

การพัฒนาวิธีสกัดดีเอ็นเอจากกระดาศับเลือดแห้ง เพื่อการตรวจทางพันธุกรรม

กรรณิการ์ ปุณณภูมิ ภาวิณี อินนาค รจนาพรรณ ปันกาญจน์โต อรอนงค์ จาเรือน มะลิวัลย์ นุ่มนวล
รัชฎีกร ใจชื่อ วิโรจน์ พวงทับทิม ชรินทร์ทิพย์ เย็นยุดดี ปุณทริกา ไพบูลย์ศิริ และ หรรษา ไทยศรี
สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ การวิเคราะห์สารพันธุกรรมด้วยเทคโนโลยีหาลำดับเบสยุคใหม่ ช่วยเพิ่มความแม่นยำและความครอบคลุมในการวินิจฉัยโรคพันธุกรรม รวมถึงการตรวจคัดกรองทารกแรกเกิดจากตัวอย่างกระดาศับเลือดแห้ง การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและประเมินวิธีสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างกระดาศับเลือดแห้งให้เหมาะสมสำหรับเทคโนโลยีหาลำดับเบสยุคใหม่ โดยเปรียบเทียบวิธีสกัด 3 วิธี ได้แก่ ชุดสกัดสำเร็จรูป อนุภาคแม่เหล็กร่วมกับบัฟเฟอร์ไลซิสที่เตรียมขึ้นเอง และอนุภาคแม่เหล็กร่วมกับบัฟเฟอร์ไลซิสสำเร็จรูป พร้อมเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดครบส่วนเป็นตัวอย่างอ้างอิง ผลการศึกษาจากอาสาสมัคร 5 ราย พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้ทั้ง 3 วิธี มีความเข้มข้นเฉลี่ย 5.28–6.88 ng/μl อัตราส่วนความบริสุทธิ์ A260/A280 และ A260/A230 อยู่ที่ 1.89–2.34 และ 0.2–1.4 ตามลำดับ มีความสมบูรณ์ (DNA Integrity Number: DIN) อยู่ที่ 8.8–9.9 เมื่อตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมทั้งแบบ singleplex และ multiplex ได้ขนาดตามที่ระบุ (233–570 bp) และเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DNA Nanoball Sequencing (DNBSEQ-E25) บนแพลตฟอร์ม MGI พบคุณภาพของการจับคู่กับจีโนมอ้างอิง ร้อยละ 99.85–99.87 ความครอบคลุมของการอ่าน 30 ครั้ง ร้อยละ 97.13–99.25 อัตราการซ้ำของลำดับดีเอ็นเอ ร้อยละ 7.87–9.11 และคุณภาพของการอ่านลำดับเบสถูกต้อง Q30 ร้อยละ 90.21–90.72 การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการใช้อนุภาคแม่เหล็กร่วมกับบัฟเฟอร์ไลซิสที่เตรียมขึ้นเองให้ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอใกล้เคียงกับชุดสกัดสำเร็จรูป และมีความเหมาะสมสำหรับการประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ความผิดปกติทางพันธุกรรมด้วยเทคโนโลยีหาลำดับเบสยุคใหม่

คำสำคัญ: กระดาศับเลือดแห้ง, การสกัดดีเอ็นเอ, อนุภาคแม่เหล็ก, เทคโนโลยีการหาลำดับเบสยุคใหม่

Corresponding author E-mail: kannikar.p@dmsc.mail.go.th

Received: 2 February 2026

Revised: 17 June 2026

Accepted: 22 June 2026

บทนำ

การตรวจคัดกรองสุขภาพทารกแรกเกิด (new-born screening: NBS) เป็นมาตรการสำคัญของระบบสาธารณสุขที่ช่วยค้นหาความผิดปกติที่ยังไม่แสดงอาการในระยะเริ่มต้น การตรวจพบและให้การรักษาทันท่วงทีสามารถลดความรุนแรงของโรค เพิ่มคุณภาพชีวิต และลดภาระค่าใช้จ่ายด้านสาธารณสุขในระยะยาว การเก็บตัวอย่างที่ใช้กันแพร่หลายใน NBS คือ การใช้กระดาษซับเลือดแห้ง (dried blood spot: DBS) ซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง เนื่องจากสามารถเก็บตัวอย่างเลือดได้จากการเจาะส้นเท้าโดยใช้เลือดเพียงเล็กน้อย⁽¹⁾ อีกทั้งยังเก็บรักษาและขนส่งได้สะดวกโดยไม่จำเป็นต้องใช้ระบบทำความเย็น ส่งผลให้ลดค่าใช้จ่ายด้านโลจิสติกส์ และเหมาะสมต่อการดำเนินงานตรวจคัดกรองในระดับประเทศ⁽²⁾ นอกจากนี้สารชีวโมเลกุลใน DBS ยังมีความคงตัวต่อการเก็บรักษากายได้สภาวะที่เหมาะสม⁽³⁾ และสามารถนำมาใช้ในการตรวจทางชีวเคมีและพันธุกรรมได้ และการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อบางชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ⁽⁴⁻⁷⁾

เทคโนโลยีการหาลำดับเบสยุคใหม่ (next generation sequencing: NGS) ได้เข้ามามีบทบาทสำคัญในด้านการแพทย์ เช่น การวินิจฉัยโรคพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาท โรคเลือด โรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง⁽⁸⁻¹⁰⁾ การประยุกต์ใช้เทคโนโลยี NGS ใน NBS จึงถือเป็นแนวทางที่ช่วยเพิ่มศักยภาพในการตรวจคัดกรองในหลายด้าน ได้แก่ เพิ่มขอบเขตของโรคที่สามารถตรวจพบได้ สามารถตรวจพันธุกรรมที่สัมพันธ์กับโรคต่างๆ ได้หลากหลายแม้จะไม่มีอาการแสดงออกในระดับเมตาบอไลต์ก็ตาม จากการศึกษาในสาธารณรัฐประชาชนจีนโดยใช้การหาลำดับพันธุกรรมเฉพาะชุดยีน (gene panel sequencing) ตรวจคัดกรองโรคหายากในทารกจำนวน 30,000 คน พบว่ามี 59 ราย ที่ตรวจไม่พบด้วยการตรวจชีวเคมีแต่พบโดย NGS คิดเป็นอุบัติการณ์ เท่ากับ 1 ต่อทารกแรกเกิด 500 ราย⁽¹¹⁻¹³⁾ ช่วยให้วางแผนการรักษาเชิงจำเพาะ ข้อมูลพันธุกรรมที่ได้จาก NGS สามารถนำไปใช้กำหนดแนวทางดูแลเฉพาะบุคคล และให้คำปรึกษาทางพันธุกรรมต่อครอบครัวได้อย่างแม่นยำ^(14,15) ลดอัตราการตรวจพบ

