Original Article

นิพนธ์ต้นฉบับ

Microsatellite DNA typing from tendon tissue for personal identification

การตรวจดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์จากเนื้อเยื่อเส้นเอ็นเพื่อระบุบุคคล

ธานินทร์ ภู่พัฒน์ พ.บ.*, กฤษณ์ เชื้อกุล วท.บ.†, เลิศลักขณา ภู่พัฒน์ พ.บ.†, Heinrich F Steger, Dr.rer.nat. ‡

** ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่*

† ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

‡ ศูนย์นิติวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทคัดย่อ

ผู้วิจัยได้ทำการตรวจลักษณะดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์จากตัวอย่างเนื้อเยื่อเส้นเอ็นร้อยหวายที่เก็บจากศพจำนวน 10 ราย เส้นเอ็นดังกล่าวถูกปล่อยให้ เน่าสลายในอุณหภูมิห้อง นาน 0, 1, 4 และ 8 สัปดาห์ จากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจดูลักษณะดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ที่ตำแหน่ง คือ D10S2325 และ D19S253 โดยใช้เทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย polymerase chain reaction และแยกแยะลักษณะของดีเอ็นเอเหล่านั้นด้วย polyacrylamide electrophoresis ซึ่งใช้ทั้งแบบวุ้นแผ่น (slab gel) และ capillary electrophoresis เปรียบเทียบผลที่ได้กับผลตรวจจากกล้ามเนื้อสดของศพทั้ง 10 ราย พบว่า ในตัวอย่างเส้นเอ็นสด สามารถตรวจได้ถูกต้องตรงกับผลที่ได้จากตัวอย่างกล้ามเนื้อทั้งหมด สำหรับเส้นเอ็นเน่า 1 และ 4 สัปดาห์ จะตรวจได้ถูกต้อง 50% ส่วนตัวอย่างเส้นเอ็นเน่า 8 สัปดาห์ ตรวจได้ถูกต้องเพียง 30%

โดยสรุปแล้ว สามารถใช้ตัวอย่างเส้นเอ็นที่ทิ้งให้เน่าสลายตามธรรมชาติ นานถึง 8 สัปดาห์ เป็นแหล่งดีเอ็นเอสำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม เพื่อตรวจดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ได้ อย่างไรก็ตาม ภาวะภูมิอากาศในประเทศไทยที่ร้อนชื้น ทำให้โอกาสประสบผลสำเร็จลดลง เมื่อระยะเวลาผ่านไป หากจำเป็นต้องใช้เนื้อเยื่อเส้นเอ็นเป็นตัวอย่างสำหรับการตรวจดีเอ็นเอ จะต้องเพิ่มจำนวนตำแหน่งดีเอ็นเอให้มากกว่าปกติ เพื่อให้ได้ผลตรวจสำหรับการพิสูจน์บุคคลที่มีความน่าเชื่อถือเพียงพอ

บทนำ

ศพที่เสียสภาพหรือเน่าแล้ว เนื้อเยื่อที่เหลืออยู่อาจจะมีความเหมาะสมต่อการใช้เป็นแหล่งของดีเอ็นเอได้แตกต่างกัน โดยทั่วไปแล้วเนื้อเยื่อที่เน่าน้อยที่สุด ย่อมเหมาะต่อการนำมาสกัดดีเอ็นเอมากที่สุด นอกจาก

