**โครงการ TA**
**งานอณูพยาธิวิทยา (Molecular Pathology)**
**ประจำปีงบประมาณ 2563**

**1. ชื่อโครงการ :** การประเมินการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างบล็อกชิ้นเนื้อ ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ QIAmp® DNA FFPE Tissue Kit และ MagPurix® Tissue DNA Extraction Kit

**ผู้ดำเนินการ:**

**ที่ปรึกษาโครงการ**

แพทย์หญิงพิริยา สุทธิเรืองวงศ์

**ผู้ดำเนินการและรับผิดชอบโครงการ**

น.ส. สุมลรัตน์ ปานทอง

**ผู้ร่วมโครงการ**

น.ส. ศิริรัตน์ สีขุนทด

น.ส. พุทธิชานันท์ เกิดพร

**หน่วยงานที่รับผิดชอบ** งานอณูพยาธิวิทยา กลุ่มงานชันสูตรพิเศษ สถาบันพยาธิวิทยา

**2. หลักการและเหตุผล/แนวคิดในการพัฒนาคุณภาพงาน**

ปัจจุบันได้มีเทคนิคการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างบล็อกชิ้นเนื้อเกิดขึ้นมากมาย ซึ่งแต่ละเทคนิคนั้นจะมีขั้นตอนและระยะเวลาในการดำเนินการที่แตกต่างกัน เทคนิคการสกัดดีเอ็นเอที่งานอณูพยาธิวิทยาใช้อยู่ในปัจจุบันคือการใช้ชุดดีเอ็นเอของ QIAmp® DNA FFPE Tissue Kit ซึ่งเป็นการตรึงดีเอ็นเอด้วย silica membrane แล้วจึงทำการ elute ดีเอ็นเอออกมาด้วยบัฟเฟอร์จำเพาะของชุดสกัด ซึ่งขั้นตอนทั้งหมดต้องดำเนินงานโดยผู้ปฏิบัติงานเท่านั้น ดังนั้นจึงอาจก่อให้เกิดความผิดพลาดเช่น มีการปนเปื้อนของตัวอย่างข้ามหลอดกันในกรณีที่มีตัวอย่างจำนวนมากทำให้ต้องมีการสกัดดีเอ็นเอซ้ำ จึงก่อให้เกิดการสูญเสียค่าใช้จ่ายเกี่ยวกับชุดสกัดดีเอ็นเอ

ดังนั้นจึงเกิดแนวคิดในการทดสอบหาชุดสกัดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอื่นๆ ที่สามารถสกัดดีเอ็นเอให้มีคุณภาพที่ดี และช่วยลดขั้นตอนการปฏิบัติงานลง เพื่อลดปัญหาเรื่องขั้นตอนการปฏิบัติงานและต้นทุนดังที่ได้กล่าวมา

**3. วัตถุประสงค์**

เพื่อเปรียบเทียบคุณภาพของดีเอ็นเอจากตัวอย่างบล็อกชิ้นเนื้อ ที่ทำการสกัดด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ QIAmp® DNA FFPE Tissue Kit และ MagPurix® Tissue DNA Extraction Kit

**4. ประโยชน์ที่จะได้รับ**

4.1 ชุดสกัดดีเอ็นเอที่ใช้งานสะดวกและสามารถสกัดดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีเพื่อนำมาใช้ในงานประจำของงานอณูพยาธิวิทยา