ผลบวกปลอม (false positive) และยืนยันการวินิจฉัยได้แม่นยำ เมื่อนำมาใช้ควบคู่กับการตรวจแบบดั้งเดิม^(16,17) แม้ทารกในหอผู้ป่วยวิกฤติทารกแรกเกิดที่เดิมไม่ได้ถูกพิจารณาว่าให้ตรวจพันธุกรรม แต่เมื่อตรวจด้วยการหาลำดับพันธุกรรมทั้งจีโนม พบโรคพันธุกรรม ร้อยละ 30 ในขณะที่ NBS แบบมาตรฐานพบผลบวกร้อยละ 3.6 และเมื่อตรวจยืนยันพบเป็นโรคจริง ร้อยละ 27 แต่ถ้าใช้การตรวจคัดกรองด้วยการหาลำดับพันธุกรรมทั้งจีโนม พบผลบวกร้อยละ 4.2 และทุกผลบวกนั้นตรวจยืนยันว่าเป็นโรคจริงทั้งหมด จึงเห็นได้ว่าการตรวจพันธุกรรมลดปัญหาผลการตรวจคลาดเคลื่อนจากวิธีมาตรฐานเดิม⁽¹⁸⁾ ภาวะสูญเสียการได้ยินเป็นหนึ่งในโรคที่สามารถตรวจวิเคราะห์ความผิดปกติทางพันธุกรรมได้ด้วยเทคโนโลยี targeted next generation sequencing (targeted NGS) ซึ่งมีบทบาทเพิ่มขึ้นในการตรวจวินิจฉัยทางพันธุกรรมและการตรวจคัดกรองทารกแรกเกิด DBS เป็นวิธีมาตรฐานในการเก็บตัวอย่างเลือดในระบบการตรวจคัดกรองทารกแรกเกิด และมีศักยภาพในการประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคโนโลยี NGS อย่างไรก็ดีตามปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ (DNA) ที่สกัดได้จาก DBS ยังคงเป็นข้อจำกัดสำคัญ เนื่องจากปริมาณ DNA มักต่ำกว่า DNA ที่สกัดจากเลือดครบส่วน (whole blood: WB) รวมถึงอาจได้รับผลกระทบจากสภาพการจัดเก็บตัวอย่างและสารยับยั้งปฏิกิริยา (inhibitors) ที่อาจมาจากส่วนประกอบของกระดาษหรือโปรตีนในเลือด ซึ่งอาจส่งผลต่อประสิทธิภาพของการวิเคราะห์ทางพันธุกรรม^(19,20)

การศึกษานี้เป็นการพัฒนาวิธีสกัด DNA จาก DBS เพื่อนำไปประยุกต์ใช้กับการตรวจทางพันธุกรรม โดยจะใช้สำหรับการตรวจหาภาวะสูญเสียการได้ยินเพื่อการคัดกรองทารกแรกเกิดในประเทศไทย แนวทางการศึกษามุ่งเน้นการพัฒนาและประเมินวิธีสกัด DNA จาก DBS ให้เหมาะสมสำหรับการใช้ร่วมกับเทคโนโลยี targeted NGS พัฒนาวิธีสกัด DNA จาก DBS โดยการเปรียบเทียบ 3 วิธี ได้แก่ วิธีที่ใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป (silica membrane column-based commercial kit) วิธีที่ใช้อนุภาคแม่เหล็ก (magnetic bead) ร่วมกับน้ำยาบัฟเฟอร์ไลซิสสำเร็จรูป และวิธีที่ใช้ magnetic

bead ร่วมกับน้ำยาบัฟเฟอร์ไลซิสที่เตรียมขึ้นเอง โดยประเมินคุณภาพ ปริมาณ และความสมบูรณ์ของ DNA พร้อมทั้งทดสอบความเหมาะสมในการนำไปใช้ในกระบวนการ downstream applications ได้แก่ Singleplex PCR, Multiplex PCR และการหาลำดับพันธุกรรมด้วย targeted NGS panel ในภาวะสูญเสียการได้ยิน (hearing loss) นอกจากนี้ได้เปรียบเทียบผลลัพธ์ที่ได้จากการสกัด DNA จาก DBS และ WB เพื่อประเมินความแตกต่างด้านคุณภาพและประสิทธิภาพของ DNA ที่ได้จาก 2 ชนิดตัวอย่าง

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

การศึกษานี้ใช้ whole blood (WB) และ dried blood spot (DBS) จากอาสาสมัครที่มีสุขภาพแข็งแรงและมีอายุมากกว่า 18 ปี จำนวน 5 ราย ปริมาตร 5 ซีซี โดยตัวอย่าง DBS ได้จากการหยดเลือดอาสาสมัครลงบนกระดาศับเลือด (Cytiva 903, USA) ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อวง จำนวน 40 วง/อาสาสมัคร ตากกระดาศับเลือดที่อุณหภูมิห้อง โดยวางในแนวระนาบอย่างน้อย 3 ชั่วโมง บรรจุกระดาศับเลือดที่แห้งแล้วในซองอลูมิเนียมพร้อมซองดูดความชื้น เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °C (REVCO, REVCO Scientific Inc., USA) ตัวอย่างเลือดที่เหลือนำไปสกัด DNA จาก WB ต่อไป

การสกัด genomic DNA (gDNA) จาก WB

การสกัด gDNA จาก WB ทำโดยการนำ WB ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ไปสกัด DNA ตามขั้นตอนที่ระบุในเอกสารกำกับชุดน้ำยา QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Germany)⁽²¹⁾ นำ gDNA ออกจากเมมเบรนด้วยสารละลาย TE low EDTA (ThermoFisher, USA) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

การสกัด genomic DNA (gDNA) จาก DBS

การสกัด DNA จาก DBS ทำโดยเจาะ DBS ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.2 มิลลิเมตร ตัวอย่างละ 5 วง ลงในหลอดทดลอง ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เพื่อนำไปสกัด DNA ด้วยวิธีการสกัด 3 วิธี ได้แก่

วิธีที่ใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปแบบ spin column ตามขั้นตอนที่ระบุในเอกสารกำกับน้ำยา QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Germany)⁽²¹⁾ นำ DNA ออกจากเมมเบรนด้วยสารละลาย TE low EDTA (ThermoFisher, USA) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

วิธีที่ใช้อนุภาคแม่เหล็ก หรือ magnetic bead (KAPA Biosystems, USA) ร่วมกับบัฟเฟอร์ไลซิสสำเร็จรูป (Puregene Cell Lysis Solution, QIAGEN, Germany) โดยเติมบัฟเฟอร์ไลซิส ปริมาตร 495 ไมโครลิตร และ Proteinase k (Qiagen, Germany) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยาในเตาหลุมไฟฟ้า (รุ่น SBH130D, Stuart, USA) ที่อุณหภูมิ 56 °C เป็นเวลา 30 นาที และใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง (รุ่น Centrifuge5420, Eppendorf, USA) ที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ดูดสารละลายส่วนใสเติม magnetic bead ปริมาตร 0.45 เท่าของสารละลายส่วนใส นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายวางบนแท่นแม่เหล็ก เป็นเวลา 5 นาที ที่ซึ่งส่วนสารละลายใสและล้างตะกอนด้วย 80% Ethanol (Merck, USA) จำนวน 2 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นนำ gDNA ออกจาก magnetic bead ด้วยสารละลาย TE low EDTA (ThermoFisher, USA) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

วิธีที่ใช้ magnetic bead ร่วมกับบัฟเฟอร์ไลซิสที่เตรียมขึ้นเอง ประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl pH 8.0 (Invitrogen, USA), 10 mM EDTA, disodium salt, pH 8.0 (Invitrogen, USA), 100mM NaCl (ThermoFisher, USA), 2% w/v SDS (ThermoFisher, USA) จากนั้นดำเนินการสกัดตามขั้นตอนเดียวกับวิธีที่ 2 ข้างต้น