กระดูกและฟันแล้ว เส้นเอ็นเป็นเนื้อเยื่ออีกชนิดหนึ่งที่เน่าสลายได้ค่อนข้างช้า แม้เราจะสามารถตรวจ ดีเอ็นเอจากกระดูกหรือฟันได้ แต่กระบวนการที่ใช้สกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อดังกล่าว ไม่ใช่เรื่องง่ายนัก และมักจะต้องใช้เครื่องมือพิเศษ เช่น เครื่องป่นกระดูก ทำให้ต้องมีค่าใช้จ่าย เสียเวลาและแรงงานเพิ่มขึ้นอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ ดังนั้นการมองหาเนื้อเยื่อที่มีความคงทนต่อการเน่าสลาย แต่สามารถนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีที่ไม่ยุ่งยาก อาจเป็นประโยชน์ ในกรณีที่ศพนั้นเน่าสลายไปมากพอควร เช่น เสียชีวิตไปแล้วประมาณ 1-2 เดือน ซึ่งยังพอมีเส้นเอ็นติดอยู่กับกระดูก การสกัดดีเอ็นเอจากเส้นเอ็น อาจเป็นทางเลือกที่เหมาะสม ให้การพิสูจน์บุคคลด้วยการตรวจดีเอ็นเอไม่ใช่งานที่ยุ่งยาก งานวิจัยนี้จึงทำขึ้นโดยหวังว่าจะได้วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อเส้นเอ็นที่สามารถนำไปใช้ได้ ในราคาประหยัด มีประสิทธิภาพสูง และเหมาะสมกับสภาพภูมิเศรษฐกิจของประเทศ

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างเอ็นร้อยหวายยาวประมาณ 5 ซม. กล้ามเนื้อ 10 ลบ.ซม. และ เนื้อตับประมาณ 10 ลบ.ซม. ถูกเก็บจากศพที่อยู่ในสภาพดี จำนวน 10 ราย ตัวอย่างเอ็นร้อยหวายถูกนำมาห่อด้วยเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อและหรือเนื้อตับ แล้วทิ้งไว้ให้เน่าในอุณหภูมิห้องตามระยะเวลาที่กำหนด คือ 1, 4 และ 8 สัปดาห์ แบ่งเอาเนื้อเยื่อเอ็นสดและกล้ามเนื้อสดไปสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Chelex [1] เนื้อเยื่อเส้นเอ็นสดอีกส่วนหนึ่งถูกนำไปสกัดดีเอ็นเอ ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่ที่เรียกว่า วิธีย่อยสลายแบบสมบูรณ์ นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อดังกล่าวไปตรวจดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ ตำแหน่ง D10S2325 เปรียบเทียบผลที่ได้เพื่อประเมินดูว่าวิธีการใดให้ผลตรวจดีกว่ากัน ในขณะเดียวกันนั้น เนื้อเยื่อเส้นเอ็นที่เหลือจะถูกปล่อยให้เน่าสลายต่อไปพร้อมๆ กับกล้ามเนื้อและ/หรือตับ และแบ่งเอาเนื้อเยื่อเส้นเอ็นมาสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีที่ดีกว่า ตามระยะเวลาที่กำหนด คือ สัปดาห์ที่ 1, 4, และ 8 ตามลำดับ ตัวอย่างที่เหลือ ถูกนำมาแช่แข็งไว้ที่ อุณหภูมิ -20 ^{o} C

ตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) ของดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ ที่ตำแหน่ง D10S2325 และ D19S253 ของตัวอย่าง DNA ที่สกัดจากตัวอย่างเส้นเอ็นเหล่านั้น เปรียบเทียบข้อมูลลักษณะดีเอ็นเอที่ได้กับข้อมูลที่ได้จากตัวอย่างกล้ามเนื้อสด จนครบทุกคู่ ประเมินผลการตรวจที่ได้ว่ามีความสอดคล้องกันมากน้อยเพียงไร หากการตรวจดีเอ็นเอจากตัวอย่างใดในครั้งแรกไม่สัมฤทธิ์ผล จะทำการตรวจซ้ำอีกครั้ง หากยังไม่ประสบผลสำเร็จ จะใช้ Laser induced Fluorescent (LIF) primers ในการตรวจแทน อีกครั้งเดียวเท่านั้น หากไม่ได้ผล ถือว่าไม่สามารถตรวจได้