4.2 สามารถลดความเสี่ยง หรือการทำซ้ำในการสกัดดีเอ็นเอของงานอณูพยาธิวิทยา

**5. ระยะเวลาในการดำเนินการ**

ตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2562 – กันยายน 2563

**6. กิจกรรมดำเนินการ**

| กิจกรรม | ปีงบประมาณ 2563 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ต.ค. – พ.ย. | ธ.ค. – ม.ค. | ก.พ. – มี.ค. | เม.ย. – พ.ค. | มิ.ย. – ก.ค. | ส.ค. – ก.ย. |
| 1. ค้นคว้าข้อมูล | ← → | | | | | |
| 2. เขียนโครงการ | ← → | | | | | |
| 3. คัดเลือกตัวอย่างจากบล็อกพาราฟินเพื่อใช้ในการสกัด DNA จำนวน 30 ตัวอย่าง | | ← | → | | | |
| 4. สกัด DNA จำนวน 30 ตัวอย่าง | | | ← | → | | |
| 5. วัดปริมาณและคุณภาพ DNA ที่ได้จากชุดสกัดทั้ง 2 ชนิด ด้วยเครื่อง Nanodrop | | | ← | → | | |
| 6. เปรียบเทียบคุณภาพ DNA ที่ได้จากชุดสกัดทั้ง 2 ชนิด ด้วยเทคนิค PCR | | | | ← | → | |
| 7. รวบรวมข้อมูลที่ได้และนำมาวิเคราะห์ผลการทดลอง | | | | | | ← → |
| 8. สรุปผลการทดลอง | | | | | | ← → |
| 9. เขียนรายงาน และนำเสนอผลการดำเนินงาน | | | | | | ← → |

**7. งบประมาณของโครงการวิจัย**

ไม่มีค่าใช้จ่าย

หมายเหตุ :

1. ใช้ Reagent และตัวอย่าง ที่ใช้ในงานประจำของงานอณูพยาธิวิทยา สถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์ ในการศึกษาครั้งนี้
2. ใช้ Reagent ตัวอย่างที่บริษัท กิบไทย จำกัด ให้ความอนุเคราะห์

**8. วิธีการและผลการทดลอง**

8.1 การคัดเลือกตัวอย่างที่นำมาใช้ในการศึกษาวิจัย

ทำการคัดเลือกตัวอย่างจากบล็อกชิ้นเนื้อที่ส่งมาตรวจวิเคราะห์ของงานอณูพยาธิวิทยาจำนวน 30 ตัวอย่าง โดยเลือกจากบล็อกที่มีชิ้นเนื้อขนาดใหญ่ ซึ่งตัวอย่างทั้งหมดเป็นดังตารางที่ 1

| No. | ชนิดของชิ้นเนื้อ | Test |
|---|---|---|
| 1 | Tissue biopsy from right hip joint | TB |
| 2 | Lymph node, right axillary region | TB |
| 3 | Lymph node, right cervical | TB |
| 4 | Neck mass, biopsy | TB |
| 5 | Bone marrow, biopsy | TB |
| 6 | Right cervical lymph node | TB |
| 7 | Lung mass, left upper lobe | EGFR |
| 8 | Esophageal ulcer | TB |
| 9 | Left supraclavicular lymph node | RAS |
| 10 | Pleural tapping | EGFR |
| 11 | Rectal mass, punch biopsy | KRAS |

| | | |
|---|---|---|
| 12 | Sigmoid colon, biopsy | RAS |
| 13 | Tissue from brain lesion | EGFR |
| 14 | Brain, right occipital, tumor removal | EGFR |
| 15 | Rectum and sigmoid colon,colectomy | RAS |
| 16 | Lung, right lower, lobectomy | EGFR |
| 17 | Cervical lymph node biopsy | EGFR |
| 18 | Rectal mass, punch biopsy | RAS |
| 19 | Left retroperitoneal mass | RAS |
| 20 | Rectum, resection | NRAS |
| 21 | Pleural tissue, left lung, biopsy | EGFR |
| 22 | Lung tissue, left upper lobe, lobectomy | EGFR |
| 23 | Rectum, biopsy | RAS |
| 24 | Pleura, left, incisional biopsy | EGFR |
| 25 | Small bowel biopsy (ileum) | TB |
| 26 | Lung, left upper lobe, LB3, biopsy | EGFR |
| 27 | Right supraclavicular lymph node | TB |
| 28 | Left cervical lymph node | TB |
| 29 | Mass in descending colon,polypectomy | RAS |
| 30 | Right pleural effusion | EGFR |