ประเมินคุณภาพและปริมาณของ gDNA

โดยวัดปริมาณด้วยเครื่อง Qubit Fluorometer (รุ่น Qubit 4, ThermoFisher, USA) วัดความบริสุทธิ์ด้วยเครื่อง Nanodrop Spectrophotometer (รุ่น 2000c, ThermoFisher, USA) และวัดความสมบูรณ์ด้วยเครื่อง Tape Station (รุ่น 4200, Agilent, USA) เก็บรักษา gDNA ที่อุณหภูมิ -20 °C จนถึงการใช้ในขั้นตอนต่อไป

การประเมินความใช้ได้ของ gDNA

ตรวจสอบความใช้ได้ของ gDNA ในการทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ของยีนฟีนิลอะลานีนไฮดรอกซีเลส (Phenylalanine hydroxylase: *PAH*) ที่ตำแหน่ง Exon 5, Exon 8, Exon 10 และ Exon 13 ที่มีผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 233–507 bp⁽²²⁾ ดังแสดงในตารางที่ 1 และตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของยีน *PAH* อ้างอิงตาม GenBank: Accession no. NG008690.2 จากฐานข้อมูล NCBI (The National Center for Biotechnology Information)⁽²³⁾ เตรียมส่วนผสม PCR master mix ของ KAPA2G Fast Multiplex PCR Kit (KAPA

Biosystems, USA) โดยใช้ primers ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 200 nM และตัวอย่าง gDNA 10 ng ในปฏิกิริยา ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ตามขั้นตอนที่ระบุในเอกสารกำกับน้ำยา⁽²⁴⁾ นำเข้าเครื่อง Thermal cycle (รุ่น ProFlex PCR System, Applied Biosystems, USA) ตั้งอุณหภูมิเริ่มต้นในการทำ PCR ที่ 95°C นาน 3 นาที หลังจากนั้นเพิ่มปริมาณ DNA จำนวน 35 รอบ โดยตั้งอุณหภูมิที่ 95°C นาน 15 วินาที ที่ 60°C นาน 30 วินาที และที่ 72°C นาน 30 วินาที เมื่อครบเพิ่มที่ 72°C นาน 1 นาที และตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product) ด้วยวิธี gel electrophoresis

ตารางที่ 1 รายละเอียด Forward และ Reverse primers สำหรับ exon 5, 8, 10 และ 13 ของยีน *PAH*

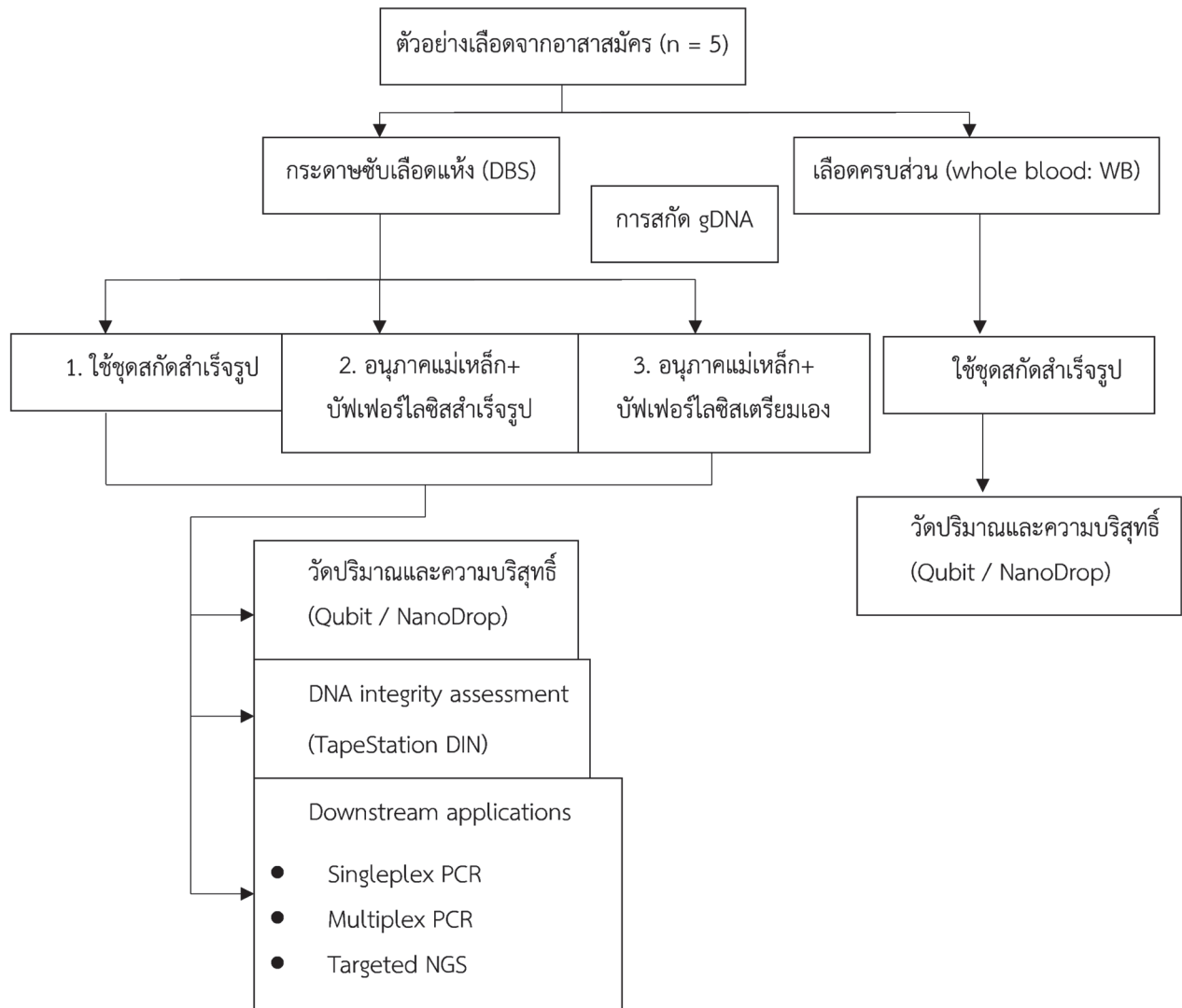
Primer Name	Sequence (5' to 3')	Position (Ref:NG008690.2)	Length (bp)	Tm (°C)	PCR Product size (bp)
5F	GCCCCATTCAAAGCATT	96668–85	18	53.5	233
5R	CCATCCTCAACTGGATGA	96883–900	18	50.9	
8F	GCCTTTTATGATCCCAACC	111489–507	19	50.8	383
8R	ACCACACACCCATTTTCAGGT	111852–71	20	56.8	
10F	TCATCCAGTCAAGGTGA	118910–26	17	49.1	297
10R	ACTGGAGAATGAGTTCCC	119189–206	18	50.9	
13F	TGAGGCTGTAAGCTCCTTGAA	124048–68	21	55.8	507
13R	CTTGAATGAAGCAGGTCCC	124536–54	19	53.5	

หมายเหตุ: Tm = melting temperature, F = Forward primer, R = Reverse primer และ ลำดับ primers ทั้งหมดแสดงในทิศทาง 5' to 3'

