ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณ DNA ที่สกัดจากเลือดของผู้เสียชีวิต โดยวิธี Salting-out กับวิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol

กาญจนา สุจิรชาโต[1], ปิยะ วงศ์ญาณิน[1], มณีรัตน์ ปัสสะ[1], ศุภาวรรณ เพชรโต[1], ภัทรภณ หมั่นกิจ[1], วิชาญ เปี้ยวนิ่ม[2*]

[1]ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา กรุงเทพมหานคร
[2]สาขาวิชานิติเวชศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร
*Corresponding author email: nitivejrama@hotmail.com

ได้รับบทความ: 20 มีนาคม 2563
ได้รับบทความแก้ไข: 31 พฤษภาคม 2563
ยอมรับตีพิมพ์: 5 มิถุนายน 2563

บทคัดย่อ

การตรวจดีเอ็นเอเป็นการตรวจที่มีความน่าเชื่อถือมากในงานนิติวิทยาศาสตร์เพื่อใช้ยืนยันผู้กระทำผิด ดีเอ็นเอต้องมีคุณภาพดีเพื่อให้ผลการตรวจถูกต้อง การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดมีหลายวิธี ที่นิยมใช้กันมากคือวิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol และวิธี Salting-out การศึกษานี้เพื่อเปรียบเทียบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดโดยวิธีฟีนอลคลอโรฟอร์มไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ และวิธี Salting-out ได้สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดของผู้เสียชีวิตจำนวน 50 ราย แล้ววัดปริมาณและความบริสุทธิ์ (A260/280) ของดีเอ็นเอ ด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมในปริมาตรน้อย และทดสอบคุณภาพโดยพีซีอาร์ เปรียบเทียบวิธีสกัดดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS พบว่าวิธีฟีนอลคลอโรฟอร์มไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ได้ปริมาณดีเอ็นเอสูงกว่าวิธี Salting-out อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.0001$) จากตัวอย่างเลือด 0.7 มิลลิลิตร พบว่าปริมาณของดีเอ็นเอเฉลี่ยโดยวิธีฟีนอลคลอโรฟอร์มไอโซเอมิลแอลกอฮอล์เท่ากับ 198.8 $\pm$ 164.7 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรในปริมาตร 300 ไมโครลิตร ขณะที่วิธี Salting-out ได้ดีเอ็นเอเฉลี่ยเท่ากับ 108.7$\pm$ 120.3 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร รายที่มีดีเอ็นเอน้อยกว่า 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร พบ 16 รายในกลุ่ม Salting-out และ 2 รายในกลุ่มฟีนอลคลอโรฟอร์มไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ความ

บริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ทั้ง 2 วิธีไม่แตกต่างกัน ทุกรายมีค่า A260/280 มากกว่า 1.5 ไม่มีปัญหาในการทำพีซีอาร์ ค่าใช้จ่ายและเวลาสกัดดีเอ็นเอทั้ง 2 วิธีใกล้เคียงกัน สรุปวิธีฟีนอลคลอโรฟอร์มไอโซเอมิลแอลกอฮอล์และวิธี Salting-out สามารถใช้สกัดดีเอ็นเอจากเลือดได้ วิธีฟีนอลคลอโรฟอร์มไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ดีสำหรับปริมาณเลือดน้อย

คำสำคัญ: สกัดดีเอ็นเอจากเลือด / Salting-out / ฟีนอลคลอโรฟอร์มไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

Comparative Study of DNA Extracted from Blood by Salting-Out and Phenol/Chloroform/Isoamyl Alcohol

Kanchana Sujirachato[1], Piya Wongyanin[1], Maneerat Passa[1], Supawan Petto[1], Pattarapon Mongid[1], Vichan Peonim[2*]

[1]Department of Medical Technology, Faculty of Science and Technology, Bansomdejchaopraya Rajabhat University, Bangkok
[2]Division of Forensic Medicine, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok
[*]Corresponding author email: nitivejrama@hotmail.com

