁹⁾ เป็นองค์ประกอบพื้นฐานของเยื่อหุ้ม⁽⁵⁾ หรือโครงสร้างของเชื้อไวรัสที่มีเปลือกหุ้ม (envelope virus) ที่มีส่วนประกอบของ lipid bilayer ที่ได้มาจากเซลล์โฮสต์⁽¹¹⁾ ทำให้เยื่อหุ้มเหล่านี้ถูกทำลายเพื่อช่วยให้เอนไซม์และการใช้สารเคมีอื่นๆ ทำงานได้ดีขึ้นในกระบวนการสกัดสารพันธุกรรม⁽³⁹⁾

วิธีการและสารละลายที่ใช้ในการย่อยสลายโครงสร้างที่ห่อหุ้มสารพันธุกรรม

การย่อยสลายและทำลายโครงสร้างที่ห่อหุ้มสารพันธุกรรมเป็นขั้นตอนที่สำคัญในกระบวนการสกัดกรดนิวคลีอิก ช่วยให้ DNA และ RNA หลุดออกจากโครงสร้างหรือโปรตีนที่ห่อหุ้ม วิธีการและสารต่างๆ ที่ใช้ล้วนมีบทบาทเฉพาะในกระบวนการสลายและทำลายโครงสร้างที่ห่อหุ้มสารพันธุกรรม ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สารเคมี เอนไซม์ และวิธีการต่างๆ ที่ใช้ในการทำลายโครงสร้างเซลล์และอนุภาคไวรัส

วิธีการ/สารเคมี/ เอนไซม์	ประเภท	กลไกการทำลายโครงสร้าง	ข้อดี	ข้อจำกัด
Guanidinium thiocyanate	เกลือไอออนิก (ionic salt)	ทำลายพันธะไฮโดรเจน และโครงสร้างโปรตีน ให้เสียสภาพ	ใช้ในการสลายเซลล์ และอนุภาคไวรัสในสาร สกัด RNA และ DNA ยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์ RNase และ DNase โดยการ ทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพ	เป็นสารเคมีอันตราย และ ต้องใช้งานร่วมกับฟีนอล คลอโรฟอร์มหรือแอลกอฮอล์ หากตกค้างจะรบกวนปฏิกิริยา PCR
Sodium dodecyl sulfate	สารลดแรงตึงผิว ชนิด ionic	ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ และโปรตีนโดย denaturation	มีประสิทธิภาพสูงใน การทำลายโปรตีน ใช้ร่วมกับไลโซไซม์ (lysozyme) ในการ สลายผนังเซลล์แบคทีเรีย แกรมบวก	หากมีสารตกค้างเหลืออยู่จะ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ และทำให้โปรตีนเสียสภาพ
Triton X-100	สารลดแรงตึงผิว ชนิด non-ionic	ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์และ ช่วยให้เอนไซม์อื่นทำงานได้	ส่งเสริมกิจกรรม การทำงานของเอนไซม์	ต้องใช้งานร่วมกับวิธีอื่น เนื่องจาก มีประสิทธิภาพในการทำลาย เซลล์ต่ำ
Tween-20/13	สารลดแรงตึงผิว ชนิด non-ionic	ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ในลักษณะ ที่ไม่รุนแรง	ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ โดยไม่ทำลายโปรตีน หรือโครงสร้างอื่น	ต้องใช้งานร่วมกับวิธีอื่น เนื่องจาก มีประสิทธิภาพในการทำลาย เซลล์ต่ำ
Cetyltrimethyl ammonium bromide	สารลดแรงตึงผิว ชนิด cationic	ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์และ จับกับ DNA และ RNA	แยกกรดนิวคลีอิกได้ดี	หากล้างออกไม่หมดและตกค้าง จะรบกวนปฏิกิริยา PCR
Tergitol-type NP-40	สารลดแรงตึงผิว	ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์โดย ไม่ทำลายโปรตีนหรือ DNA	รักษาสภาพโครงสร้าง DNA	ต้องใช้งานร่วมกับวิธีอื่น เนื่องจาก มีประสิทธิภาพในการทำลาย เซลล์ต่ำ
Ammonium- Chloride-Potassium	สารเคมี	สร้างแรงดันออสโมติก เพื่อทำลายเซลล์	เหมาะกับเซลล์ เม็ดเลือดแดง	ไม่เหมาะกับเซลล์ชนิดอื่น
Dounce Homogenizer	เครื่องมือเชิงกล	ใช้แรงบดเบาๆ เพื่อทำลาย โครงสร้างเซลล์	ควบคุมระดับการทำลายได้	ใช้แรงมากเหมาะกับ ตัวอย่างปริมาณน้อย
Mortar and pestle	เครื่องมือเชิงกล	บดเซลล์อย่างหยาบ เพื่อเปิดโครงสร้างเซลล์	ใช้งานง่าย ราคาถูก	ประสิทธิภาพต่ำต้องใช้งาน ร่วมกับวิธีอื่น
Potter-Elvehjem Tissue Grinder	เครื่องมือเชิงกล	ใช้แรงบดหมุนในการทำลาย โครงสร้างเซลล์	เหมาะกับเนื้อเยื่ออ่อน	ไม่เหมาะกับเซลล์ที่แข็งแรง
Polytron Homogenizer	เครื่องมือเชิงกล	ใช้แรงตัดหมุนความเร็วสูง เพื่อทำลายโครงสร้างเซลล์	ประสิทธิภาพสูง	อาจทำให้กรดนิวคลีอิก ถูกทำลาย เกิดการแตกหัก
French Press	เครื่องมือ แรงดันสูง	ใช้แรงดันไฮดรอลิกสูง ทำลายเซลล์	ประสิทธิภาพสูง	เครื่องมือมีราคาแพง
Gaulin Homogenizer	เครื่องมือ แรงดันสูง	ใช้แรงเฉือนและ แรงดันทำลายเซลล์	ใช้กับตัวอย่างปริมาณมาก	อาจทำลายโครงสร้าง สารพันธุกรรม
Bead mill	เครื่องมือเชิงกล	ใช้ลูกปัดบดเซลล์ในระบบปิด	เหมาะกับเซลล์ที่แข็งแรง เช่น เชื้อรา	ต้องควบคุมอุณหภูมิ เนื่องจาก อาจมีความร้อนในระบบสูง