หาลำดับพันธุกรรมด้วย targeted NGS panel สำหรับโรคภาวะสูญเสียการได้ยิน (hearing loss) ด้วย platform DNBSEQ-E25 นำ gDNA ที่สกัดได้สร้าง libraries ซึ่งมีขั้นตอนการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ การเลือกชิ้นส่วน DNA ขนาด 300–500 bp เติม dATP บริเวณปลาย 3' ให้เป็น sticky end และติด index adapter ที่ปลายทั้งสองข้างของชิ้นส่วนดีเอ็นเอในแต่ละตัวอย่างเพื่อทำให้สามารถระบุตัวอย่างได้ ทำการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR นำ DNA libraries ที่เตรียมได้จากแต่ละตัวอย่างมารวมกัน ทำการ hybridize และ capture ยีนที่ต้องการด้วยชุดโพรบที่ออกแบบไว้ หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยทำการแยก DNA สายคู่จากการทำ DNA libraries ให้เป็น DNA สายเดี่ยว เพื่อทำเป็น single stranded DNA circle จากนั้นทำเป็น DNA

nanoball และนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNBSEQ-E25, MGI, China) ตามขั้นตอนกระบวนการของ DNBSEQ-E25 platform⁽²⁵⁾ วิเคราะห์ข้อมูลเพื่อประเมินคุณภาพของการทำ NGS ในด้านการจับคู่กับจีโนมอ้างอิง (mapping quality) ความครอบคลุมในการอ่าน 30 ครั้ง (30x coverage) อัตราการซ้ำของลำดับ DNA (DNA duplicate rate) และคุณภาพของการอ่านลำดับเบสถูกต้อง (Phred quality score) ที่ Q30

ขั้นตอนแสดงกระบวนการสกัด DNA จาก DBS ด้วยวิธีต่างๆ และการประเมินคุณภาพ DNA สำหรับการนำไปใช้ในกระบวนการ downstream applications ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แสดงขั้นตอนการสกัด DNA จากกระดาศับเลือด การประเมินคุณภาพ ปริมาณ และความใช้ได้ของ gDNA

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลเชิงปริมาณวิเคราะห์โดยใช้สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) และแสดงผลในรูปค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานและช่วงของข้อมูล

จริยธรรมการวิจัย

การวิจัยนี้ได้รับอนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณา การศึกษาวิจัยในคน กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เลขที่ DMSc-EC049 รหัสโครงการวิจัย 8/2567 วันที่ 25 มีนาคม พ.ศ. 2568

ผล

วัดปริมาณ gDNA และความบริสุทธิ์ของ gDNA ที่สกัดได้จากตัวอย่าง WB และ DBS วิธีละ 5 ตัวอย่าง พบว่าตรวจพบ gDNA ในทุกวิธีการสกัดที่นำมาศึกษา ดังแสดงในตารางที่ 2

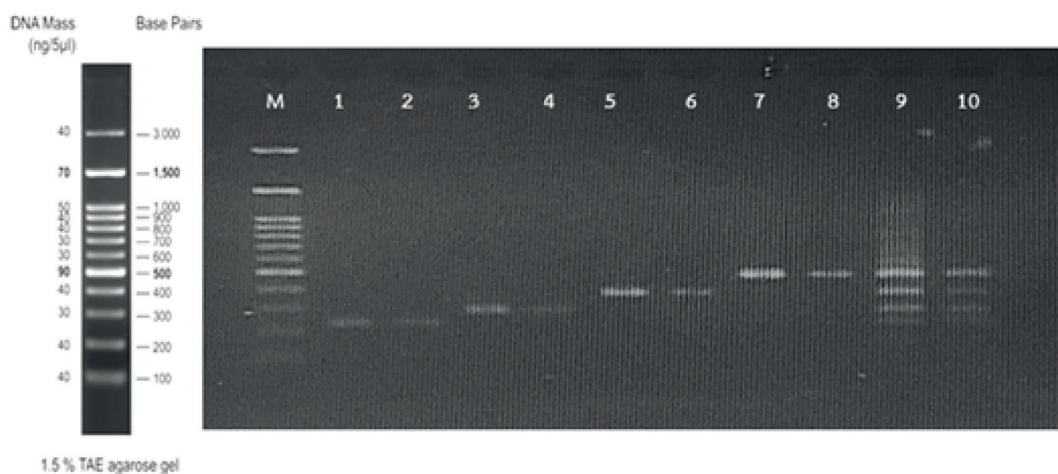
ตารางที่ 2 ผลการวัดปริมาณ gDNA ที่สกัดจากตัวอย่างเลือด (n = 5) และด้วยการสกัด 4 วิธี

วิธีสกัด	ชนิดของตัวอย่าง	ปริมาณเฉลี่ย (ng/ul) $\pm$ SD	ความบริสุทธิ์ A260/A280	ความบริสุทธิ์ A260/A230
ชุดสกัดสำเร็จรูป (QIAamp DNA Blood Mini Kit)	WB	24.56 $\pm$ 6.99	2.09 $\pm$ 0.02	2.36 $\pm$ 0.09
ชุดสกัดสำเร็จรูป (QIAamp DNA Blood Mini Kit)	DBS	6.87 $\pm$ 1.91	1.97 $\pm$ 0.06	1.33 $\pm$ 0.08
magnetic bead+บัฟเฟอร์ไลซิสสำเร็จรูป	DBS	6.88 $\pm$ 1.81	2.08 $\pm$ 0.14	0.26 $\pm$ 0.04
magnetic bead+บัฟเฟอร์ไลซิสที่เตรียมขึ้นเอง	DBS	5.28 $\pm$ 1.48	2.01 $\pm$ 0.07	0.46 $\pm$ 0.05

หมายเหตุ: ค่าอัตราส่วน A260/A280 ใช้ประเมินความบริสุทธิ์ของ DNA (ค่าที่เหมาะสมประมาณ 1.8–2.0) ส่วนค่า A260/A230 ใช้ประเมินการปนเปื้อนของสารตกค้างจากกระบวนการสกัด (ค่าที่เหมาะสม > 2.0)

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ทั้งแบบ singleplex และ multiplex ด้วยวิธี gel electrophoresis ของ DNA จาก DBS ที่สกัดจากชุดสำเร็จรูปและ

ชุดสกัดที่เตรียมเอง ด้วยไพรเมอร์ของยีน *PAH* ที่ขนาด 233–507 bp พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ตามขนาดที่ระบุ ดังแสดงในภาพที่ 2



Lane M – DNA Marker 100 bp ladder (5 μ L)

DNA สกัดด้วยวิธีใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป (QIAamp DNA Blood Mini Kit)

Lane 1 – PCR Product Exon-5 (233 bp)

Lane 3 – PCR Product Exon-10 (297 bp)

Lane 5 – PCR Product Exon-8 (383 bp)

Lane 7 – PCR Product Exon-13 (507 bp)

Lane 9 – PCR Product Exon-5-8-10-13

DNA สกัดด้วย magnetic bead+บัฟเฟอร์ไลซิสที่เตรียมขึ้นเอง

Lane 2 – PCR Product Exon-5 (233 bp)

Lane 4 – PCR Product Exon-10 (297 bp)

Lane 6 – PCR Product Exon-8 (383 bp)

