RMJ Ramathibodi Medical Journal

Rama Med J | Original Article

การศึกษาปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดจากเส้นผมของผู้เสียชีวิต

กาญจนา สุจิรชาโต[1], สุรนันท์ ตีระวัฒนพงษ์[1], นูรฮัสนี หมิแหม[1], ศิริรัตน์ อินอ่อน[1], อดิศักดิ์ แก้วดวงดี[1], วิศาล วรสุวรรณรักษ์[2]

[1] ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา กรุงเทพฯ ประเทศไทย

[2] ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ ประเทศไทย

บทนำ: ปัญหาที่พบบ่อยในการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นผมคือการได้ปริมาณน้อยและมีความไม่บริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ

วัตถุประสงค์: เพื่อประเมินการสกัดดีเอ็นเอจากรากผมโดยวิธีสกัดด้วยสารละลาย Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol

วิธีการศึกษา: ตัวอย่างรากผม จำนวน 5 เส้น และ 10 เส้น ของผู้เสียชีวิต จำนวน 30 คน ถูกนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยสารละลาย Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol จากนั้นเปรียบเทียบปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง NanoDrop spectrophotometer และตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยวิธี PCR ทำการวิเคราะห์ปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้กับปัจจัยที่อาจมีผลกระทบ เช่น เพศ อายุ และพฤติการณ์การเสียชีวิต

ผลการศึกษา: ปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอจากรากผม 10 เส้น สูงกว่ารากผม 5 เส้น ($P > .05$) โดยปริมาณดีเอ็นเอจากรากผม 10 เส้น และ 5 เส้น ในปริมาตร 30 ไมโครลิตร มีค่าเฉลี่ย (ค่าต่ำสุด - ค่าสูงสุด) เท่ากับ 200.4 (35.2 - 799.6) และ 148.2 (21.7 - 571.5) นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (A260/280) ของรากผม 10 เส้น และ 5 เส้น มีค่าเฉลี่ย (ค่าต่ำสุด - ค่าสูงสุด) เท่ากับ 1.6 (1.3 - 1.9) และ 1.5 (1.3 - 1.9) ตามลำดับ ปัจจัยด้านเพศ อายุ และพฤติการณ์การเสียชีวิตไม่มีผลต่อปริมาณและความบริสุทธิ์ดีเอ็นเอจากรากผม

สรุป: ดีเอ็นเอสามารถถูกสกัดจากรากผมโดยวิธีสกัดด้วยสารละลาย Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol โดยได้ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอเพียงพอสำหรับตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล และการสกัดดีเอ็นเอจากรากผม 10 เส้น ได้ผลดีกว่ารากผม 5 เส้น

คำสำคัญ: นิติพันธุศาสตร์ ปริมาณดีเอ็นเอ การสกัดดีเอ็นเอจากรากผม สารละลาย Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol วิธี PCR เครื่อง NanoDrop spectrophotometer

Rama Med J: doi:10.33165/rmj.2020.43.2.224635

Received: November 19, 2019 **Revised:** April 9, 2020 **Accepted:** May 1, 2020

Corresponding Author:
วิศาล วรสุวรรณรักษ์
ภาควิชาพยาธิวิทยา
คณะแพทยศาสตร์
โรงพยาบาลรามาธิบดี
มหาวิทยาลัยมหิดล
270 ถนนพระรามที่ 6
แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี
กรุงเทพฯ 10400 ประเทศไทย
โทรศัพท์ +66 2201 1145
โทรสาร +66 2201 1145
อีเมล wisarn.wor@mahidol.ac.th

บทนำ

ในกระบวนการยุติธรรมจำเป็นต้องหาหลักฐานยืนยันบุคคลผู้กระทำผิด การพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลเพื่อให้ทราบตัวตนที่แท้จริงในเหตุการณ์จะเป็นประโยชน์ในทางกฎหมาย โดยเฉพาะการตรวจดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะมากกว่าการตรวจโดยวิธีอื่น[1] ทั้งนี้ วัตถุพยานส่วนใหญ่เป็นเลือด แต่ในบางคดีไม่สามารถพบเลือดของผู้ต้องสงสัย เส้นผมจึงเป็นวัตถุพยานที่พบได้บ่อยรองจากเลือด[2-4] การสกัดดีเอ็นเอจากเส้นผมมักมีปัญหาเรื่องได้ปริมาณดีเอ็นเอน้อย และอาจมีตัวยับยั้ง (Inhibitor) ที่ส่งผลให้การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Amplify DNA) โดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) ไม่ได้ผล[5]