ตารางที่ 1 สารเคมี เอนไซม์ และวิธีกลต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำลายโครงสร้างเซลล์และอนุภาคไวรัส (ต่อ)

วิธีการ/สารเคมี/ เอนไซม์	ประเภท	กลไกการทำลายโครงสร้าง	ข้อดี	ข้อจำกัด
Bead beating	เครื่องมือเชิงกล	ใช้ลูกปัดบดในหลอดทำลายเซลล์	เหมาะกับเซลล์ที่มีความแข็งแรง	ต้องควบคุมอุณหภูมิ
Nebulizer	เครื่องมือเชิงกล	ใช้พ่นตัวอย่างในของเหลวให้เป็นละอองละเอียด	ใช้งานง่าย ลดแรงเฉือน ไม่ทำลายกรดนิวคลีอิก	ไม่เหมาะกับเซลล์ที่มีผนังหนา เช่น เซลล์พืชหรือแบคทีเรียแกรมบวก
Heat lysis	ความร้อน	ทำให้โปรตีนและเยื่อหุ้มเสียโครงสร้าง	ใช้งานง่าย ต้นทุนต่ำ	อาจทำลายโครงสร้างสารพันธุกรรม ให้เสียสภาพธรรมชาติ
Freeze-thaw cycles	ความเย็น/การละลาย	สร้างแรงดันภายในเซลล์จากการเปลี่ยนสถานะน้ำ	ต้นทุนต่ำ ใช้งานง่าย เหมาะกับเซลล์ที่มีผนังบาง	ใช้เวลานาน ไม่เหมาะกับตัวอย่างปริมาณมาก
Cycling heating and cooling	ความเย็น/ความร้อน	การสลับอุณหภูมิเพื่อทำให้โครงสร้างเซลล์เปราะและแตกตัว	ไม่ต้องใช้สารเคมี ต้นทุนต่ำ	ประสิทธิภาพต่ำเมื่อใช้เพียงวิธีนี้เพียงอย่างเดียว
Sonication	คลื่นเสียง	ใช้คลื่นเสียงความถี่สูงเพื่อทำลายเยื่อหุ้มและเซลล์	มีประสิทธิภาพสูงในการทำลายเซลล์ ใช้งานง่าย ไม่ต้องใช้สารเคมี	ไม่เหมาะกับตัวอย่างปริมาณมาก เสียงดัง
Ultrasonication	คลื่นเสียงความถี่สูง	ใช้ความถี่เสียงที่สูงมาก ๆ สำหรับทำลายโครงสร้างเซลล์	มีประสิทธิภาพสูงในการทำลายเซลล์ ใช้งานง่าย ไม่ต้องใช้สารเคมี	ไม่เหมาะกับตัวอย่างปริมาณมาก หากใช้เวลานานเกินไป อาจทำให้ DNA และ RNA เกิดการแตกหัก
Microwaves	คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า	ใช้คลื่นไมโครเวฟเพิ่มอุณหภูมิทำลายโครงสร้างเซลล์	ใช้งานง่าย สะดวก และรวดเร็ว	ความร้อนสูง อาจทำลายกรดนิวคลีอิก
Electrochemical cell lysis	ไฟฟ้าเคมี	ใช้สนามไฟฟ้าและปฏิกิริยาเคมีทำลายเยื่อหุ้มเซลล์	ไม่ต้องใช้เอนไซม์หรือสารเคมีรุนแรง	ต้องใช้อุปกรณ์เฉพาะและมีความเสี่ยงต่อการทำลาย DNA และ RNA จากสารอนุมูลอิสระและสารตกค้าง
Proteinase K	เอนไซม์โปรตีเอส	ย่อยสลายโปรตีนในเยื่อหุ้มเซลล์หรือเปลือกไวรัส	ย่อยสลายโปรตีนได้ดีโดยไม่ทำลาย DNA และ RNA	ต้องควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสม ต้องใช้ร่วมกับวิธีอื่นหรือใช้สารเคมีบางชนิดไม่ได้ เช่น EDTA ที่มีความเข้มข้นสูง
Lipase	เอนไซม์ไลเปส	ย่อยสลายไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์และเปลือกไวรัสที่มีไขมัน	ลดการใช้สารเคมีรุนแรง เหมาะกับไวรัสที่มี envelope	ต้องควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสมและต้องใช้ร่วมกับวิธีอื่น ต้นทุนสูง ไม่เหมาะกับไวรัสแบบ non-envelope

ปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายโครงสร้างเซลล์โฮสต์ และอนุภาคไวรัสที่ห่อหุ้มสารพันธุกรรม

ปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายโครงสร้างที่ทำหน้าที่ห่อหุ้มสารพันธุกรรมของเซลล์โฮสต์

และอนุภาคไวรัส แบ่งออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่ ปัจจัยทางเคมี ปัจจัยทางกายภาพ และปัจจัยทางชีวภาพ

ปัจจัยทางเคมี

ความเข้มข้นและปริมาณของสารเคมีที่ใช้เป็นปัจจัยสำคัญในการทำลายเซลล์ เช่น หากความเข้มข้นของ

สารซักฟอกต่ำเกินไปหรือปริมาณของตัวอย่างมากเกินไป อาจทำให้กระบวนการสกัดกรดนิวคลีอิกไม่สมบูรณ์^(16,17) ระยะเวลาที่ใช้การทำปฏิกิริยาที่สั้นเกินไป ส่งผลให้สารเคมีไม่สามารถทำลายโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์หรือโปรตีนได้อย่างเต็มที่ เช่น การใช้ไลซิสบัฟเฟอร์ต้องใช้ระยะเวลาเพียงพอ เพื่อให้เซลล์และอนุภาคไวรัสถูกทำลายอย่างสมบูรณ์^(18,37) การสกัดตัวอย่างที่มีสารเติมแต่ง เช่น ตัวอย่างเนื้อเยื่อในพาราฟิน อาจต้องใช้สารละลายเฉพาะเพื่อทำการสลายพาราฟินก่อนทำการย่อย แล้วจึงนำเข้าสู่กระบวนการสกัดสารพันธุกรรมในขั้นตอนต่อไป⁽³⁹⁾

ปัจจัยทางกายภาพ

ประสิทธิภาพของการย่อยสลายเซลล์และอนุภาคไวรัสขึ้นอยู่กับลักษณะทางกายภาพของตัวอย่าง เช่น ความหนืดของตัวอย่างที่สูง เช่น เมือกในเสมหะหรือความเหนียวของเนื้อเยื่อ อาจลดประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์หรือสารเคมีที่ใช้ในการสกัดกรดนิวคลีอิก^(37,39) ตัวอย่างที่มีผนังหนา เช่น ตัวอย่างจากหัวใจอาจต้องใช้วิธีการทำลายเซลล์ที่เหมาะสม เช่น การบดด้วยโกร่งหรือการใช้แรงดันสูง^(19,23) นอกจากนี้ตัวอย่างที่มีเยื่อหุ้มไขมันสูง เช่น ไวรัสที่มีเปลือกหุ้ม อาจต้องใช้เอนไซม์ไลเปสหรือสารซักฟอก เพื่อทำลายโครงสร้าง lipid bilayer^(11,39) การเลือกใช้วัสดุหรืออุปกรณ์ที่ไม่เหมาะสม เช่น การใช้โกร่งบดตัวอย่าง

เนื้อเยื่อที่มีความแข็งแรง และใช้แรงบดไม่เพียงพอ อาจลดประสิทธิภาพของกระบวนการบดหรือทำลายเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการแบบอัตโนมัติ^(20,25)

ปัจจัยทางชีวภาพ

อุณหภูมิเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลโดยตรงต่อการทำงานของเอนไซม์ หากใช้อุณหภูมิที่สูงเกินไปอาจทำให้เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายเซลล์ เช่น เอนไซม์ proteinase K หรือเอนไซม์ lipase เสื่อมสภาพ^(37,39) ระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยสลายควรเหมาะสม เพื่อให้ปฏิกิริยาการย่อยสลายเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ เช่น หากใช้ระยะเวลาที่สั้นเกินไปอาจทำให้โปรตีนห่อหุ้มโครงสร้างและเยื่อหุ้มบางส่วนยังคงอยู่⁽³⁸⁾ ชนิดของสิ่งส่งตรวจมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ เช่น ตัวอย่างที่มีองค์ประกอบที่ซับซ้อนหรือมีโปรตีนสูง อาจต้องใช้สารซักฟอก หรือเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมและจำเพาะกับชนิดของตัวอย่าง^(11,16) การปรับสภาพแวดล้อมให้เหมาะสม เช่น pH และความเข้มข้นของสารละลาย มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการสกัดสารพันธุกรรม⁽³⁹⁾

