การประเมินวิธีการทั้งสามรูปแบบสำหรับการสกัดดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพจากเส้นผมของมนุษย์

Evaluation of three methods for effective extraction of DNA from human hair

510 702 สัมมนาสำหรับนิติวิทยาศาสตร์ 1 ภาคต้น ปีการศึกษา 2553

ผู้ให้สัมมนา ว่าที่ร.ต.หญิง กัญญารัตน์ ยาประเสริฐ รหัส 52312301

วัน เวลา สถานที่ ห้อง 4205 **อาคารวิทยาศาสตร์** 4

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้ประเมินวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นผมของมนุษย์ไว้3วีด้วยกัน คือ Chelex method, QIAamp® DNA Mini Kit และวิธี ISOHAIR® method โดยวีที่แนะนำในการวิเคราะห์ DNA จากเส้นผมทำสี คือวิธี ISOHAIR เนื่องจาก จะเกิดการขัดขวางการเกิดปฏิกิริยายับยั้งในเทคนิค PCR ซึ่งกล่าวได้คือ มีตัวยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาน้อย เมื่อเทียบกับการสกัด DNA จากเส้นผมทำสีในวิธี Chelex และ QIAamp DNA Mini Kit

สรุป คือ แนะนำให้ใช้วิธี Chelex สำหรับการทำ PCR กับตัวอย่างเส้นผม เนื่องจากมีวิธีการสกัดที่ค่อนข้างง่าย และราคาถูก นอกจากนี้ ยังมีความน่าเชื่อถือสำหรับการสกัด genomic DNA ทั้งจากเส้นผมสีดำธรรมชาติ และเส้นผมทำสี และเมื่อมีการเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ Minisatellite Variant Repeat – Polymerase Chain Reaction (MVR-PCR) ที่สกัดด้วยวิธี Chelex จากการใช้เส้นผม (เส้นผมดำธรรมชาติ 3 ตัวอย่าง และ เส้นผมทำสี 3 ตัวอย่าง) เปรียบเทียบกับการสกัด DNA จาก Buccal swab จากทั้ง 6 ตัวอย่าง พบว่า ผลการวิเคราะห์มีความสอดคล้องกันระหว่างตัวอย่างจากเส้นผม และตัวอย่างเยื่อบุกระพุ้งแก้มของแต่ละคน

Keywords : DNA extraction; Hair analysis; Polymerase chain reaction inhibitor

บทที่1
บทนำ

เมื่อไม่นานมานี้เราใช้ปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) ในการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอในเส้นผมที่เป็นหลักฐานสำคัญในทางนิติวิทยาศาสตร์ แต่ปริมาณนิวเคลียร์ดีเอ็นเอใน DNAs ที่ได้จากเส้นผมมีปริมาณที่น้อยมาก ดังนั้น ในหลายการศึกษาจึงใช้ mtDNA ที่มีอยู่เป็นจำนวนมาก และค่อนข้างที่จะสมบูรณ์มากกว่า เพราะDNAs มีน้อยเกินกว่าที่จะนำมาเพิ่มปริมาณได้ โดยเฉพาะที่ได้มาจากเส้นผมธรรมชาติ หรือเป็นเส้นผมที่ถูกดึงมา มากกว่าที่จะเป็นรากผม นอกจากนี้ ถึงแม้ว่าการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นผมจะได้ดีเอ็นเอในปริมาณที่มากพอก็ตาม แต่ก็มักจะไม่ประสบความสำเร็จในการนำมาเพิ่มปริมาณโดยเทคนิค PCR ได้อยู่ดี ด้วยเหตุนี้จึงเป็นการแสดงให้เห็นว่า ในการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเส้นผมนั้น อาจจะเกิดตัวยับยั้งปฏิกิริยา PCR ขึ้น ซึ่งตรงกับการศึกษาวัจัยก่อนหน้านี้ที่ได้ให้ข้อมูลว่า รงควัตถุ เมลานิน ในเส้นผมเป็นตัวที่ทำให้เกิดสารที่มีผลเป็นอย่างมากในการยับยั้งปฏิกิริยา PCR

ดังนั้น ในงานวิจัยนี้ จึงได้ทำการประเมินวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นผมของมนุษย์ไว้ 3 วิธีด้วยกัน ซึ่งก็คือ Chelex method, QIAamp®DNA Mini Kit และวิธี ISOHAIR®method เพื่อให้ทราบว่าวิธีการสกัดไหนที่ทำให้ได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพและปราศจากสารที่เป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยา PCR เพื่อจะไม่เป็นอุปสรรค์ในการที่จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งยีนของโครโมโซม DIS8 (MS 38) โดยที่ Minisatellite variant Repeat-Polymerase chain Reaction (MVR-PCR)

สุดท้ายนี้ เมื่อทำการศึกษาว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเส้นผมด้วยวิธี Chelex โดยเฉพาะเส้นผมที่มีการทำสี ที่นำมาเป็นตัวอย่าง genomicDNA และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับ MVR-PCR Patterns ของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากรากผม กับดีเอ็นเอที่ได้จากเยื่อบุกระพุ้งแก้ม

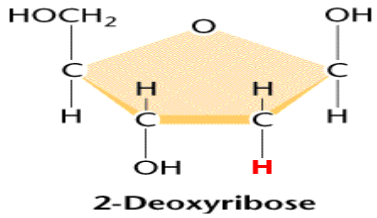
บทที่2
ทบทวนวรรณกรรม
การตรวจดีเอ็นเอทางนิติวิทยาศาสตร์
(DNA testing in forensic medicine)

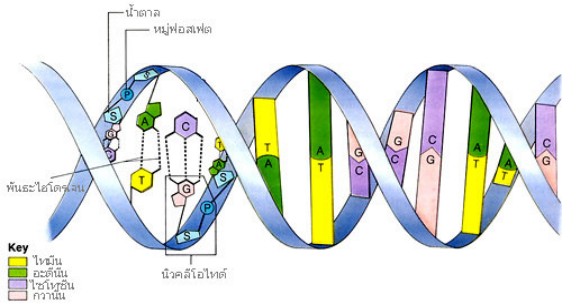
ในการตัดสินคดีความส่วนใหญ่มักอาศัยหลักฐานที่ได้มาจากการสอบสวนพยานรู้เห็น ค้นหาวัตถุและร่องรอยต่างๆ จากที่เกิดเหตุ ซึ่งมักจะเป็นข้อเท็จจริงในการสืบค้นหาผู้ที่กระทำความผิด นอกจากนี้แล้ว มีความจำเป็นที่จะต้องนำความรู้ทางวิทยาศาสตร์มาสนับสนุนข้อเท็จจริงดังกล่าว เพื่อค้นหาผู้กระทำความผิดที่แท้จริง ซึ่งเรียกว่า นิติวิทยาศาสตร์ (Forensic science) อันเป็นกระบวนการที่ประกอบด้วยการพิสูจน์บุคคลจากลายพิมพ์นิ้วมือ ลักษณะเส้นผม การบันทึกมิติของกระดูกส่วนต่างๆ ของร่างกาย การตรวจหมู่เลือด และโปรตีนบนผิวเซลล์เม็ดเลือด เป็นต้น กระทั่งปัจจุบันเทคโนโลยีทางพันธุศาสตร์ได้เข้ามามีบทบาทในเรื่องนี้เป็นอย่างมาก โดยการใช้วิธีการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting หรือ DNA profiling) ซึ่งเป็นที่นิยมที่สุดในปัจจุบัน เนื่องจากเป็นการตรวจที่ให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการพิสูจน์ความจริงอย่างมากมาย และมักเป็นเครื่องช่วยไขปริศนาอันมืดมนในคดีความที่สำคัญหลายคดี

โครงสร้างทางกายภาพและทางเคมีของดีเอ็นเอ
(Physical and chemical structure of DNA)

DNA เป็นชื่อย่อของสารพันธุกรรม มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า กรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (Deoxyribonucleic acid) ซึ่งเป็นกรดนิวคลีอิกที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยๆ ที่เรียกว่านิวคลีโอไทด์ (nucleotide) มาเชื่อมต่อกันเป็นสายยาวที่เรียกว่าโพลีนิวคลีโอไทด์ (polynucleotide) โดยโมเลกุลของดีเอ็นเอประกอบด้วยสายโพลีนิวคลีโอไทด์ 2 สาย ซึ่งนิวคลีโอทด์แต่ละโมเลกุล ประกอบด้วย

1. **น้ำตาลเพนโตส (pentose sugar)** คือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม เป็นองค์ประกอบ มีโครงสร้างเป็นวงแหวน ซึ่งในดีเอ็นเอจะเป็นน้ำตาลดีออกซีไรโบส (Deoxyribose sugar) ซึ่งเป็นน้ำตาลเพนโตสที่มีหมู่ไฮดรอกซี(hydroxyl ; OH) ของคาร์บอนอะตอมในตำแหน่งที่ 2 หายไป ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลที่พบในเซลล์สัตว์และเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอ





ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของน้ำตาลดีออกซีไรโบส (**ที่มา** Tamarin 1998, นิพนธ์ ศรีนฤมล)

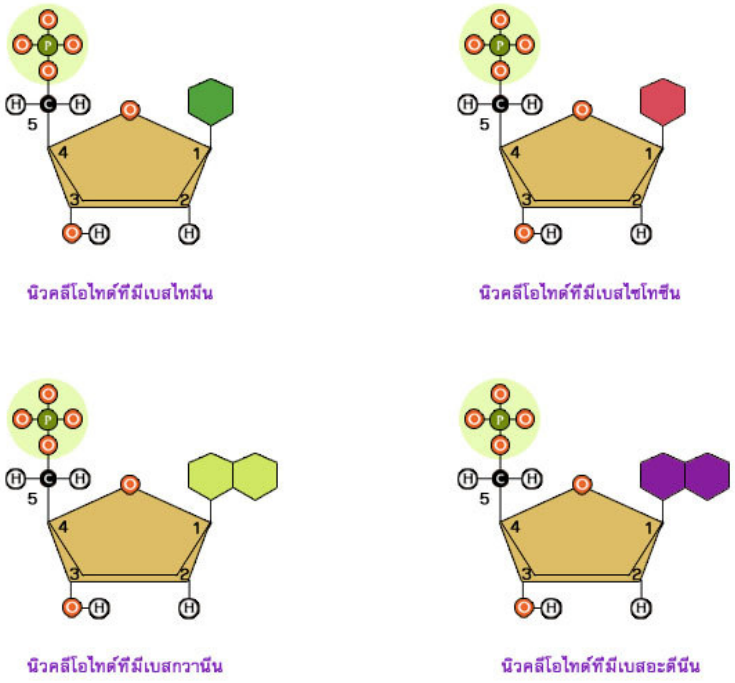
2.ไนโตรจีนัสเบส (Nitrogenous base) แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

2.1 เบสพิวรีน (purine)

เป็นเบสที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวน 2 วง มี 2 ชนิด ได้แก่ อะดีนีน(Adenine;A) และกัวนีน (Guanine;G)

2.2 ไพริมิดีน(Pryimidine)