Received: 20 March 2020
Revised: 31 May 2020
Accepted: 5 June 2020

Abstract

DNA testing is a highly sensitive and reliable method for personal identification especially for justice process. An accurate result will be obtained from good quality DNA outcome. There are many methods of DNA extraction from blood. Two widely used manual techniques are phenol/chloroform/isoamyl alcohol and salting-out. The aim of this study is to compare DNA extraction techniques by phenol/chloroform/isoamyl alcohol and salting-out. Fifty postmortem EDTA blood samples were studied. The DNA concentration and purity (A260/280) were determined by Nanodrop and PCR amplification. SPSS was used for comparison analysis. Phenol/chloroform/isoamyl alcohol gave significantly higher DNA concentration than salting-out ($p < 0.0001$). From 0.7 ml of blood sample, the result showed that average DNA concentration from phenol/chloroform/isoamyl alcohol was 198.8 $\pm$ 164.7 ng/µl in 300 µl whereas 108.7 $\pm$ 120.3 ng/µl was obtained from salting-out. Samples with DNA less than 50 ng/µl were found in 16 cases and 2 cases of salting-out and

phenol/chloroform/isoamyl alcohol, respectively. The purity of DNA from both techniques was similar. All subjects had A260/280 value (purity) greater than 1.5. The cost and time for DNA extraction by both techniques were not quite different. Both techniques can be used for DNA extraction from blood. Phenol/chloroform/isoamyl alcohol would be better for small amount of blood.

Keywords: DNA extraction / Salting-out / Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol

บทนำ

เนื่องจากสภาพเศรษฐกิจในปัจจุบันกำลังมีปัญหาส่งผลให้มีผู้ตกงานมากขึ้น และค่าครองชีพสูงขึ้น เป็นสาเหตุการเกิดอาชญากรรม วิธีการทางวิทยาศาสตร์หรือนิติวิทยาศาสตร์สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการยุติธรรม เพื่อหาผู้กระทำผิดที่แท้จริง และในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างของเลือดผู้เสียชีวิตจากวิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol เทียบกับวิธี Salting-out การตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลจากวัตถุพยานต่าง ๆ โดยใช้เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์เข้ามาเกี่ยวข้อง ส่วนใหญ่เป็นการปฏิบัติในห้องปฏิบัติการ ใช้อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการตรวจพิสูจน์ เช่น เครื่อง Scanning electron microscope (SEM) ที่สามารถตรวจวิเคราะห์พยานวัตถุในเชิงกายภาพได้ถึงระดับโมเลกุล หรือเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ที่สามารถวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากพยานวัตถุที่มาจากร่างกายมนุษย์ โดยที่เลือดเป็นวัตถุพยานที่ใช้บ่อยที่สุดในการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล การสกัด DNA จากเลือดโดยวิธี Manual เช่น Boiling method, Salting-out, Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol, Isopropanol precipitation น้ำยามีทั้งเตรียมเอง และ Commercial kit [1] ข้อดีของ Commercial kit คือสะดวกแก่ผู้ปฏิบัติงาน แต่ข้อเสียคือราคาแพง วิธีที่เป็นวิธีมาตรฐานและเป็นวิธีที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการหลายแห่ง คือวิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol [2,3] พบว่าวิธีนี้สกัด DNA มีประสิทธิภาพ และได้ปริมาณมาก รวมทั้งค่าใช้จ่ายไม่แพง และใช้เวลาน้อย [4,5] แต่วิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol มีข้อเสียคือใช้สารอินทรีย์ที่มีฤทธิ์เป็นพิษและกัดกร่อนอาจเกิดอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงาน [6,7] ดังนั้นเพื่อหลีกเลี่ยงการใช้สารอินทรีย์นี้ ค.ศ. 1988 Miller et al. [8] ได้พัฒนาวิธี Simple salting-out แต่วิธีนี้ยังมีข้อเสียคือใช้ Proteinase K ซึ่งมีราคาแพง และใช้เวลานาน เมื่อเทียบกับสารที่ใช้ในวิธี Phenol ต่อมาในปี ค.ศ. 1991 Lahiri และ Nurnberger [2] ได้ทำการพัฒนาวิธีเพื่อลดการใช้สารอินทรีย์และลดเวลาสำหรับ Proteinase K และในปี ค.ศ. 2005 Nasiri et al. [9] ได้ทำการพัฒนาวิธี Modified salting out โดยการใช้ Laundry powder แทน Proteinase K ซึ่งได้ผลดี สามารถสกัด DNA ได้ง่าย และใช้กันอย่างแพร่หลาย มีการใช้วิธี Salting-out สกัด DNA จากเลือดเพื่อหลีกเลี่ยงการใช้ Phenol ซึ่งเป็นพิษ [10-12]