การสกัดดีเอ็นเอจากเส้นเอ็นโดยวิธีย่อยสลายแบบสมบูรณ์

1) นำเส้นเอ็นประมาณ 20 มิลลิกรัม มาบดให้ละเอียดที่สุด
2) นำเนื้อเยื่อเอ็นบดละเอียดใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml แล้วเติม 10 mM Tris (pH 8.5) ปริมาณ 255 ไมโครลิตร, 10% SDS 15 ไมโครลิตร และ สารละลาย proteinase K (4 มก./มล.) ปริมาณ 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยการเขย่าวน แล้วแช่อบ 55 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

3) ปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที จากนั้นดูดน้ำใสส่วนบนใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml อันใหม่แล้วทิ้งหลอดเก่าไป
4) เติม Phenol ลงไป 300 ไมโครลิตร เขย่าวน (vortex) นาน 30 วินาที แล้วปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จากนั้นดูดน้ำใสส่วนบนใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml อันใหม่แล้วทิ้งหลอดเก่าไป
5) เติม Chloroform ลงไป 300 ไมโครลิตร เขย่าวน (vortex) นาน 30 วินาที แล้วปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จากนั้นดูดน้ำใสส่วนบนใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml อันใหม่ เก็บไว้ในตู้เย็น เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบของขบวนการ PCR ต่อไป

การตรวจลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) ของดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่งต่าง ๆ ทำโดยใช้เทคนิคเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย polymerase chain reaction ในปริมาตร 10 ไมโครลิตร แยกหลอดแยกคู่ primers ในสารละลายปฏิกิริยาประกอบด้วย 20 มิลลิโมลาร์ ของ Tris, pH 8.4, 50 มิลลิโมลาร์ ของ KCl, 1.5 มิลลิโมลาร์ ของ $MgCl_2$, 0.01% bovine serum albumin, 0.05% Tween 20 , 100 ไมโครโมลาร์ ของ dNTP แต่ละชนิด 4 ชนิด, 0.2 ไมโครโมลาร์ ของ primers ทั้งสองตัว และเอนไซม์ Taq DNA polymerase 0.2 หน่วย หลอดปฏิกิริยาถูกนำเข้าเครื่องปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ โดยตั้งค่าอุณหภูมิ ดังนี้ 94 C 1 นาที, 58 C 1 นาที และ 72 C 1 นาที รวมทั้งสิ้น 32 รอบ

D10S2325 locus

เส้นที่ 1 (primer A): 5'-GCA TGA AGC TCA CGA AAG AAG CC-3'

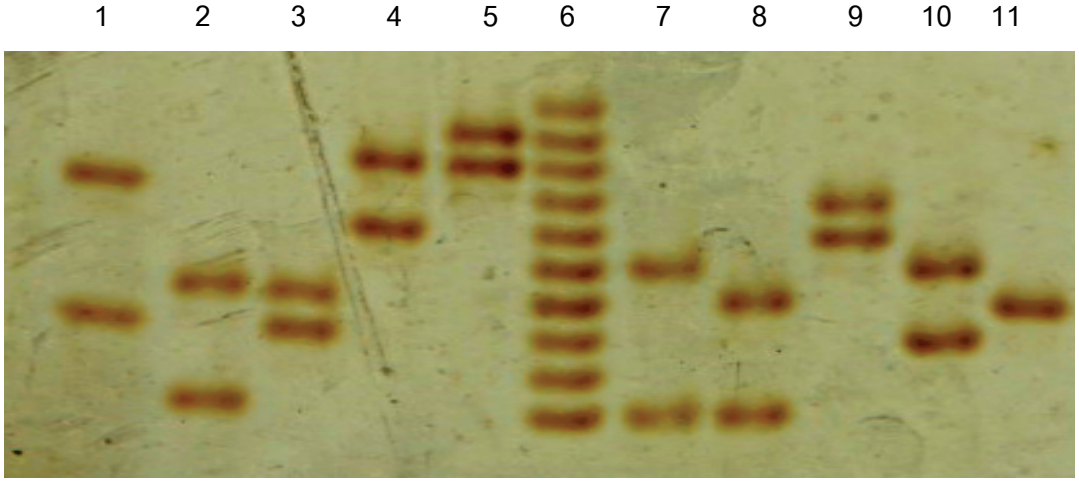
เส้นที่ 2 (primer B): 5'-AGA GAT CAC GCA CTG CAT TCC-3'