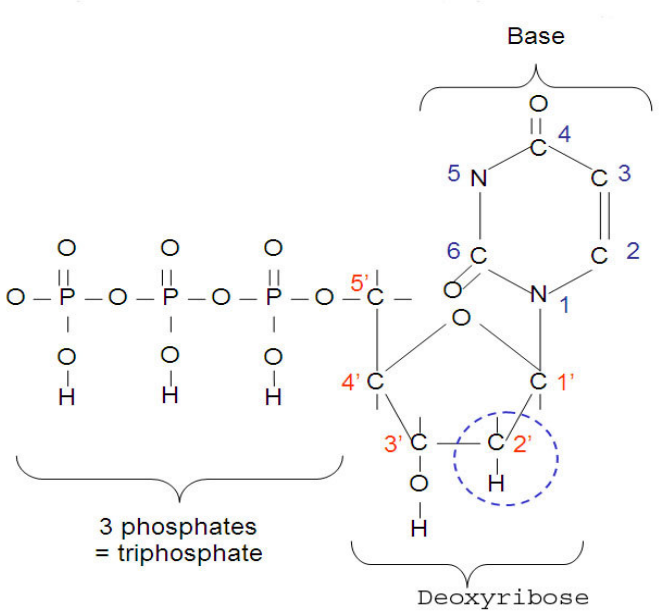
เป็นเบสที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวน 1 วง ซึ่งเบสในกลุ่มนี้มี 3 ชนิดคือ ไทมีน(Thymine;T), ไซโตซีน(Cytosine;C) และ ยูราซิล(Urasil;U)ซึ่งพบได้เฉพาะใน RNA



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างนิวคลีโอไทด์ที่มีเบสชนิดต่างๆ ซึ่งเป็นองค์ประกอบของ DNA

(**ที่มา**http://cs4940207547.site90.com/cs4940207227/)

3. หมู่ฟอสเฟต (Phosphate group) หมู่ฟอสเฟตจะเข้าจับกับอะตอมของออกซิเจน (O) ของหมู่ไฮดรอกซี (HO) ที่อะตอมของคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 หรือ 3 หรือ 2 ของน้ำตาลเพนโตส (C_5 หรือC_3 หรือC_2) ด้วยพันธะเอสเทอร์ กลายเป็นสารประกอบที่เรียกว่านิวคลีโอไทด์ (Nucleotide)



ภาพที่2.3 โครงสร้างของนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ ที่ประกอบด้วย ดีออกซีไรโบส เบส และหมู่ฟอสเฟต (**ที่มา** learners.in.th)

จีโนมมนุษย์ (Human genome)

ในจีโนมหรือดีเอ็นเอทั้งหมดของมนุษย์ ประกอบด้วยลำดับเบส (Base sequence) ประมาณ 3 พันล้านลำดับเบส ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 2 ส่วน ดังนี้

1. ดีเอ็นเอส่วนที่เป็นยีน (Gene)

มีประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ของดีเอ็นเอทั้งหมดในมนุษย์ สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ส่วน คือ

1.1 ส่วนที่เป็นรหัสพันธุกรรม (Codon sequence) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่มีรหัสพันธุกรรม (exon) ที่สามารถลอกรหัสและแปรรหัสเป็นสายโพลีเปปไทด์ได้ โดยส่วนที่เป็นรหัสพันธุกรรมจะน้อยกว่า 10 เปอร์เซนต์ ของส่วนที่เป็นยีน

1.2 ส่วนที่ไม่เป็นระหัส (Non-codon) ซึ่งเป็นส่วนของ intron มีจำนวนมากกว่า 90 เปอร์เซนต์ของส่วนที่เป็นยีน

2. ดีเอ็นเอส่วนที่ไม่ใช่ยีน (Non-gene)

พบว่ามีประมาณ 80 เปอร์เซนต์ ของดีเอ็นเอทั้งหมดในมนุษย์ แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ

2.1 ดีเอ็นเอที่มีเบสซ้ำ (Repetitive DNA) มีประมาณ 20-30 เปอร์เซนต์ของดีเอ็นเอในส่วนที่ไม่ใช่ยีน ซึ่ง repetitive DNA แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ

2.1.1 เบสซ้ำต่อเนื่อง (Tandem repeat) คือ เบสซ้ำที่มีลำดับการเรียงตัวของเบสซ้ำต่อกันเป็นช่วงยาว ได้แก่ Satellite, Minisatellite และ Microsatellite ซึ่งแบ่งตามจำนวนซ้ำและความยาวของหน่วยซ้ำ ดังนี้

2.1.1.1 Satellite (Highly repetitive DNA) คือเบสซ้ำขนาด 1-6 เบส ฟรือเบสซ้ำยาวขนาดหลายร้อยเบส โดยมีจำนวนซ้ำแต่ละตำแหน่งตั้งแต่ 10^3-10^7 ครั้ง

2.1.1.2 Minisatellite (Moderately repetitive DNA หรือ Variable number of tandem repeat; VNTR) คือเบสขนาด 9-100 เบส ที่มีจำนวนซ้ำแต่ละตำแหน่งตั้งแต่ 10-1,000 ครั้ง

2.1.1.3 Microsatellite (Simple sequence repeats; SSR หรือ Short tandem repeats; SSTR) คือเบสซ้ำขนาด 1-6 โดยที่มีจำนวนซ้ำในแต่ละตำแหน่งไม่เกิน 100 ครั้ง

2.1.2 เบสซ้ำกระจาย (Interspersad repeats) คือกลุ่มของเบสซ้ำที่พบกระจายอยู่ที่บริเวณต่างๆในจีโนม ในลักษณะที่ต่างจากกลุ่มเบสซ้ำแบบต่อเนื่อง คือไม่พบซ้ำกันเป็นช่วงต่อเนื่องแต่จะอยู่ในลักษณะเดี่ยว (Individual unit) กระจายทั่วไปหลายๆแห่งในจีโนม ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อยตามความยาวของเบสซ้ำ

2.1.2.1 Short interspersed element (SINES) คือ เบสกระจายแบบสั้น มีขนาดประมาณ 130-300เบส

2.1.2.2 Long interspersed element (LENES) คือเบสกระจายแบบสั้น มีขนาดตั้งแต่ 500 เบสขึ้นไป พบประมาณ 1-2 ดปอร์เซนต์ ของจีโนม

2.2 ลำดับเบสเฉพาะ มีปริมาณ 70-80 เปอร์เนต์ ของดีเอ็นเอส่วนที่ไม่ใช่ยีน

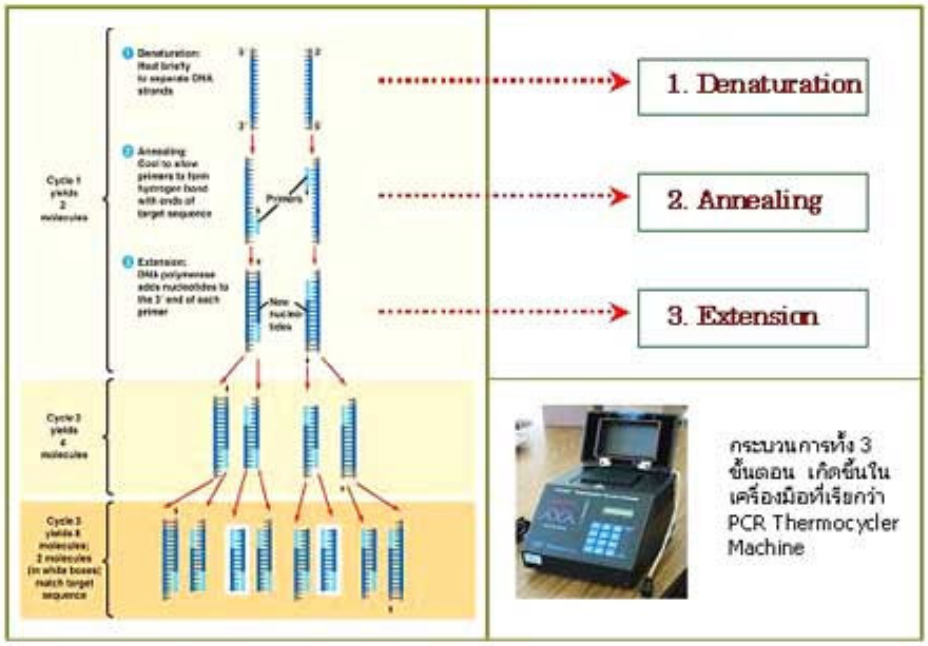
เทคนิคพีซีอาร์

(PCR, Polymerase Chain Reactioin)

เป็นเทคนิคเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมคือดีเอ็นเอ ให้มีปริมาณมากเป็นล้านเท่า ในระยะเวลาอันรวดเร็ว โดยอาศัยหลักการจำลองตัวของสายดีเอ็นเอ (DNA Replication) เลียนแบบกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติ ที่มีการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่อีกหนึ่งสายจากดีเอ็นเอเดิม

หลักการ

ใช้หลักการพื้นฐานในการเพิ่มดีเอ็นเอด้วยการจำลองดีเอ็นเอสายใหม่จากสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบหนึ่งสาย **ด้วย**เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) โดยใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้นหรือไพรเมอร์ (Primer) 1 คู่ ทำให้สังเคราะห์ดีเอ็นเอได้คราวละ 2 สายพร้อมกัน ประกอบด้วยปฏิกิริยาสำคัญ 3 ขั้นตอน และหมุนเวียนต่อเนื่องกันไป ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน



ภาพที่ 2.4 หลักการของเทคนิค PCR

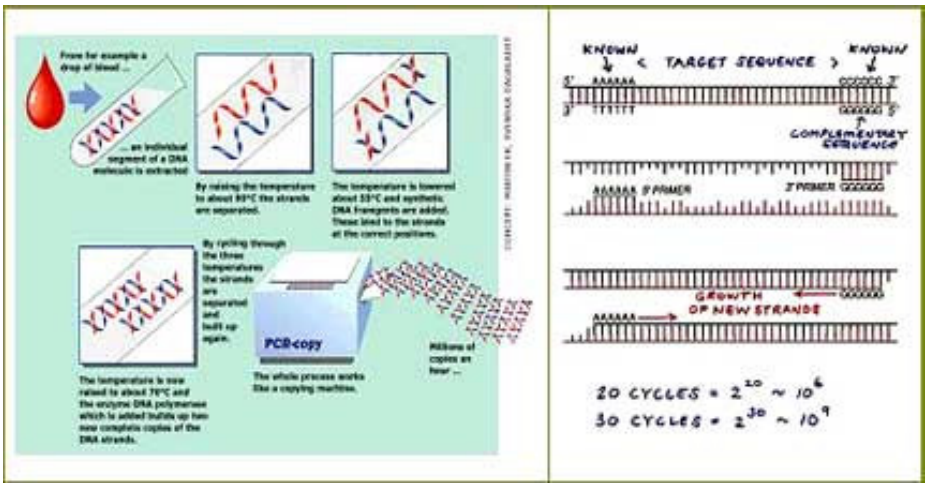
(**ที่มา** http://www.pseudomonassyringae.org/Outreach/Module_3_Home.htm)

ขั้นแรก เรียกว่า Denaturation เป็นการแยกสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิในช่วง92-95องศาเซลเซียส