การศึกษานี้เปรียบเทียบวิธีสกัดจากเลือด โดยวิธี Salting-out กับ วิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol เพื่อใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์สำหรับพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลโดยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยคำนึงถึง ปริมาณ (Yield) ความบริสุทธิ์ (Purity) ค่าใช้จ่าย (Expense) และความรวดเร็ว (Rapidity)

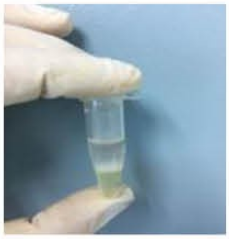
วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างเลือด EDTA ของคนเสียชีวิตจำนวน 50 ราย เป็นชาย 34 ราย และหญิง 16 ราย อายุระหว่าง 8 - 88 ปี (เฉลี่ย 49.2 ปี) ที่ส่งมาชันสูตรที่ห้องปฏิบัติการชันสูตรศพ สาขาวิชานิติเวชศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี ระหว่างกันยายนถึงพฤศจิกายน 2561 เก็บตัวอย่างเลือดในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส ปฏิเสธตัวอย่างเลือด Clot หรือมีไขมันมาก

การวิจัยนี้ได้รับการรับรองโดยคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน จากคณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล เลขที่ COA. No. MURA2018/458 ลงวันที่ 29 สิงหาคม 2561

สกัด DNA จากเลือดโดยวิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol [13]

ตัวอย่างเลือด 0.7 มิลลิลิตร ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกด้วยน้ำ 0.8 มิลลิลิตร ใน Microtube 1.5 มิลลิลิตร คว่ำหงายหลอดหลาย ๆ ครั้ง นำไปปั่น 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ดูดของเหลวส่วนบนซึ่งเป็น Hemoglobin ทิ้ง ทำซ้ำอีก 1-2 ครั้งจนได้ตะกอนขาว ย่อยผนังเม็ดเลือดขาวและ Nuclear membrane ให้ปล่อย DNA ออกด้วย 0.2 M Na-acetate 375 ไมโครลิตร, Proteinase K (10 mg/ml) 15 µl และ 10% SDS 25 µl ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง สกัด DNA ออกจากโปรตีนอื่น ๆ ด้วย Phenol/$CHCl_3$/Isoamyl alcohol (25:24:1, v/v/v) 200 µl เขย่าแรง ๆ แล้วนำไปปั่น 12,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ดูด Aqueous phase ชั้นบนซึ่งมี DNA ไปยัง Microtube หลอดใหม่ (ภาพที่ 1) แล้วตกตะกอน DNA ด้วย Absolute ethanol 1 ml คว่ำหงายหลอดหลาย ๆ ครั้ง ปั่น 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ดูด Supernatant ทิ้ง ละลายตะกอน DNA ใน 0.2 M Na-acetate 200 ไมโครลิตร บ่มที่ 55 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วตกตะกอน DNA ซ้ำด้วย Absolute ethanol 500 µl คว่ำหงายหลอดหลาย ๆ ครั้ง ปั่น 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ดูด Supernatant ทิ้ง ล้างตะกอน DNA ด้วย 70% Ethanol ปั่นดูด Supernatant ทิ้ง คว่ำหลอดให้ของเหลวที่ยังค้างอยู่ไหลออก เป่าลมให้แห้งหมาด ๆ แล้วละลายตะกอน DNA ใน DNase-free water 300 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อช่วยการละลาย เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 1 สกัด DNA โดยวิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol
ชั้นบน: Aqueous phase (DNA) ชั้นล่าง: Organic phase (Protein)

