

การเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดที่ปนเปื้อนด้วยดินเหนียว โดยใช้สารเติมแต่ง

ขวัญสุตา ถาวร¹, ทยาวิร์ รมแก้ว², เอนก ภูทอง³ และ สุนิษา โอบอ้อม^{4*}

รับบทความ: 10 เมษายน 2568; ส่งแก้ไข: 27 พฤษภาคม 2568; ตอรับ: 6 มิถุนายน 2568

บทคัดย่อ

บทนำ : ตัวอย่างเลือดที่ปนเปื้อนดินเหนียวเป็นสิ่งท้าทายอย่างหนึ่งสำหรับการตรวจพิสูจน์ทางดีเอ็นเอด้วยองค์ประกอบและคุณสมบัติทางเคมีในดินที่อุดมไปด้วยแร่ธาตุ และมีความสามารถในการดูดซับดีเอ็นเอสูง ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการสกัดดีเอ็นเอและการขยายชิ้นส่วนดีเอ็นเอในปฏิกิริยาพีซีอาร์ลดลง ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญของการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลในทางนิติพันธุศาสตร์

วัตถุประสงค์การวิจัย : เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารเติมแต่งที่ใช้ร่วมกับชุดสกัดดีเอ็นเอในการสกัดดีเอ็นเอมนุษย์จากตัวอย่างเลือดที่ปนเปื้อนด้วยดินเหนียว

วิธีการดำเนินการวิจัย : ทดลองสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดที่ปนเปื้อนด้วยดินเหนียว ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปที่มีการเติมสารเติมแต่งอย่างใดอย่างหนึ่ง ได้แก่ Sodium dodecyl sulfate (SDS), Potassium dihydrogen orthophosphate (KH_2PO_4), Skim milk, และ Nuclease free water ในขั้นตอนการสลายเซลล์ (Lysis) จากนั้นเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารเติมแต่งต่าง ๆ กับกลุ่มควบคุมจากปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ ซึ่งวัดด้วยเทคนิค Real-time PCR

ผลการศึกษา : สารเติมแต่ง KH_2PO_4 ให้ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสารเติมแต่งอื่น ๆ และกลุ่มควบคุม รองลงมา คือ SDS และ Skim milk ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาคุณภาพของตัวอย่างดีเอ็นเอด้วยการวัดค่า Internal PCR control (IPC) พบว่า KH_2PO_4 , SDS และ Skim milk สามารถช่วยลดผลกระทบของสารยับยั้งในดินที่อาจปนเปื้อนในตัวอย่างดีเอ็นเอระหว่างขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ ซึ่งสารยับยั้งดังกล่าวมีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของปฏิกิริยาพีซีอาร์

สรุปผล : KH_2PO_4 น่าจะเป็นสารเติมแต่งที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้ และช่วยลดผลกระทบของสารยับยั้งในดินในตัวอย่างดีเอ็นเอได้ จึงเป็นตัวเลือกที่เหมาะสมสำหรับการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดที่ปนเปื้อนดินเหนียว

คำสำคัญ : การสกัดดีเอ็นเอ ดินเหนียว สารเติมแต่ง นิติพันธุศาสตร์

¹ บัณฑิตศึกษา สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี 12121

² กลุ่มงานตรวจชีววิทยาและดีเอ็นเอ กองพิสูจน์หลักฐานกลาง สำนักงานพิสูจน์หลักฐานตำรวจ สำนักงานตำรวจแห่งชาติ จังหวัดกรุงเทพมหานคร 10330

³ ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี 12121

^{4*} สาขานิติวิทยาศาสตร์ ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี 12121 อีเมล: Sunisa.aobaom@gmail.com

Optimization of DNA Extraction from Blood Samples Contaminated with Clay Using Additive Reagents

Khwansuda Thavorn¹, Tayawee Romgaew²,
Anek Pootong³ and Sunisa Aobaom^{4*}

Received: April 10, 2025; Received revision: May 27, 2025; Accepted: June 6, 2025

Abstract

Background : Clay-contaminated blood samples present a significant challenge for forensic DNA analysis. The composition and chemical properties of clay soil, which is abundant in minerals and possess a high DNA adsorption capacity, often lead to a reduction in the efficiency of DNA extraction and PCR amplification. These issues pose a major obstacle in forensic genetic identification.

Objective : To compare the efficiency of additive reagents used in combination with a commercial DNA extraction kit in extracting human DNA from clay-contaminated blood samples.

Material and methods : DNA was extracted from blood samples contaminated with clay using a commercial DNA extraction kit with the addition of one of the following additive reagents, including Sodium dodecyl sulfate (SDS), Potassium dihydrogen orthophosphate (KH_2PO_4), Skim milk, and Nuclease free water, during the cell lysis step. The efficiency of each additive was subsequently compared with the control group based on the quantity of DNA extracted, which was measured using Real-time PCR.

