การศึกษาวิธีการสกัด DNA และ RNA ร่วมกันในตัวอย่างทางนิติวิทยาศาสตร์โดยใช้ระบบ Promega DNA IQ™ system

A method for DNA and RNA co-extraction for use on forensic samples using the Promega DNA IQ™ system

510 702 สัมมนาสำหรับนิติวิทยาศาสตร์ 1 ภาคต้นปีการศึกษา 2553

ผู้ให้สัมมนา นายเอกรัตน์ ศรัทธา รหัส 52312350

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.ธงชัย เตโชวิศาล

วัน เวลา สถานที่ 31 กรกฎาคม 2553 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทคัดย่อ

การใช้รูปแบบของ messenger RNA มาระบุที่มาของตัวอย่างทางชีวภาพ (เช่น เลือด น้ำอสุจิ และน้ำลาย เป็นต้น) จากสถานที่เกิดเหตุเป็นขั้นตอนดำเนินการทางนิติวิทยาศาสตร์ที่ปฏิบัติกันอยู่ จากรายงานความสำเร็จของการพัฒนาระบบปฏิบัติการ DNA Promega IQ ™ เพื่อใช้ในการสกัด DNA และ RNA จากตัวอย่างเดียวกันพร้อมกัน โดยที่ไม่สูญเสียของรูปแบบ DNA โดยใช้โปรโตคอลในห้องปฏิบัติการสกัด DNA โดยใช้ระบบของ DNA IQ ™ รวมกับ Zymo Research Mini RNA Isolation Kit™ II แสดงให้เห็นถึงการสกัดร่วมพร้อมกันของ DNA และ RNA จากตัวอย่างเดียวกัน เพื่อใช้เป็นขั้นตอนดำเนินการในการสกัดรูปแบบของ DNA และ mRNA ที่ใช้ได้ทั้งการระบุความเป็นเอกลักษณ์บุคคล และคราบทางชีวภาพ

เอกสารอ้างอิง

Anna Bowden, Rachel Fleming and SallyAnn Harbison *Forensic Science International: Genetics, In Press, Corrected Proof, Available online 6 January 2010*

A method for DNA and RNA co-extraction for use on forensic samples using the Promega DNA IQ™ system

Anna Bowden , Rachel Fleming b, SallyAnn Harbison

Forensic Science Program, Department of Chemistry, University of Auckland, New Zealand

Institute of Environmental Science and Research Ltd, Mt Albert Research Centre, Hampstead Road, Private Bag 92021, Auckland, New Zealand

A B S T R A C T

use of messenger RNA profiling to identify the origin of biological samples (e.g. blood, semen and saliva) from crime scenes is now at the stage of being implemented into routine forensic casework. We report on the successful modification of the Promega DNA IQTM system to enable co-extraction of DNA and RNA from the same sample without compromising the potential DNA profile. Using the protocol in our laboratory for extracting DNA using the DNA IQTM system combined with the Zymo Research Mini RNA Isolation KitTM II we demonstrate the simultaneous co-extraction of DNA and RNA from the same sample for routine DNA and mRNA profiling for the identification of both the individual and the biological stain.

Reference

[1] M. Bauer, D. Patzelt, Evaluation of mRNA markers for the identification of menstrual blood, J. Forensic Sci. 47 (2002) 1–5.

[2] M. Bauer, D. Patzelt, A method for simultaneous RNA and DNA isolation from dried blood and semen stains, Forensic Sci. Int. 136 (2003) 76–78.

[3] J. Juusola, J. Ballantyne, Messenger RNA profiling: a prototype method to supplant conventional methods for body fluid identification, Forensic Sci. Int. 135 (2003) 85–96.

[4] M. Alvarez, J. Juusola, J. Ballantyne, An mRNA and DNA co-isolation method for forensic casework samples, Anal. Biochem. 335 (2004) 289–298.

[5] J. Juusola, J. Ballantyne, Multiplex mRNA profiling for the identification of body fluids, Forensic Sci. Int. 152 (2005) 1–12.

[6] R. Fang, C.F. Manohar, C. Shulse, M. Brevnov, A. Wong, O.V. Petrauskene, P. Brzoska, M.R. Furtado, Real-time PCR assays for the detection of tissue and body fluid specific mRNAs, Int. Congr. Ser. 1288 (2006) 685–687.