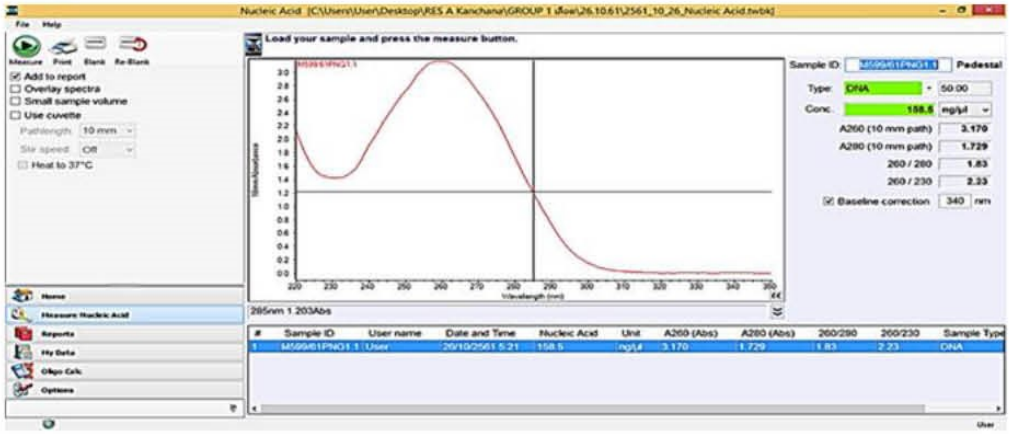
สกัด DNA จากเลือดโดย วิธี Salting–out [14]

ตัวอย่างเลือด 0.7 มิลลิลิตร ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกด้วย Red cell lysis buffer (RCLB) 0.8 มิลลิลิตร ใน Microtube 1.5 มิลลิลิตร คว่ำหงายหลอดหลาย ๆ ครั้ง นำไปปั่น 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ดูดของเหลวส่วนบนซึ่งเป็น Hemoglobin ทิ้ง ทำซ้ำอีก 1-2 ครั้งจนได้ตะกอนขาว ย่อยผนังเม็ดเลือดขาวและ Nuclear membrane ให้ปล่อย DNA ออกด้วย 5X Proteinase K buffer 80 µl, Proteinase K (10 mg/ml) 20 µl, 10% SDS 40 µl และ Milli-Q water 200 µl ที่ 55 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นตกตะกอน Protein ด้วย 5M NaCl 100 µl ปั่น 12,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ดูดของเหลวส่วนบนใส่หลอดใหม่ ปั่นอีก 1 รอบ ดูดของเหลวส่วนบนใส่หลอดใหม่แล้วตกตะกอน DNA ด้วย Absolute ethanol (ปริมาตร 2 เท่าของตัวอย่าง) คว่ำหงายหลอดหลาย ๆ ครั้ง นำไปปั่น 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ดูด Supernatant ทิ้ง ล้างตะกอน DNA ด้วย 70% Ethanol ปั่นดูด Supernatant ทิ้ง คว่ำหลอดให้ของเหลวที่ยังค้างอยู่ไหลออก เป่าลมให้แห้งหมาด ๆ แล้วละลายตะกอน DNA ด้วย DNase-free water 300 ไมโครลิตร บ่มที่ 55 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อช่วยการละลาย เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