Results : The additive KH_2PO_4 yielded the highest amount of extracted DNA with statistical significance ($p < 0.05$) compared to the other additives and the control group, followed by SDS and Skim milk, respectively. Furthermore, assessment of DNA samples quality, using the Internal PCR control (IPC), indicated that KH_2PO_4 , SDS, and Skim milk could reduce the effects of soil-derived inhibitors that may be co-extracted with DNA during the extraction process, such inhibitors can negatively impact the efficiency of the PCR reaction.

Conclusion : KH_2PO_4 is the most effective additive for increasing the yield of extracted DNA and mitigating the inhibitory effects of soil-derived substances in DNA samples. Therefore, it is a suitable choice for the extraction of DNA from blood samples contaminated with clay soil.

Keywords : DNA extraction, clay soil, additive reagent, forensic genetics

¹ Graduate Program in Forensic Science, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Rangsit Campus, Pathum Thani 12121, Thailand

² Biology and DNA Sub-Division, Central Police Forensic Science, Office of Police Forensic Science, Royal Thai Police, Bangkok 10330, Thailand

³ Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Rangsit Campus, Pathum Thani 12121, Thailand

^{4*} Division of Forensic Science, Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Rangsit Campus, Pathum Thani 12121, Thailand. E-mail: Sunisa.aobaom@gmail.com

บทนำ

การสืบสวนคดีทางนิติวิทยาศาสตร์ในสถานที่เกิดเหตุกลางแจ้ง เช่น อุบัติเหตุทางรถยนต์ การทะเลาะวิวาท การลักพาตัว และคดีความรุนแรงทางเพศ ซึ่งทำให้เกิดการทำร้ายร่างกายจนผู้เสียหายได้รับบาดเจ็บหรือเสียชีวิต เลือดหรือคราบเลือดเป็นพยานชีววัตถุที่สำคัญในการเชื่อมโยงบุคคลกับเหตุการณ์ หรือสถานที่เกิดเหตุที่มักปนเปื้อนดิน ซึ่งเป็นอุปสรรคของการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยเฉพาะอย่างยิ่งดินเหนียว เป็นดินที่อุดมไปด้วยแร่ธาตุและสารอินทรีย์มากกว่าดินประเภทอื่น อีกทั้งคุณสมบัติทางเคมีภายในดินที่สามารถดูดซับและยึดจับสารพันธุกรรมได้^[1] ทำให้การสกัดดีเอ็นเอในดินเหนียวมีความซับซ้อนมากกว่า เนื่องจากแร่ธาตุ สารอินทรีย์ และโลหะหนัก ซึ่งเป็นสารยับยั้งในดิน (soil inhibitors) ที่สามารถรบกวนกระบวนการสกัดดีเอ็นเอ และการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์เรสหรือพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction; PCR) ส่งผลให้ประสิทธิภาพของการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอลดลง โดยหมู่ฟอสเฟตของโมเลกุลดีเอ็นเอจับกับหมู่ไฮดรอกซิล (OH group) ของแร่ธาตุในดิน ได้แก่ อะลูมิเนียมออกไซด์ (Aluminium oxide; Al_2O_3) และเหล็กออกไซด์ (Ferric or Ferrous oxide) ซึ่งส่งผลกระทบต่อกระบวนการสกัดดีเอ็นเอ และยับยั้งการทำงานของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ประจุลบจากหมู่ฟอสเฟตของโมเลกุลดีเอ็นเอจับกับประจุบวกของแร่ธาตุในดิน ได้แก่ แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) และแมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) หรือดีเอ็นเอสามารถจับกับสารอินทรีย์ในดินได้โดยตรง เช่น Humic acid ที่ส่งผลให้เกิดการรบกวนการทำงานของเอนไซม์ DNA Polymerase ในปฏิกิริยาพีซีอาร์^[2-3] ดินเหนียวจึงเป็นความ

ท้าทายอย่างหนึ่งสำหรับการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดที่ปนเปื้อนดิน

การศึกษาที่ผ่านมาได้มีการพัฒนาการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างชีววัตถุของมนุษย์ที่ปนเปื้อนดินหรือจากแบคทีเรียในดิน ด้วยการดัดแปลงกระบวนการสกัดดีเอ็นเอของชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปให้มีความแตกต่างจากวิธีการมาตรฐานของผู้ผลิต อีกทั้งปรับปรุงกระบวนการสกัดดีเอ็นเอ^[4-5] เพื่อประเมินและเพิ่มประสิทธิภาพของวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างดีเอ็นเอในดิน และมีการพัฒนาด้วยการนำสารเติมแต่ง (additive reagent) ที่มีฟอสเฟตไอออน หรือประจุลบ (Anion) เป็นองค์ประกอบ มาประยุกต์ใช้ในกระบวนการสกัดดีเอ็นเอร่วมกับชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป^[6-7] เพื่อให้ฟอสเฟตไอออนหรือประจุลบจับกับสารยับยั้งในดินแทนการจับกับดีเอ็นเอตามกลไกการดูดซับโมเลกุลดีเอ็นเอของดิน ทำให้ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้เพิ่มขึ้น และตัวอย่างดีเอ็นเอสามารถเข้าสู่กระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ นอกจากนี้ ในการจัดการสารยับยั้งของดินในตัวอย่างดีเอ็นเอโดยวิธีการเจือจาง (dilution) ด้วยน้ำที่ใช้ในห้องปฏิบัติการด้านชีวโมเลกุล เพื่อลดความเข้มข้นของสารยับยั้งที่อยู่ในตัวอย่างดีเอ็นเอ ทำให้สามารถนำตัวอย่างดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ DNA profile ได้ต่อไป อย่างไรก็ตามการเจือจางที่มากเกินไปอาจทำให้ความเข้มข้นของตัวอย่างดีเอ็นเอลดลงไปด้วย^[8] การวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพและปราศจากปัญหาสารยับยั้ง เป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งที่ช่วยเพิ่มความน่าเชื่อถือของหลักฐานทางนิติวิทยาศาสตร์ในกระบวนการยุติธรรม การเลือกวิธีการและขั้นตอนที่เหมาะสมจึงช่วยสนับสนุนให้การสืบสวนและการพิสูจน์หลักฐานมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