8.2 ทำการตัดชิ้นเนื้อจากพาราฟินบล็อกที่ความหนา 7 ไมครอน จำนวน 7-10 แผ่น ใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรจำนวน 2 หลอด จากนั้นทำการ deparaffin ด้วยสารเคมี xylene และ absolute ethanol เมื่อได้แล้ว นำตัวอย่างจากแต่ละหลอดไปทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด 2 ชนิดคือ QIAmp® DNA FFPE Tissue Kit ที่ใช้หลักการของ silica membrane เป็นตัวจับดีเอ็นเอที่อยู่ในตัวอย่าง และชุดสกัด MagPurix® Tissue DNA Extraction Kit ซึ่งใช้หลักการของ magnetic bead เป็นตัวจับดีเอ็นเอและชุดสกัดชนิดนี้จะทำงานแบบอัตโนมัติ เมื่อได้ดีเอ็นเอจากชุดสกัดทั้ง 2 ชนิดแล้ว นำมาวัดปริมาณและ purity (ratio 260/280 และ 260/230) ของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง nanodrop ผลที่ได้ดังตารางที่ 2

| No. | test | QIAmp® DNA FFPE Tissue Kit | | | MagPurix® Tissue DNA Extraction Kit | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Conc (ng/ul)* | $A_{260}/A_{280}$ | $A_{260}/A_{230}$** | Conc (ng/ul)* | $A_{260}/A_{280}$ | $A_{260}/A_{230}$** |
| 1 | TB | 566.9 | 2.00 | 2.22 | 31.6 | 1.99 | 1.55 |
| 2 | TB | 1925.6 | 2.00 | 2.26 | 292 | 2.01 | 1.96 |
| 3 | TB | 1694.3 | 1.95 | 2.21 | 120.9 | 1.84 | 1.95 |
| 4 | TB | 1657.9 | 1.99 | 2.27 | 292.6 | 2.05 | 2.11 |
| 5 | TB | 823.2 | 1.84 | 2.20 | 19.5 | 2.05 | 1.15 |
| 6 | TB | 1039.1 | 1.94 | 2.29 | 133.6 | 1.89 | 1.74 |
| 7 | EGFR | 995.3 | 1.99 | 2.18 | 49 | 1.64 | 0.83 |
| 8 | TB | 98 | 1.90 | 2.46 | 3.7 | 2.19 | 0.98 |
| 9 | RAS | 1971.5 | 1.99 | 2.14 | 99.7 | 1.95 | 1.86 |
| 10 | EGFR | 320.3 | 1.84 | 2.25 | 18.5 | 2.09 | 1.02 |
| 11 | KRAS | 1019.4 | 2.00 | 2.26 | 57.3 | 1.95 | 1.76 |
| 12 | RAS | 161.8 | 1.99 | 2.22 | 10.0 | 2.04 | 0.72 |
| 13 | EGFR | 784.2 | 1.91 | 2.28 | 33.1 | 1.95 | 1.40 |
| 14 | EGFR | 1459.5 | 1.93 | 2.15 | 113.2 | 1.92 | 1.78 |
| 15 | RAS | 955.4 | 1.92 | 2.21 | 47.6 | 1.89 | 1.66 |
| 16 | EGFR | 430.6 | 1.79 | 2.13 | 13.4 | 1.74 | 1.29 |
| 17 | EGFR | 472.4 | 1.97 | 2.20 | 19.5 | 1.93 | 1.37 |
| 18 | RAS | 180.3 | 1.85 | 2.19 | 9.2 | 1.77 | 0.81 |
| 19 | RAS | 462.3 | 1.95 | 2.18 | 24.9 | 1.97 | 1.33 |
| 20 | NRAS | 2767.9 | 1.99 | 2.20 | 161.7 | 1.97 | 2.00 |
| 21 | EGFR | 124.5 | 1.92 | 2.22 | 20.7 | 1.80 | 1.78 |
| 22 | EGFR | 2987.8 | 1.96 | 2.21 | 228.5 | 2.00 | 2.08 |
| 23 | RAS | 929 | 2.01 | 2.19 | 151.2 | 1.97 | 2.07 |
| 24 | EGFR | 238.9 | 2.00 | 2.22 | 22.0 | 1.88 | 1.81 |
| 25 | TB | 2164.5 | 1.94 | 2.24 | 79.3 | 1.95 | 1.89 |
| 26 | EGFR | 402.3 | 1.95 | 2.28 | 27.3 | 1.89 | 1.85 |
| 27 | TB | 563.6 | 2.00 | 2.20 | 45.7 | 1.99 | 1.91 |
| 28 | TB | 1277.7 | 2.01 | 2.24 | 64.9 | 1.94 | 1.97 |
| 29 | RAS | 2421.1 | 1.98 | 2.27 | 165.8 | 2.03 | 1.85 |
| 30 | EGFR | 243.4 | 1.95 | 2.28 | 15.7 | 1.92 | 1.38 |