การสกัดดีเอ็นเอจากเส้นผมมีรายงานการศึกษาในต่างประเทศ เช่น ญี่ปุ่น[5] เวียดนาม[6] และสาธารณรัฐเช็ก[7] วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นผมมีหลายวิธี เช่น การต้ม (Boiling) การตกตะกอนด้วยเกลือ (Salting-out) การใช้สารละลาย Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol การตกตะกอนด้วยสาร Isopropanol และการใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (Commercial kits)[8] โดยพบว่า การใช้สารละลาย Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol สามารถสกัดดีเอ็นเอได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีปริมาณมาก รวมทั้งค่าใช้จ่ายไม่แพงและใช้เวลาสกัดน้อย[9-10] แต่มีข้อเสียคือ สามารถทำให้เกิดพิษจากสาร Phenol[11]

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเส้นผมโดยวิธีสกัดด้วยสารละลาย Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol และวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดจากรากผม ระหว่างรากผม จำนวน 5 เส้น และ 10 เส้น โดยวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง NanoDrop spectrophotometer และศึกษาคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยใช้วิธี PCR

วิธีการศึกษา

กลุ่มตัวอย่าง

เส้นผมของผู้เสียชีวิต จำนวน 30 คน จากห้องปฏิบัติการชันสูตรศพ สาขาวิชานิติเวชศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล ระหว่างเดือนตุลาคมถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2561 โดยเลือกเส้นผมจากแต่ละคนที่มีรากผมด้วยแว่นขยาย ตัดรากผมยาว 5 มิลลิเมตร ด้วยกรรไกรสะอาด ชั่งน้ำหนักโดยเครื่องชั่งความละเอียดสูงทศนิยม 4 ตำแหน่ง ใส่ในหลอดทดลอง (Microtube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร โดยหลอดที่ 1 ใส่รากผม จำนวน 10 เส้น และหลอดที่ 2 ใส่รากผม จำนวน 5 เส้น

การพิทักษ์สิทธิของกลุ่มตัวอย่าง

การศึกษานี้ได้รับการอนุมัติดำเนินการวิจัยโดยผ่านการพิจารณาและรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล เลขที่ 2019/957 เมื่อวันที่ 27 กันยายน พ.ศ. 2562

วิธีดำเนินการวิจัย

การสกัดดีเอ็นเอจากรากผมโดยวิธีสกัดด้วยสารละลาย Phenol/Chloroform/Isoamyl Alcohol

ตัวอย่างรากผมถูกย่อยผนังเซลล์รากผมด้วยเอนไซม์ Proteinase K และ Lysis buffer ทิ้งไว้ค้างคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นสกัดดีเอ็นเอด้วยสารละลาย Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 25:24:1 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และสารละลาย Chloroform/Isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 24:1 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ดูดชั้นบนซึ่งเป็นสารละลายน้ำ (Aqueous) ใส่ในหลอดใหม่แล้วตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย Ethanol sodium acetate และ Glycogen โดยไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นด้วยความเร็วสูง (12,000 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 15 นาที โดยใช้เครื่องปั่นแยกสารแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) เนื่องจากการปั่นนานจะเกิดความร้อน จากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย 70% Ethanol และละลายตะกอนดีเอ็นเอในน้ำกลั่น (DNase-free water) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเก็บหลอดตัวอย่างสกัดดีเอ็นเอไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส [3, 12-13]

การทดสอบดีเอ็นเอที่สกัดได้ในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ

การทดสอบเชิงปริมาณโดยใช้เครื่อง NanoDrop 2000c UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, USA) ซึ่งสามารถวัดได้ทั้งปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260/280 (A260/280) นาโนเมตร จำนวน 3 ครั้ง รายงานค่าเฉลี่ยปริมาณดีเอ็นเอเป็นหน่วยนาโนกรัมต่อไมโครลิตร และค่าเฉลี่ยความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (A260/280) ควรมากกว่า 1.5

การทดสอบเชิงคุณภาพโดยวิธี PCR[12-13] ทดสอบคุณภาพดีเอ็นเอโดยใช้ Human growth hormone (HGH-S และ HGH-AS) (Biodesign, Pathum Thani, Thailand) เป็น Primer ซึ่งมีลำดับดีเอ็นเอดังนี้ HGH-S: 5′-TGCCTTCCCAACCATTCCCTTA-3′ และ HGH-AS: 5′-CCACTCACGGATTTCTGTTGTGTT-TC-3′ และใช้ชุดน้ำยา Perfect*Taq*™ Plus MasterMix (5 PRIME GmbH, Hamburg, Germany) โดยปฏิบัติตามคู่มือของชุดน้ำยา จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR ด้วยเครื่อง T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, California, USA) โดยตั้งค่าโปรแกรมปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 1) Predenaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที 2) Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที 3) Annealing ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที 4) Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 35 รอบ และ 5) Final Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที โดยหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส จากนั้นตรวจสอบขนาดของ PCR product ด้วย 2% Agarose gel electrophoresis ร่วมกับดีเอนเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส (100 bp DNA Ladder, MBGEN Biosciences, Taipei, Taiwan) ซึ่งทราบขนาดที่แน่นอนของดีเอ็นเอแต่ละชิ้น (Molecular weight marker) ย้อมด้วย Ethidium bromide และตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gel Doc (Cell Biosciences, Santa Clara, USA) ซึ่งควรปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 434 คู่เบส

การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกับความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอของรากผม 10 เส้น และ 5 เส้น กับเพศ อายุ และพฤติการณ์การเสียชีวิต โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS รุ่นที่ 25.0 (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp; 2017) แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย (Mean) ค่าต่ำสุด (Minimum) ค่าสูงสุด (Maximum) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) กำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ .05 ($P < .05$)

ผลการศึกษา

กลุ่มตัวอย่าง จำนวนทั้งหมด 30 คน แบ่งเป็นเพศชาย จำนวน 25 คน และเพศหญิง จำนวน 5 คน (อัตราส่วนเพศชายต่อเพศหญิง เท่ากับ 5:1) อายุมีค่าเฉลี่ย (ค่าต่ำสุด - ค่าสูงสุด) เท่ากับ 43.6 (17 - 88) ปี สำหรับพฤติการณ์การเสียชีวิต ส่วนใหญ่เสียชีวิตแบบกะทันหัน จำนวน 12 คน คิดเป็นร้อยละ 40.0 รองลงมาคือ อุบัติเหตุจราจร จำนวน 8 คน ถูกฆ่า/ฆ่าตัวตาย/อุบัติเหตุ จำนวน 6 คน และอื่นๆ จำนวน 4 คน

การเปรียบเทียบปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดรากผม 10 เส้น และ 5 เส้น ของกลุ่มตัวอย่างพบว่า น้ำหนักของรากผม 10 เส้น และ 5 เส้น มีค่าเฉลี่ย (ค่าต่ำสุด - ค่าสูงสุด) เท่ากับ 0.0010 (0.0002 - 0.0040) และ 0.0005 (0.0001 - 0.0021) กรัม ตามลำดับ ปริมาณดีเอ็นเอจากรากผม 10 เส้น มีค่าเฉลี่ย (ค่าต่ำสุด - ค่าสูงสุด) เท่ากับ 200.4 (35.2 - 799.6) นาโนกรัมต่อไมโครลิตร สูงกว่าปริมาณดีเอ็นเอจากรากผม 5 เส้น ซึ่งมีค่าเฉลี่ย (ค่าต่ำสุด - ค่าสูงสุด) เท่ากับ 148.2 (21.7 - 571.5) นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

เมื่อพิจารณาความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (A260/280) พบว่าดีเอ็นเอจากรากผม 10 เส้น มีค่าเฉลี่ย (ค่าต่ำสุด - ค่าสูงสุด) เท่ากับ 1.61 (1.31 - 1.99) สูงกว่าดีเอ็นเอจากรากผม 5 เส้น ซึ่งมีค่าเฉลี่ย (ค่าต่ำสุด - ค่าสูงสุด) เท่ากับ 1.54 (1.32 - 1.90) นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มรากผม 5 เส้น ที่สกัดดีเอ็นเอ

ได้น้อยกว่า 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร มีจำนวนมากกว่ากลุ่มรากผม 10 เส้น คิดเป็นร้อยละ 33.3 และร้อยละ 16.7 ตามลำดับ และกลุ่มรากผม 5 เส้น ที่สกัดดีเอ็นเอแล้วมีค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (A260/280) ในระดับต่ำ (น้อยกว่า 1.5) มีจำนวนมากกว่ากลุ่มรากผม 10 เส้น คิดเป็นร้อยละ 40.0 และร้อยละ 23.3 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ไม่มีความแตกต่างทั้งปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอระหว่างกลุ่มรากผม 10 เส้น และ 5 เส้น (ตารางที่ 1)

การเปรียบเทียบเพศกับปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดจากรากผม 10 เส้น และ 5 เส้น โดยวิธีสกัดด้วยสารละลาย Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol พบว่า ปริมาณดีเอ็นเอเฉลี่ยในผู้ชายมากกว่าผู้หญิง กล่าวคือ ในกลุ่มรากผม 10 เส้น ค่าเฉลี่ยปริมาณดีเอ็นเอในผู้ชาย เท่ากับ 219.3 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ขณะที่ในผู้หญิง เท่ากับ 105.9 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และในกลุ่มรากผม 5 เส้น ค่าเฉลี่ยปริมาณดีเอ็นเอในผู้ชาย เท่ากับ 150.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ขณะที่ในผู้หญิง เท่ากับ 136.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ในทางกลับกัน ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอของผู้หญิงสูงกว่าผู้ชาย กล่าวคือในกลุ่มรากผม 10 เส้น ค่าเฉลี่ยความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ(A260/280) ในผู้หญิง เท่ากับ 1.70 ขณะที่ในผู้ชาย เท่ากับ 1.59 และในกลุ่มรากผม 5 เส้น ค่าเฉลี่ยความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (A260/280) ในผู้หญิง เท่ากับ 1.59 ขณะที่ในผู้ชาย เท่ากับ 1.53 เมื่อทดสอบทางสถิติพบว่า ปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอระหว่างผู้ชายและผู้หญิงในกลุ่มผม 10 เส้น และ 5 เส้น ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > .05$) (ตารางที่ 2)

การเปรียบเทียบอายุกับปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดจากรากผม 10 เส้น และ 5 เส้น โดยวิธีสกัดด้วยสารละลาย Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol พบว่า ปริมาณดีเอ็นเอเฉลี่ยในคนอายุน้อยกว่า 50 ปี และมากกว่าหรือเท่ากับ 50 ปี ไม่มีความแตกต่างกัน กล่าวคือ ในกลุ่มผม 10 เส้น คนอายุน้อยกว่า 50 ปี ปริมาณดีเอ็นเอเฉลี่ยเท่ากับ 204.8 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ขณะที่คนอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 50 ปี ปริมาณดีเอ็นเอเฉลี่ยเท่ากับ 208.1 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ส่วนในกลุ่มผม 5 เส้น คนอายุน้อยกว่า 50 ปี ปริมาณดีเอ็นเอเฉลี่ยเท่ากับ 158.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ขณะที่คนอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 50 ปี ปริมาณดีเอ็นเอเฉลี่ยเท่ากับ 142.6 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

ตารางที่ 1. การเปรียบเทียบปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดจากรากผม 10 เส้น และ 5 เส้น

รายการ	จำนวน (%)	
	ผม 10 เส้น	ผม 5 เส้น
ปริมาณดีเอ็นเอ (ในปริมาตร 30 µL), ng/µL		
< 50	5 (16.7)	10 (33.3)
50 - 100	5 (16.7)	6 (20.0)
> 100	20 (66.6)	14 (46.7)
Mean (SD) [min - max], ng/µL	200.4 (169.7) [35.2 - 799.6]	148.2 (137.0) [21.7 - 571.5]
ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (A260/280)		
< 1.5	7 (23.3)	12 (40.0)
1.5 - 1.7	18 (60.0)	14 (46.7)
> 1.7	5 (16.7)	4 (13.3)
Mean (SD) [min - max]	1.61 (0.15) [1.31 - 1.99]	1.54 (0.13) [1.32 - 1.90]

SD, standard deviation.

ตารางที่ 2. การเปรียบเทียบเพศกับปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอจากรากผม 10 เส้น และ 5 เส้น

เพศ	ปริมาณดีเอ็นเอ (ในปริมาตร 30 µL), ng/µL			ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (A260/280)		
	ค่าเฉลี่ย	จำนวน (%)		ค่าเฉลี่ย	จำนวน (%)	
		< 50	≥ 50		< 1.5	≥ 1.5
ผม 10 เส้น						
ชาย (n = 25)	219.3	3 (12)	22 (88)	1.59	6 (24)	19 (76)
หญิง (n = 5)	105.9	2 (40)	3 (60)	1.70	1 (25)	4 (75)
ผม 5 เส้น						
ชาย (n = 25)	150.5	8 (32)	17 (68)	1.53	10 (40)	15 (60)
หญิง (n = 5)	136.5	2 (40)	3 (60)	1.59	2 (40)	3 (60)

สำหรับความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอในคนอายุน้อยกว่า 50 ปี และมากกว่าหรือเท่ากับ 50 ปี ได้ผลใกล้เคียงกันคือ ในกลุ่มผม 10 เส้น คนอายุน้อยกว่า 50 ปี ค่าเฉลี่ยความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (A260/280) เท่ากับ 1.64 ขณะที่คนอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 50 ปี ค่าเฉลี่ยความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (A260/280) เท่ากับ 1.56 ส่วนในกลุ่มผม 5 เส้น คนอายุน้อยกว่า 50 ปี ค่าเฉลี่ยความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (A260/280) เท่ากับ 1.53 ขณะที่คนอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 50 ปี ค่าเฉลี่ยความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (A260/280) เท่ากับ 1.57 เมื่อทดสอบทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอระหว่างกลุ่มอายุน้อยกว่า 50 ปี และกลุ่มอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 50 ปี ทั้งในกลุ่มผม 10 เส้น และ 5 เส้น ($P > .05$) (ตารางที่ 3)

การเปรียบเทียบพฤติการณ์การเสียชีวิตกับปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดจากรากผม 10 เส้น และ 5 เส้น โดยวิธีสกัดด้วยสารละลาย Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol พบว่า ปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอกับพฤติการณ์การเสียชีวิตไม่มีความแตกต่างกันทั้งในกลุ่มผม 10 เส้นและ 5 เส้น ($P > .05$) (ตารางที่ 4)