ขั้นที่สอง เรียกว่า Annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงอยู่ในช่วง 50-60 องศาเซลเซียส และใช้ไพรเมอร์ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้น ๆ (ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 17-24 เบส) ที่มีลำดับเบสเป็นเข้าคู่กับสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน

ขั้นที่สาม เรียกว่า Extension หรือ Synthesis of new DNA ซึ่งเป็นขั้นตอนการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลายของไพรเมอร์ (ที่ใส่เข้าไปในขั้นที่สอง) ตามข้อมูลบนดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของเอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรส(DNA polymerase) ซึ่งเอนไซม์นี้ทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72-75 องศาเซลเซียส

จากขั้นตอนที่ 1-3 ซึ่งนับเป็นจำนวน 1 รอบ (One cycle) ให้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สม (หรือเข้ากัน) กับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบ เพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า และเมื่อจัดให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่จากขั้นที่ 1 ถึง 3 หมุนเวียนไปอีกหลาย ๆ รอบ จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จำนวนมาก ประมาณว่าปฏิกิริยา 30 - 40 รอบ สามารถเพิ่มปริมาณสารดีเอ็นเอได้ไม่น้อยกว่าพันล้านเท่า ดังนั้น แม้ตัวอย่างที่นำมาศึกษามีปริมาณสารพันธุกรรมน้อยมาก เราก็ใช้เทคนิคพีซีอาร์เพิ่มจำนวนได้หลายเท่าทวีคูณ



ภาพที่ 2.5 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในปฏิกิริยาPCR

(**ที่มา** http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/illpres/pcr.html)

เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR machine)

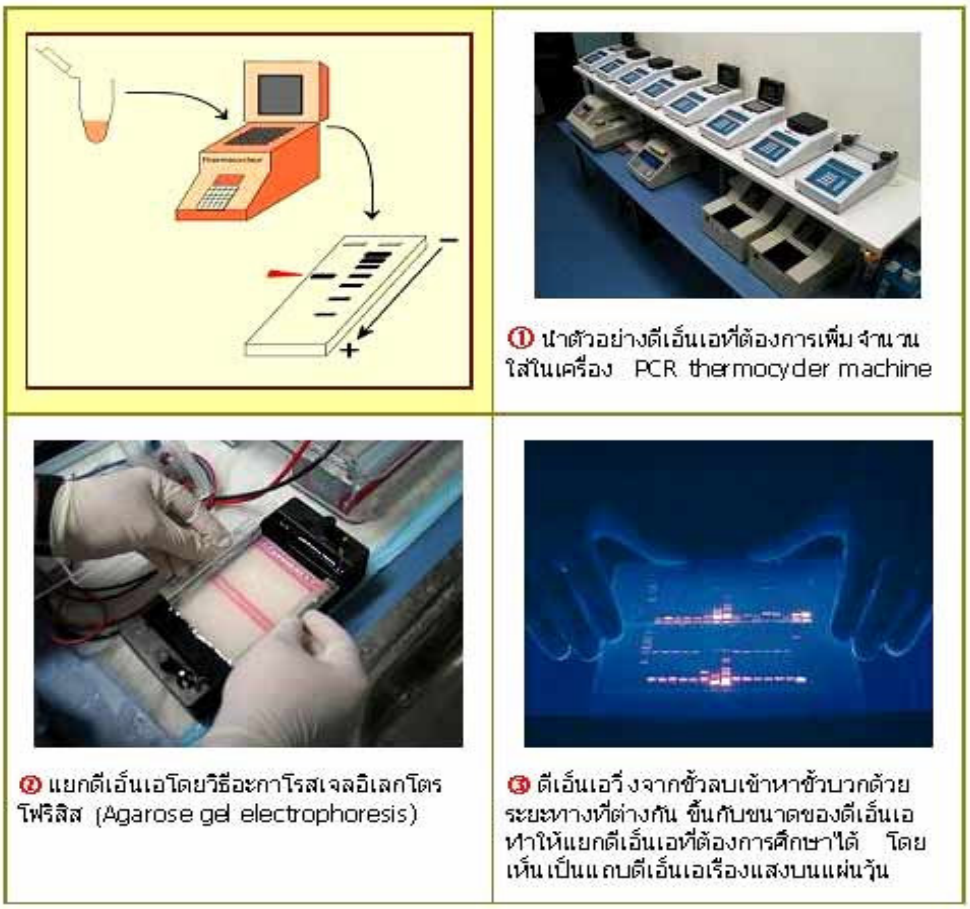
เครื่อง Thermal cycler หรือ PCR machine เป็นเครื่องที่จำเป็นในการทำ PCR ซึ่งเครื่องนี้มีอยู่หลายแบบ และหลายระบบขึ้นกับการออกแบบและการคิดค้นของบริษัท ผู้ผลิต ข้อสำคัญคือต้องสามารถปรับเปลี่ยนอุณหภูมิได้เป็นขั้นตอน ตามที่ตั้งไว้และทำงานหมุนเวียนกันหลาย ๆ รอบได้ตั้งโปรแกรมการทำงานได้และการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ในแต่ละขั้นตอนใช้ระยะเวลาไม่นานนักระยะเวลาที่ใช้แต่ละขั้นคือ denaturing annealing และ extension อยู่ในช่วง 15 วินาที ถึง 10 นาที ดังนั้นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR 25-40 รอบ จะใช้เวลาประมาณ 1.5-5 ชั่วโมง

ภาพที่ 2.6 เครื่อง Thermal cycler หรือ PCR machine

(**ที่มา** http://www.molecularstation.com)

อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริสิส (Agarose gel electrophoresis)

ดีเอ็นเอที่เกิดจากเทคนิคPCRในหลอดทลอง มองไม่เห็นด้วยตาเปล่า ดังนั้นเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอผลผลิต ต้องนำตัวอย่างที่ทำพีซีอาร์มแยกหาดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริสิส (Agarose gel electrophoresis) ซึ่งเป็นการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นวุ้น (Agarose gel) โดยระยะทางที่ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ไปได้ขึ้นกับขนาดของดีเอ็นเอและกระแสไฟฟ้าที่ใช้ ดีเอ็นเอที่แยกโดยวิธีนี้มองเห็นได้เมื่อย้อมด้วยสีพิเศษ ซึ่งเรืองแสงภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต



ภาพที่ 2.7 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริสิส (Agarose gel electrophoresis)
(**ที่มา** http://www.griffith.edu.au/centre/grc/general/volunteers_myBlood3.html)

เส้นผม/เส้นขน กับ กระบวนการนิติวิทยาศาสตร์

(Hair and Forensic Science)

เส้นผมและเส้นขนเป็นพยานหลักฐานที่พบอยู่เสมอในอาชญากรรมที่มีการสัมผัสทางร่างกายกัน เช่นฆาตกรรม ข่มขืน ทำร้ายร่างกาย อุบัติเหตุจราจร ฯลฯ เส้นผมหรือเส้นขนอาจพบอยู่ในสถานที่เกิดเหตุ ตามร่างกายของผู้เสียหาย หรือผู้ต้องสงสัย ติดอยู่ที่อาวุธ เครื่องมือ ยานพาหนะ หรือตามเสื้อผ้าเครื่องแต่งกาย คดีความผิดทางเพศ โดยเฉพาะในกรณีที่มีการข่มขืนกระทำชำเรา ผู้ตรวจจะต้องนึกถึงวัตถุพยานที่เป็นเส้นขน บริเวณอวัยวะเพศด้วยเสมอนอกเหนือจากคราบอสุจิ เพราะมักพบหลุดร่วงตกหล่นอยู่ในบริเวณที่เกิดเหตุแม้กระทั่งตกหล่นอยู่ตามร่างกาย หรือภายในช่องคลอด และทวารหนักของผู้เสียหายหรือผู้ตาย ด้วยวัตถุพยานประเภทนี้มีความคงทนต่อสภาพแวดล้อม และมีความสำคัญอย่างมากในการ พิสูจน์หาผู้เป็นเจ้าของ ไม่ว่าจะ เป็นการตรวจเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพเพื่อให้ทราบว่าเป็นเส้น-ผม เส้นขนของบุคคลใด ซึ่งการตรวจลักษณะทางกายภาพของเส้นผม/เส้นขนนั้น ต้องกระทำโดยผู้ที่มีความชำนาญ และมีประสบการณ์สูงเท่านั้น

นอกจากนี้หากพบว่ามีรากผมสามารถนำมาตรวจหาเพศว่าเป็นชายหรือหญิงตรวจหาหมู่เลือด อีกทั้งตรวจหาลักษณะทางพันธุกรรม (DNA) เพื่อการยืนยันตัวบุคคล และในกรณีที่ไม่มีรากผม/รากขนติดมาด้วย ก็สามารถนำมาตรวจหาสารพันธุกรรมจาก mitochondrial DNA ที่มีอยู่ในเส้นผม/เส้นขนได้เส้นขนในแต่ละส่วนของร่างกายคนเรามีหลายแบบ ไม่เหมือนกันคนเรามีขนหลายชนิด ภาษาไทยเรียกขนบนศีรษะว่า ผม แต่ขนที่อื่นเรียกว่า ขน ส่วนภาษาอังกฤษเรียกว่า Hair หมดทุกที่ แบ่งออกเป็น 3 ลักษณะ คือ

1.ขนเทอร์มินัล (Terminal hair) เป็นขนที่มีเส้นหนาบนศีรษะ ขนชนิดนี้นอกจากพบที่ศีรษะแล้วอาจจะพบได้ที่ หัวเหน่า รักแร้ หน้าอก หากขาดหายไปจะทำให้เกิดภาวะผมบาง หรือหัวล้านนั่นเอง

2. ขนเวลลัส (Vellus hair) เป็นขนอ่อนที่มักพบตามหน้า ตามลำตัว ที่แขนขาของเด็ก และผู้หญิง

3.ขนลานูโก (Lanugo hair) เป็นขนอุยที่พบตามตัวทารก มักไม่มีสี แม้ว่าขนอุยนี้จะไม่มีประโยชน์อะไรมากนัก แต่เป็นต้นตอที่จะเจริญพัฒนาไปเป็นขนเทอร์มินัลหรือขนเวลลัสได้

ลักษณะของเส้นผมมนุษย์

เส้นผมของมนุษย์เป็นส่วนของระบบผิวหนังเจริญจากHair Follicle ที่ฝังในผิวหนังเมื่อเจริญงอกออกมาพ้นผิวหนัง มีอัตราการเจริญวันละ 0.2 - 0.5 มิลลิเมตรแบ่ง ออกเป็น 3 ส่วนคือ **1.** ราก (Root) เป็นส่วนที่ฝังอยู่ในส่วนของผิวหนัง **2.** เส้นผม (Shaft) **3.** ส่วนปลาย (Tip) ปกติจะแหลมนอกจากจะมีการตัดหรือถ้ามีการแปรงผมบ่อยๆ ส่วนปลายจะแตกเป็นเส้นเล็ก