D19S253 locus

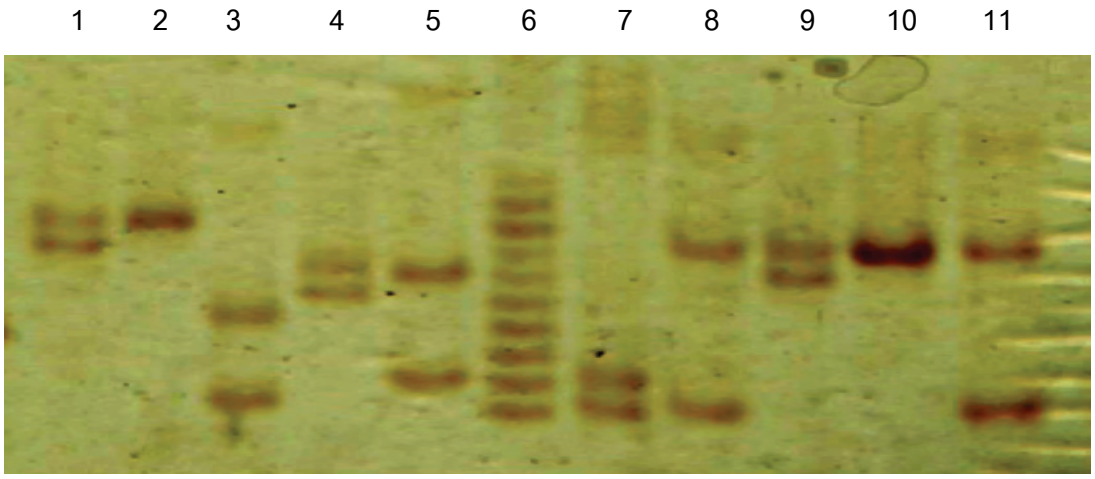
เส้นที่ 1 (primer A): 5'-AGA TCA TAG ACA GAC AGA CGG ACT-3'

เส้นที่ 2 (primer B): 5'-TGT GGC TCC TCC TGG GAA AT-3'

การแยกชิ้นดีเอ็นเอ เพื่อระบุชนิดของอัลลีล ทำด้วย polyacrylamide gel electrophoresis ในชุดแยกสารในวุ้น protean II xi cell โดยขนาดของวุ้นกว้าง 16 ซม. ยาว 20 ซม. และหนา 0.1 ซม. ความเข้มข้นของ acrylamide โดยรวม = 8.5% และ 4.8 % ของ bis-acrylamide gel buffer ประกอบด้วย 33 มิลลิโมลาร์ ของ $TrisSO_4$ (pH 4.5), 6% glycerol และ electrophoresis buffer = 1x TBE ตามวิธีของ Sajantila และคณะ[2] ย้อมวุ้นด้วย silver staining การกำหนดชนิดของชิ้นดีเอ็นเอจากตัวอย่างตรวจ ทำโดยการเปรียบเทียบกับอัลลีลมาตรฐาน ดังภาพที่ 1 a และ 1b



ภาพที่ 1 a – *แสดงลักษณะผลการตรวจดีเอ็นอไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง D10S2325 โดยวิธี manual จากตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากกล้ามเนื้อสด 10 ราย lane 1-5 และ 7-11 ส่วน lane 6 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Allelic ladder) ซึ่งประกอบด้วยอัลลีล 7-16*



ภาพที่ 1 b – *แสดงลักษณะผลการตรวจดีเอ็นอไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง D19S253 โดยวิธี manual จากตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากกล้ามเนื้อสด 10 ราย lane 1-5 และ 7-11 ส่วน lane 6 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Allelic ladder) ซึ่งประกอบด้วยอัลลีล 7-16*

การตรวจดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ด้วยเครื่องวิเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเออัตโนมัติ อาศัยหลักของการติดฉลากดีเอ็นเอตัวเริ่มด้วยสารเรืองแสง (Fluorescent dye) ที่เส้นใดเส้นหนึ่งของคู่ primer เมื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลองด้วย polymerase chain reaction แล้วจึงนำผลิตผลที่ได้ไปแยกชิ้นและวิเคราะห์ขนาดของมันด้วย capillary electrophoresis และ กำหนดชนิดอัลลีลของชิ้นดีเอ็นเอนั้นได้ ด้วยโปรแกรม gene mapper โดยดูจากขนาดของมัน

สำหรับ Laser induced Fluorescent (LIF) primers ซึ่งเป็นการออกแบบ primer เองและเลือกติดฉลากด้วยสารเรืองแสงที่เส้นหนึ่งของคู่ primer โดย primer สำหรับตำแหน่ง D10S2325 ติดสีเรืองแสง VIC ซึ่งจะเรืองแสงสีเขียวออกมาหลังจากถูกกระตุ้น สำหรับตำแหน่ง D19S253 ได้ออกแบบลำดับเบสใหม่ และติดสี 6-FAM ซึ่งจะเรืองแสงสีฟ้าออกมาหลังจากถูกกระตุ้น แล้วทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย polymerase chain reaction แบบทีละตำแหน่ง (Monoplex) การตรวจด้วย (LIF) primers จะทำเมื่อการตรวจด้วย primer ปกติ 2 ครั้ง แล้วยังไม่สำเร็จ สำหรับรายละเอียดของ primers ปรากฏดังข้างล่าง

D10S2325 locus

เส้นที่ 1 (primer A): VIC-GCA TGA AGC TCA CGA AAG AAG CC-3'

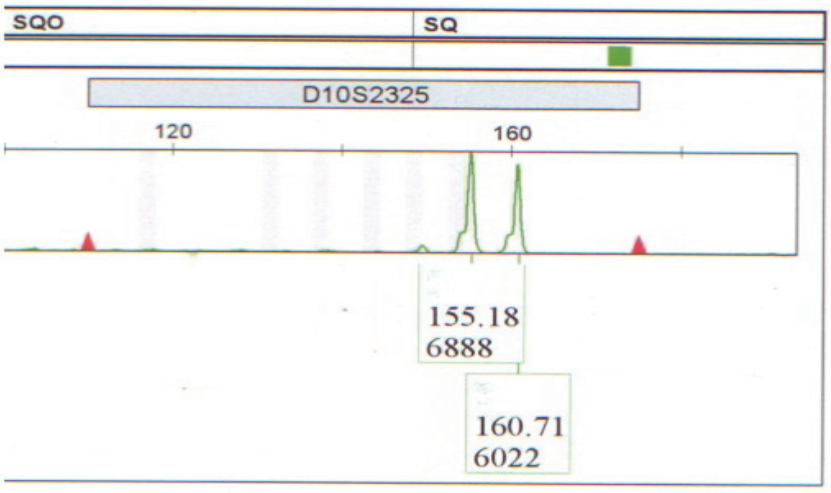
เส้นที่ 2 (primer B): 5'-AGA GAT CAC GCA CTG CAT TCC-3'