พบว่าชุดสกัด QIAmp® DNA FFPE Tissue Kit สามารถสกัดดีเอ็นเอได้ปริมาณมากกว่าชุดสกัด MagPurix® Tissue DNA Extraction Kit อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อเปรียบเทียบ purity ของดีเอ็นเอจากชุดสกัดทั้ง 2 ชนิดที่ ratio 260/280 จะไม่มีความแตกต่างกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบ purity ของดีเอ็นเอจากชุดสกัดทั้ง 2 ชนิดที่ ratio 260/230 พบว่าดีเอ็นเอที่ได้จากชุดสกัด QIAmp® DNA FFPE Tissue Kit มี purity ที่ดีกว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากชุด MagPurix® Tissue DNA Extraction Kit อย่างมีนัยสำคัญ

8.3 นำดีเอ็นเอที่ได้จากชุดสกัดทั้ง 2 ชนิดมาทำการเปรียบเทียบคุณภาพในการ amplify ด้วยเทคนิค Realtime PCR โดยทำการตรวจวัดการ amplify ของดีเอ็นเอ 3 ขนาดได้แก่ 100 bp, 200 bp และ 300 bp โดยการติดฉลากสารเรืองแสงที่มีความแตกต่างกัน ผลดังตารางที่ 3

| | **QIAmp® DNA FFPE Tissue Kit** | **MagPurix® Tissue DNA Extraction Kit** |
|---|---|---|
| **100 bp** | 30 ตัวอย่าง | 25 ตัวอย่าง |
| **200 bp** | 22 ตัวอย่าง | 17 ตัวอย่าง |
| **300 bp** | 0 ตัวอย่าง | 0 ตัวอย่าง |

**9. สรุปผลการทดลอง**

| | QIAmp® DNA FFPE Tissue Kit | MagPurix® Tissue DNA Extraction Kit |
|---|---|---|
| ระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการ | ประมาณ 1 ชม. 15 นาที | ประมาณ 1 ชม. |
| ลักษณะการทำงานของแต่ละชุดสกัด | ผู้ปฏิบัติงานทำเองทุกขั้นตอน | เครื่องทำงานแบบอัตโนมัติ |
| ราคา | 214 บาท/ 1 ตัวอย่าง | 120 บาท/ 1 ตัวอย่าง<br>(***ยังไม่รวมค่าเครื่องมือ) |
| ปริมาณ DNA ที่ได้ | QIAmp > MagPurix | |
| คุณภาพของ DNA | DNA จากชุดสกัด QIAmp คุณภาพดีกว่า | |

เมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาและลักษณะการทำงานของชุดสกัดทั้ง 2 ชนิด แม้ว่าชุดสกัดชนิด QIAmp® DNA FFPE Tissue Kit จะมีขั้นตอนที่ยุ่งยากและใช้เวลานานกว่าแต่ปริมาณดีเอ็นเอและคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้จากชุดสกัดชนิดนี้ดีกว่าดีเอ็นเอที่ได้ชุดสกัด MagPurix® Tissue DNA Extraction Kit ดังนั้น QIAmp® DNA FFPE Tissue Kit จึงเป็นชุดสกัดที่เหมาะสมจะใช้ในงานอณูพยาธิวิทยาต่อไป