ตรวจสอบ DNA ที่สกัดได้ทั้งปริมาณและคุณภาพ

1. โดยเครื่องนาโนดร็อปสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Nanodrop spectrophotometer)

DNA ที่สกัดได้ 1 ไมโครลิตร วัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของ DNA (A260/280) ด้วยเครื่องนาโนดร็อป 3 ครั้ง (ภาพที่ 2) ใช้ค่าเฉลี่ยในการวิเคราะห์



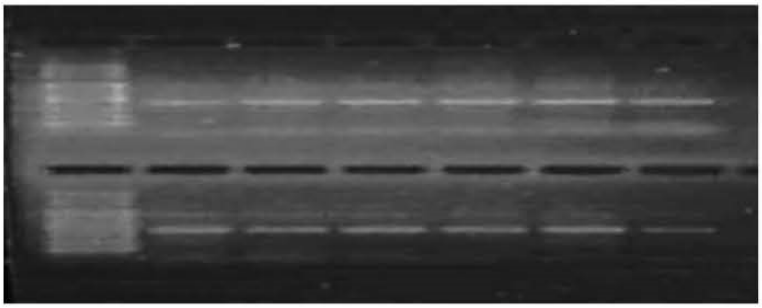
ภาพที่ 2 รายงานปริมาณ (ng/µl) และความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (A260/280) จากเครื่องนาโนดร็อป พร้อมกราฟแสดง

2. โดยโพลีเมอเรสเชนรีแอคชั่น (พีซีอาร์) [14]

DNA ที่สกัดได้ 1 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยา PCR ใน MasterMix 12 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยชุดน้ำยา Perfect*Taq*™ Plus MasterMix (5 Prime, Germany) และ Primer สำหรับ Human growth hormone (HGH-S และ HGH-AS) (BioDesign, Thailand) Final concentration ของส่วนประกอบใน PCR MasterMix ดังนี้ Taq DNA polymerase 1.25 U, $MgCl_2$ 1.5 µM, dNTP 200 µM, 1X PerfectLoad Dye, Primer 0.5 µM ลำดับเบสของ Primer ดังนี้ HGH-S: 5'-TGC-CTT-CCC-AAC-CAT-TCC-CTT-A-3' และ HGH-AS: 5'-CCA-CTC-ACG-GAT-TTC-TGT-TGT-GTT-TC-3'

ตั้ง PCR Thermal cycler ดังนี้: 1) Predenaturation ที่ 94°C 3 นาที, 2) Denaturation ที่ 94°C 60 วินาที, 3) Annealing ที่ 65°C 30 วินาที, 4) Extension ที่ 72°C 30 วินาที, ทำซ้ำ 2) ถึง 4) 35 รอบ, 5) Final Extension ที่ 72°C 5 นาที

ตรวจสอบ PCR Product โดย 2% Agarose gel electrophoresis ร่วมกับ DNA Ladder 100 bp (MBGEN, Taiwan) จะปรากฏ Band ขนาด 434 bp (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ผลิตผล PCR ของ HGH (434 bp) บน Agarose gel electrophoresis

3. การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบปริมาณและความบริสุทธิ์ (Nanodrop และ PCR) ของ DNA ที่สกัดโดยวิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol กับวิธี Salting-out และความสัมพันธ์กับตัวแปร (เพศ อายุ และพฤติกรรมการเสียชีวิต) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป IBM SPSS Version 25 (Pair-t test, independent-t test) ค่า P-value น้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีความสำคัญทางสถิติ

ผลการศึกษา

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบปริมาณ DNA ที่สกัดจากเลือด 0.7 มิลลิลิตร โดยวิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol และวิธี Salting-out พบว่ากลุ่ม Salting-out ได้