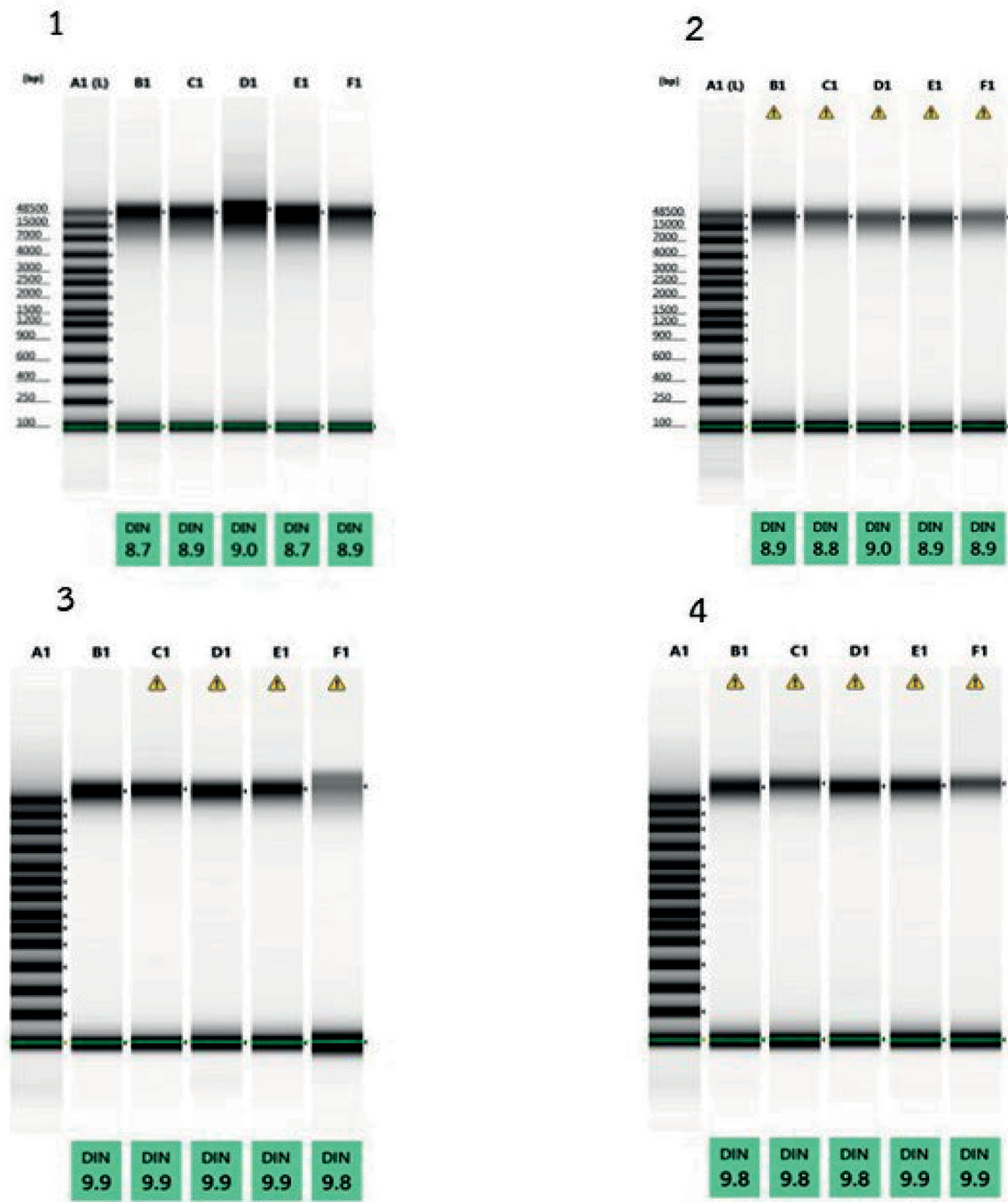
Lane 8 – PCR Product Exon-13 (507 bp)

Lane 10 – PCR Product Exon-5-8-10-13

ภาพที่ 2 แสดง PCR Products ของ DNA จาก DBS ที่สกัดด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป (QIAamp DNA Blood Mini Kit) เปรียบเทียบกับ magnetic bead+บัฟเฟอร์ไลซิสที่เตรียมขึ้นเองบน 1.5% Agarose gel

การตรวจสอบความสมบูรณ์ของ gDNA พบว่าทุกวิธีให้ DNA ที่มีความสมบูรณ์สูง โดยมีค่า DNA Integrity Number, DIN > 8 ซึ่งมีความเหมาะสม

ต่อการนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ด้วย NGS ต่อไป ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 แสดงความสมบูรณ์ของ DNA ที่ได้จากตัวอย่างอาสาสมัคร 5 ตัวอย่าง และวิธีต่าง ๆ

- 1) WB: ชุดสกัดสำเร็จรูป
 - 2) DBS: ชุดสกัดสำเร็จรูป
 - 3) DBS: magnetic beads และบัฟเฟอร์ไลซิสชุดสกัดสำเร็จรูป
 - 4) DBS: magnetic beads และบัฟเฟอร์ไลซิสเตรียมเอง
- (Lane B1, C1, D1, E1, F1 หมายถึง ตัวอย่างอาสาสมัคร 1-5 ตามลำดับ)

การประเมินคุณภาพ gDNA ที่ได้จากตัวอย่าง และวิธีการสกัดที่แตกต่างกัน โดยใช้ผลของข้อมูล การหาลำดับพันธุกรรมจากการทำ NGS ด้วยเทคนิค DNA Nanoball Sequencing (DNBSEQ-E25)

พบว่าทุกวิธีการสกัดมี mapping quality มากกว่า ร้อยละ 90 และ 30x coverage มากกว่าร้อยละ 97 แสดง ถึงคุณภาพของข้อมูลเชื่อถือได้ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลคุณภาพข้อมูลการหาลำดับพันธุกรรมจากตัวอย่างและวิธีสกัด DNA ที่แตกต่างกัน

ตัวอย่าง และวิธีสกัด	คุณภาพของการทำ NGS			
	mapping quality	30x coverage	DNA duplicate rate (%)	Phred quality score (Q30)
1) WB ชุดสกัดสำเร็จรูป	99.87	99.03	7.37	91.23
2) DBS ชุดสกัดสำเร็จรูป	99.85	99.25	9.11	90.72
3) DBS Magnetic bead ร่วมกับบัฟเฟอร์ไลซิสจากชุดสกัดสำเร็จรูป	99.89	98.75	7.99	90.41
4) DBS Magnetic bead ร่วมกับบัฟเฟอร์ไลซิสที่เตรียมขึ้นเอง	99.87	97.13	7.87	90.21

หมายเหตุ: ข้อมูลคุณภาพการหาลำดับพันธุกรรมในตารางเป็นผลจากตัวอย่าง จำนวน 1 ราย ที่ผ่านการสกัด DNA ด้วยแต่ละวิธี