จากปัญหาดังกล่าวงานวิจัยนี้จึงเห็นถึงความสำคัญของการสกัดดีเอ็นเอในขั้นต้น คือ การสลายเซลล์ (Lysis) ด้วยการนำสารเติมแต่งที่มีฟอสเฟตไอออนหรือมีประจุลบเป็นองค์ประกอบมาช่วยลดการเกิดสารยับยั้งในดินที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างดีเอ็นเอ มีจุดประสงค์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารเติมแต่งที่ใช้ร่วมกับชุดสกัดสำเร็จรูปในการสกัดดีเอ็นเอมนุษย์ในดิน โดยทดลองสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดที่จำลองการปนเปื้อนดินเหนียว นำสารเติมแต่ง (additive reagent) ได้แก่ Sodium dodecyl sulfate (SDS), Potassium dihydrogen orthophosphate (KH_2PO_4), Skim milk และ Nuclease free water มาประยุกต์ใช้ร่วมกับชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปในขั้นตอนการสลายเซลล์ของกระบวนการสกัดดีเอ็นเอ ทำการสกัดดีเอ็นเอที่ต้องการและพิจารณาคุณภาพของตัวอย่างดีเอ็นเอด้วยการวัดปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้เพื่อเป็นแนวทางในการนำมาประยุกต์ใช้ทางนิติวิทยาศาสตร์ในการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างชีววัตถุของมนุษย์ในดิน และเพื่อประโยชน์ต่อการนำไปใช้ในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารเติมแต่ง (additive reagent) ที่ใช้ร่วมกับชุดสกัดดีเอ็นเอในการสกัดดีเอ็นเอมนุษย์จากตัวอย่างเลือดที่ปนเปื้อนดินเหนียว

วิธีการดำเนินการวิจัย

การรับรองจริยธรรมการวิจัย

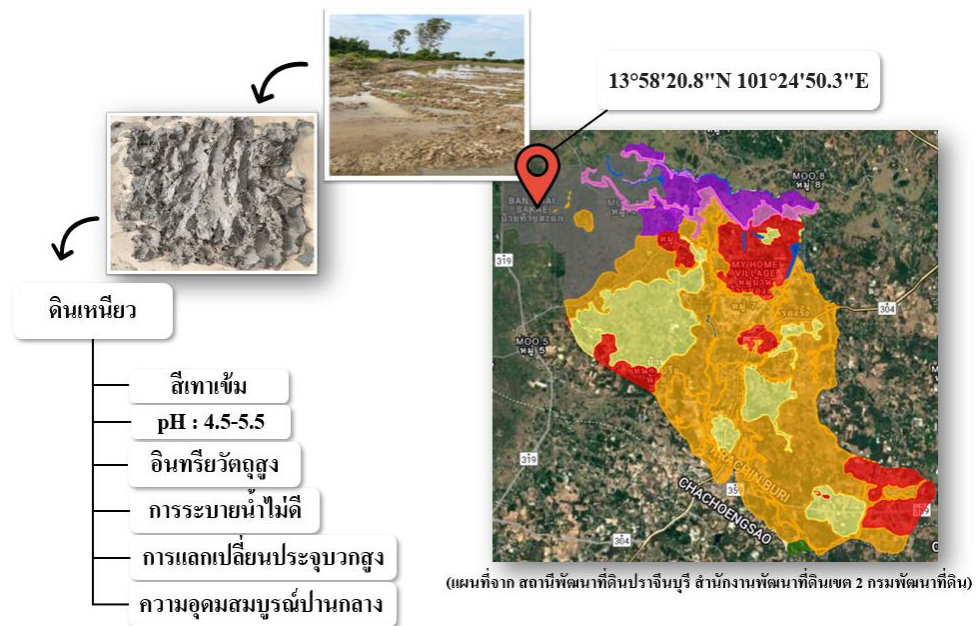
งานวิจัยนี้ได้รับการรับรองจริยธรรมการวิจัยในคน จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์ เมื่อวันที่ 27 ธันวาคม พ.ศ.2567 หนังสือรับรองเลขที่ 143/2567