โดยสรุปการสกัดกรดนิวคลีอิกจากไวรัสในสิ่งส่งตรวจทางการแพทย์ชนิดต่าง ๆ ด้วยวิธีทางเคมี กายภาพ และชีวภาพ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 วิธีการสกัดกรดนิวคลีอิกจากไวรัสในสิ่งส่งตรวจจากมนุษย์ชนิดต่าง ๆ ทางเคมี กายภาพ และชีวภาพ

สิ่งส่งตรวจ	การเตรียมตัวอย่าง	วิธีทางเคมี	วิธีทางกายภาพ	วิธีทางชีวภาพ	หมายเหตุ
Bronchoalveolar lavage	ปั่นตกตะกอน	Lysis buffer, CTAB, SDS	Centrifuge, Vortex	Proteinase K, Lysozyme, DNase/RNase inhibitor	หากมีความชื้นหนืดต้อง pre-treatment ด้วย mucolytic agent
Blood	ปั่นแยกพลาสมาหรือซีรัม	Guanidine HCl, CTAB, SDS	Centrifuge, Vortex	Proteinase K	หลีกเลี่ยงตัวอย่างที่มีภาวะเม็ดเลือดแดงแตก ซึ่งอาจทำให้เกิดผลลบปลอมจากการยับยั้งปฏิกิริยา PCR
Cerebrospinal fluid	ใช้ได้โดยตรงหรือปั่นแยกสารตกค้าง เช่น เม็ดเลือด	Lysis buffer, Guanidine Isothiocyanate	Centrifuge, Vortex	DNase/RNase inhibitor	หากมีการปนเปื้อนของเม็ดเลือดจากกระบวนการเจาะน้ำไขสันหลัง ให้ปั่นตกตะกอนก่อนใช้ตัวอย่าง

ตารางที่ 2 วิธีการสกัดกรดนิวคลีอิกจากไวรัสในสิ่งส่งตรวจจากมนุษย์ชนิดต่างๆ ทางเคมี กายภาพ และชีวภาพ (ต่อ)

สิ่งส่งตรวจ	การเตรียมตัวอย่าง	วิธีทางเคมี	วิธีทางกายภาพ	วิธีทางชีวภาพ	หมายเหตุ
Nasal swab	เก็บตัวอย่างใน VTM หรือ UTM หรือปั่นผสมด้วยเครื่อง Vortex ก่อน	Lysis buffer+ Mucolytic agent, Guanidine Isothiocyanate, SDS	Vortex	DNase/RNase inhibitor	ควรเก็บรักษาไว้ในภาชนะ เก็บรักษาความเย็นระหว่างนำส่งตัวอย่าง
Nasopharyngeal swab	เก็บตัวอย่างใน VTM หรือ UTM หรือปั่นผสมด้วยเครื่อง vortex ก่อน	Lysis buffer+ Mucolytic agent, Guanidine Isothiocyanate, SDS	Vortex	DNase/RNase inhibitor	ควรเก็บรักษาไว้ในภาชนะ เก็บรักษาความเย็นระหว่างนำส่งตัวอย่าง
Sputum	เก็บตัวอย่างในภาชนะที่สะอาด ปราศจากเชื้อ ก่อนใช้งานให้ละลายเสมหะเพื่อลดความข้นหนืดด้วย mucolytic agent ก่อน	Lysis buffer+ Mucolytic agent,	Vortex, Heating, Freeze-thaw	Proteinase K, Lysozyme, DNase/RNase inhibitor	หากตัวอย่างมีความข้นหนืด หลีกเลี่ยงการสกัดด้วยเครื่องสกัดแบบอัตโนมัติ
Throat swab	เก็บตัวอย่างใน VTM หรือ UTM ก่อนใช้ตัวอย่างให้ปั่นผสมด้วยเครื่อง vortex	Lysis buffer+ Mucolytic agent, Lysis buffer+ Detergent	Vortex	Proteinase K	ระหว่างนำส่งตัวอย่าง ควรเก็บรักษาไว้ในภาชนะ เก็บรักษาความเย็น
Tissue	เก็บตัวอย่างในภาชนะที่สะอาด ปราศจากเชื้อ หรือหั่นเป็นชิ้นขนาดเล็ก	Lysis buffer, SDS, Triton X-100	Bead mill, Homogenizer, Manual grinding	Proteinase K	หากตัวอย่างมีความแข็งและเหนียวมาก ควรแบ่งตัวอย่างให้มีขนาดเล็กเพื่อให้สารเคมีและเอนไซม์เข้าไปทำปฏิกิริยาได้ดียิ่งขึ้น
Urine	เก็บตัวอย่างในภาชนะที่สะอาด ปราศจากเชื้อ ก่อนใช้งานให้ปั่นแยกตะกอนก่อนใช้งาน	Lysis buffer, Guanidine Isothiocyanate	Centrifuge, Vortex	DNase/RNase inhibitor	ระหว่างนำส่งตัวอย่าง ควรเก็บรักษาไว้ในภาชนะ เก็บรักษาความเย็น