DNA น้อยกว่ากลุ่ม Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol คือ ปริมาณ DNA < 50 ng/µl พบ 16 ราย (32%) (p = 0.0004), ปริมาณ DNA 50-100 ng/µl พบ 20 ราย (40%) (p = 0.0486) ขณะที่กลุ่ม Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol ได้ปริมาณ DNA 100 - 300 ng/µl พบ 31 ราย (62%) (p < 0.0001) ค่าเฉลี่ยปริมาณ DNA โดยวิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (198.8 ± 164.7 ng/µl) สูงกว่าวิธี Salting-out (108.7 ± 120.3 ng/µl) ในปริมาตร 300 ไมโครลิตร อย่างมีนัยสำคัญ และพบว่ารายที่มี DNA น้อยกว่า 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร พบมากในกลุ่มที่สกัดโดยวิธี Salting-out คือพบ 16 ใน 50 ราย (32%) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่สกัดโดยวิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol พบ DNA น้อยกว่า 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพียง 2 ใน 50 ราย (4%)

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือด 0.7 ml โดยวิธี Salting-out กับวิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol

ปริมาณดีเอ็นเอ ใน 300 µl	จำนวน (%)		P value
	วิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol	วิธี Salting-out	
< 50 ng/µl	2 (4%)	16 (32%)	0.0004
50-100 ng/µl	10 (20%)	20 (40%)	0.0486
101-300 ng/µl	31 (62%)	9 (18%)	< 0.0001
> 300 ng/µl	7 (14%)	5 (10%)	NS
Mean ± S.D. (ng/µl)	198.8 ± 164.7	108.7 ± 120.3	
Range (ng/µl)	30.8 – 974.0	14.2 – 549.6	
Yield (µg)	59.64	32.61	

ตารางที่ 2 แสดงความบริสุทธิ์ของ DNA (A260/280) และการปนเปื้อนของสารเคมี (A260/230) ที่ใช้ในการสกัด DNA พบว่าความบริสุทธิ์ของ DNA โดยวิธี Salting-out กับวิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol ใกล้เคียงกัน คือ 1.79 ± 0.08 และ 1.76 ± 0.08 ตามลำดับ ทุกรายมีค่า A260/280 > 1.5 ทั้ง 2 กลุ่มไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (P > 0.05) การปนเปื้อนของสารเคมี พบว่าค่า A260/230 ทั้ง 2 วิธีไม่แตกต่างกัน โดยค่าเฉลี่ยของตัวอย่างที่สกัดด้วยวิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol อยู่ที่ 2.27 ± 0.12 (range 1.93 – 2.46) และค่าเฉลี่ยของวิธีที่สกัดด้วย Salting out อยู่ที่ 2.20 ± 0.21 (range 1.61 – 2.50)

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอและการปนเปื้อนจากการสกัดด้วยวิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol และวิธี Salting-out

ความบริสุทธิ์/ ของดีเอ็นเอ	จำนวน (%)		p value
	วิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol	วิธี Salting-out	
ความบริสุทธิ์ (A260/280)			
1.51 – 1.60	1 (2%)	3 (6%)	NS
1.61 – 1.80	31 (62%)	23 (46%)	NS
> 1.80	18 (36%)	24 (48%)	NS
Mean ± S.D.	1.76 ± 0.08	1.79 ± 0.08	
Range	1.53 – 1.87	1.51 – 1.91	
การปนเปื้อน (A260/230)			
< 2.00	2 (6.5%)	4 (12.9%)	NS
2.00 – 2.20	4 (12.9%)	8 (25.8%)	NS
> 2.20	25 (80.6%)	19 (61.3%)	NS
Mean ± S.D.	2.27 ± 0.12	2.20 ± 0.21	
Range	1.93 – 2.46	1.61 ± 2.50	