D19S253 locus

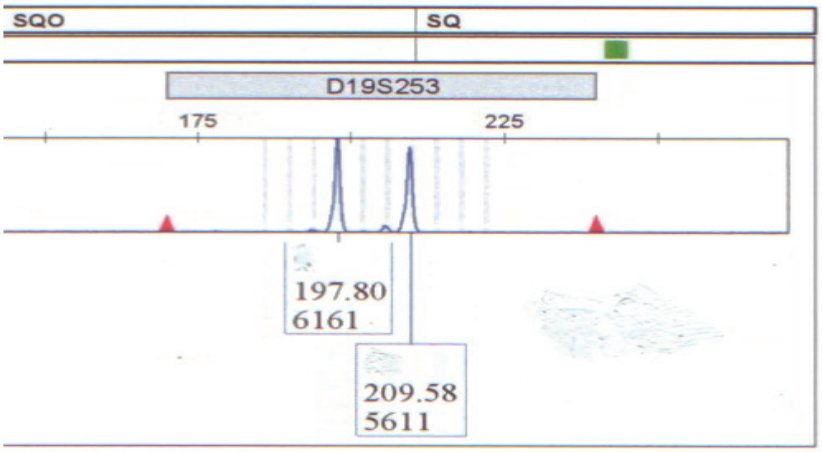
เส้นที่ 1 (primer A): 6-FAM-GAT AGA TCA TAG ACA GAC AGA CGG-3'

เส้นที่ 2 (primer B): 5'-GAA TCT GGA CAT GCT GGT CAT TGC-3'

ผลการตรวจลักษณะดีเอ็นเอที่ได้ จะแสดงเป็นเส้นกราฟของอัลลีล ที่เรียกว่า Electropherogram ดังภาพที่ 2a และ 2b



ภาพที่ 2 a – *แสดงลักษณะผลการตรวจ microsatellite DNA ตำแหน่ง D10S2325 โดยใช้ Laser induced Fluorescent (LIF) primer ที่พัฒนาขึ้นมาเอง*



ภาพที่ 2 b – *แสดงลักษณะผลการตรวจ microsatellite DNA ตำแหน่ง D19S253 โดยใช้ Laser induced Fluorescent (LIF) primer ที่พัฒนาขึ้นมาเอง*

ผลการค้นคว้าวิจัย

ผลการตรวจดีเอ็นเอที่สกัดจากเนื้อเยื่อเส้นเอ็นสด โดยวิธี Chelex เทียบกับวิธีย่อยสมบูรณ์ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ ให้ผลสัมฤทธิ์มากกว่า ดังตารางที่ 1

Specimen No.	Chelex D10S2325 Muscle	Chelex D10S2325 Tendon	New D10S2325 Tendon
1	9/13	9/13	9/13
2	7/10	7/10	7/10
3	9/10	9/10	9/10
4	12/14	12/14	12/14
5	14/15	n.b.	14/15
6	7/11	7/11	7/11
7	7/10	7/10	7/10
8	12/13	12/13	12/13
9	9/11	9/11	9/11
10	10/10	10/10	10/10

ตารางที่ 1 – แสดงผลการตรวจลักษณะ microsatellite DNA ที่ตำแหน่ง D10S2325 ของน้ำสกัดดีเอ็นเอจากกล้ามเนื้อสด เส้นเอ็นสด โดยใช้วิธีสกัดด้วย Chelex เทียบกับผลที่ได้จากน้ำสกัดดีเอ็นเอจากเส้นเอ็นสดโดยใช้วิธีสกัดที่พัฒนาขึ้นมาใหม่
หมายเหตุ – n.b. = ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

ผลการตรวจลักษณะ microsatellite DNA 2 ตำแหน่ง จากตัวอย่างกล้ามเนื้อสดเทียบกับเส้นเอ็นที่ทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง ตามระยะเวลาต่างๆ ปรากฏดังตารางที่ 2