การเก็บตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดโดยนักเทคนิคการแพทย์ ซึ่งได้รับจากอาสาสมัครเพศชาย จำนวน 1 คน และเพศหญิง จำนวน 1 คน ปริมาตร 1-2 ml บรรจุลงในหลอดเก็บเลือดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA โดยอาสาสมัครเป็นกลุ่มบุคคลที่มีอายุตั้งแต่ 18 ปีขึ้นไป และมีสุขภาพดี ในการเก็บตัวอย่างได้ให้ข้อมูลเกี่ยวกับการวิจัย และขอความยินยอมในการเข้าร่วมงานวิจัยแก่อาสาสมัครด้วย

การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินเหนียวในพื้นที่อำเภอศรีมหาโพธิ์ จังหวัดปราจีนบุรี ($13^{\circ}57'52.1''\text{N}$ $101^{\circ}27'07.0''\text{E}$) ซึ่งมีคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของดิน ดังภาพที่ 1 โดยเก็บที่ระดับความลึกจากผิวดินประมาณ 5 เซนติเมตร นำดินตากแดดให้แห้งเป็นเวลา 3 วัน และนำเศษวัชพืชออก จากนั้นบดดินให้ละเอียดและนำเก็บรักษาไว้ในภาชนะที่ปิดสนิทที่อุณหภูมิห้อง^[9] เพื่อบริโภคไปศึกษาขั้นต่อไป



ภาพที่ 1 พิกัดตำแหน่ง คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของตัวอย่างดิน
(ข้อมูลจาก สถานีพัฒนาที่ดินปราจีนบุรี สำนักงานพัฒนาที่ดินเขต 2 กรมพัฒนาที่ดิน)

การเตรียมตัวอย่าง

นำดินเหนียว ปริมาณ 0.1 กรัม บรรจุลงในหลอด Microcentrifuge ขนาด 2 mL และหยดเลือด ปริมาตร 20 μ L ลงบนดิน จากนั้นผสมตัวอย่างเข้าด้วยกัน ซึ่งตัวอย่างเลือดของแต่ละเพศเตรียมซ้ำ 2 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 4 ตัวอย่างต่อการทดลอง

การเตรียมขั้นตอนก่อนการสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างที่เตรียมก่อนหน้านี้เติมสารเติมแต่ง ได้แก่ 1%(w/v) SDS, 0.5%(w/v) KH_2PO_4 , 0.5%(w/v) Skim milk และ Nuclease free water ปริมาตร 250 μ L ลงในตัวอย่าง โดยเติม 1 ชนิดต่อ 1 ตัวอย่าง จากนั้นผสมสารให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารแบบ Vortex (Vortex Mixer) เป็นเวลา 10 นาที สำหรับกลุ่มควบคุมจะไม่มีสารเติมแต่งลงในส่วนนี้

การสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างทั้งหมดที่เตรียมก่อนหน้านี้มาทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยา QIAamp

DNA Mini kit (Qiagen, Germany) โดยเติม AL buffer ปริมาตร 200 μ L และ Proteinase K ปริมาตร 20 μ L ลงในหลอดทดลองของแต่ละตัวอย่าง ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารแบบ Vortex และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 56 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีที่ระบุในชุดสกัด

การวัดปริมาณดีเอ็นเอ

วัดปริมาณตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยชุดน้ำยา PowerQuant System (Promega, USA) ซึ่งลดปริมาณของปฏิกิริยาลงครึ่งหนึ่ง (half-reaction) สำหรับการเตรียมตัวอย่าง และคำนวณผลด้วยโปรแกรม PowerQuant Analysis software

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารเติมแต่งแต่ละชนิดที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดที่ปนเปื้อนดินเหนียวจากปริมาณ

ดีเอ็นเอที่สกัดได้ แล้ววิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดย Kruskal-Wallis's test เพื่อระบุสารเติมแต่งที่สามารถช่วยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มากที่สุด และ Mann-Whitney U test เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของการใช้สารเติมแต่งต่างชนิดกันกับกลุ่มควบคุม ซึ่งกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ p -value < 0.05 และวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 10

ผลการวิจัย

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการใช้สารเติมแต่งในการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดที่ปนเปื้อนดินเหนียว

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการใช้สารเติมแต่งต่าง ๆ ในการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดที่ปนเปื้อนดินเหนียวกับกลุ่มควบคุม (control) ซึ่งไม่มีการเติมสารเติมแต่งในการสกัดดีเอ็นเอจากดิน พบว่า สารเติมแต่ง