วัตถุประสงค์ในการตรวจพิสูจน์เส้นผมเส้นขน

1.เป็นเส้นผมเส้นขนหรือไม่

2.เป็นเส้นผมเส้นขนมนุษย์หรือสัตว์

3.เป็นเส้นผมเส้นขนของบุคคลใด

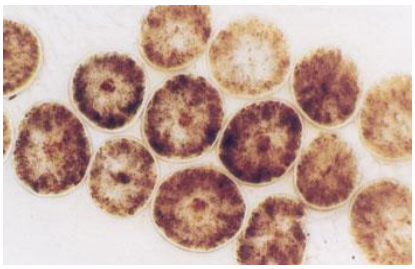
ประโยชน์ของเส้นผมเส้นขนต่อการสืบสวนสอบสวน

1. เชื่อมโยงผู้ต้องสงสัยกับสถานที่เกิดเหตุ
2. เชื่อมโยงผู้ต้องสงสัยกับอาวุธ
3. สนับสนุนคำให้การของพยาน
4. บอกถึงเส้นทางของคนร้ายในการเข้าและออกจากสถานที่เกิดเหตุ
5. สามารถพบได้ที่บริเวณหรือตามสิ่งต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับคดี เช่น ผู้ตาย สถานที่เกิดเหตุ อาวุธ เครื่องมือยานพาหนะ เสื้อผ้า และผู้ต้องสงสัย

ประโยชน์ที่ได้จากการตรวจเส้นผมเส้นขน

1. ทราบ Species คนหรือสัตว์
2. ทราบเชื้อชาติ Caucasoid , Negroid , หรือ Mongoloid เช่น

คนเอเชีย อินเดียแดง (Mongolian hair) เส้นผมจะมีเม็ดสีมากพอสมควรกระจายสม่ำเสมอ เส้นผมมักจะตรงและมีสีดำ cross section จะกลม medulla มักอยู่กลาง



รูปที่ 2.8 Cross-section of Mongoloid Hair

รูปที่ 2.9 Mongoloid Head Hair

(**ที่มา** http://mathildasanthropologyblog.wordpress.com/2008/07/03/racial-differences-in-scalp-hair/)

คนผิวขาว (Caucasian hair) เส้นผมแตกต่างกันทั้งขนาด ความหยาบ ความหงิกงอของเส้น ผม และความเข้มของสี cross section กลมหรือรีเล็กน้อย medulla จะอยู่หรือไม่อยู่ตรงกลางก็ได้ผม บรอนซ์ แดง หรือดำ เม็ดสีจะคล้ำ ถ้าผมสีอ่อน เม็ดสีเป็นสีส้มแดง เม็ดละเอียดหรือหยาบกระจายสม่ำเสมอ

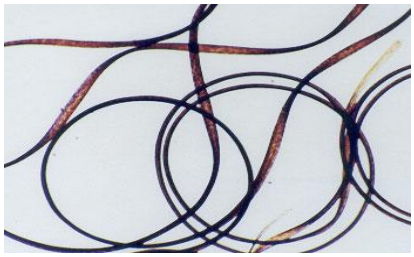
รูปที่ 2.10 Cross-section of Caucasian Hair

รูปที่ 2.11 Caucasian Head Hair

(**ที่มา** http://mathildasanthropologyblog.wordpress.com/2008/07/03/racial-differences-in-scalp-hair/)

คนผิวดำ (Negroid hair) เส้นผมจะหยิกมาก สีดำ cross section รีเล็กน้อย medulla จะเบี้ยวไปเล็กน้อย ไม่อยู่ตรงกลาง เม็ดสีมีสีเข้มและติดกันเป็นกลุ่ม

รูปที่ 2.12 Cross-section of Negroid Hair



รูปที่ 2.13 Negroid Head Hair

(**ที่มา** http://mathildasanthropologyblog.wordpress.com/2008/07/03/racial-differences-in-scalp-hair/)

3. ทราบอายุ

- วัยเด็กเด็กแรกเกิดเส้นผมจะอ่อนนุ่ม ละเอียด ไม่มีเม็ดสี ไม่มี medulla เมื่อเด็ก เจริญเติบโตขึ้นขนาดของเส้น ผมจะใหญ่ขึ้น เม็ดสีจะเพิ่มมากขึ้นและค่อยๆสร้าง medulla
- วัยหนุ่มสาว ขาดของเส้นผมใหญ่เต็มที่ มักจะมี medulla มีเม็ดสีมาก
- อายุ 40 ปีขึ้นไป เส้นผมจะเริ่มเปลี่ยนเป็นเทาและขาว ซึ่งจะไม่มีเม็ดสีเลย

4. ทราบเพศ ลักษณะทั่วไปเส้นผมของผู้ชายมักจะสั้นและหยาบกระด้างกว่าผู้หญิงหรืออาจตรวจยืนยันได้โดยดู sex chromatin

5. ตำแหน่งที่อยู่บนร่างกาย ศีรษะ คอ หน้าอก อวัยวะเพศ เป็นต้น

6. การบำรุงรักษา การย้อม ดัดหรือยืดเส้นผม การเคลือบสารบางตัว ฯลฯ

7. ลักษณะของการหลุดร่วง ถูกดึงเองตามธรรมชาติ ถูกตัด ในข้อนี้เป็นสิ่งที่ผู้ตรวจสามารถพิจารณาได้เองในสถานที่เกิดเหตุ จากการสังเกตดังนี้

- เส้นผมที่ถูกดึงหลุดออกมา จะมีส่วนของรากผมติดออกมาด้วย ซึ่งในส่วนของรากผมนี้สามารถใช้ในการตรวจหาเพศ หมู่เลือดได้

- เส้นผมที่หลุดร่วงตามธรรมชาติ จะไม่มีส่วนรากผมให้เห็น เนื่องจากรากผมฝ่อไป การตรวจพบเส้นผมจำนวนมากในสถานที่เกิดเหตุ ที่มีลักษณะการหลุดร่วงมาจากการถูกดึงนั้น ก็อาจหมายถึงว่ามีการต่อสู้กันในที่เกิดเหตุ หรือถ้าเป็นกรณีของการข่มขืน ก็อาจแสดงถึงการไม่ยินยอมพร้อมใจได้ นอกจากนี้การที่พบเส้นผมตกอยู่จำนวนมากในบริเวณใด ก็ยังอาจแสดงว่าบริเวณนั้นเป็นตำแหน่งจริงที่เกิดเหตุหรือบริเวณที่มีการต่อสู้กัน

วิธีการเก็บเส้นผมหรือเส้นขน

1. ใช้ไฟฉายส่องทำมุมเฉียงกับพื้น เพื่อตรวจหาเส้นผมหรือเส้นขนบนพื้นผิวในสถานที่เกิดเหตุ
2. ใช้ปากคีบคีบเส้นผมหรือเส้นขนขึ้นมาอย่างระมัดระวัง อย่าให้เส้นผมหรือเส้นขนแตกหรือหัก
3. บรรจุในซองกระดาษ หรือกระดาษพับปิดผนึกให้สนิท ระบุรายละเอียดให้เรียบร้อย (ห้ามใส่ในถุงหรือซองพลาสติก)

การตรวจหาเอกลักษณ์จากเส้นผม/เส้นขน(ของมนุษย์)

1. ตรวจลักษณะทั่วไป

-เส้นผมเส้นขนจะมีลักษณะภายนอกเป็นเนื้อเดียวกันไม่เป็นขุยหรือประกอบด้วยเส้นใยเล็กๆมารวมกันเหมือนกับเส้นใยอื่นๆ

- มีความคงทน เมื่อนำมาแช่นน้ำจะไม่เปื่อยขาดง่าย

2. ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์

- เส้นผมเส้นขนที่ไม่ถูกตัดขาดมาก่อนส่วนปลาย จะมีลักษณะเรียวแหลมหรือปลายอาจแตกออกเป็นเส้นเล็กๆ ส่วนผมตัดปลายจะมีขนาดใกล้เคียงกับโคน
- เส้นผมเส้นขนที่หลุดร่วงออกมาเองส่วนปลายที่เป็นรากจะมีลักษณะเป็นกระเปาะเล็กๆ
- ผิวส่วนนอกที่เรียกลายของเปลือกหุ้ม (cuticular scale)จะมีลักษณะเฉพาะคล้ายเกล็ดปลาเรียงซ้อนกัน
- ส่วนเนื้อของเส้นผมจะประกอบด้วย 2 ส่วนใหญ่ๆคือ ส่วน cortex จะโปร่งใสส่วนแกนกลาง (medulla) จะทึบแสง

3.การตรวจเปรียบเทียบเส้นผม/เส้นขน

วัสดุอุปกรณ์

- กล้องจุลทรรศน์
- แว่นขยาย
- กระจกสไลด์แบบแผ่นเรียบ
- ถาดแก้ว หรือถาดสแตนเลส
- ปากคีบ
- กรรไกร
- ผงซักฟอก หรือน้ำยาล้างจ้าน
- แอลกอฮอล์
- ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์
- เทปกาวใส
- ปากกาเขียนแก้ว
- แบบบันทึกรายละเอียด

ขั้นตอนการตรวจแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน

1. การตรวจลักษณะภายนอก

เป็นการตรวจลักษณะโดยสังเกตด้วยตาเปล่า หรือแว่นขยาย ได้แก่ ความยาว สีธรรมชาติ หรือถูกย้อมความโค้งงอ ความหยิกงอของลำเส้น ความหยาบ ความอ่อนนุ่ม หลุดร่วงเองหรือถูกดึงออกมีปลายหรือมีรากหรือไม่แบบใด ร่องรอยการบุบสลาย เช่น ถูกตัดหรือถูกบด ความสะอาดและสิ่งแปลกปลอมที่ติดอยู่กับเส้นผมเช่น คราบเลือดเศษผงน้ำมันฯลฯ โดยจะต้องบันทึกรายละเอียดต่างๆ ของเส้นผมเส้นขนแต่ละเส้นไว้ก่อนเสมอ

2. การตรวจลักษณะภายใน

หลังจากตรวจและบันทึกรายละเอียดดังที่กล่าวมาแล้ว จะเป็นการตรวจลักษณะภายในของเส้นผมโดยละเอียดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ได้แก่ ปลาย ราก เปลือกชั้นนอก (Cuticle) ชั้นกลาง(Cortex) และแกนใน (Medulla)

การเตรียมตัวอย่างตรวจ

โดยนำเส้นผมที่ต้องการตรวจเปรียบเทียบแยกใส่ระหว่างกลางของกระจกสไลด์ 2 แผ่นที่วางปะกบกันปิด ทับหัว - ท้ายด้วยเทปใส เพื่อไม่ให้กระจกสไลด์หลุดออกจากกัน ทำเครื่องหมาย หรือเขียนด้วยปากกาเขียนแก้ว

ว่าเป็นของกลางใด เพื่อการจดจำและไม่ให้ปะปนกันต่างๆ แล้วนำไปดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์บันทึกรายละเอียดต่างๆ แล้วนำไปดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