ค่าใช้จ่ายในการสกัดดีเอ็นเอจากรากผมโดยวิธีสกัดด้วยสารละลาย Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol คิดเป็นเงิน 49.55 บาทต่อคน จำแนกเป็นค่าน้ำยา 37.55 บาท และค่าอุปกรณ์สิ้นเปลือง 12.00 บาท ใช้เวลาสกัดดีเอ็นเอเป็นเวลา 20 ชั่วโมง 33 นาที

การสุ่มตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากรากผม 10 เส้น และ 5 เส้น ที่มีปริมาณดีเอ็นเอและความบริสุทธิ์ต่างๆ กันจากคนๆ เดียวกัน จำนวนอย่างละ 9 คน (M599, M600, M605, M603, M620, M626, M625, M649 และ M665) ทดสอบด้วยวิธี PCR พบว่ากลุ่มผม 10 เส้น มีปัญหาการทำ PCR ไม่ได้ผล จำนวน 2 คน คิดเป็นร้อยละ 22.2 ขณะที่กลุ่มผม 5 เส้น มีปัญหาทำ PCR ไม่ได้ผล จำนวน 3 คน คิดเป็นร้อยละ 33.3 เมื่อนำค่าที่ได้จากเครื่อง NanoDrop spectrophotometer มาวิเคราะห์ร่วมกับผล PCR เพื่อหาสาเหตุของการทำ PCR ไม่ได้ผล สรุปได้เป็น 3 แบบ ดังนี้

ตัวอย่างดีเอ็นเอ M600 จากผม 5 เส้น ปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 34.6 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (A260/280) เท่ากับ 1.87 น่าจะเกิดจากปริมาณดีเอ็นเอน้อย (ภาพที่ 1)

ตัวอย่างดีเอ็นเอ M620 จากผม 10 เส้น ปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 85.7 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (A260/280) เท่ากับ 1.46 น่าจะเกิดจากความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอน้อย

ตัวอย่างดีเอ็นเอ M620 จากผม 5 เส้น ปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 87.3 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (A260/280) เท่ากับ 1.40 น่าจะเกิดจากความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอน้อย

ตัวอย่างดีเอ็นเอ M665 จากผม 10 เส้น ปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 255.7 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (A260/280) เท่ากับ 1.63 น่าจะเกิดจากตัวยับยั้งปฏิกิริยา PCR

ตัวอย่างดีเอ็นเอ M665 จากผม 5 เส้น ปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 214.8 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรและค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (A260/280) เท่ากับ 1.57 น่าจะเกิดจากตัวยับยั้งปฏิกิริยา PCR

เมื่อนำตัวอย่างดีเอ็นเอ M665 จากผม 10 เส้น และ 5 เส้น มาเจือจางเพื่อลดผลของตัวยับยั้งปฏิกิริยา PCR แต่ยังคงความเข้มข้นของดีเอ็นเอไม่น้อยกว่า 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร โดยทำการเจือจางแบบ 2-fold dilution จนได้อัตราส่วน 1:2 และ 1:4 จากนั้นทำการทดสอบซ้ำโดยวิธี PCR พบว่า ผลยังคงไม่เห็นแถบดีเอ็นเอขนาด 434 คู่เบส แสดงว่า การทำ 2-fold dilution ไม่สามารถลดผลของตัวยับยั้งปฏิกิริยา PCR ได้

ตารางที่ 3. การเปรียบเทียบอายุกับปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอจากรากผม 10 เส้น และ 5 เส้น

อายุ, ปี	ปริมาณดีเอ็นเอ (ในปริมาตร 30 µL), ng/µL			ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (A260/280)		
	ค่าเฉลี่ย	จำนวน (%)		ค่าเฉลี่ย	จำนวน (%)	
		< 50	≥ 50		< 1.5	≥ 1.5
ผม 10 เส้น						
< 50 (n = 18)	204.8	3 (16.7)	15 (83.3)	1.64	3 (16.7)	15 (83.3)
≥ 50 (n = 11)	208.1	1 (9.1)	10 (90.9)	1.56	4 (36.4)	7 (63.6)
ผม 5 เส้น						
< 50 (n = 18)	158.5	6 (33.3)	12 (66.7)	1.53	8 (44.4)	10 (55.6)
≥ 50 (n = 11)	142.6	4 (36.4)	7 (63.6)	1.57	4 (36.4)	7 (63.6)

ตารางที่ 4. การเปรียบเทียบพฤติการณ์การเสียชีวิตกับปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอจากรากผม 10 เส้น และ 5 เส้น