[7] C. Nussbaumer, E. Gharehbaghi-Schnell, I. Korschineck, Messenger RNA profiling:

a novel method for body fluid identification by real-time PCR, Forensic Sci. Int. 157 (2006) 181–186.

[8] J. Juusola, J. Ballantyne, mRNA profiling for body fluid identification by multiplex quantitative RT-PCR, J. Forensic Sci. 52 (2007) 1–11.

[9] R. Fleming, S. Harbison, The Development of a mRNA Multiplex RT-PCR Assay for the Definitive Identification of Body Fluids, http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2009.10.006.

[10] J. Karlinsey,G. Stamatoyannopoulos, T. Enver, Simultaneous purification of DNA and RNA from small numbers of eukaryotic cells, Anal. Biochem. 180 (1989) 303–306.

[11] Promega DNA IQTM System Database Protocol Technical Bulletin, TB297, 2009.

บทนำ

การตรวจ Messenger RNA เพื่อใช้ในการระบุที่มาของสารคัดหลั่งจากร่างกายเป็นเทคนิคใหม่ที่จะนำมาใช้ในงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ เพราะ mRNA มีศักยภาพในการช่วยเพิ่มความจำเพาะเจาะจงการวิเคราะห์วัตถุพยานชีวภาพ เป็นวิธีการที่ควรจะนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการณ์นิติวิทยาศาสตร์ ในที่จะสกัด RNA มาใช้วิเคราะห์นั้น ในงานวิจัยนี้จะใช้ Promega DNA IQ™ system ซึ่งเป็นการสกัด DNA โดยใช้เม็ดแม่เหล็กและเป็นระบบอัตโนมัติ มาใช้สกัดร่วมกันระหว่าง DNA และ RNA ซึ่งเป็นวิธีการที่รวดเร็ว เหมาะสมเพื่อนำมาวิเคราะห์พยานหลักฐานที่ได้จากที่เกิดเหตุต่อไป

สารบัญ

เรื่อง	**หน้า**
บทคัดย่อภาษาไทย	
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	
บทนำ	1
วิธีการทดลอง	2
ผลการทดลอง	4
เอกสารอ้างอิง	
ภาคผนวก	

วิธีการทดลอง

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

ตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย ได้แก่ semen 1 µl และ 10 µl เลือด 1 µl และ น้ำลาย µl เก็บโดยใช้ sterlile Cultiplast® swabs และสารคัดหลั่งจากช่องคลอดจะถูกเก็บจากช่องคลอดโดยตรง โดยใช้ใช้ sterlile Cultiplast® swabs จากนั้น ทุกๆตัวอย่างจะถูกทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ – 20°C จนกว่าจะนำมาสกัดดีเอ็นเอ ตัวอย่างทุกตัวอย่างเก็บจากอาสาสมัครที่ยินยอม

การสกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ

ใช้การสกัดของ Promega DNA IQ™ system เทียบกับ วิธี organic extraction

วิธีการทดลอง

1.นำตัวอย่างที่เก็บได้จากอาสาสมัคร์มาทำการสกัดดีเอ็นเอ โดยจะแบ่งตัวอย่างออกเป็นสองส่วน ส่วนแรกใช้วิธี organic extraction และส่วนที่สองใช้วิธี Promega DNA IQ™ system ในขั้นตอนที่ใช้ lysis buffer นำบัฟเฟอร์ที่เหลือจากการสกัดดีเอ็นจำนวน 200 µl นำมาสกัด RNA และทำให้บริสุทธิด้วย Zymo Research Mini RNA Isolation แล้วนำมาล้างด้วย Free water
50 µl จากนั้นนำ RNA ที่ได้มาวัดหาความเข้มข้นด้วยเครื่อง Agilent 2100 Bioanalyzer และ RNA 6000 Pico Chip Kit

2.DNA ที่สกัดได้จากขั้นตอนแรกนำมาหาความเข้มข้นโดยใช้ Quantifiler™system และ และเครื่อง ABI 7500 real time PCR ชุดเครื่องมือที่ใช้ จะใช้ชุด AmpF/STR®SGM Plus® and AmpF/STR® Idenitfiler PCR Amplification Kits

3.นำ RNA ที่ได้จากการสกัดจาก lysis buffer จากตัวอย่างที่ได้ มาสังเคราะห์ cDNA โดยใช้ primer และความเข้มข้นต่างๆ กัน ดังแสดงไว้ในตาราง

Table 1
Primer concentrations used in the mRNA multiplex.