วิจารณ์

ในการย่อยสลายเซลล์และทำลายอนุภาคไวรัส กระบวนการสกัดกรดนิวคลีอิกที่ใช้กันทั่วไป เช่น การสกัดแบบฟีนอล-คลอโรฟอร์ม และการปั่นเหวี่ยงแบบไล่ระดับความหนาแน่น (density-gradient centrifugation) การสกัดแบบใช้สาร TRIzol (TRIzol extraction) การสกัดด้วยคอลัมน์แบบปั่นเหวี่ยง (centrifugal column extraction) การสกัดด้วยคอลัมน์ซิลิกาเจล

(silica gel column extraction) และการสกัดด้วยลูกปัดแม่เหล็ก (magnetic bead extraction)⁽²⁾ นั้นถือว่าเป็นขั้นตอนแรกในกระบวนการสกัดกรดนิวคลีอิกที่มีความสำคัญในการเตรียมตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ไวรัสในระดับชีวโมเลกุล วิธีการและสารเคมีที่ใช้สำหรับการสกัดกรดนิวคลีอิกจะมีความแตกต่างจากการสกัดโปรตีน เช่น การใช้ guanidine isothiocyanate ในการย่อยสลายเซลล์ การใช้ phenol และ chloroform

ช่วยแยกชั้นสารชีวโมเลกุลตามคุณสมบัติทางเคมีเป็นต้น⁽²⁾ ชนิดของ lysis buffer ที่ใช้ในการสกัดสารพันธุกรรมจะขึ้นอยู่กับชนิดของกรดนิวคลีอิกที่ต้องการสกัด เช่น DNA จากจีโนม (genomic DNA) จากไมโทคอนเดรีย (mitochondria DNA) หรือจากพลาสมิด (plasmid DNA) โดยทั่วไปสารเคมีสำหรับสกัดสารพันธุกรรม ประกอบด้วย lysis buffer ที่มี SDS ซึ่งช่วยย่อยสลายเซลล์และโปรตีน แมทริกซ์สำหรับจับกรดนิวคลีอิก (nucleic acid-binding matrix) เช่น ซิลิกาเมมเบรน เพื่อแยกกรดนิวคลีอิกออกจากสิ่งเจือปน สำหรับการสกัด RNA จะใช้ lysis buffer ที่มีคุณสมบัติในการทำลายโครงสร้างเซลล์ได้สูง ประกอบด้วย phenol และ guanidine isothiocyanate เพื่อทำลายโปรตีนและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ RNase ที่ย่อยสลาย RNA⁽⁴⁰⁾

ในการทำลายโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ และ lipid bilayer ของไวรัส เพื่อให้ DNA และ RNA หลุดออกจากโครงสร้างที่ห่อหุ้ม การเลือกใช้สารซักฟอกต้องคำนึงถึงโปรตีนและคุณสมบัติของเยื่อหุ้มแต่ละชนิดเนื่องจากสารเหล่านี้มีความคงตัวในบัฟเฟอร์ที่แตกต่างกัน⁽¹⁶⁻¹⁸⁾ ขณะเดียวกันการใช้เอนไซม์ เช่น proteinase K และ lipase จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายโปรตีนและไขมันของเยื่อหุ้ม และแยกสารชีวเคมีต่างๆ ที่ปนเปื้อนในตัวอย่าง DNA และ RNA^(37,39) การใช้วิธีการทางกายภาพ เช่น การใช้แรงกลหรือคลื่นเสียงความถี่สูงจะช่วยสร้างแรงเฉือนและแรงกระแทกที่มีประสิทธิภาพในการทำลายโครงสร้างเซลล์^(20,33) ส่วนการใช้ความร้อน หรือการแช่แข็ง-ทำละลายหลายรอบ (freeze-thaw cycle) จะช่วยเพิ่มความสะอาดและลดขั้นตอนการสกัด โดยเฉพาะในสถานการณ์เร่งด่วน เช่น การตรวจหาเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ในตัวอย่างทางคลินิก⁽²⁹⁻³¹⁾

ข้อจำกัดหรือปัจจัยในการย่อยสลายเซลล์โฮสต์และอนุภาคไวรัสขึ้นอยู่กับลักษณะของสิ่งส่งตรวจทาง การแพทย์และวิธีการที่เลือกใช้ด้วย เช่น ตัวอย่างที่มีผนังเซลล์หนา อาจต้องใช้วิธีการควบคุมกับการใช้สารเคมีและเอนไซม์ช่วยในการย่อย ส่วนตัวอย่างที่มีลักษณะเป็นเมือกหรือมีความหนืด ซึ่งสามารถขัดขวางการย่อยสลาย