พฤติการณ์การเสียชีวิต	ปริมาณดีเอ็นเอ (ในปริมาตร 30 µL), ng/µL			ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (A260/280)		
	ค่าเฉลี่ย	จำนวน (%)		ค่าเฉลี่ย	จำนวน (%)	
		< 50	≥ 50		< 1.5	≥ 1.5
ผม 10 เส้น						
เสียชีวิตกะทันหัน (n = 12)	215.8	2 (16.7)	10 (83.3)	1.59	5 (41.7)	7 (58.3)
อุบัติเหตุจราจร (n = 8)	236.7	1 (12.5)	7 (87.5)	1.65	2 (25)	6 (75)
ถูกฆ่า/ฆ่าตัวตาย (n = 6)	191.7	0 (0)	6 (100)	1.59	0 (0)	6 (100)
อื่นๆ (n = 4)	94.6	2 (50)	2 (50)	1.60	0 (0)	4 (100)
ผม 5 เส้น						
เสียชีวิตกะทันหัน (n = 12)	119.3	5 (41.7)	7 (58.3)	1.57	4 (33.3)	8 (66.7)
อุบัติเหตุจราจร (n = 8)	185.0	2 (25)	6 (75)	1.54	2 (25)	6 (75)
ถูกฆ่า/ฆ่าตัวตาย (n = 6)	125.2	1 (16.7)	5 (83.3)	1.54	2 (33.3)	4 (66.7)
อื่นๆ (n = 4)	195.8	2 (50)	2 (50)	1.49	3 (75)	1 (25)

ภาพที่ 1. การทดสอบคุณภาพของดีเอ็นเอจากรากผม M599 M600 และ M605 โดยวิธี PCR

1	2	3	4	5	6	7
MW marker	M599	M599	M600	M600	M605	M605
Hair	10	5	10	5	10	5
DNA, ng/µL	35.5	22.5	80.4	34.6	39.4	30.9
A260/280	1.52	1.49	1.90	1.87	1.70	1.59
PCR (434 bp)	Present	Present	Present	Pale	Present	Present

MW, molecular weight; PCR, polymerase chain reaction.

อภิปรายผล

ประเทศไทยมีรายงานการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นผมเพียงบทความเดียว[14] เมื่อ พ.ศ. 2555 หรือประมาณ 7 ปีที่ผ่านมา โดยเก็บตัวอย่างหนวดสัตว์ป่าตระกูลเสือ ตัวละ 3 - 5 เส้น ใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป และวัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง NanoDrop spectrophotometer พบว่า ค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (A260/280) ส่วนใหญ่มีค่าน้อยกว่า 1.8 ซึ่งผลที่ได้นั้นใกล้เคียงกับการศึกษานี้ ในการสกัดเส้นผม 5 เส้น ได้ปริมาณดีเอ็นเอเฉลี่ย เท่ากับ 148.2 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (A260/280) มีค่าเฉลี่ย (ค่าต่ำสุด - ค่าสูงสุด) เท่ากับ 1.54 (1.32 - 1.90)

การสกัดดีเอ็นเอจากเส้นผมในต่างประเทศมีรายงานการศึกษาของ Takayanagi และคณะ[5] ได้เปรียบเทียบวิธีสกัดดีเอ็นเอจากเส้นผมด้วยวิธี Phenol/Chloroform method วิธี Sodium iodide (NaI) method และวิธี Silica-beads method พบว่า ปริมาณดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย (Mitochondrial DNA, mtDNA) ที่สกัดจากเส้นผม (Fresh hair shaft) ที่มีความยาว 1, 3, 5 และ 10 เซนติเมตร ทั้ง 3 วิธีได้ผลไม่แตกต่างกัน รายงานการศึกษาของ Riemann และคณะ[15] ได้เสนอว่า ควรสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีการทำด้วยมือ (Manual DNA extraction) เพื่อลดค่าใช้จ่าย เนื่องจากเครื่องสกัดดีเอ็นเอแบบอัตโนมัติ (Automated DNA extraction) มีราคาแพงร่วมกับตัวอย่างมีจำนวนน้อย นอกจากนี้ รายงานการศึกษาของ Hue และคณะ[6] ได้ศึกษาการสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีสกัดด้วยสารละลาย Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol พบว่า การทำ 2 ขั้นตอน (2-step Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol) ได้ผลดีกว่า 1 ขั้นตอน (1-step Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol) และเมื่อเร็วๆ นี้ รายงานการศึกษาของ Votrubova และคณะ[7] ได้นำเครื่องอัตโนมัติ MagCore HF 16 Plus (RBC Bioscience, Taipei, Taiwan) มาใช้สกัดดีเอ็นเอพบว่า สามารถช่วยลดภาระงานที่เพิ่มขึ้น แต่ข้อเสียคือเครื่องมีราคาแพง

อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นถึงการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้อุปกรณ์ น้ำยา และเครื่องมือราคาไม่แพง คิดเป็นค่าใช้จ่ายประมาณ 50 บาทต่อคน และใช้เวลาไม่เกิน 24 ชั่วโมง ในการสกัดดีเอ็นเอ เมื่อใช้วิธีการนี้บ่มค้างคืน สามารถลดระยะเวลาการสกัดดีเอ็นเอได้ให้เหลือเพียง 3 ชั่วโมง ซึ่งจะทำให้ประหยัดเวลาในการสกัดดีเอ็นเอได้เพิ่มขึ้นอีก แต่ข้อเสียของวิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol คือพิษจาก Phenol ซึ่งมีผลต่อผิวหนัง ถ้าสัมผัสจะเกิดรอยไหม้ เนื้อตาย (Necrosis) และมีผลต่อระบบหายใจ เกิดอาการคลื่นไส้ วิงเวียนศีรษะ ระคายเคืองทางเดินหายใจ นอกจากนี้ยังมีผลต่อตา ถ้าสัมผัสจะเกิดการกัดกร่อน ทำให้ปวดตา การศึกษานี้ใช้วิธีการ Microtechnique ปริมาตรน้อยมาก และมีการสวมถุงมือ (Glove) เสื้อกาวน์ (Gown) แว่นตา (Goggle) และหน้ากากปิดจมูก (Mask) เพื่อป้องกันการสัมผัสโดยตรง รวมทั้งมีการกำจัดสิ่งปนเปื้อนตามหลักการห้องปฏิบัติการที่ดี (Good Laboratory Practice, GLP) จึงไม่พบปัญหาในการปฏิบัติงาน

ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากรากผมโดยวิธีการใช้สารละลาย Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol ในการศึกษานี้พบว่ารากผม จำนวน 10 เส้น มีปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอดีกว่าเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากรากผม จำนวน 5 เส้น แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอาจเป็นเพราะจำนวนตัวอย่างในการศึกษานี้ยังมีจำนวนค่อนข้างน้อย นอกจากนี้ ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากรากผมไม่มีปัญหาในการทำ PCR โดยใช้ Human growth hormone เป็น Primer ในกรณีที่มีปัญหาเนื่องจากความเข้มข้นของดีเอ็นเอน้อยกว่า 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอจางหรือไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ได้แก้ปัญหาโดยเพิ่มสัดส่วนปริมาตรดีเอ็นเอในสารองค์ประกอบของการทำ PCR (PCR mixture) เพื่อให้มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอไม่น้อยกว่า 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร พบว่า สามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้ สำหรับค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (A260/280) ที่น้อยกว่า 1.5 จะพบปัญหาในการทำ PCR ซึ่งกรณีนี้ไม่สามารถแก้ปัญหาโดยการตกตะกอนดีเอ็นเอซ้ำ เนื่องจากดีเอ็นเอเดิมมีน้อย สำหรับตัวยับยั้งที่พบในตัวอย่าง 1 คน ซึ่งทำ PCR ไม่ได้ผล แม้ว่าความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเออยู่ในเกณฑ์ดี ซึ่งมีรายงานการศึกษาของ Takayanagi และคณะ[5] พบเหตุการณ์เช่นนี้และอธิบายว่าเกิดจากตัวยับยั้งคือสาร Melanin มีผลต่อ *Taq* polymerase ซึ่งมักพบในกลุ่มตัวอย่างที่มีเส้นผมสีดำโดยธรรมชาติ (Natural black hairs) อาจต้องตรวจจากวัตถุพยานอื่น

อย่างไรก็ตาม การสกัดดีเอ็นเอจากรากผมพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กับเพศ อายุ และพฤติการณ์การเสียชีวิตอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ากลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้ยังมีจำนวนน้อย ซึ่งหากมีการเพิ่มกลุ่มตัวอย่างให้มากขึ้น อาจทำให้เห็นความแตกต่างทางสถิติได้

สรุปผล

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดจากรากผมโดยวิธีการใช้สารละลาย Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol ของรากผม จำนวน 10 เส้น ได้ทั้งปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (A260/280) ที่สกัดได้ดีกว่ารากผม จำนวน 5 เส้น ซึ่งดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพเพียงพอสำหรับตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล

References

1. Seubwai W, Khunkitti W. Application of molecular biology techniques on forensic sciences. *Srinagarind Med J.* 2014;29(3):321-326.
2. Köchl S, Niederstätter H, Parson W. DNA extraction and quantitation of forensic samples using the phenol-chloroform method and real-time PCR. *Methods Mol Biol.* 2005;297:13-30.
3. Cigliero SS, Edalucci E, Fattorini P. DNA Extraction from Blood and Forensic Samples. In: Stanta G, ed. *Guidelines for Molecular Analysis in Archive Tissues*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 2011:45-54.
4. Lee SB, Shewale JG. DNA extraction methods in forensic analysis. In: Meyers RA, ed.

Encyclopedia of Analytical Chemistry. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2017:1-18. doi:10.1002/9780470027318.a1104m.pub2.