Primer	Body fluid	Concentration (µM)
Glycophorin A (GlycoA)	Blood	0.4
Matrix metalloproteinase 11 (MMP11)	Menstrual blood	0.2
Histatin 3 (HIS)	Saliva	0.5
Statherin (STATH)	Saliva	0.05
Protamine 2 (PRM2)	Spermatozoa	0.05
Transglutaminase 4 (TGM4)	Semen	0.05
Transcription elongation factor (TEF)	Housekeeping gene	0.05
Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH)	Housekeeping gene	0.4
Ubiquitin conjugating enzyme (UCE)	Housekeeping gene	0.25
L. crispatus (CRIS)	Vaginal fluid	0.2
L. gasseri (GASS)	Vaginal fluid	0.05

ในการใช้ RNA จากตัวอย่าง 10 µl มาทำ RT-PCR 35 cycle ได้จำนวน cDNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ 25 µl

จากนั้นนำ DNA และ cDNA ที่ได้ มาแยกกันวิเคราะห์บนเครื่อง 3130 genetic analyzer โดยที่ cDNA นำมาวิเคราะห์โดยใช้ GeneScan v3.7 และ DNA วิเคราะห์ด้วย GeneMapper ID v3.2

ผลการทดลอง

จากการทดลองใช้ Promega DNA IQ™ system สามารถพบ RNA ในระดับต่ำมากๆ ได้ (<20pg/µl) การสกัด RNA จากตัวอย่างที่เก็บได้นั้น ได้มาจากขั้นตอนในการสกัด DNA ของระบบปฏิบัติการ Promega DNA IQ™ โดยได้มาจาก lysis buffer ที่ใช้ในการสกัด DNA โดยทั่วไปแล้วในการสกัด DNA เมื่อใช้ lysis buffer แล้วจะทิ้งไป เมื่อนำ lysis buffer ที่จะทิ้งนั้นมาหา RNA ก็ ไม่เป็นการรบกวนขั้นตอนการสกัด DNA เป็นกระบวนการที่ไม่ทำให้เกิดการสูญหายของ DNA จึงเหมาะกับตัวอย่างที่มีปริมาณน้อยๆ ในส่วนของ organic co-extraction นั้น การจะสกัด DNA และ RNA ได้นั้น จะต้องแบ่งตัวอย่างที่เก็บได้ออกเป็นสองส่วน เพื่อหา nucleic acid อย่างละส่วน ทำให้เกิดการสูญหายของ DNA ที่จะสกัด สามารถสรุปการใช้ Promega DNA IQ™ system ได้ดังรูป

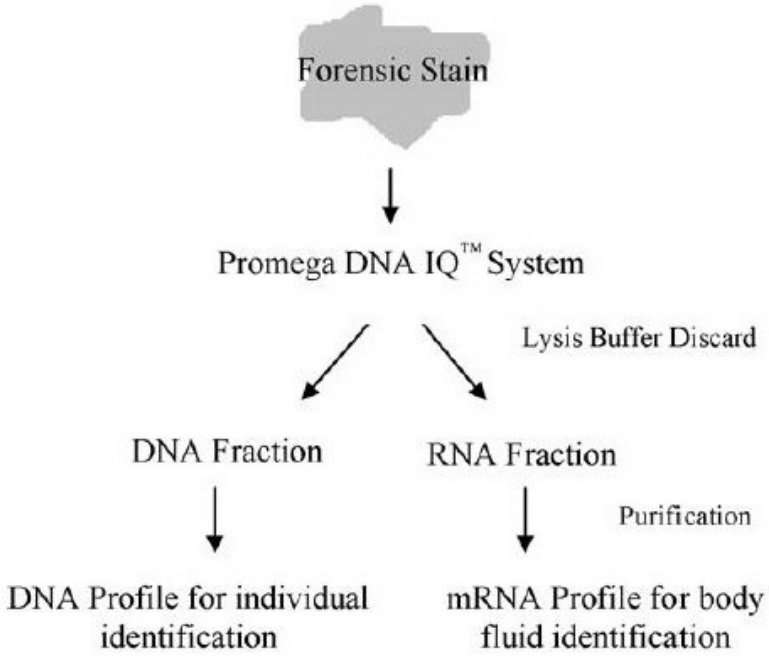


Fig. 1. Simplified schematic of overall Promega DNA IQ™ method with purification using the Zymo Research Mini RNA Isolation Kit™ II.