หากพบว่าเส้นผมเส้นขนมีสิ่งสกปรกติดอยู่มากหรือผ่านการย้อมสี ให้ผู้ตรวจบันทึกไว้ เพื่อประ-โยชน์ในการตรวจเปรียบเทียบกับตัวอย่างเส้นอื่น หลังจากนั้น อาจต้องนำตัวอย่างตรวจออกมาทำความสะอาดด้วยผงซักฟอกน้ำยาล้างจานแอลกอฮอร์ หรือแช่ในไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เพื่อทำให้สะอาดและสามารถตรวจดูลักษณะภายในได้ชัดเจนยิ่งขึ้น แต่ต้องกระทำอย่างระมัดระวัง โดยเฉพาะเส้นที่มีรากติดอยู่ด้วย เพราะอาจทำให้เซลล์รากผมหรือเนื้อเยื่อที่ติดอยู่หลุดหายหรือถูก ทำลายไป ซึ่งจะมีผลต่อการตรวจหา DNA สำหรับการตรวจยืนยันอีกครั้งในภายหลัง

ขั้นตอนการตรวจมีดังนี้

1. ตรวจลักษณะปลาย เพื่อทราบลักษณะว่าเป็นปลายเรียวแหลม ปลายแตก หรือปลายตัด และเป็นปลายตัดในลักษณะใด เช่น ตัดตรง ตัดเฉียง รวมถึงลักษณะการแตกหักที่อาจพบว่ามีลักษณะเป็นแบบใด

2. ตรวจราก เพื่อให้ทราบลักษณะรากของเส้นผมเส้นขนแต่ละเส้นว่าเป็นแบบใด จะได้ทราบว่าเกิดจากการดึงให้หลุดหรือหลุดร่วงออกเองซึ่งการตรวจนี้จะมีประโยชน์ในการพิจารณานำไปตรวจหาสารพันธุกรรม (DNA) ต่อไป

3. ตรวจลักษณะลายเปลือกนอก (Scale Pattern) ของเส้นผมหรือเส้นขน จะต้องเป็นแบบ Irregular annular เท่านั้น

4. ตรวจวัดขนาดความกว้างของชั้น cortex และ medulla

5. ตรวจลักษณะการกระจายความหนาแน่นและสีของ pigment ในชั้น cortex

6.ตรวจลักษณะและรูปแบบของ medulla ว่าเป็นแบบใด เช่น Fragmentary Discontinuous หรือ Continuous รวมถึงลักษณะความหนาแน่นของ medulla ในแต่ละเส้น

7.ตรวจลักษณะเกล็ด (Scale) และขอบของเส้นว่ามีลักษณะแบบใด

8. ตรวจลักษณะพิเศษต่างๆ เช่น รูปร่างเป็นคล้ายลูกประคำ (Monilethrix) หรือเป็นปล้อง (Trichoresis invagination)

การตรวจลักษณะภายนอก และภายในดังที่กล่าวมา ผู้ตรวจจะต้องทำการบันทึกรายละเอียด ของเส้นผม/เส้นขนแต่ละเส้นไว้ เพื่อเป็นข้อมูลในแปรผลการตรวจเปรียบเทียบ และเพื่อให้สามารถจดจำลักษณะของเส้นผมหรือเส้นขนแต่ละเส้นได้โดยที่ไม่ต้องนำกลับมาดูใหม่อีกครั้งเมื่อต้องไปให้การเบิกความต่อศาลในภายหลัง

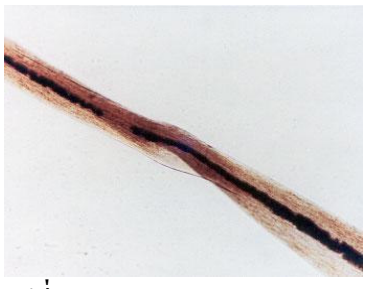
การลงความเห็น

ผู้ตรวจจะต้องนำข้อมูลหรือสิ่งต่างๆทั้งลักษณะภายนอกและลักษณะภายในที่ตรวจพบมาประมวลเพื่อวินิจฉัยว่าเส้นผมในที่เกิดเหตุนั้นเป็นเส้นผมของบุคคลใดซึ่งอาจจะมีหลายคนก็ได้

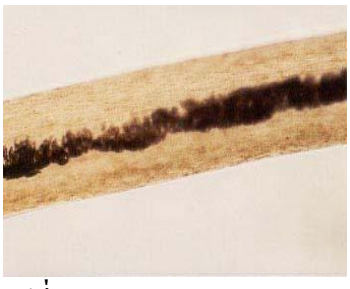
การตัดสินใจเพื่อลงความเห็นต้องอาศัยความรู้ความชำนาญและประสบการณ์ของผู้ตรวจอย่างสูง แต่เนื่องจากเป็นการตรวจเปรียบเทียบลักษณะที่มีความแปรปรวน ไม่เหมือนกับลายพิมพ์นิ้วมือหรือรอยประทับต่างๆ ที่นำมาตรวจเข้ารอยกัน ดังนั้นการลงความเห็นจึงไม่อาจยืนยันชี้ชัดตัวบุคคลได้ ผู้ตรวจจึงมักรายงานผลการตรวจเปรียบเทียบเส้นผมในเชิงยืนยันตัวบุคคลว่า “เชื่อว่า” หรือ “น่าเชื่อว่า” ตัวอย่างเช่น เส้นผมของกลางรายการที่ 1 เป็นเส้นผมมนุษย์ มีลักษณะคล้ายคลึงกับเส้นผมของนาย ก. ตามของกลางรายการที่ 2 เชื่อว่าเป็นเส้นผมของบุคคลเดียวกัน

4. การตรวจเส้นขนบริเวณอวัยวะเพศ

เส้นขนบริเวณอวัยวะเพศเ เป็นเส้นขนที่ขึ้นอยู่บริเวณอวัยวะเพศทั้งชายและหญิง พบตั้งแต่หัวเหน่าจนถึงทวารหนักเส้นขนชนิดนี้จะมีลักษณะแตกต่างไปจากเส้นผมและเส้นขนตามร่างกายบริเวณอื่นๆ โดยปกติแล้วจะมีลักษณะภายนอกโค้งงอคล้ายกับเส้นขนรักแร้และเส้นขนหน้าแข้งมาก แต่ที่แตกต่างออกไป คือเส้นขนบริ-เวณ อวัยวะเพศจะมีลำเส้นหยาบกระด้างมากกว่า บริเวณลำเส้นที่โค้งงอนั้น จะมีลักษณะลำเส้นที่แบน มากกว่าบริเวณอื่นในเส้นเดียวกัน ทำให้เกิดการบิดงอของลำเส้นมาก เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะเห็นลักษณะที่กล่าวนี้ได้ชัดเจน ส่วนของmedulla จะกว้างและมักเป็นแบบต่อเนื่องรากจะมีลักษณะเป็นแผ่นแบน (tag) ส่วนเส้นขนบริเวณหน้าแข้งและขนรักแร้นั้น บริเวณที่โค้งงอจะมีลำเส้นสม่ำเสมอกัน ลักษณะดังกล่าวจึงนำมาใช้ในการแยกเส้นขนบริเวณอวัยวะเพศ ออกจากเส้นขนตามร่างกายบริเวณอื่นๆ



รูปที่ 2.14 Pubic Hair Buckling



รูปที่ 2.15 Pubic Hair Medulla

รูปที่ 2.16 Pubic Hair Root

(ที่มา http://www.ontariosasquatch.com/#/humanhairp3/4521774223**)**

เส้นขนบริเวณอวัยวะเพศ เป็นวัตถุพยานที่สำคัญอย่างหนึ่งในคดีความผิดทางเพศ เพราะอาจจะมีการหลุดล่วงตกหล่นอยู่ในบริเวณที่เกิดเหตุ และอาจพบอยู่ภายในช่องคลอดห รือปนอยู่กับเส้นขนบริเวณหัวเหน่าของผู้เสียหาย หรือตามลำตัวของศพที่ถูกกระทำชำเรา ปกติแล้วเส้นขนชนิดนี้จะไม่พบในคดีประเภทอื่น

วิธีการตรวจและการแปลผล

เช่นเดียวกับการตรวจเส้นผมที่ได้กล่าวมาแล้ว

5.การตรวจ DNA จากเส้นผม/เส้นขน

ขั้นตอน 1 การสกัด DNA จากเส้นผม/ขน

เส้นผม/เส้นขนที่นำมาสกัด DNA ต้องมีเซลล์รากผม หรือเซลล์รากขนติดมาด้วย มิฉพนั้นแล้วจะไม่สามารถนำมาใช้ได้ เนื่องจากเส้นผม/เส้นขนที่ไม่มีเซลล์รากจะไม่มี DNA ดังนั้นจึงควรตัด เส้นผม/เส้นขนให้มีความยาวห่างจากรกขึ้นมาประมาณ 1 เซนติเมตร จากนั้นนำรากผม/รากขน มาล้างด้วยน้ำกลั่น 1-2 ครั้ง ก่อนที่จะนำไปต้มในสารละลาย คีเล็กซ์เรซินนาน 8 นาที

***ข้อควรระวัง** ในการต้มรากผม/รากขน ในสารละลายคีเล็กซ์เรซิน คือ ควรทำให้รากผม/รากขนจมอยู่ในเนื้อของสารละลายคีเล็กซ์เรซินก่อนทำการต้ม เพื่อจะทำให้การสกัดDNA มีประสิทธิภาพสูงสุด

ขั้นตอนที่ 2 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

การเพิ่มจำนวน DNA ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสประกอบด้วย 3 ช่วงอุณหภูมิ ได้แก่

1. ช่วงอุณหภูมิ 90-95 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่ทำให้ DNA ต้นแบบแยกตัวจากเส้นคู่เป็นเส้นเดียว

2. ช่วงอุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส เป็นช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการจับคู่กัน ระหว่าง DNA เส้นเดี่ยว และไพรเมอร์

3. ช่วงอุณหภูมิ 70-72 องศาเซลเซียส เป็นช่วงอุณหภูมิสำหรับการเติมเบสที่ปลาย 3’ ของ DNA เส้นเดี่ยว

ขั้นตอนที่ 3 การ แยกผลผลิตพีซีอาร์ด้วยกระแสไฟฟ้า

เมื่อปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสยุติแล้ว จะได้ผลผลิตคือชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน เนื่องจากมีจำนวนของลำดับเบสแกนไม่เท่ากัน นำผลผลิตดังกล่าวมาแยกได้โดยใช้กระแสไฟฟ้า ซึ่งมีวิธีการแยกเป็น 2 ประเภท ตามลักษณะของชิ้นส่วนดีเอ็นเอนั้นๆ ว่าเป็นแบบมินิแซทเทลไลท์หรือไมโครแซทเทลไลท์

การแยกผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากส่วนที่เป็นมินิแซทเทลไลท์จะใช้อะกาโรสเจล (agarose gel) ความเข้มข้น 2-3 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวกลางให้กระแสไฟฟ้าขนาด 5 โวลต์/ซม. ผ่าน การใช้กระแสไฟฟ้าที่มีโวลต์ต่ำจะช่วยให้มีประสิทธิภาพในการแยกผลผลิตที่มีขนาดใกล้เคียงกัน เมื่อผ่านกระแสไฟฟ้าลงในตัวกลางที่แช่ในบัฟเฟอร์ ชิ้นดีเอ็นเอที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่ไปทางขั้วบวก และชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าชิ้นดีเอ็นเอขนาดใหญ่ สำหรับเวลานั้นจะแตกต่างกันไปขึ้นกับขนาดของผลผลิตแต่ละโลกัส กล่าวคือโลกัสที่มีลำดับเบสแกนขนาดเล็ก จะใช้เวลานานกว่าโลกัสที่มีลำดับเบสแกนขนาดใหญ่ เมื่อชิ้นดีเอ็นเอถูกแยกโดยสมบูรณ์แล้วจึงนำตัวกลาง อะกาโรสเจล มาย้อมด้วยสารละลายเอธิเลี่ยมโบรไมด์ (ethidium bromide) แล้วบันทึกผลด้วยแสงอุลตราไวโอเลต เพื่อดูลักษณะของผลผลิตที่ได้