5. Takayanagi K, Asamura H, Tsukada K, Ota M, Saito S, Fukushima H. Investigation of DNA extraction from hair shafts. *Int Congr Ser*. 2003;1239:759-764. doi:10.1016/S0531-5131(02)00582-4.
6. Hue NT, Chan NDH, Phong PT, Linh NTT, Giang ND. Extraction of human genomic DNA from dried blood spots and hair roots. *Int J Biosci Biochem Bioinforma*. 2012;2(1):21-26. doi:10.7763/IJBBB.2012.V2.62.
7. Votrubova J, Saskova L, Dalihodova S, Vanek D. DNA extraction from forensic samples using MagCore HF 16 Plus automated nucleic acid extractor - A preliminary study. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser*. 2017;6:e150-e152. doi:10.1016/j.fsigss.2017.09.023.
8. Garg UC, Hanson NQ, Tsai MY, Eckfeldt JH. Simple and rapid method for extraction of DNA from fresh and cryopreserved clotted human blood. *Clin Chem*. 1996;42(4):647-648.
9. Grimberg J, Nawoschik S, Belluscio L, McKee R, Turck A, Eisenberg A. A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood. *Nucleic Acids Res*. 1989;17(20):8390. doi:10.1093/nar/17.20.8390.
10. Santella RM. Approaches to DNA/RNA extraction and whole genome amplification. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15(9):1585-1587. doi:10.1158/1055-9965.EPI-06-0631.
11. Mohammadi N, Kazemi B, Roozkhosh Gh, Masoomi K, Farghadani MT. A simple, inexpensive and safe method for DNA extraction of frigid and clotted blood samples. *Novel Biomed*. 2015;13(3):119-123. doi:10.22037/nbm.v3i3.9507.
12. Green MR, Sambrook J. Chapter 2: Analysis of DNA. In: Green MR, Sambrook J, eds. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4th ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012;1:81-155.
13. Green MR, Sambrook J. Appendix 1: Reagents and Buffers. In: Green MR, Sambrook J, eds. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4th ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012;3:1811-1842.
14. Manitkul S. *DNA Samples Collection from Whisker of Wild* [master's thesis]. Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom; Kasetsart University; 2012.
15. Riemann K, Adamzik M, Frauenrath S, et al. Comparison of manual and automated nucleic acid extraction from whole-blood samples. *J Clin Lab Anal*. 2007;21(4):244-248. doi:10.1002/jcla.20174.

RMJ Ramathibodi Medical Journal

Rama Med J | Original Article

The Study of the Yield of DNA Extracted From Hairs of Postmortem Cases

Kanchana Sujirachato[1], Suranan Tirawatnapong[1], Nurhasnee Mimae[1], Sirirat Inon[1], Adisuk Kaewdouengdee[1], Wisarn Worasuwannarak[2]

[1] Department of Medical Technology, Faculty of Science and Technology, Bansomdejchaopraya Rajabhat University, Bangkok, Thailand

[2] Department of Pathology, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand

Background: Problems frequently occur from hair extraction are low concentration and impurity of DNA.

Objective: To assess the Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol method for extracting DNA from hair roots.

Methods: Hairs from 30 postmortem cases were collected. In each case, 5 and 10 hair roots were extracted DNA by Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol. The amount and purity of DNA (A260/280) were detected by NanoDrop spectrophotometer. The quality of DNA was examined using polymerase chain reaction (PCR). Amount of DNA was analyzed compared with gender, age, and manner of death.

Results: The amount and purity of DNA extracted from 10 hair roots were slightly better than 5 hair roots ($P > .05$). The mean (range) of DNA concentration was 200.4 (35.2 - 799.6) ng/µL from 10 hair roots vs 148.2 (21.7 - 571.5) ng/µL from 5 hair roots in 30 µL volume whereas the mean (range) of A260/280 was 1.61 (1.31 - 1.99) in 10 hair roots vs 1.54 (1.32 - 1.90) in 5 hair roots. The results from NanoDrop showed no difference among various gender, age, and manners of death.

Conclusions: DNA can be extracted from hair by Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol. The quantity and quality of DNA were good enough for personal identification by PCR. DNA extracted from 10 hair roots is better than 5 hair roots.

Keywords: Forensic genetics, DNA yield, DNA extracted from hairs, Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol method, PCR, NanoDrop spectrophotometer

Rama Med J: doi:10.33165/rmj.2020.43.2.224635

Received: November 19, 2019 **Revised:** April 9, 2020 **Accepted:** May 1, 2020

Corresponding Author:
Wisarn Worasuwannarak
Department of Pathology,
Faculty of Medicine
Ramathibodi Hospital,
Mahidol University,
270 Rama VI Road, Ratchathewi,
Bangkok 10400, Thailand.
Telephone: +66 2201 1145
Fax: +66 2201 1145
E-mail: wisarn.wor@mahidol.ac.th