โดยทำให้สารเคลื่อนที่หรือซึมผ่านได้ยาก ตัวอย่างที่มีความหนืด เช่น ตัวอย่างจากเสมหะ จึงไม่สามารถนำไปสกัดโดยวิธีอัตโนมัติได้⁽⁴¹⁾ ด้วยเหตุนี้จึงไม่เหมาะสมที่จะนำตัวอย่างเสมหะมาตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี RT-PCR แบบอัตโนมัติ เนื่องจากตัวอย่างที่มีความหนืดอาจจะอุดตันในเครื่อง⁽⁴²⁾ ในตัวอย่างมักมีเอนไซม์ Deoxyribo-nuclease (DNase) และ Ribonuclease (RNase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลาย DNA และ RNA ปนเปื้อนอยู่เพื่อป้องกันตัวอย่างถูกย่อยสลาย จึงควรเติม DNase inhibitor และ Ribonuclease (RNase) เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวในกระบวนการสกัด^(43,44)

การพัฒนาวิธีการสกัดด้วยเยื่อหุ้มใยแก้ว (glass fiber membranes) ด้วย nontoxic buffer ประกอบด้วย การสลายไวรัส การยึดจับ และการละลาย RNA โดยใช้ KCl, เอนไซม์ proteinase K และตัวนำพา RNA (carrier RNA) สามารถเก็บรักษาสารพันธุกรรมไว้ได้โดยไม่ต้องใช้ระบบควบคุมความเย็นหรืออุปกรณ์ที่มีราคาแพง ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและประหยัด ช่วยเพิ่มความสามารถในการตรวจหาเชื้อไวรัส และตอบสนองต่อสถานการณ์การแพร่ระบาดของเชื้อก่อโรคในพื้นที่ที่มีข้อจำกัดด้านทรัพยากรต่างๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ⁽⁴⁵⁾

จากการทบทวนองค์ความรู้ พบว่าแม้ในปัจจุบันจะมีการพัฒนาวิธีการสกัดสารพันธุกรรมทั้งแบบ manual และแบบอัตโนมัติ (automated) ด้วยนวัตกรรมและเทคโนโลยีที่ทันสมัย เช่น การเสริมสมรรถนะการสกัดกรดนิวคลีอิก โดยใช้กระบวนการทางเคมี ทางฟิสิกส์ และทางชีวภาพแบบผสมผสาน จึงช่วยให้สามารถสกัดกรดนิวคลีอิกได้ในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้การเตรียมตัวอย่างเบื้องต้นอย่างเหมาะสมก่อนสกัดก็มีความสำคัญเช่นกัน เช่น ตัวอย่างชิ้นเนื้อปอด ควรบดเนื้อเยื่อด้วยวิธีกลจนมีลักษณะละเอียดก่อนใช้วิธีทางเคมีหรือชีวภาพต่อไป เป็นต้น วิธีการที่กล่าวมานี้จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลล์และอนุภาคไวรัส แม้ไวรัสที่จะอยู่ในชิ้นเนื้อ เนื้อเยื่อ หรือมีเชื้อไวรัสในปริมาณต่ำ จะช่วยให้สามารถสกัดกรดนิวคลีอิกที่มีความบริสุทธิ์และมีความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น ทำให้ได้ปริมาณและคุณภาพของกรดนิวคลีอิกที่เหมาะสมสำหรับนำไปวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุลต่อไป

สรุป

การย่อยสลายโครงสร้างห่อหุ้มสารพันธุกรรมของไวรัสเริ่มตั้งแต่การย่อยสลายเซลล์โฮสต์ การทำลายโครงสร้างไวรัส และย่อยสลายโปรตีนที่ห่อหุ้มสารพันธุกรรม เป็นขั้นตอนสำคัญสำหรับกระบวนการสกัดกรดนิวคลีอิก การเลือกวิธีการที่เหมาะสมจึงขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่าง รวมทั้งข้อจำกัดและทรัพยากรของห้องปฏิบัติการ ในการสกัดกรดนิวคลีอิกต้องพิจารณาการใช้วิธีการต่างๆ เช่น วิธีทางด้นเคมี กายภาพ และชีวภาพ เพื่อให้ได้สารพันธุกรรมของไวรัสที่มีความบริสุทธิ์และลดการปนเปื้อนของสารตกค้างจากกระบวนการสกัด นอกจากนี้การควบคุมสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิ ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา และการรักษาความสมดุลของกรด-ด่าง มีความสำคัญต่อประสิทธิภาพของกระบวนการสกัดสารพันธุกรรม เพื่อให้ได้สารพันธุกรรมที่มีคุณภาพสูงในการนำไปใช้ประโยชน์ต่างๆ ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา และภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ช่วยให้เกิดการศึกษาและจัดทำบทความนี้