บทที่3

วิธีการทดลอง

ชื่อการทดลอง : การประเมินคุณภาพจาก 3 วิธีที่ใช้สกัด DNA จากเส้นผม

(Evaluation of three methods for effective extraction of DNA from human hair)

วัตถุประสงค์ : 1. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัด DNAจากเส้นผม ว่าวิธีใดที่ไม่ทำให้เกิดสารยับยั้งในการเกิดปฏิกิริยา PCR

2. ศึกษาเพื่อเลือกวิธีการสกัด DNA ไปใช้ให้เหมาะสมกับงาน

ขอบเขตการวิจัย :

ตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

เส้นผม , เยื่อบุกระพุ้งแก้ม

กลุ่มประชากร

ชาวญี่ปุ่นที่มีผมสีดำ 26 คน , ชาวญี่ปุ่นผมทำสี 15 คน

ตำแหน่งยีนที่ศึกษา

D1S8

วิธีการสกัด DNA ที่ศึกษา

Chelex method, QAIamp ® DNA Mini Kit method, ISOHAIR ®method

วิธีการวิเคราะห์ผล

Agarose gel electrophoresis , Microchip electrophoresis

วัสดุอุกรณ์ : 1. เส้นผมสีดำธรรมชาติที่ถูกถอนจากชาวญี่ปุ่น 26 คน และ เส้นผมที่ทำสีที่ถูกถอนจอกชาวญี่ปุ่น15 คน

2. Chelex ®100 จากBIORAD (RICHmond,CA,USA)

3. QIAamp® DNA Mini Kit จาก QIAGEN (Hiden,Germany)

4. ISOHAIR® Proteinase K, Gene Taq สำหรับ PCR และMaker 5 (X174/Hinc®digest), Agarose 21 สำหรับ gel electrophoresis จาก NIPPON GEVE โดยใน ISOHAIR ประกอบด้วย

- Extraction buffer
- Enzyme solution
- Lysis solution
- Ethachachinmate

5. เตรียม Primer โดย Awady Technology (Tokyo, japan)

6. ซื้อ PicoGreen® daDNA Quantitation และ SYBR® Glod nucleic Gel Stain ซึงเป็นสารย้อมสีสำหรับดีเซน 10 ที่ได้จาก Molecular Probes

7. ทำน้ำให้บริสุทธิ์โดยใช้ระบบ Mili-Q (Millipore;Bedford,Ma,USA)

8. บัฟเฟอร์และสารละลายอื่นๆ ที่ได้รับการรับรอง

วิธีการทดลอง : ขั้นตอนที่ 1 การเตรียมเส้นผม และเยื่อบุกระพุ้งแก้มก่อนทำการสกัดดีเอ็นเอ

<u>การเตรียมเส้นผม</u>

1. นำเส้นผมทั้ง 2 ชนิด(เส้นผมดำธรรมชาติ และเส้นผมทำสี)ไปล้างด้วย 100% ethanol 500 µl ในหลอดทดลอง Polypropyrene ขนาดเล็ก

2. เป่าให้แห้ง แล้วนำไปวางในหลอดปั่นเหวี่ยง((Microcentrifuge tub) ขนาด 1.5 ml.

<u>การเตรียมเยื่อบุกระพุ้มแก้ม</u>

1. เก็บตัวอย่างดดยใช้ไม้พันสำลีตรงปลาย ขูดที่กระพุ้งแก้มด้านใน อย่างน้อย 6 ครั้ง แล้วทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 2 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะแห้ง

2. ตัดปลายสำลีด้วยกรรไกร แล้วนำไปใส่ในMicrocentrifuge tube ขนาด 1.5 ml.

ขั้นตอนที่ 2 การสกัดดีเอ็นเอจากเส้นผม

1. <u>วิธี Chelex method</u>

- เติม 5 % Chelex ®100 ปริมาตร 200 µl.
- เติม 10 mg/ml Proteinase K ปริมาตร 10 µl. ลงใน Microcentrifuge tub ที่เตรียมไว้
- เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไป Incubate ที่55 °Cอย่างน้อย 6-8 ชั่วโมง หรือทิ้งไว้ข้ามคืน
- นำไป Vortex และ Incubate ในอ่างน้ำเดือด 8 นาที
- นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 – 15,000 x g 2-3 นาที
- ดูดแยกเอา Supernatant (ส่วนใส) ออกมาใส่ Microcentrifuge tubeใหม่ที่สะอาด

2. <u>วิธี QIAamp ®DNA Mini Kit</u>

- เติมบัฟเฟอร์ X1 ปริมาตร 200 µl. ลงใน Microcentrifuge tub ที่เตรียมไว้
- นำไป Incubate ที่55 °C อย่างน้อย 1 ชั่วโมง หรือจนกว่าตัวอย่างจะละลายหมด
- เติมบัฟเฟอร์AL (Lisis Buffer) ปริมาตร 200 µl. ตามด้วย Vortex
- เติม Ethanol ปริมาตร 200 µl.
- ถ่ายสารละลายลงใน Spin column
- เติมบัฟเฟอร์AW1(Washing Buffer)500µlแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 x g เป็นเวลา 1 นาที
- นำ Spin column มาใส่ใน Collection tube 1 ขนาด 2 ml. ที่สะอาด

- เติม Buffer AW2 (Washing Buffer) ที่มี Sodium azide ลงไปในปริมาตร 500µl. แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 20,000 g 3 นาที
- ย้าย Spin column มาใส่ในMicrocentrifuge tubขนาด 1.5 ml. ใหม่ที่สะอาด
- เติมบัฟเฟอร์AE(Elution Buffer) ปริมาตร50-100 µl.ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที
- นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 6,000 x g ก็จะได้ดีเอ็นเอทั้งหมดใน Microcentrifuge tub

3. วิธี ISOHAIR ®method

- เติม Extraction Buffer ปริมาตร 200 µl, Enzyme solution 5 µl และ Lysis solution 8 µl ลงบนเส้นผมในหลอด Microcentrifuge tubขนาด 1.5 ml. ที่เตรียมไว้
- นำไป Incubate ที่ 55 °C อย่างน้อย 20 นาที
- เติม Enzyme solution ปริมาตร 5 µl. แล้วนำไป Incubate ที่ 55 °C 5-10 นาที
- เติมส่วนผสมของ Phenol-Chloroform-Isoamylalcohol (25:24:1,v/v/v)
- Invert หลอด 2-3 ครั้งเพื่อให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่11,000 x g 5 นาที
- ถ่ายส่วนSupernatant ออกมาใส่หลอด Microcentrifuge tub 1.5 ml.ใหม่ที่สะอาด
- เติม 3M Sodium acetate pH (5.2) ปริมาตร 20 µl และ Ethachinmate ปริมาตร 2 µl
- Invert หลอดเพื่อให้เข้ากัน แล้วเติม Ethanol 400µl เพื่อเร่งให้ดีเอ็นเอตกตะกอน
- แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว11,000 x g เป็นเวลา15 นาที
- ดูดเอาส่วนSupernatant ออกมาใส่หลอด Microcentrifuge tub 1.5 ml.ใหม่ที่สะอาด
- ล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol แล้วเป่าให้แห้ง
- ละลายดีเอ็นเอใน บัฟเฟอร์ TE 50 µl

ขั้นตอนที่ 3 นำดีอ็นเอที่สกัดจากเส้นผมทั้ง3วิธีมาเพิ่มปริมาณด้วยการทำ MVR-PCR โดยปรับ Condition ตามที่ Jeffeny และคณะ ดังนี้

- เพิ่มปริมาณตัวอย่างgenomicDNAใน50 µl ของPCR Solution ที่มี1µM primer 32D
- ทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพที่ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที
- เติม Taq polymerase แล้วทำให้เกิดปฏิกิริยาที่ 94 °C เป็นเวลา1.3 นาที, 68 °C เป็นเวลา 1 นาที และ 70 °C 5 นาที ใน 30 Cycle แรก
- นำไป Incubate ที่ 68 °Cเป็นเวลา 1นาที และที่70 °C เป็นเวลา1นาที ในCycle ต่อไป โดยใช้เครื่อง Thermal Cycler

ขั้นตอนที่ 4 นำดีเอ็นเอจากเส้นผมที่เพิ่มปริมาณแล้วจาก MVR-PCR มาวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์โดยใช้ Agarose gel electrophoresis

- บรรจุสารที่ได้จาก PCR ปริมาตร 10 µl ลงบนเจล โดยสารที่ใช้ย้อมสีคือ SYBR Gold Nucleic Gel Stain
- แยกแถบของดีเอ็นเอที่ได้จาก PCR บน 3% Agarose21 ในบัฟเฟอร์ TBE ที่แรงดันไฟฟ้า คงที่ 60V
- ตรวจจับแถบดีเอ็นเอที่ขยายแล้วโดยใช้เครื่อง Fluorimageanalyzer FLA-2000

2. การวิเคราะห์โดยใช้อุปกรณ์ Microchip electrophoresis

- ใช้ Agilent 2100 Bioanalyzer ร่วมกับ DNA 1000 Labelchip
- ในการวิเคราะห์แต่ละครั้ง จะใช้สารที่ได้จาก PCR 1 µl
- การแยกขนาดของดีเอ็นเอ จะเกิดขึ้นระหว่างการกรองผ่านช่องขนาดเล็ก (Interconnected microchannels) โดยใช้แผ่นกรองโพลิเมอร์กรอง

ขั้นตอนที่ 5 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเส้นผมแต่ละวิธี

ขั้นตอนที่ 6 เลือกวิธีที่มีผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ดีที่สุด

ขั้นตอนที่ 7 นำวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ให้ผลดีที่สุดมาสกัดดีเอ็นเอจากเยื่อบุกระพุ้งแก้ม

การสกัดดีเอ็นเอจากเยื่อบุกระพุ้งแก้มโดยวิธี Chelex method

1. เติม 5% Chelex ปริมาตร 500 µl และ10 mg/ml Proteinase K 10 µl ลงบนสำลีที่เตรียมไว้ใน Microcentrifuge tubขนาด 1.5 ml เขย่าให้เข้ากัน
2. นำสารละลายไป Incubate ที่ 55 °C 30 นาที Vortex ให้เข้ากัน
3. นำส่วนผสมไปแช่ในอ่างน้ำเดือด 8 นาที
4. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 x g 5-10 นาที
5. ดูดเอาส่วนSupernatant ออกมาใส่หลอด Microcentrifuge tub 1.5 ml.ใหม่ที่สะอาด