ค่าเฉลี่ยความเข้มข้น RNA และ DNA ที่สกัดได้จากตัวอย่างสารคัดหลั่งของร่างกายโดยใช้ Promega DNA IQ™ system ดังในตารางที่ 2

Table 2
Concentration of DNA and RNA extracted from each body fluid in duplicate using the modified DNA IQ™ manual method compared to those obtained with the organic method (average values).

Body fluid	Promega DNA IQ™ system extraction		Organic extraction	
	RNA concentration (ng/µL)	DNA concentration (ng/µL)	RNA concentration (ng/µL)	DNA concentration (ng/µL)
Blood (1 µL)	0.045	0.225	0.032	0.030
Semen (1 µL)	3.625	5.335	3.025	7.995
Saliva (10 µL)	0.051	3.48	0.090	6.345

จากตารางจะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพของการสกัด RNA ของ Promega DNA IQ™ system นั้น เทียบเท่ากับการสกัดด้วยวิธี organic extraction

ตัวอย่างการวิเคราะห์แยก RNA จากสารคัดหลั่งต่างๆ ตาม SGM Plus® ด้วย Promega DNA IQ™ system ซึ่งแสดงในรูปที่ 2 และ 3 ในรูปที่ 2 A แสดง housekeeper gene G6PDH, TEF และ UCE ตลอดจน TGM4 และ PRM2 ซึ่งเป็น marker ของ semen ตัวอย่าง semen ที่ใช้ปริมาณ 10 µl ได้ ความเข้มข้น RNA 2.5 ng/µl ตรงกับ การวิเคราะห์ DNA ดังแสดงในรูป 2 B โดยความเข้มข้นของ DNA 2.1 ng/µl