ได้แก่ 1%(w/v) SDS, 0.5%(w/v) KH_2PO_4 และ 0.5%(w/v) Skim milk มีแนวโน้มช่วยเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้ เนื่องจากมีค่าเฉลี่ยของปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 2) โดยสารเติมแต่ง KH_2PO_4 มีแนวโน้มที่ประสิทธิภาพในการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดในดินเหนียวสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.006$) ซึ่งมีความมัธยฐาน (5.150) และค่าคะแนนอันดับเฉลี่ย (mean rank=15.13) สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารเติมแต่งอื่น ๆ และกลุ่มควบคุม สารเติมแต่ง SDS และ Skim milk มีประสิทธิภาพรองลงมา ซึ่งมีความมัธยฐาน และค่าคะแนนอันดับเฉลี่ยสูงตามลำดับ นอกจากนี้ SDS มีค่าคะแนนอันดับเฉลี่ย (mean rank=15.00) ซึ่งใกล้เคียงกับ KH_2PO_4 ในทางกลับกัน การเติม Nuclease free water มีประสิทธิภาพในการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดในดินเหนียวต่ำสุด (ตารางที่ 1)

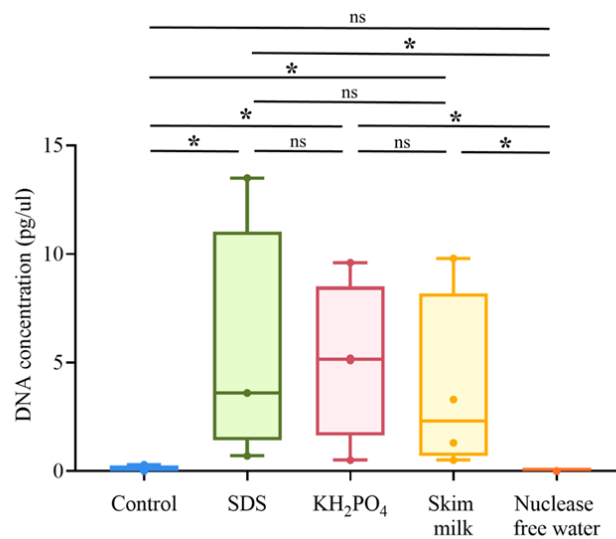
ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบอันดับค่าเฉลี่ยปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยการใช้สารเติมแต่งต่างๆ กับกลุ่มควบคุม (Kruskal Walli's test)

ตัวอย่าง	สารเติมแต่ง	Mean $\pm$ SD	Median	Mean Rank	Rank	p -value
เลือดผสมดินเหนียว (n=4)	ไม่มีสารเติมแต่ง (Control)	0.125 $\pm$ 0.150	0.100(0.000-0.300)	5.50	4	0.006**
	1%(w/v) SDS	5.350 $\pm$ 5.603	3.600(0.700-13.500)	15.00	2	0.006**
	0.5%(w/v) KH_2PO_4	5.100 $\pm$ 3.716	5.150(0.500-9.600)	15.13	1	0.006**
	0.5%(w/v) Skim milk	3.725 $\pm$ 4.218	2.300(0.500-9.800)	13.38	3	0.006**
	Nuclease free water	0.000 $\pm$ 0.000	0.000(0.000-0.000)	3.50	5	0.006**

(** p -value < 0.01)

สารเติมแต่ง SDS, KH_2PO_4 และ Skim milk มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.029$) กับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตาม ปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยการเติมสารเติมแต่งเหล่านี้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่า สารทั้งสามชนิดนี้มี

ประสิทธิภาพใกล้เคียงกันในการสกัดดีเอ็นเอในทางกลับกัน การเติม Nuclease free water ไม่สามารถช่วยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ ซึ่งมีค่าเฉลี่ยของปริมาณดีเอ็นเอต่ำ และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 2, ตารางที่ 2)



ภาพที่ 2 การเปรียบเทียบปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเลือดในดินเหนียวด้วยการใช้สารเติมแต่งต่าง ๆ กับกลุ่มควบคุม (* p -value < 0.05)

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยการใช้สารเติมแต่งต่าง ๆ กับกลุ่มควบคุม (Mann-Whitney t-test)

ตัวอย่าง	สารเติมแต่ง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยใช้สารเติมแต่ง ($\alpha = 0.05$)			
		1%(w/v) SDS	0.5%(w/v) KH ₂ PO ₄	0.5%(w/v) Skim milk	Nuclease free water
เลือดผสม ดินเหนียว (n=4)	ไม่มีสารเติมแต่ง (Control)	0.029*	0.029*	0.029*	0.429
	1%(w/v) SDS		0.800	0.457	0.029*
	0.5%(w/v) KH ₂ PO ₄			0.771	0.029*
	0.5%(w/v) Skim milk				0.029*

(* p -value < 0.05)

การศึกษาลักษณะที่มีต่อปฏิกิริยา Real-time PCR ของการใช้สารเติมแต่งในการสกัดดีเอ็นเอ

การประเมินประสิทธิภาพของตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ในการใช้สารเติมแต่งต่าง ๆ ด้วยการวิเคราะห์ค่า IPC cq (Internal PCR control) ของตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากการวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Real-time PCR ซึ่งเป็นค่าที่สามารถประเมินการมีอยู่ของสารยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR inhibitors) ในตัวอย่างดีเอ็นเอ จากตารางที่ 3 พบว่า ตัวอย่าง