ขั้นตอนที่ 8 นำดีอ็นเอที่สกัดได้จากเยื่อบุกระพุ้งแก้มไปเพิ่มปริมาณด้วยการทำ MVR-PCR เช่นเดียวกับ ขั้นตอนที่ 3

ขั้นตอนที่ 9 นำดีเอ็นเอจากเยื่อบุกระพุ้งแก้มที่เพิ่มปริมาณแล้วจาก MVR-PCR มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเส้นผมที่มีวิธีการสกัดเดียวกัน (วิธี Chelex)

ขั้นตอนที่ 10 เปรียบเทียบและสรุปผล

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

การประเมิณและการอภิปราย

ตำแหน่งของ D1S8 ตั้งอยู่บนโครโมโซมตำแหน่งที่ 1 ที่ใกล้กับ 1q 42-q43 [11,12] โดย Minisatellite จะประกอบด้วย 2 ประเภทใหญ่ๆของ Repeat unit (29bp) ซึ่งเรียกว่า a-type และ t-type ที่มีความแตกต่างจาก Single base substitution ภายใน Repeat unit และมีรูปแบบการกระจายอยู่ภายใน allele

Primer ที่มีความจำเพาะกับ MVR (32-TAG-A and 32-TAG-T) จะเกิดเฉพาะร่วมกับ single base ที่มีความแตกต่างกัน ที่ปลาย3' พื่อแยกส่วนที่ซ้ำกันเป็น 2 ประเภทอย่างแม่นยำ โดยบริเวณแรกที่มี Repeat unit คาดว่าจะมีขนาด 293 bp ซึ่งในขั้นในขั้นตอนที่ได้ PCR product จะมีความแปรผันอยู่กับความชำนาญของแต่ละบุคคลด้วย

การวัดปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดโดยใช้วิธี Pico Green dsDNA Quantitatiion Kit ซึ่งที่เลือกใช้วิธีนี้ก็เนื่องจากว่า สารประกอบเช่น RNA, Melanin และ Aromatic amines ที่อยู่ในเส้นผมทำสีและคาดว่า เป็นสารประกอบที่จะพบในการสกัด และเป็นสารที่มีนัยสำคัญในการที่จะดูดซับ UV ที่ 260 nm. โดยลักษณะปริมาณดีเอ็นที่วัดได้จากการสกัดดีเอ็นเอแต่ละวิธีมีดังนี้

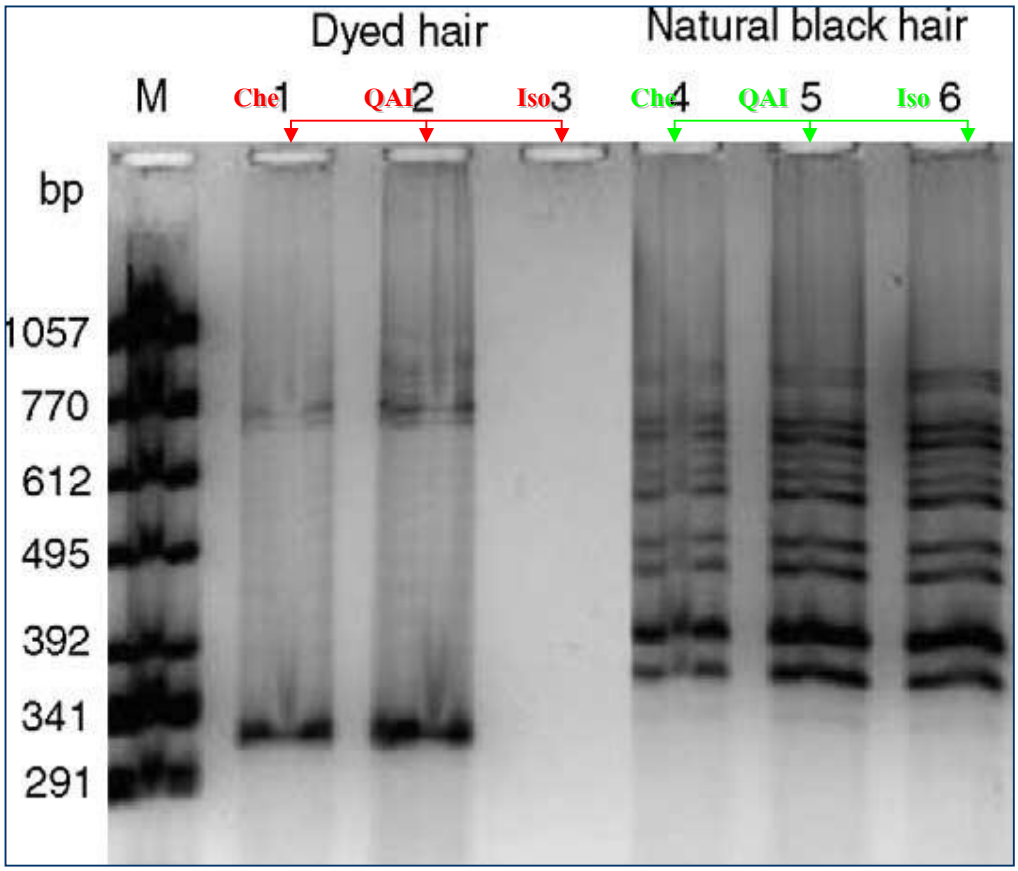
วิธีการสกัด DNA	ปริมาณ DNA	สีของ DNA
Chelex method	120-140 ng	ไม่มีสี
QAIamp ® DNA Mini Kit method	<120 ng	ไม่มีสี
ISOHAIR®method	>150 ng	สีน้ำตาลเข้ม

ตารางที่ 4.1 ตารางข้อมูลลักษณะและปริมาณของ DNA ที่ได้จากการสกัด **(ที่มา** กัญญารัตน์**)**

จากตารางที่ 4.1 เห็นได้ว่า วิธี ISOHAIR® method ให้ปริมาณดีเอ็นจากการสกัดได้สูงที่สุดใน 3 วิธีที่นำมาศึกษา ซึ่งสามารถสกัดดีเอ็นเอได้มากกว่า 150 ng โดยดีเอ็นเอที่ได้นั้นเป็นสีน้ำตาลเข้ม แต่ในขณะที่ วิธี Chelex method ให้ดีเอ็นเอที่ไม่มีสีปริมาณ 120-140 ng และวิธี QAIamp ® DNA Mini Kit

method ให้ดีเอ็นเอที่ไม่มีสี ปริมาณที่น้อยกว่า 120 ng ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี QAIamp® DNA Mini Kit method เป็นวิธีการสกัดดดีเอ็นเอที่ ได้ปริมาณน้อยที่สุด อีกทั้งเป็นวิธีที่ใช้ต้นทุนสูงอีกด้วย

เมื่อนำดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดจากทั้ง 3 วิธีมาวิเคราะห์เปรียบเทียบกันแล้ว ซึ่งได้ผลการวิเคราะห์ ดังนี้



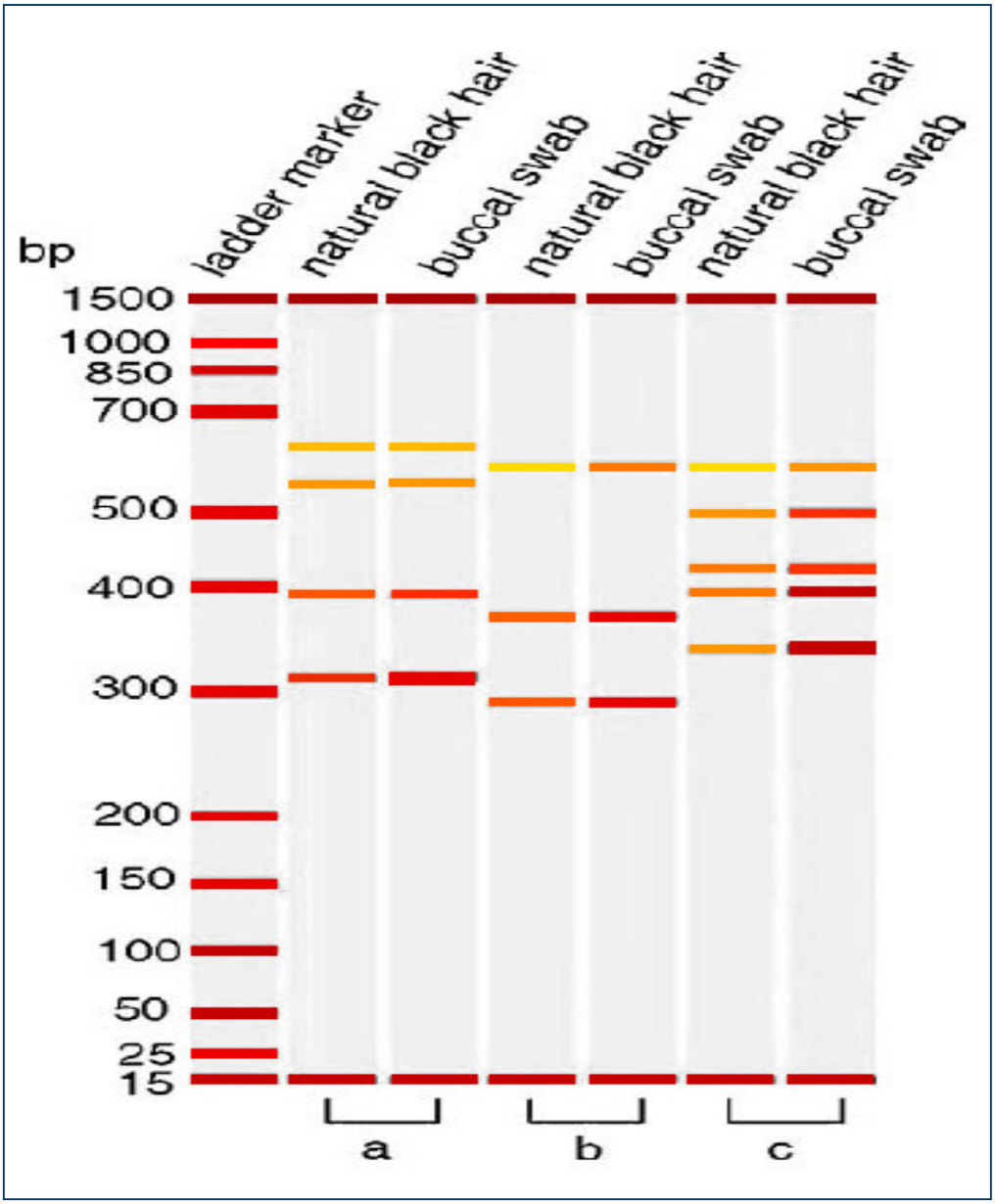
ภาพที่ 4.1 การเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่สกัดจากเส้นผมทั้ง 3 วิธี ด้วย Agarose gel electrophoresis **(ที่มา** E.Suenaga, H.Nakamura/J.Chromatogr. B 820,2005;137-141**)**