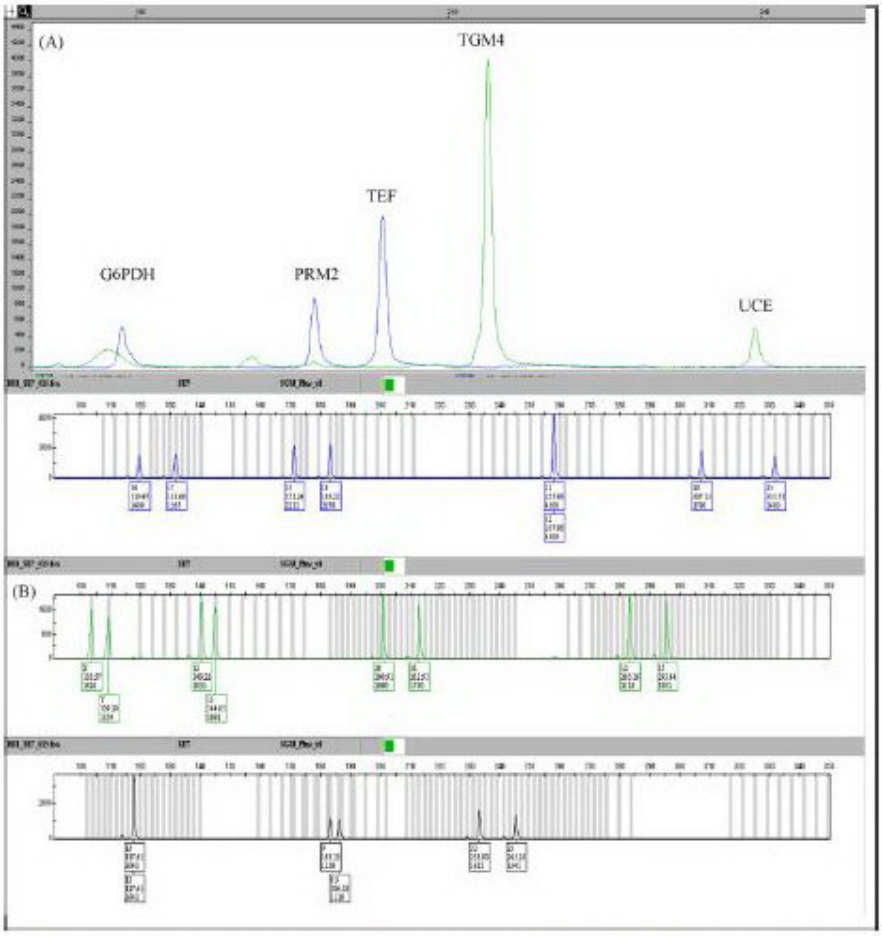


Fig. 2. (A) mRNA multiplex profile from a 10 µL semen sample. (B) Corresponding AmpFISTR® SGM Plus® DNA profile from the 10 µL semen sample.

รูปที่ 3 A แสดงถึง housekeeper gene และ marker ของ 16S-23S rRNA บน spacer region ของแบคทีเรีย Lactobacillus crispatus และ Lactobacillus gasseri แยก RNA ที่ได้จากสารคัดหลั่งในช่องคลอดออกจากสารคัดหลั่งอื่นๆ ในรูปที่ 3 B เป็นการตรวจ DNA โดยใช้ SGM Plus®

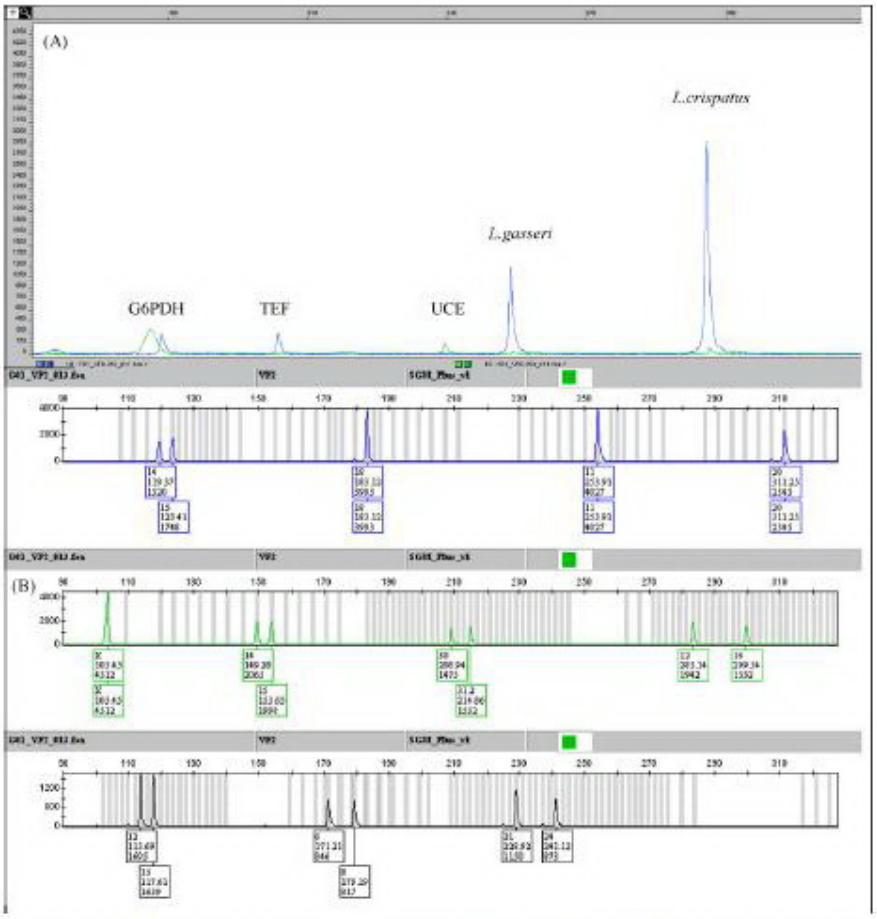
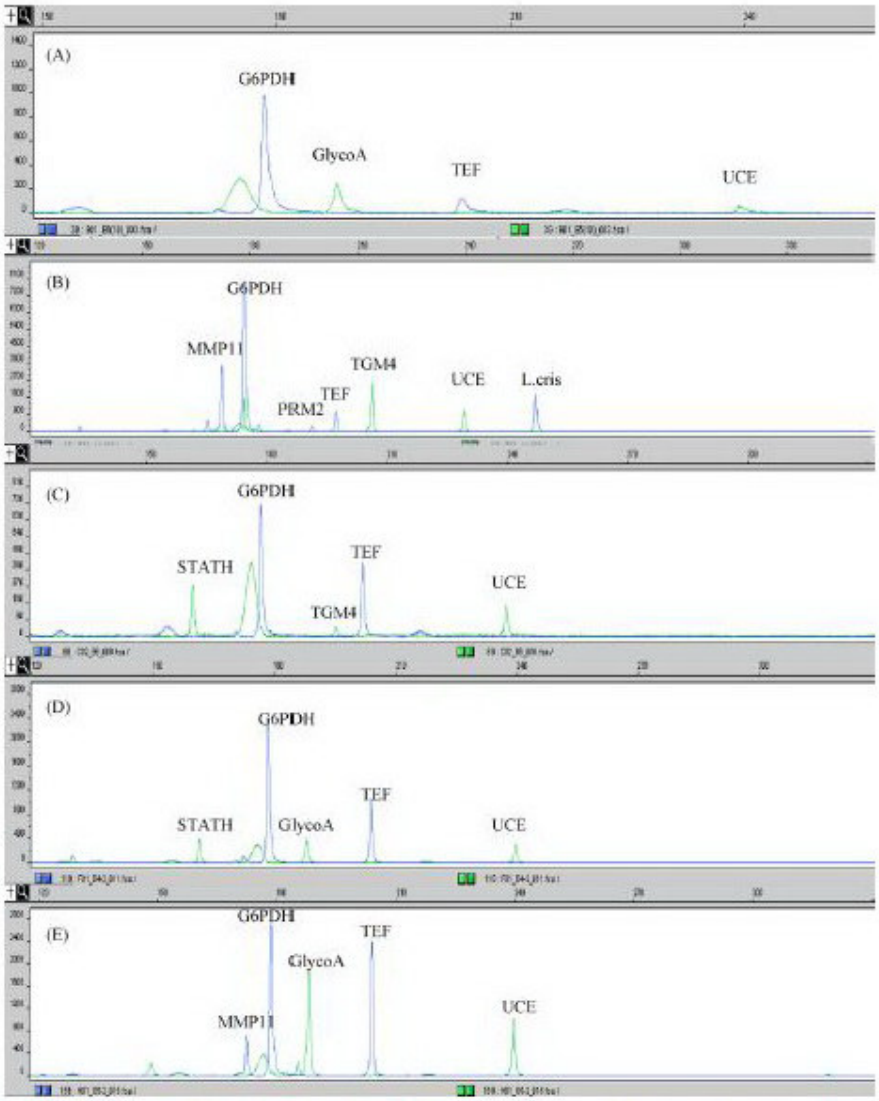