เลือดบริสุทธิ์ ซึ่งไม่มีดินและสารเติมแต่ง มีค่า IPC cq เฉลี่ยที่ 21.130 ± 0.227 ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงการขยายสัญญาณพีซีอาร์ได้ตามปกติ และไม่มีการยับยั้งปฏิกิริยา Real-time PCR สำหรับตัวอย่างดีเอ็นเอของกลุ่มควบคุม ซึ่งไม่มีการเติมสารเติมแต่งมีค่าเฉลี่ย IPC Cq เฉลี่ยลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (10.430 ± 12.050) แสดงถึงการรบกวนปฏิกิริยา Real-time PCR เนื่องจากสารยับยั้งในดินเหนียวที่อาจปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างดีเอ็นเอ ในการเติม SDS, KH₂PO₄ และ Skim milk ช่วยเพิ่มค่าเฉลี่ย IPC cq (21.000 ± 0.088 , $20.950 \pm$

0.287 และ 20.810 ± 0.120 ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ทั้งนี้ มีค่าเฉลี่ยใกล้เคียงกับตัวอย่างเลือดบริสุทธิ์ แสดงถึงการเติมสารเติมแต่งเหล่านี้ในการสกัดดีเอ็นเอจากดิน สามารถช่วยลดผลกระทบของการเกิดสารยับยั้งในดินเหนียวที่ปนเปื้อนในตัวอย่างดีเอ็นเอได้ อย่างไรก็ตาม การเติม Nuclease free water มีค่าเฉลี่ย IPC cq ของตัวอย่าง

ดีเอ็นเอต่ำ แสดงถึง Nuclease free water ไม่สามารถช่วยลดผลกระทบของการเกิดสารยับยั้งในดินได้ ทำให้ในตัวอย่างดีเอ็นเอมีการปนเปื้อนของสารยับยั้งในดินเหนียวส่งผลต่อการขยายสัญญาณพีซีอาร์ ทำให้ปฏิกิริยา Real-time PCR ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ย IPC cq ของตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากการใช้สารเติมแต่งต่าง ๆ

ตัวอย่าง	สารเติมแต่ง	IPC cq (cycles)		
		Minimum	Maximum	Mean $\pm$ SD
เลือด (n=4)	-	20.90	21.34	21.130 ± 0.227
	ไม่มีสารเติมแต่ง (Control)	0.00	21.41	10.430 ± 12.050
เลือดผสม	1%(w/v) SDS	20.60	21.30	20.950 ± 0.287
ดินเหนียว	0.5%(w/v) KH_2PO_4	20.70	20.97	20.810 ± 0.120
(n=4)	0.5%(w/v) Skim milk	20.90	21.09	21.000 ± 0.088
	Nuclease free water	0.00	0.00	0.00 ± 0.00

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างเลือดที่ปนเปื้อนดินเหนียวมีผลให้ปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้ลดลง และมีการปนเปื้อนของสารยับยั้งในดินที่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการทำงานของปฏิกิริยา Real-time PCR เนื่องจากภายในดินเหนียวประกอบด้วยสารอินทรีย์ และแร่ธาตุมากมายที่เป็นสารยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR inhibitors) เช่น Humic acid เป็นสารอินทรีย์ที่สามารถจับกับโมเลกุลของดีเอ็นเอได้โดยตรง ทำให้เกิดการรบกวนการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ในปฏิกิริยา Real-time PCR และประกอบด้วย Kaolinite ซึ่งเป็นแร่ดินเหนียวที่สามารถดูดซับดีเอ็นเอผ่านกลไกการแลกเปลี่ยนประจุบวกภายในดิน โดยอาศัยประจุบวก (cation) ที่อยู่บนพื้นผิวของอนุภาคดิน เช่น แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) และ

แมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) ซึ่งทำหน้าที่เป็นสะพานเชื่อมระหว่างหมู่ฟอสเฟตของโมเลกุลดีเอ็นเอกับแร่ของดิน อีกทั้งหมู่ไฮดรอกซิล (OH groups) ของแร่ออกไซด์ในดิน เช่น อะลูมิเนียมออกไซด์ (Aluminium oxide) และเหล็กออกไซด์ (Ferric or Ferrous oxide) ที่สามารถจับกับหมู่ฟอสเฟตของโมเลกุลดีเอ็นเอได้^[2-3, 10] นอกจากนี้ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของดินยังมีผลต่อความสามารถในการดูดซับดีเอ็นเอ ทำให้ดินสามารถยึดจับกับโมเลกุลของดีเอ็นเอได้ ซึ่งดินที่มีค่า pH ต่ำกว่า 5.5 จะสามารถดูดซับดีเอ็นเอได้สูง^[7, 11] ตัวอย่างดินเหนียวที่ใช้ในการวิจัยนี้มีค่า pH อยู่ในช่วง 4.5-5.5 จึงมีแนวโน้มที่ดินจะสามารถดูดซับดีเอ็นเอได้ดี ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ประสิทธิภาพในการสกัดดีเอ็นเอลดลง และส่งผลกระทบต่อความแม่นยำในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอทางด้านนิติพันธุศาสตร์

ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารเติมแต่งที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดที่ปนเปื้อนดินเหนียวร่วมกับชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป พบว่า การเติมสารเติมแต่ง ได้แก่ 1%(w/v) SDS, 0.5%(w/v) KH_2PO_4 และ 0.5%(w/v) Skim milk มีแนวโน้มช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดดีเอ็นเอ โดยการเติม KH_2PO_4 ในสกัดดีเอ็นเอมีค่าเฉลี่ยของปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ รองลงมาคือ SDS และ Skim milk ตามลำดับ ทั้งนี้พบว่า KH_2PO_4 และ SDS มีค่าเฉลี่ยของปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ใกล้เคียงกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Guerra et al. ในปี ค.ศ. 2020^[7] ที่ประยุกต์ใช้ SDS ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุลบ (strong anionic) และ Phosphate buffer ในการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างดิน สารเหล่านี้สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดดีเอ็นเอจากดินได้ และตัวอย่างดีเอ็นเอมีความเหมาะสมต่อการนำไปวิเคราะห์ดีเอ็นเอ รวมทั้งผลของการใช้ Skim milk ที่สอดคล้องกับงานวิจัยของ Hirashima et al. ในปี ค.ศ. 2022^[6] พบว่า ฟอสเฟตไอออนใน Skim milk สามารถจับกับหมู่ไฮดรอกซิลของแร่ในดินแทนดีเอ็นเอได้ จึงสามารถช่วยเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดจากดินได้ จากกลไกที่กล่าวมาข้างต้น สารทั้งสามชนิดนี้มีองค์ประกอบที่มีหมู่ฟอสเฟตหรือประจุลบ จึงสามารถแข่งขันกับดีเอ็นเอในการแย่งจับกับสารยับยั้งในดินได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงส่งผลให้ดีเอ็นเอถูกปลดปล่อยออกมาสู่สารละลายในกระบวนการสกัดดีเอ็นเอมากขึ้น นอกจากนี้ผลการตรวจวัด IPC c_q ของการวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Real-time PCR พบว่า KH_2PO_4 , SDS และ Skim milk สามารถลดผลกระทบของสารยับยั้งในดินที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ในปฏิกิริยา Real-time PCR ได้

สำหรับ Nuclease free water เป็นน้ำบริสุทธิ์ที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการด้านชีวโมเลกุล โดยทั่วไปนิยมใช้จัดการสารยับยั้งในตัวอย่างดีเอ็นเอด้วยวิธีการเจือจาง (dilution) ในงานวิจัยนี้น้ำ Nuclease free water ประยุกต์ใช้เป็นสารเติมแต่งในการสกัดดีเอ็นเอร่วมกับชุดสกัดดีเอ็นเอในขั้นตอนการสลายเซลล์ จากผลการศึกษาพบว่า Nuclease free water สามารถสกัดดีเอ็นเอได้ปริมาณต่ำ และส่งผลให้เกิดการรบกวนปฏิกิริยา Real-time PCR ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Saeki et al. ในปี ค.ศ. 2009^[2] และ Crecchio et al. ในปี ค.ศ. 1998^[12] ที่กล่าวว่า ดีเอ็นเอที่ถูกดูดซับด้วยสารอินทรีย์ในดินไม่สามารถสกัดได้ด้วยน้ำ ทั้งนี้ แม่น้ำจะเป็นองค์ประกอบหนึ่งในสารละลาย ซึ่งเป็นตัวช่วยหรือตัวทำลายที่ตี้อย่างไรก็ตาม น้ำไม่สามารถเป็นสารเติมแต่งที่ช่วยในการยึดจับกับองค์ประกอบของดินได้โดยตรง ดังนั้น การใช้น้ำเพื่อเจือจางตัวอย่างดีเอ็นเอภายหลังกระบวนการการสกัดดีเอ็นเอจึงเป็นแนวทางที่เหมาะสมมากกว่าสำหรับการลดความเข้มข้นของสารยับยั้งในตัวอย่างดีเอ็นเอ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang et al. ในปี ค.ศ. 2017^[8] ที่ศึกษาผลของการเจือจางตัวอย่างดีเอ็นเอด้วยน้ำในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการลดผลกระทบจากสารยับยั้งที่ปนเปื้อนในตัวอย่าง และทำให้สามารถนำตัวอย่างเข้าสู่การวิเคราะห์ดีเอ็นเอได้อย่างมีประสิทธิภาพ จะเห็นได้ว่า KH_2PO_4 เป็นสารเติมแต่งที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้ และช่วยลดผลกระทบของสารยับยั้งในดินในตัวอย่างดีเอ็นเอ ทำให้ปฏิกิริยา Real-time PCR สามารถดำเนินการต่อไปได้ อีกทั้งยังสามารถใช้ร่วมกับชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปได้ในการสกัดดีเอ็นเอ ดังนั้น KH_2PO_4 จึงเป็นตัวเลือกที่เหมาะสมสำหรับการ