วิจารณ์

การประเมินปริมาณของ DNA จาก DBS ทั้ง 3 วิธีสกัด พบว่าวิธีที่ใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปและ magnetic bead ทั้งร่วมกับบัฟเฟอร์ไลซิสจากชุดสกัดสำเร็จรูปให้ ปริมาณใกล้เคียงกันและมากกว่าวิธีที่ใช้ magnetic bead ร่วมกับบัฟเฟอร์ไลซิสที่เตรียมขึ้นเอง ซึ่งไม่สอดคล้อง กับงานวิจัยที่ได้ศึกษาไว้ก่อนหน้านี้ว่า DNA จาก mag- netic bead ได้ปริมาณสูงกว่าชุดสกัดสำเร็จรูปที่เป็น column-base โดยเฉพาะเมื่อเริ่มต้นด้วยตัวอย่าง ที่มีปริมาณต่ำมีการสูญเสีย DNA ในขั้นตอนการจับ (binding) การล้าง (washing) น้อยกว่า ลดการตกค้าง ของ DNA ที่ column membrane⁽²⁶⁻²⁹⁾ ความไม่สอดคล้อง ดังกล่าวอาจอธิบายได้จากความแตกต่างของชนิดตัวอย่าง ที่ใช้ศึกษาโดยงานวิจัยก่อนหน้านี้ส่วนใหญ่จะใช้ WB หรือเซลล์เพาะเลี้ยง ในขณะที่ DBS เป็นตัวอย่างที่ผ่าน การทำให้แห้งและมีการตรึงของ DNA กับโปรตีนและ เส้นใยของกระดาษกรอง ส่งผลให้การปลดปล่อย DNA ในขั้นตอนไลซิสทำได้ยากกว่า หาก DNA ไม่ถูกปล่อย ออกมาอย่างสมบูรณ์ตั้งแต่ขั้นตอนแรกอาจทำให้ปริมาณ DNA ต่ำ นอกจากนี้บัฟเฟอร์ไลซิสสำเร็จรูปได้รับ

การออกแบบให้มียอดประกอบที่เหมาะสม ซึ่งช่วยทั้ง การสลายเซลล์และเพิ่มประสิทธิภาพของการจับ DNA กับ magnetic bead ในขณะที่บัฟเฟอร์ไลซิสที่เตรียมขึ้นเอง อาจยังไม่สามารถสร้างสภาวะดังกล่าวได้อย่างเหมาะสม ส่งผลให้ DNA ถูกปล่อยออกมาไม่สมบูรณ์หรือจับกับ magnetic bead ไม่แน่นพอและสูญเสียในขั้นตอน การล้างในที่สุด ผลการตรวจสอบความสมบูรณ์ของ DNA พบว่าทุกวิธีให้ค่า DNA Integrity Number, DIN > 8 แสดงว่า DNA มีความสมบูรณ์สูง ไม่เกิดการเสื่อมสลาย และเหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ในกระบวนการ downstream เช่น PCR, sequencing

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่าง WB และ DBS จะพบว่า DNA จาก DBS มีค่าความบริสุทธิ์ A260/A280 ต่ำกว่าหรือใกล้เคียงเกณฑ์มาตรฐาน (1.8-2.0) และค่า A260/A230 ต่ำ (< 1.0) บ่งชี้ว่ามีสารปนเปื้อนที่ ดูดกลืนแสงที่ 230 นาโนเมตร ปนมากับ DNA ซึ่งตาม มาตรฐาน Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) เรื่อง Blood Collection on Filter Papers for Newborn Screening Programs กำหนดให้ DBS ต้องทำจากเส้นใยฝ้าย 100%⁽³⁰⁾ แม้ว่าจะใช้

วัสดุที่มีความบริสุทธิ์สูง ทั้งนี้ในการสกัด DNA อาจเกิดการย่อยสลายตัวบางส่วนของเซลลูโลส ทำให้ได้สารโมเลกุลเล็กหรือโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ละลายน้ำได้ เช่น กลูโคส (glucose) เซลโลไบโอส (cellobiose) เซลโลไตรโอส (cellotriose) กรดกลูคูโรนิก (glucuronic acid) รวมทั้งอนุพันธ์ที่ผ่านการออกซิโดซ์ของเซลลูโลส เช่น คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethyl cellulose) สารเหล่านี้มีคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงยูวีที่ 230 นาโนเมตรส่งผลให้ค่า A260/A230 ของ DNA ต่ำ (< 1.0) นอกจากนี้ยังมีฮีมี (heme) โปรตีนจากเลือดและสารเคมีจากบัฟเฟอร์ไลซิส เช่น guanidine thiocyanate, guanidine hydrochloride, sodium dodecyl sulfate (SDS) ที่อาจตกค้างและมีผลต่อค่า A260/A230 การตรวจสอบ PCR product ทั้งแบบ singleplex และ multiplex ของ DNA จาก DBS ที่สกัดด้วยชุดสกัดสำเร็จรูปและ magnetic bead ร่วมกับบัฟเฟอร์ไลซิสที่เตรียมเอง พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ ยีน PAH ขนาด 233–570 bp ได้ตามขนาดที่ระบุ แสดงว่า DNA ที่ได้มีคุณภาพเพียงพอสำหรับการทำ PCR

การประเมินคุณภาพของข้อมูลที่ได้จากการทำ NGS พบว่าทุกวิธีสกัดมี mapping quality มากกว่าร้อยละ 90 และ 30x coverage มากกว่าร้อยละ 97 บ่งชี้ถึงความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของการอ่านเบสในกระบวนการหาลำดับพันธุกรรม เมื่อเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่าง WB และ DBS พบว่าทั้งสองชนิดให้ผลลัพธ์ที่ใกล้เคียงกัน โดยตัวอย่าง DBS ที่ผ่านการสกัดด้วยชุดสกัดสำเร็จรูปให้ค่า 30x coverage Q30 ใกล้เคียงกับตัวอย่าง WB แสดงให้เห็นว่า DBS สามารถใช้เป็นตัวอย่างไม่ทดแทนได้อย่างเหมาะสมในงานตรวจวิเคราะห์ทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค NGS สำหรับวิธีการสกัดด้วย magnetic bead ทั้งที่ใช้บัฟเฟอร์ไลซิสจากชุดสกัดสำเร็จรูปและบัฟเฟอร์ไลซิสที่เตรียมขึ้นเอง พบว่าผลลัพธ์ของข้อมูล NGS อยู่ในระดับที่เทียบเท่ากับชุดสกัดสำเร็จรูปโดยมีค่า DNA duplicate rate ต่ำกว่าร้อยละ 10 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลเชิงลึก เช่น การระบุการกลายพันธุ์หรือการวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับโรคทางพันธุกรรม ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าการสกัด DNA จาก DBS ด้วยเทคนิค

magnetic bead เป็นทางเลือกที่มีศักยภาพสูง สามารถให้ DNA ที่มีความสมบูรณ์และคุณภาพเพียงพอสำหรับการหาลำดับพันธุกรรมได้เทียบเท่ากับการใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป ทั้งนี้ยังเหมาะสมสำหรับนำไปประยุกต์ใช้ในงานตรวจคัดกรองทางพันธุกรรม (genetic screening) หรืองานวิจัยทางอนุพันธุศาสตร์ที่มีข้อจำกัดด้านปริมาณตัวอย่างหรือการเก็บรักษา เช่น การใช้ตัวอย่าง DBS รวมถึงการประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์โรคการสูญเสียการได้ยิน (hearing loss) โดยใช้ targeted gene panel ซึ่งต้องการความแม่นยำสูงในการตรวจหาการกลายพันธุ์เฉพาะยีนที่เกี่ยวข้องกับโรค