Fig. 3. (A) mRNA multiplex profile from a vaginal swab. (B) Corresponding AmpFISTR® SGM Plus® DNA profile from a vaginal swab.

รูปที่ 4 แสดงการตรวจ mRNA ต่างๆ ที่ได้จากคดี 5 ตัวอย่าง โดยที่ไม่ทราบถึงแหล่งที่มาแล้วไม่ได้ผ่านการทำ screening test ใดๆ มาก่อน นำ lysis buffer ที่มี RNA มาสกัดแล้วนำไปอธิบายได้



รูปที่ 4 A แสดง mRNA ที่เก็บได้จากเลือดที่พบบนตัวคนร้าย โดยตรวจพบ housekeeper gene และ GlycoA ซึ่งเป็น marker ที่จำเพาะกับเลือด ในส่วนของ DNA นั้น พบ 3 หรือมากกว่า 3 ชุด DNA จึงต้องใช้ผล mRNA marker มายืนยันผล

รูปที่ 4 B แสดงการตรวจ mRNA ที่เก็บได้จากผ้าเช็ดตัว สามารถตัวพบ DNA ในปริมาณมาก และเป็น DNA ของผู้หญิงคนหนึ่ง ในขณะที่การตรวจ mRNA พบ housekeeper gene, MMP11 ซึ่งจำเพาะกับเลือดประจำเดือน, L. gasseri ซึ่งจำเพาะกับสารคัดหลั่งในช่องคลอด TGM4 จำเพาะกับ semen และ PRM2 ที่จำเพาะกับตัวอสุจิ การตรวจ DNA ที่ได้จาก Identifiler ได้ผลเป็น DNA ของผู้หญิง ซึ่งไม่เกี่ยวเนื่องกันกับการสอบสวน และตัวอย่างนี้ไม่ได้ส่งตรวจ semen DTT เนื่องจากรู้แหล่งที่มาของสารคัดหลั่งที่พบว่ามาจากอวัยวะใด ซึ่งเพียงพอแล้วต่อการอธิบายว่ามี DNA ของผู้ชายมาได้อย่างไร