Specimen No.	Muscle D10S2325	Muscle D19S253	Tendon week 0 D10S2325	Tendon week 0 D19S253	Tendon week 1 D10S2325	Tendon week 1 D19S253	Tendon week 4 D10S2325	Tendon week 4 D19S253	Tendon week 8 D10S2325	Tendon week 8 D19S253
1	9/13	13/14	9/13	13/14	n.b.	n.b.	9/13	13/14	n.b.	n.b.
2	7/10	14/14	7/10	14/14	7/10	14/14	n.b.	n.b.	7/10	14/14
3	9/10	7/10	9/10	7/10	9/10	7/10	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
4	12/14	11/12	12/14	11/12	n.b.	n.b.	12/14	11/12	12/14	11/12
5	14/15	8/12	14/15	8/12	14/15	8/12	14/15	8/12	14/15	8/12
6	7/11	7/8	7/11	7/8	7/11	7/8	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
7	7/10	7/13	7/10	7/13	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
8	12/13	12/13	12/13	12/13	12/13	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
9	9/11	13/13	9/11	13/13	n.b.	n.b.	9/11	13/13	n.b.	n.b.
10	10/10	7/13	10/10	7/13	10/10	n.b.	10/10	7/13	n.b.	n.b.

ตารางที่ 2 – *แสดงลักษณะ microsatellite DNA ที่ ตำแหน่ง D10S2325 และ D19S253 จากตัวอย่างกล้ามเนื้อสดและเส้นเอ็นที่ปล่อยให้เน่าสลายในระยะเวลาต่างๆ*

หมายเหตุ – n.b. = ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

อภิปรายผลการวิจัย

จากการวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเส้นเอ็นสามารถนำมาใช้เป็นตัวอย่างสำหรับสกัดดีเอ็นเอได้โดยวิธีที่ไม่ยุ่งยากและราคาถูก แม้จะปล่อยให้เส้นเอ็นเน่าสลายตามธรรมชาติในอุณหภูมิและความชื้นสูง เช่น ในประเทศไทย นานถึง 8 สัปดาห์ การตรวจลักษณะดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อเส้นเอ็นก็ยังสามารถทำได้ผลดี โดยโอกาสที่จะสำเร็จมีพอสมควร อย่างไรก็ตามจะเห็นว่าผลสำเร็จในการตรวจดีเอ็นเอจากเส้นเอ็นจะลดลงอย่างรวดเร็วในสัปดาห์แรก คือ ตรวจได้ถูกต้อง เพียง 50% และยังคงผลสำเร็จนั้นได้ไปถึง 4 สัปดาห์ จากนั้นจะลดลงไปอีกเล็กน้อยเมื่อปล่อยให้เส้นเอ็นนั้นเน่าสลายไปถึงสัปดาห์ที่ 8 โดยความสำเร็จจะลดลงเหลือ 30 % ดังนั้นหากจำเป็นต้องใช้เส้นเอ็นเป็นตัวอย่างสำหรับส่งตรวจดีเอ็นเอ อาจจำเป็นต้องเพิ่มจำนวนตำแหน่งตรวจให้มากกว่าปกติ สำหรับ microsatellite DNA ทั้ง 2 ตำแหน่งที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ มีขนาดของ amplicon ค่อนข้างยาว คือ 115-195 เบส สำหรับตำแหน่ง D10S2325 และ 123 -159 เบสสำหรับตำแหน่ง D19S253 เมื่อเทียบกับการศึกษาของ วรวีย์และคณะ [3] เคยประเมินความสำเร็จในการตรวจดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อที่เน่าสลาย โดยเลือกกล้ามเนื้อขมับมาเก็บไว้ในภาชนะปิด แล้วปล่อยให้เน่าสลายในอุณหภูมิห้อง ตามระยะเวลาต่างๆ จากนั้นนำกล้ามเนื้อเหล่านั้นมาสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี organic phenol chloroform นำน้ำสกัดดีเอ็นเอที่ได้มาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมตรงตำแหน่งที่บอกเพศ (amelogenin) ซึ่งมีขนาดของ amplicon ค่อนข้างเล็ก พบว่าสามารถประเมินผลได้ถูกต้องทั้งหมดใน 2 สัปดาห์แรกจากนั้นจะลดลงเหลือ 60% และ ตรวจไม่ได้เลยในเวลา 1 และ 2 เดือนตามลำดับ จะเห็นว่าในช่วงแรกๆ จะมีโอกาสสำเร็จสูง หากเทียบกับการวิจัยครั้งนี้กับ