เอกสารอ้างอิง

1. The Scientist, MilliporeSigma. Viral nucleic acid purification in a single spin: a simple nucleic acid extraction approach quickly purifies genomic viral RNA and DNA while minimizing cross-contamination risks. [online]. 2022; [cited 2024 Dec 13]. Available from: URL: <https://www.the-scientist.com/viral-nucleic-acid-purification-in-a-single-spin-69881>.
2. Zeng Y, Tang X, Chen J, Kang X, Bai D. Optimizing total RNA extraction method for human and mice samples. PeerJ 2024; 12: e18072. (22 pages).
3. Sabatier M, Bal A, Destras G, Regue H, Quéromès G, Cheynet V, et al. Comparison of nucleic acid extraction methods for a viral metagenomics analysis of respiratory viruses. Microorganisms 2020; 8(10): 1539. (17 pages).
4. Ponce-Rojas JC, Costello MS, Proctor DA, Kosik KS, Wilson MZ, Arias C, et al. A fast and accessible method for the isolation of RNA, DNA, and protein to facilitate the detection of SARS-CoV-2. J Clin Microbiol 2021; 59(4): e02403-20. (9 pages).
5. The origin and evolution of cells. In: Cooper GM. The cell: a molecular approach. 2nd ed. Sunderland, MA.: Sinauer Associates. [online]. 2000; [cited 2024 Dec 13]. Available from: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9841>.
6. Histology, Cell. [updated 2023 May 1]. In: Khan YS, Farhana A. StatPearls. Treasure Island, FL.: StatPearls Publishing; [online]. 2024; [cited 2024 Dec 13]. Available from: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554382>.
7. SEER Training Modules. Module name U.S. National Institutes of Health, National Cancer Institute. [online]. [cited 2024 Dec 7]. Available from: URL: <https://training.seer.cancer.gov>.
8. Chapter 8, The nucleus. In: Cooper GM. The cell: a molecular approach. 2nd ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates. [online]. 2000; [cited 2024 Dec 13]. Available from: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9845>.
9. Genetics, histone code. [updated 2023 Aug 8]. In: Shahid Z, Simpson B, Miao KH, et al. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. [online]. 2024; [cited 2024 Dec 13]. Available from: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538477>.
10. Wikipedia. Nucleoprotein. [online]. 2019; [cited 2024 Dec 7]. Available from: URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Nucleoprotein>.
11. Pellett PE, Mitra S, Holland TC. Basics of virology. Handb Clin Neurol 2014; 123: 45-66.

12. Srivastava V, Ahmad A. New perspective towards therapeutic regimen against SARS-CoV-2 infection. *J Infect Public Health* 2021; 14(7): 852-62.
13. Turrell L, Lyall JW, Tiley LS, Fodor E, Vreede FT. The role and assembly mechanism of nucleoprotein in influenza A virus ribonucleoprotein complexes. *Nat Commun* 2013; 4: 1591. (24 pages).
14. Šantak M, Matic Z. The role of nucleoprotein in immunity to human negative-stranded RNA viruses-not just another brick in the viral nucleocapsid. *Viruses* 2022; 14(3): 521. (37 pages).
15. Brown RB, Audet J. Current techniques for single-cell lysis. *J R Soc Interface* 2008; 5(Suppl 2): S131-8.
16. Wikipedia. Lysis buffer. [online]. 2020; [cited 2024 Dec 8]. Available from: URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Lysis_buffer.
17. Linke D. Detergents: an overview. *Methods Enzymol* 2009; 463: 603-17.
18. Wikipedia. Cetrimonium bromide. [online]. 2020; [cited 2024 Dec 8]. Available from: URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Cetrimonium_bromide.
19. Ivanov AA, Leonova ON, Wiebe DS, Krutko AV, Gridina MM, Fishman VS, et al. Method for the isolation of "RNA-seq-quality" RNA from human intervertebral discs after mortar and pestle homogenization. *Cells* 2022; 11(22): 3578. (10 pages).
20. DeCaprio J, Kohl TO. Using Dounce homogenization to lyse cells for immunoprecipitation. *Cold Spring Harb Protoc* 2019; 2019(7): pdb-prot098574. (5 pages).
21. Hartz AMS, Schulz JA, Sokola BS, Edelmann SE, Shen AN, Rempe RG, et al. Isolation of cerebral capillaries from fresh human brain tissue. *J Vis Exp* 2018; (139): 57346. (12 pages).
22. National Center for Biotechnology Information. GEO accession viewer: GSM3067997. Bethesda, MD.: NCBI. [online]. 2018; [cited 2024 Dec 9]. Available from: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSM3067997>.
23. Dehazya P, Coles RS, Jr. Extraction and properties of hemagglutinin from cell wall fragments of *Fusobacterium nucleatum*. *J Bacteriol* 1982; 152(1): 298-305.
24. Lander R, Manger W, Scouloudis M, Ku A, Davis C, Lee A. Gaulin homogenization: a mechanistic study. *Biotechnol Prog* 2000; 16(1): 80-5.
25. National Center for Biotechnology Information (NCBI). GEO accession viewer: GSM708138. Bethesda, MD.: NCBI. [online]. 2011; [cited 2024 Dec 10]. Available from: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSM708138>.
26. Goldberg S. Mechanical/physical methods of cell disruption and tissue homogenization. *Methods Mol Biol* 2021; 2261: 563-85.
27. Rintarhat P, Cho YJ, Koh H, Park S, Lee EJ, Lim H, et al. Assessment of DNA extraction methods for human gut mycobiome analysis. *R Soc Open Sci* 2024; 11(1): 231129. (12 pages).
28. Thermo Fisher Scientific. Nebulizers. [online]. [cited 2024 Dec 10]. Available from: URL: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/nebulizer_man.pdf.
29. Guan B, Frank KM, Maldonado JO, Beach M, Pelayo E, Warner BM, et al. Sensitive extraction-free SARS-CoV-2 RNA virus detection using a chelating resin. *iScience* 2021; 24(9): 102960. (17 pages).
30. Laposova K, Oveckova I, Tomaskova J. A simple method for isolation of cell-associated viral particles from cell culture. *J Virol Methods* 2017; 249: 194-6.
31. Wiraswati HL, Ma'ruf IF, Ekawardhani S, Faridah L, Laelalugina A, Septanto H, et al.