รูป 4 C แสดงการตรวจ mRNA ที่ได้จากถุงมือของคนร้าย ซึ่งการตรวจ DNA รู้ว่าเป็นDNA ของผู้ชาย แต่ mRNA ตรวจพบ housekeeper gene , และ STATH ซึ่งจำเพาะกับน้ำลาย

รูป 4 D แสดงการตรวจ mRNA ที่ได้จากหมวกฮูดของคนร้าย จากตรวจพบ DNA ของผู้ชาย housekeeper gene STATH และ GlycoA ซึ่งจำเพาะกับน้ำลายและเลือดตามลำดับ

รูป 4 E แสดงการตรวจ mRNA ที่ได้จากคราบเลือดที่พบบนผ้าเช็ดมือของคนร้าย ซึ่งตรวจพบบางส่วนของ DNA ผู้หญิง MMP11 ซึ่งจำเพาะกับเลือดประจำเดือน และ GlycoA ซึ่งจำเพาะกับเลือด

เอกสารอ้างอิง

1. Promega DNA IQTM System Database Protocol Technical Bulletin, TB297, 2009.
2. www.xiril.com
3. www.google.com

ภาคผนวก

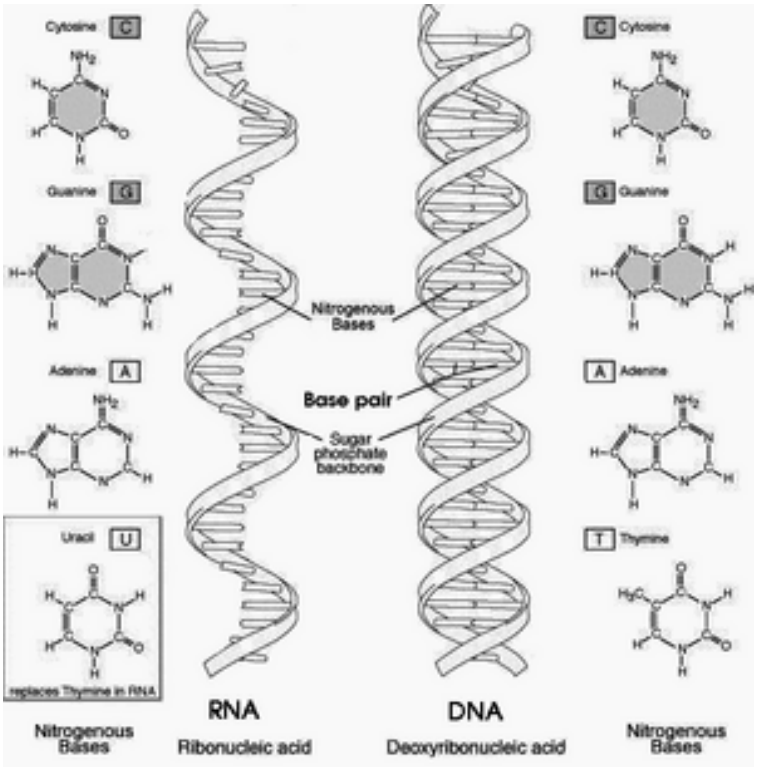
กรดไรโบนิวคลีอิก หรือ **อาร์เอ็นเอ** (Ribonucleic acid - RNA) เป็นพอลิเมอร์ของกรดนิวคลีอิกที่ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะโคเวเลนต์ อาร์เอ็นเอนิวคลีโอไทด์ประกอบด้วยวงแหวนไรโบส (ribose) ซึ่งแตกต่างจากดีเอ็นเอที่ประกอบด้วยวงแหวนดีออกซีไรโบส (deoxyribose) อาร์เอ็นเอเกิดจากการคัดสำเนาข้อมูลจากดีเอ็นเอโดยเอนไซม์อาร์เอ็นเอพอลิเมอเรส แล้วเข้ากระบวนการต่อเนื่องโดยเอนไซม์อื่นๆ อีก อาร์เอ็นเอจะทำหน้าที่เหมือนแม่แบบสำหรับแปลข้อมูลจากยีน ไปเป็นข้อมูลในโปรตีน แล้วขนย้ายกรดอะมิโนเข้าไปในไรโบโซม (ribosome) เพื่อผลิตโปรตีน และแปลข้อความไปเป็นสำเนาข้อมูล (transcript) ในโปรตีน