จากภาพที่ 1ที่แสดงถึง Agarose gel electrophoresis ของ PCR product (t-type) ที่ได้มาจากการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นผมดำธรรมชาติ และเส้นผมทำสี โดยใช้วิธีการสกัดที่แตกต่างกัน 3 วิธี โดยเลนที่ 1 และ 4 เป็นวิธี Chelex method, เลนที่ 2 และ 5 เป็นวิธี QIAamp ®DNA Mini Kit, เลนที่ 3 และ 6 เป็นวิธี ISOHAIR ®method

พบว่า เลนที่ 1,4 ซึ่งเป็นวิธี Chelex method และเลนที่ 2, 5 ซึ่งเป็นวิธี QIAamp ®DNA Mini Kit จะให้ผลของ PCR product ที่มีความสอดคล้องกันทุกตัวอย่าง โดยในการวิเคราะห์เส้นผมด้วย 2 วิธีนี้ ได้รับความประสบความสำเร็จในเส้นผมทำสี 15 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 15 ตัวอย่าง และในเส้นผมดำธรรมชาติ 26 ตัวอย่าง จาก 26 ตัวอย่าง ซึ่งตรงข้ามกับการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธี ISOHAIR ®method (เลน 3, 6) ซึ่งไม่ได้รับความประสบความสำเร็จในการ Amplified ซึ่งให้ PCR product ไม่เป็นที่น่าพอใจ โดยเฉพาะกับการสกัดดีเอ็นเอที่ได้จากเส้นผมทำสี ดังนั้น การใช้วิธี ISOHAIR ®method จึงล้มเหลวในการการวิเคราะห์ 6 ตัวอย่าง จาก 15 ตัวอย่างในเส้นผมทำสี และล้มเหลวใน 1 ตัวอย่างจาก 25 ตัวอย่างในเส้นผมสีดำธรรมชาติ

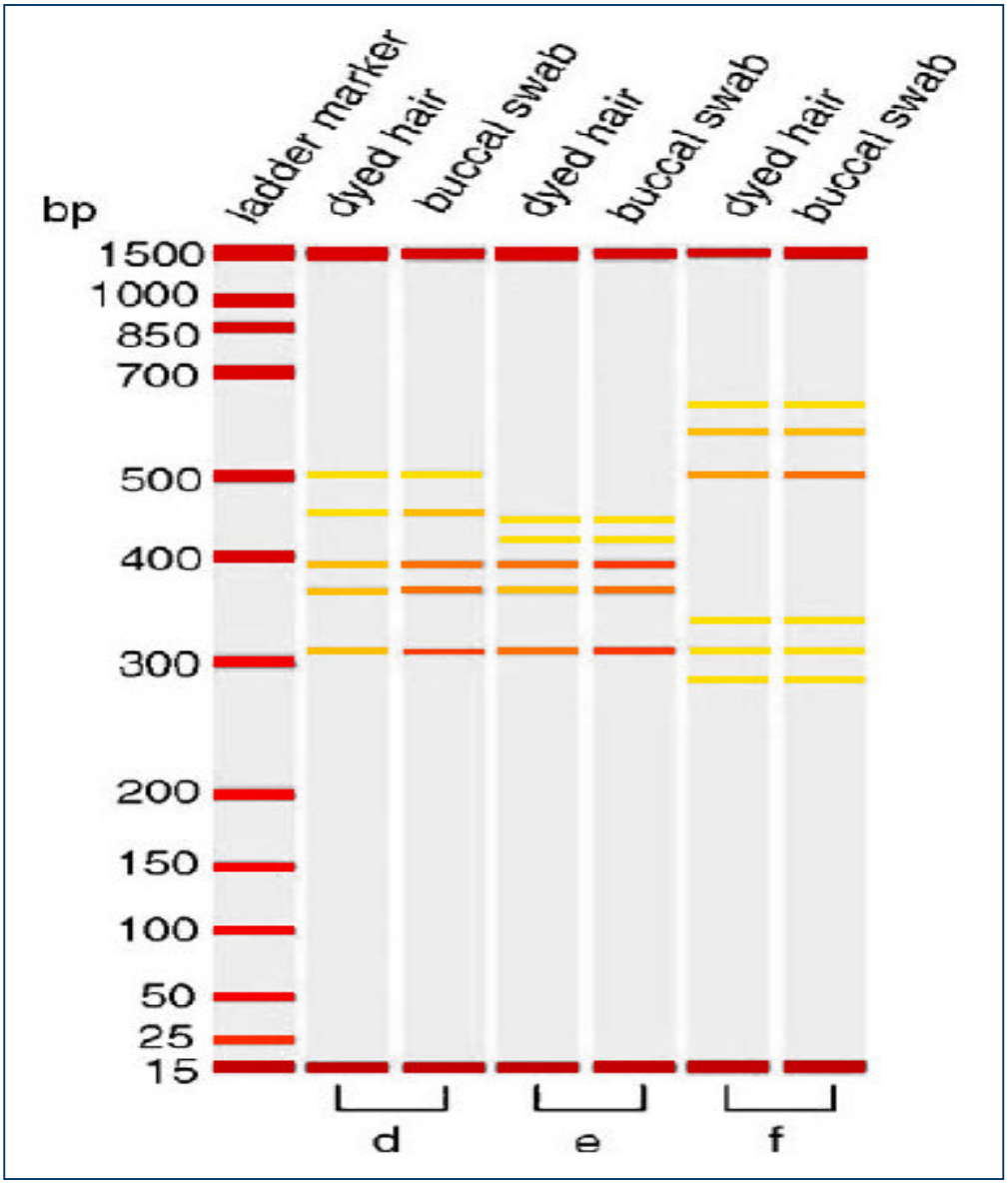
ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า การสกัดดีเอ็นเอจากเส้นผมทำสีโดยใช้วิธี ISOHAIR ®method อาจจะเกิด Inhibitors ที่เป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยา PCR ซึ่งผู้ศึกษารายงานว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเส้นผมทำสี มีสารชนิด Melanin ที่มีความเป็นไปได้ว่า จะเป็นสาร PCR Inhibitor นอกจากนี้ Hydrogen peroxide ซึ่งเป็นสารที่ใช้ทำสีผม อาจจะเปลี่ยนรูปสาร Melanin ที่ไม่ละลายน้ำ เป็นสาร Melanin ที่ละลายน้ำ เนื่องจาก Melanin ที่เปลี่ยนรูปนี้ มีคุณสมบัติคล้ายกันกับวิธีการทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ และอาจคงอยู่ในสารละลายดีเอ็นเอเพื่อยับยั้งปฏิกิริยา PCR โดยเฉพาะการสกัดด้วยวิธี ISOHAIR ®method เพราะถ้าหากดีเอ็นเอไหนถูกแยกออกมาจากส่วนประกอบอื่นๆที่มีเบสต่างกันในการถูกละลายในส่วนผสมของ Phenol-Chloroform-Isoamylalcohol และ Ethanol โดยที่จริงแล้ว การเตรียมดีเอ็นเอที่ถูกสกัดโดยวิธี ISOHAIR ®method จะได้ดีเอ็นเอที่มีสีน้ำตาลเข้ม แต่ในทางตรงกันข้ามนั้น จะเห็นได้ว่าในการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Chelex method และวิธี QAIamp®DNA Mini Kit method จะได้ดีเอ็นเอที่ไม่มีสี จากการสกัดซึ่งจะไม่เกิดการยับยั้งในปฏิกิริยา PCR analysis ดังนั้น ผลการทดลองนี้จึงแสดงให้เห็นว่า 2 วิธีนี้เป็นวิธีการสกัดดีเอ็นเอ ที่ไม่มีขึ้นกับสาร Melanin ที่ละลายน้ำที่อาจจะเป็นตัวยับยั้งการทำปฏิกิกริยา PCR ซึ่งในทั้ง 2 วิธีนี้ จะเห็นได้ว่าวิธี Chelex method เหมาะสำหรับการสกัดดีเอ็นเอจาก เส้นผมมนุษย์ (รากผม) มากที่สุด เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย และประหยัดต้นทุนที่สุด

ดังนั้น จึงนำวิธี Chelex method มาสกัดดดีเอ็นจากเยื่อบุกระพุงแก้ม เพื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเส้นผมว่ามีการสอดคล้องกันหรือไม่ เพื่อให้ทราบว่า วิธีนี้สามารถนำมาสกัดดีเอ็นเอจากส่วนอื่นให้ได้ผลที่ประสบความสำเร็จเหมือนกันหรือไม่ ดังนี้



ภาพที่ 4.2 เปรียบเทียบ DNAที่สกัดได้จากเส้นผมสีดำธรรมชาติและเยื่อบุกระพุ้งแก้มจากตัวอย่าง 3คนa-c

(ที่มา E.Suenaga, H.Nakamura/J.Chromatogr. B 820,2005;137-141**)**



ภาพที่ 4.3 เปรียบเทียบ DNAที่สกัดได้จากเส้นผมทำสี และเยื่อบุกระพุ้งแก้มจากตัวอย่าง 3 คน d-f

(ที่มา E.Suenaga, H.Nakamura/J.Chromatogr. B 820,2005;137-141**)**

จากภาพที่ 4.2 และ 4.3 เป็นการเปรียบเทียบรูปแบบของ MVR-PCR ของดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างเส้นผม และจากตัวอย่างเยื่อบุกระพุ้งแก้ม ซึ่งในการศึกษานี้ ได้ค้นคว้า ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดโดยวิธี Chelex method ที่แสดงถึง genomicDNA ของเส้นผมปกติ และเส้นผมทำสี ที่ทำให้เกิดความเสียหายต่อดีเอ็นเอเดิม และมีผลต่อการวิเคราะห์ MVR-PCR, รูปแบบของ D1S8 locus MVR-PCR สำหรับดีเอ็นเอ ที่บริสุทธิ์ที่ได้มาจากการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นผม และจากการขูดเยื่อบุกระพุ้งแก้ม ที่ถูกเลือกมาเป็นตัวอย่างอิสระที่ไม่มีการทำสีผม จาก 6 คน ซึ่งเมื่อทำ PCR product (t-type) ที่สกัดได้จากเส้นผมดำธรรมชาติ และจากเยื่อบุกระพุ้งแก้ม ซึ่งการสกัดโดยวิธี Chelex method จะใช้เครื่อง Electrophoresis พบว่า ตำแหน่ง locus ที่ถูก Amplified มีความแปรปรวนของความเข้มข้นสัมพันธ์ของ D1S8 locus ในตัวอย่างเส้นผมดะรรมชาติ และดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างเยื่อบุกระพุ้งแก้ม ของแต่ละคน ที่แสดงให้เห็นว่า วิธีการนี้ ให้ genomicDNA ที่มีคุณภาพ และมีความสามารถในการทำซ้ำได้สูง (reproducible) และในกรณีที่เส้นผมทำสี D1S8 locus มีความแปรปรวนในเส้นผมทำสี พบว่า มีการเข้ากันได้ของการสกัดดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดจากตัวอย่างเยื่อบุกระพุ้งแก้ม วิ่งผลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่า เส้นผมที่ทำสี ไม่มีผลกระทบกับการวิเคราะห์โดยใช้ Minisatellite Repeat analysis ดังนั้น วิธี Chelex method จึงเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสำหรับการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นผมของมนุษย์ โดยที่ไม่คำนึงการทำสี