แม้ว่าปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากแต่ละวิธีจะมีความแตกต่างกัน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากทุกวิธีมีปริมาณเพียงพอและสามารถประยุกต์ใช้กับตัวอย่างปริมาณน้อย เช่น DBS ซึ่งเหมาะกับงานตรวจคัดกรองสุขภาพทารกแรกเกิด มีคุณภาพเหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ในการเตรียมไลบรารีและการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค next generation sequencing (NGS) นอกจากนี้มีข้อที่ควรระวัง ได้แก่ การเตรียมน้ำยาใช้เองอาจมีความไม่คงที่ในแต่ละรอบการเตรียมและความสม่ำเสมอในการทำซ้ำอาจต่ำกว่าชุดสกัดสำเร็จรูป หากไม่มีการควบคุมกระบวนการอย่างสม่ำเสมอและควรประเมินต้นทุนเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพที่ได้ เพื่อความคุ้มค่าของวิธีในระยะยาว การศึกษานี้มีข้อจำกัด ได้แก่ จำนวนตัวอย่างที่ค่อนข้างน้อย และเป็นการศึกษาที่ดำเนินการภายในห้องปฏิบัติการเดียว อาจยังไม่ครอบคลุมความแปรปรวนจากสภาพแวดล้อมหรือกระบวนการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการอื่น และยังไม่มีการประเมินความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) ของแต่ละวิธีสกัด รวมถึงจำนวนตัวอย่างอาจยังไม่เพียงพอสำหรับการวิเคราะห์เปรียบเทียบเชิงสถิติระหว่างวิธีสกัด อีกทั้งการประเมินประสิทธิภาพของ DNA ที่สกัดได้ในงานวิจัยนี้ทดสอบเฉพาะการประยุกต์ใช้ร่วมกับ targeted NGS panel สำหรับภาวะสูญเสียการได้ยิน ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในจำนวนตัวอย่างที่มากขึ้น รวมถึงการประเมินความสามารถในการทำซ้ำและการประยุกต์ใช้กับการตรวจทางพันธุกรรมในรูปแบบอื่นต่อไปในอนาคต

สรุป

วิธีการสกัด DNA จากบัพเฟอร์ที่เตรียมขึ้นเอง ร่วมกับเทคนิค magnetic bead-based extraction สามารถให้ DNA ที่มีคุณภาพและปริมาณเพียงพอสำหรับการศึกษาทางพันธุกรรม การประเมินคุณภาพของ DNA จาก DBS แสดงให้เห็นว่า DNA ที่ได้มีความเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคโนโลยี targeted NGS นอกจากนี้วิธีการนี้ยังเป็นทางเลือก สำหรับการสกัด ดีเอ็นเอจาก DBS สามารถนำมาใช้สำหรับงานคัดกรองภาวะสูญเสียการได้ยิน (hearing loss) ในทารกแรกเกิด ซึ่งสอดคล้องกับความต้องการในการสร้างระบบตรวจคัดกรองเชิงรุกโดยใช้ NGS ในอนาคต

การเปิดเผยการใช้ปัญญาประดิษฐ์

ผู้พิมพ์ได้มีการใช้โปรแกรมปัญญาประดิษฐ์ ได้แก่ ChatGPT (OpenAI, USA) เพื่อช่วยสืบค้นข้อมูลและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง ทั้งนี้ได้มีการพิจารณาความถูกต้องของข้อมูลที่สืบค้นแล้ว นอกจากนี้มีการใช้โปรแกรมปัญญาประดิษฐ์เพื่อช่วยตรวจสอบและปรับปรุงความถูกต้องทางไวยากรณ์ภาษาอังกฤษของต้นฉบับ และผู้พิมพ์ไม่ได้ใช้ในการออกแบบการวิจัย การวิเคราะห์ข้อมูล การแปลผล หรือการตัดสินใจทางวิชาการใดๆ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ปี พ.ศ. 2567 และ 2568 ขอขอบคุณ ศูนย์การแพทย์จีโนมิกส์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือ อุปกรณ์ และขอขอบคุณ ผู้อำนวยการสถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ หัวหน้าศูนย์ปฏิบัติการตรวจคัดกรองสุขภาพทารกแรกเกิดแห่งชาติ ที่ปรึกษาโครงการวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย และผู้ร่วมวิจัยทุกท่าน ในการให้ความร่วมมือในการดำเนินงานวิจัยเป็นอย่างดี ตลอดจนช่วยตรวจทานแก้ไขต้นฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. McDade TW, Williams S, Snodgrass JJ. What a drop can do: dried blood spots as a minimally invasive method for integrating biomarkers into population-based research. *Demography* 2007; 44(4): 899-925.
2. Mei JV, Zobel SD, Hall EM, Jesus VR, Adam BW, Hannon WH. Performance properties of filter paper devices for whole blood collection. *Bioanalysis* 2010; 2(8): 1397-403.
3. Adam BW, Hall EM, Sternberg M, Lim TH, Flores SR, O'Brien S, et al. The stability of markers in dried-blood spots for recommended newborn screening disorders in the United States. *Clin Biochem* 2011; 44(17-18): 1445-50.
4. Chace DH, Kalas TA, Naylor EW. Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood spot specimens from newborns. *Clin Chem* 2003; 49(11): 1797-817.
5. Adam BW, Alexander JR, Smith SJ, Chace DH, Loeber JG, Elvers LH, et al. Recoveries of phenylalanine from two sets of dried-blood-spot reference materials: prediction from hematocrit, spot volume, and paper matrix. *Clin Chem* 2000; 46(1): 126-8.
6. Tuailon E, Kania D, Pisoni A, Bollore K, Taieb F, Ontsira Ngoyi EN, et al. Dried blood spot tests for the diagnosis and therapeutic monitoring of HIV and viral hepatitis B and C. *Front Microbiol* 2020; 11: 373. (7 pages).
7. Doornekamp L, Embregts CWE, Aron GI, Goeijenbier S, van de Vijver DAMC, van Gorp ECM, et al. Dried blood spot cards: a reliable sampling method to detect human antibodies against rabies virus. *PLoS Negl Trop Dis* 2020; 14(10): e0008784. (10 pages).
8. Sun H, Shen XR, Fang ZB, Jiang ZZ, Wei XJ, Wang ZY, et al. Next-generation sequencing technologies and neurogenetic diseases. *Life* 2021; 11(4): 361. (17 pages).