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดที่ปนเปื้อนดินเหนียว และ SDS สามารถเป็นตัวเลือกเสริมในการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดที่ปนเปื้อนดินเหนียวได้ เนื่องจากมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับ KH_2PO_4

งานวิจัยนี้จึงสรุปได้ว่า การนำสารเติมแต่ง (additive reagent) มาใช้ร่วมกับชุดสกัดดีเอ็นเอในการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดที่ปนเปื้อนดินนั้น สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการสกัดดีเอ็นเอได้และให้ปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นซึ่งเป็นประโยชน์แก่การนำไปใช้ในการตรวจหาเอกลักษณ์บุคคลในงานทางนิติวิทยาศาสตร์ต่อไป

ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาวิจัยในอนาคตเพื่อพัฒนาและปรับปรุงกระบวนการสกัดดีเอ็นเอมนุษย์จากตัวอย่างดินให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ควรศึกษาการทดลองกับตัวอย่างชีวภาพ และตัวอย่างดินประเภทอื่น ๆ ที่อาจอยู่ในสถานที่ที่แตกต่างกันเพิ่มเติม เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ครอบคลุมถึงผลกระทบและประสิทธิภาพของ KH_2PO_4 ที่มีต่อตัวอย่างและสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน รวมทั้งศึกษาการใช้สารเติมแต่งอื่น ๆ ที่มีคุณสมบัติสามารถยึดจับกับองค์ประกอบของดินแทนดีเอ็นเอได้ และศึกษาเพิ่มเติมร่วมกับชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปที่นิยมใช้ในหน่วยงานสำหรับการตรวจวิเคราะห์ทางดีเอ็นเอในทางนิติวิทยาศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับความอนุเคราะห์และความช่วยเหลือจากหลายท่าน ที่ทำให้งานวิจัยสามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ได้แก่เจ้าหน้าที่สถานีพัฒนาที่ดินปราจีนบุรี สำนักงานพัฒนาที่ดินเขต 2 กรมพัฒนาที่ดิน ที่ให้ความรู้และข้อมูลเกี่ยวกับดินในพื้นที่เพื่อใช้ในการวิจัยขอขอบคุณ คุณกนกพร พิมแพ่ง ประชาชนใน

พื้นที่ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการเดินทางเข้าไปเก็บตัวอย่างดินในพื้นที่ที่กำหนดและขอขอบคุณ ผศ.ดร.ปราโมทย์ ศรีวานิชรักษ์ ที่ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างเลือดที่ใช้ในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. Young JM, Rawlence NJ, Weyrich LS, Cooper A. Limitations and recommendations for successful DNA extraction from forensic soil samples: a review. *Sci Justice*. 2014;54(3):238-44.
2. Saeki K, Sakai M. The influence of soil organic matter on DNA adsorptions on andosols. *Microbes Environ*. 2009;24(2):175-9.
3. Pietramellara G, Ascher J, Borgogni F, Ceccherini MT, Guerri G, Nannipieri P. Extracellular DNA in soil and sediment: fate and ecological relevance. *Biol Fertil Soils*. 2009;45(3):219-35.
4. Howarth A, Drummond B, Wasef S, Matheson CD. An assessment of DNA extraction methods from blood-stained soil in forensic science. *Forensic Sci Int*. 2022; 341:111502.
5. Barbaro A, Cormaci P, La Marca A. DNA extraction from soil by EZ1 advanced XL (Qiagen). *Forensic Sci Int*. 2019;299:161-7.
6. Hirashima H, Hisazumi R, Mason MLT, Yamamoto A, Saeki Y. Development of an effective method of human DNA extraction

- from soil as forensic evidence. *Forensic Sci Int.* 2022;335:111284.
7. Guerra V, Beule L, Lehtsaar E, Liao H-L, Karlovsky P. Improved protocol for DNA extraction from subsoils using phosphate lysis buffer. *Microorganisms.* 2020;8(4):532.
 8. Wang H, Qi J, Xiao D, Wang Z, Tian K. A re-evaluation of dilution for eliminating PCR inhibition in soil DNA samples. *Soil Biol Biochem.* 2017;106:109-18.
 9. Wichachai S. Forensic Analysis of Soil Samples by Using Energy Dispersive X-Ray Fluorescence. *JCFS.* 2023;9(1):157-70.
 10. Yankson KK, Steck TR. Strategy for extracting DNA from clay soil and detecting a specific target sequence via selective enrichment and real-time (quantitative) PCR amplification. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(18):6017-21.
 11. Ogram A, Sayler GS, Gustin D, Lewis RJ. DNA adsorption to soils and sediments. *Environ Sci Technol.* 1988;22(8):982-4.
 12. Crecchio C, Stotzky G. Binding of DNA on humic acids: Effect on transformation of *Bacillus subtilis* and resistance to DNase. *Soil Biol Biochem.* 1998;30(8):1061-7.