- Optimization of nucleic acid extraction methods for rapid detection in pandemic situations or diseases with high prevalence. *J Pharm Anal* 2023; 13(12): 1577-9.
32. Zakaria Z, Umi SH, Mokhtar SS, Mokhtar U, Zaiharina MZ, Aziz AT, et al. An alternate method for DNA and RNA extraction from clotted blood. *Genet Mol Res* 2013; 12(1): 302-11.
33. Branch DW, Vreeland EC, McClain JL, Murton JK, James CD, Achyuthan KE. Rapid nucleic acid extraction and purification using a miniature ultrasonic technique. *Micro-machines* 2017; 8(7): 228. (17 pages).
34. Wikipedia Contributors. Electromagnetic radiation. Wikipedia. [online]. 2019; [cited 2024 Dec 10]. Available from: URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Electromagnetic_radiation.
35. Taglia F, Wang L, Setser CH, Fernández-Tejero N, McCord BR, Lee SB. Development of a microwave-based extraction for forensic biological samples. *Forensic Sci Int Synerg* 2022; 5: 100291. (8 pages).
36. Lee HJ, Kim JH, Lim HK, Cho EC, Huh N, Ko C, et al. Electrochemical cell lysis device for DNA extraction. *Lab Chip* 2010; 10(5): 626-33.
37. Sweeney PJ, Walker JM. Proteinase K (EC 3.4.21.14). *Methods Mol Biol* 1993; 16: 305-11.
38. Shukla A, Gangwar M, Sharma G, Prakash P, Nath G. Vitality of proteinase K in rRTPCR detection of SARS-CoV2 bypassing RNA extraction. *Front Cell Infect Microbiol* 2021; 11: 717068. (7 pages).
39. Wikipedia Contributors. Lipase. Wikipedia. [online]. 2024; [cited 2024 Dec 10]. Available from: URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Lipase>.
40. Bio-Rad Laboratories. Lysis buffer. [online]. 2024; [cited 2024 Dec 12]. Available from: URL: <https://www.bio-rad.com/en-th/feature/lysis-buffer.html>.
41. Yu F, Qiu T, Zeng Y, Wang Y, Zheng S, Chen X, et al. Comparative evaluation of three preprocessing methods for extraction and detection of influenza A virus nucleic acids from sputum. *Front Med* 2018; 5: 56. (4 pages).
42. Branche AR, Walsh EE, Formica MA, Falsey AR. Detection of respiratory viruses in sputum from adults by use of automated multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2014; 52(10): 3590-6.
43. Kolarevic A, Yancheva D, Kocic G, Smelcerovic A. Deoxyribonuclease inhibitors. *Eur J Med Chem* 2014; 88: 101-11.
44. Lomax JE, Bianchetti CM, Chang A, Phillips GN Jr, Fox BG, Raines RT. Functional evolution of ribonuclease inhibitor: insights from birds and reptiles. *J Mol Biol* 2014; 426(17): 3041-56.
45. Hernandez S, Cardozo F, Myers DR, Rojas A, Waggoner JJ. Simple and economical extraction of viral RNA and storage at ambient temperature. *Microbiol Spectr* 2022; 10(3): e00859-22. (9 pages).

Lysis of Host Cells and Viral Particles in Extracting Viral Nucleic Acids from Human Samples

Treewat Watthanachockchai and Kingkan Rakmanee

Department of Pathology, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

ABSTRACT Cell lysis and disruption of the structures encapsulating the genetic materials of viruses are the initial steps in nucleic acid extraction, a critical process in the molecular diagnostics of viral pathogens such as HIV, SARS-CoV-2, MERS-CoV, and influenza, which are essential for controlling outbreaks, monitoring their spread, and studying the evolution of pathogenic viruses. Nucleic acid extraction plays a pivotal role in molecular biology techniques, including PCR, Real-Time PCR, and Next-Generation Sequencing (NGS). The development of extraction methods that destroy the genetic material envelope structure, inhibit nuclease activity, and eliminate contaminants is essential. These approaches contribute to the efficient degradation of cells and virus particles. Laboratory diagnostic experience indicates that the quality of extracted nucleic acid has a direct impact on analytical accuracy. This effect is particularly significant in samples containing low viral loads. Therefore, the development of efficient extraction methods is crucial for obtaining pure nucleic acids in sufficient quantities for laboratory analysis and medical applications.

Keywords: Cell lysis, Viral particle disruption, Nucleoprotein, Nucleic acid extraction