9. Gallo V, Dotta L, Giardino G, Cirillo E, Lougaris V, D'Assante R, et al. Diagnostics of primary immunodeficiencies through next-generation sequencing. *Front Immunol* 2016; 7: 466. (10 pages).
10. Elsink K, Huibers MMH, Hollink IHIM, Simons A, Zonneveld-Huijssoon E, van der Veken LT, et al. Implementation of early next-generation sequencing for inborn errors of immunity: a prospective observational cohort study of diagnostic yield and clinical implications in dutch genome diagnostic centers. *Front Immunol* 2021; 12: 780134. (11 pages).
11. Veldman A, Kiewiet MBG, Heiner-Fokkema MR, Nelen MR, Sinke RJ, Sikkema-Raddatz B, et al. Towards next-generation sequencing (NGS)-based newborn screening: a technical study to prepare for the challenges ahead. *Int J Neonatal Screen* 2022; 8(1): 17. (11 pages).
12. Remec ZI, Trebusak Podkrajsek K, Repic Lampret B, Kovac J, Groselj U, Tesovnik T, et al. Next-generation sequencing in newborn screening: a review of current state. *Front Genet* 2021; 12: 662254. (11 pages).
13. Jiang S, Wang H, Gu Y. Genome sequencing for newborn screening—an effective approach for tackling rare diseases. *JAMA Netw Open* 2023; 6(9): e2331141. (3 pages).
14. Rudowski S, Boerkoel CF, He M, Kanungo S. Whole genome sequencing in era of newborn screening. *OBM Genetics* 2023; 7(4): 2304195. (13 pages).
15. Smith L, Willis MJ, Feigenbaum A, Scharer G, Mardach R, Hansen C, et al. Genome-to-treatment and begin newborn genome screening: a review of system guides for the acute management and newborn screening follow-up of genetic disorders in infants and children. *Med Res Arch*. [serial online]. 2023; 11(10): [cited 2026 Jan 12]; [20 screens]. Available from: URL: <https://doi.org/10.18103/mra.v11i10.4528>.
16. Shen G, Li W, Zhang Y, Chen L. Next-generation sequencing based newborn screening and comparative analysis with MS/ MS. *BMC Pediatr* 2024; 24: 230. (7 pages).
17. Kingsmore SF, Wright M, Smith LD, Liang Y, Mowrey WR, Protopsaltis L, et al. Prequalification of genome-based newborn screening for severe childhood genetic diseases through federated training based on purifying hyperselection. *Am J Hum Genet* 2024; 111: 2618–42.
18. Kingsmore S, Wright M, Olsen L, Schultz B, Protopsaltis L, Averbuj D, et al. Genome-based newborn screening for severe childhood genetic diseases has high positive predictive value and sensitivity in a NICU pilot trial. *Am J Hum Genet* 2024; 111: 2643–67.
19. Boemer F, Fasquelle C, d'Otrepppe S, Josse C, Dideberg V, Segers K, et al. A next-generation newborn screening pilot study: NGS on dried blood spots detects casual mutations in patients with inherited metabolic diseases. *Sci Rep* 2017; 7: 17641. (9 pages).
20. Hendrix MM, Cuthbert CD, Cordovado SK. Assessing the performance of dried-blood-spot DNA extraction methods in next generation sequencing. *Int J Neonatal Screen* 2020; 6: 36. (15 pages).
21. QIAGEN. QIAamp DNA kits for DNA extraction. [online]. 2025; [cited 2026 Jan 12]; [97 screens]. Available from: URL: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/qiaamp-dna-kits?catno=51304>.
22. รจนพรพรรณ ปั่นกาญจน์โต, ภาวิณี อินนาค, มะลิวัลย์ นุ่มนวล, อีระยุทธ สมบุญ, สุภาพร นามมูลน้อย, นวลจันทร์ วิจักขณ์จินดา และคณะ. การกลายพันธุ์ของยีนฟีนิลอะลานีนไฮดรอกซีเลสในทารกไทยที่สงสัยเป็นโรคฟีนิลคีโตนูเรีย. *ว กรมวิทย์ พ* 2565; 64(4): 223–6.

23. National Library of Medicine. Homo sapiens phenylalanine hydroxylase (PAH), RefSeqGene on chromosome 12. [online]. 2025; [cited 2026 Jan 12]. Available from: URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_008690.2.
24. Kapa Biosystems. KAPA2G fast multiplex PCR kit. [online]. 2016; [cited 2026 Jan 12]; [4 screens]. Available from: URL: https://n-genetics.com/files/co/Documents/manual/kapa_12664.pdf.
25. Twist Bioscience. Twist target enrichment fast hybridization protocol: for use with the twist NGS workflow [online]. 2025; [cited 2026 Jan 12]; [22 screens]. Available from: URL: <https://www.twistbioscience.com/content/dam/twistbioscience/resources/2026-01/DOC-001066-Protocol-FastHyb-REV6-singles-compressed.pdf>.
26. Pan S, Gu B, Wang H, Yan Z, Wang P, Pei H, et al. Comparison of four DNA extraction methods for detecting *Mycobacterium tuberculosis* by real-time PCR and its clinical application in pulmonary tuberculosis. J Thorac Dis 2013; 5(3): 251-7.
27. Na B, Park J, Park S, Park E, Jang J, Kim YH, et al. Comparison evaluation of bacterial DNA extraction methods for improved molecular diagnostic accuracy of sepsis-causing pathogens in clinical whole blood samples. Sci Rep 2025; 15: 4167. (6 pages).
28. Zamuner FT, Ramos-López A, García-Negrón A, Purcell-Wiltz A, Cortés-Ortiz A, Cuevas AR, et al. Evaluation of silica spin column and magnetic bead formats for rapid DNA methylation analysis in clinical and point of care settings. Biomed Rep 2024; 21: 112. (11 pages).
29. Gall-David SL, Boudry G, Buffet-Bataillon S. Comparison of four DNA extraction kits efficiency for 16SrDNA microbiota profiling of diverse human samples. Future Sci OA 2023; 9(1): FS0837. (12 pages).
30. Clinical and Laboratory Standards Institute. Dried blood spot specimen collection for newborn screening. 7th ed. CLSI standard NBS01. Malvern, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2021.

Development of DNA Extraction Method from Dried Blood Spots for Genetic Analysis

Kannikar Punnapum, Pawinee Innark, Rotjanapan Pankanjanato, Onanong Jaruan, Maliwan Numnuan, Ratchaneekorn Jaisue, Wiroj Puangtabtim, Charintip Yenyuvadee, Pundharika Piboonsiri, and Hansa Thaisri

Medical Life Science Institute, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Genetic analysis using next generation sequencing (NGS) technology has significantly improved the accuracy and comprehensiveness of genetic diagnosis, including newborn screening using dried blood spot (DBS) samples. This study aimed to develop and evaluate DNA extraction methods from DBS samples suitable for NGS applications. Three extraction methods were compared: a commercial extraction kit, a magnetic bead-based method combined with an in-house lysis buffer, and a magnetic bead-based method with a commercial lysis buffer. DNA extracted from whole blood (WB) was used as a reference. The results obtained from five volunteers showed that DNA extracted from all three methods had an average concentration of 5.28–6.88 ng/μL. The purity ratios (A₂₆₀/A₂₈₀ and A₂₆₀/A₂₃₀) ranged from 1.89–2.34 and 0.20–1.40, respectively, while DNA integrity numbers (DIN) were between 8.8 and 9.9. PCR amplification using both singleplex and multiplex assays produced target fragments of 233–570 bp as expected. NGS data generated by the DNA Nanoball Sequencing (DNBSEQ-E25) platform from MGI demonstrated high sequencing quality, with mapping rate of 99.85–99.87%, 30× coverage of 97.13–99.25%, duplicate rate of 7.87–9.11%, and base call accuracy (Q₃₀) of 90.21–90.72%. This study demonstrates that the magnetic bead-based extraction method combined with an in-house lysis buffer provides DNA yield and quality comparable to the commercial extraction kit, and is suitable for NGS-based genetic analysis.

Keywords: Dried blood spot (DBS), DNA extraction, Magnetic beads, Next generation sequencing