RNA ถูกสร้างเริ่มแรกจากด่าง (bases) แตกต่างกัน 4 ชนิด คือ

- อะดีนีน (adenine)
- กัวนีน (guanine)
- ไซโตซีน (cytosine)
- ยูราซิล (uracil)

ด่าง 3 ตัวแรกเหมือนกับที่พบใน DNA แต่ ยูราซิล มาแทนที่ไทมีน (thymine) โดยจะเชื่อมต่อกับ อะดีโนซีน ด่างตัวนี้เป็นสารประกอบ ไพริมิดีน (pyrimidine) ด้วย และมีความคล้ายกับ ไทมีน (thymine) ยูราซิลมีพลังของการทำงานน้อยกว่า ไทมีน อย่างไรก็ดีใน DNA ยูราซิลจะถูกผลิตโดยการสลายตัวทางเคมีของ ไซโตซีน ดังนั้นจึงสามารถตรวจพบ ไทมีน จึงสรุปว่า

- ยูราซิลถูกจัดสรรไว้สำหรับ RNA ที่ซึ่งปริมาณมีความสำคัญแต่ช่วงอายุสั้น
- ไทมีนถูกจัดสรรไว้สำหรับ DNA ที่ซึ่งการรักษาช่วงตอน (sequence) ของโครงสร้างโมเลกุลมีความสำคัญ



พบว่ามีการดัดแปลงด่างจำนวนมากใน RNA ซึ่งมีบทบาทแตกต่างกันมากมาย ซูโดยูริดีน (Pseudouridine) และ ด่าง ดีเอ็นเอ ไทมิดีน (thymidine) ถูกพบในหลายที่ แต่ที่มีมากอยู่ใน ทีซี ลูป (TC loop) ของทุก tRNA ในธรรมชาติพบว่ามีการปรับเปลี่ยนด่างเป็น 100 กรณี ที่เรายังไม่เข้าใจดีนัก

การสังเคราะห์ RNA ถูกเร่งปฏิกิริยาโดย เอนไซม์ อาร์เอ็นเอ พอลิเมอเรส (RNA polymerase) ใช้ DNA เป็นแม่แบบ เริ่มต้นการสังเคราะห์โดยการเชื่อมต่อกับเอนไซม์ตรงตำแหน่ง โปรโมเตอร์ (promoter) ซีเควนซ์ (sequence) ใน DNA (ตามธรรมดาพบ "อัพสตรีม" (upstream) ของ ยีน) DNA ดับเบิลเฮลิกซ์จะคลายตัวออกโดยการทำงานของเอนไซม์ เฮลิเคส (helicase) แล้วเอนไซม์จะเคลื่อนไปตามแม่แบบเกลียวในทิศทางจาก 3’ -> 5’ และการสังเคราะห์โมเลกุลของ RNA จะมีทิศทางจาก 5’ -> 3’

การสังเคราะห์ RNA ถูกเร่งปฏิกิริยาโดย เอนไซม์ อาร์เอ็นเอ พอลิเมอเรส (RNA polymerase) ใช้ DNA เป็นแม่แบบ เริ่มต้นการสังเคราะห์โดยการเชื่อมต่อกับเอนไซม์ตรงตำแหน่ง โปรโมเตอร์ (promoter) ซีเควนซ์ (sequence) ใน DNA (ตามธรรมดาพบ "อัพสตรีม" (upstream) ของ ยีน) DNA ดับเบิลเฮลิกซ์จะคลายตัวออกโดยการทำงานของเอนไซม์ เฮลิเคส (helicase) แล้วเอนไซม์จะเคลื่อนไปตามแม่แบบเกลียวในทิศทางจาก 3’ -> 5’ และการสังเคราะห์