เนื้อเยื่อเส้นเอ็น แม้กระนั้นก็ตามมีข้อที่ต้องพิจารณา ดังนี้ 1) การเก็บรักษาตัวอย่างต่างกัน เนื่องจากการทดลองกับเนื้อเยื่อเส้นเอ็นต้องการเรียนแบบความเป็นจริง จึงได้มีการเตรียมเนื้อเยื่อเส้นเอ็นโดยห่อหุ้มด้วยกล้ามเนื้อ แล้วปล่อยให้เน่าในภาชนะเปิดให้แมลงวันเข้ามาได้ ซึ่งพบว่าภายใน 1 สัปดาห์ กล้ามเนื้อที่ห่อหุ้มเส้นเอ็นก็เน่าสลายเป็นอาหารของหนอนแมลงจนหมดสิ้นแล้ว 2) วิธีสกัดดีเอ็นเอ ในการวิจัยครั้งนี้ใช้วิธีที่ง่ายและประหยัดกว่าการทดลองของ วรวีย์มาก และ 3) ตำแหน่งดีเอ็นเอที่ใช้ทดสอบต่างกัน วรวีย์เลือกใช้ตำแหน่งบอกเพศ ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีขนาดเล็ก คือ ขนาดของ amplicon เพียง 106 และ 112 เบส เท่านั้น

จากการศึกษาของ Roeper และคณะ[4] พบว่าในศพที่ยังไม่เน่า ปริมาณดีเอ็นเอต่อหน่วยน้ำหนักของเนื้อเยื่อที่เท่ากัน ในเส้นเอ็นจะมีปริมาณน้อยกว่ากล้ามเนื้อและไตอย่างชัดเจน แต่ในศพที่เน่าแล้วกลับพบว่าปริมาณดีเอ็นเอในเส้นเอ็นไม่ได้ลดลงไปแต่กลับมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น ในขณะที่ปริมาณดีเอ็นเอในกล้ามเนื้อและไตจะลดลงไปอย่างมาก นอกจากนั้นยังสามารถตรวจดีเอ็นเอจากเส้นเอ็นได้ผลสำเร็จถึง 80% ตรงนี้อาจเป็นเพราะสภาพภูมิอากาศของประเทศทางยุโรปหนาวเย็นกว่าและมีความชื้นน้อยกว่าประเทศไทยมาก

สรุป

เนื้อเยื่อเส้นเอ็นสามารถนำมาสกัดดีเอ็นเอ เพื่อตรวจดูลักษณะดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์สำหรับใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล ได้แม้จะ ถูกทิ้งไว้ให้เน่าในอุณหภูมิที่ร้อนชื้นในประเทศไทยนานถึง 8 สัปดาห์ อย่างไรก็ตามโอกาสที่จะตรวจได้ประสบผลสำเร็จ อาจลดลงไปตามระยะเวลาที่ทิ้งไว้ เมื่อเทียบกล้ามเนื้อและกระดูกแล้ว เนื้อเยื่อเส้นเอ็นอาจคงทนกว่ากล้ามเนื้อและสามารถสกัดดีเอ็นเอได้ง่ายกว่ากระดูก

เอกสารอ้างอิง

1. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR based typing from forensic material. Bio Techniques.1991; 10: 506-13.
2. Sajantila A, Pacek P, Lukka M, et al, A microsatellite polymorphism in the von Willebrand factor gene : comparison of allele frequencies in different population samples and evaluation for forensic medicine. Forens Sci Int. 1994; 68:91-102.
3. Waiyawuth W, Keeratiwuthiseth V. The sex determination from putrified tissue using DNA profile. J Forens Sci Assoc Thailand. 2000;29:29-33.
4. Roeper A, Reichert W, Mattern R. The achilies tendon as a DNA source for STR typing of highly decayed corpses. Forens Sci Int. 2007;173:103-6.