ผู้ชายได้ปริมาณ DNA สูงกว่าผู้หญิงทั้งวิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol และวิธี Salting–out (ตารางที่ 3) คือโดยวิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol ผู้ชายมีค่าเฉลี่ย DNA = 206.2 นาโนกรัม/ไมโครลิตร และผู้หญิงมีค่าเฉลี่ย DNA = 182.5 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ในปริมาตร 300 ไมโครลิตร ส่วนวิธี Salting-out ผู้ชายมีค่าเฉลี่ย DNA = 123.6 นาโนกรัม/ไมโครลิตร และผู้หญิงมีค่าเฉลี่ย DNA = 77.9 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ในปริมาตร 300 ไมโครลิตร แต่ไม่มีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) สำหรับความบริสุทธิ์ของ DNA พบว่าโดยวิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol ผู้ชายและผู้หญิงมีค่าเฉลี่ย A260/280 เท่ากันคือ 1.76 ส่วนวิธี Salting-out ค่าเฉลี่ย A260/280 ของผู้ชายสูงกว่าผู้หญิง (1.80 vs 1.74) ไม่มีนัยสำคัญเช่นกัน ($p > 0.05$)

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอในเพศชายและหญิงที่สกัดโดยวิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol และ Salting-out

เพศ/ วิธีสกัดดีเอ็นเอ	ปริมาณดีเอ็นเอใน 300 µl (ng/µl)			ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (A260/280)			p value
		จำนวน (%)			จำนวน (%)		
	เฉลี่ย	< 50	≥ 50	เฉลี่ย	< 1.60	≥ 1.60	
วิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol							
ผู้ชาย (n = 34)	206.2	1 (2.9%)	33 (97.1%)	1.76	0 (0%)	34 (100%)	NS
ผู้หญิง (n = 16)	182.5	1 (6.2%)	15 (93.8%)	1.76	1 (6.2%)	15 (93.8%)	NS
วิธี Salting-out							
ผู้ชาย (n = 34)	123.6	12 (35.3%)	22 (64.7%)	1.80	1 (2.9%)	33 (97.1%)	NS
ผู้หญิง (n = 16)	77.9	4 (25.0%)	12 (75.0%)	1.74	2 (12.5%)	14 (87.5%)	NS

วิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol กลุ่มอายุ ≤ 50 ปี ได้ DNA เฉลี่ย 195.9 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ค่าเฉลี่ย A260/280 = 1.78 ส่วนกลุ่มอายุ > 50 ปีได้ DNA เฉลี่ย = 203.0 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ค่าเฉลี่ย A260/280 = 1.73 ในปริมาตร 300 ไมโครลิตร สำหรับวิธี Salting-out กลุ่มอายุ ≤ 50 ปี ได้ DNA เฉลี่ย 112.5 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ค่าเฉลี่ย A260/280 = 1.79 ส่วนกลุ่มอายุ > 50 ปีได้ DNA เฉลี่ย = 105.9 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ค่าเฉลี่ย A260/280 = 1.78 ในปริมาตร 300 ไมโครลิตร เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณและความบริสุทธิ์ของ DNA กับอายุ ทั้ง 2 วิธี ไม่มีความแตกต่าง ($P > 0.05$) (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบดีเอ็นเอในกลุ่มอายุน้อยกว่าและมากกว่า 50 ปีที่สกัดโดยวิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol และ Salting-out

อายุ/ วิธีสกัดดีเอ็นเอ	ปริมาณดีเอ็นเอใน 300 µl (ng/µl)			ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (A260/280)			p value
		จำนวน (%)			จำนวน (%)		
	เฉลี่ย	< 50	≥ 50	เฉลี่ย	< 1.60	≥ 1.60	
วิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol							
อายุ ≤ 50 ปี (n = 25)	195.9	1 (4.0%)	24 (96.0%)	1.78	0 (0%)	25 (100%)	NS
อายุ > 50 ปี (n = 24)	203.0	1 (4.2%)	23 (95.8%)	1.73	1 (4.2%)	23 (95.8%)	NS
วิธี Salting-out							
อายุ ≤ 50 ปี (n = 25)	112.5	8 (32.0%)	17 (68.0%)	1.79	2 (8.0%)	23 (92.0%)	NS
อายุ > 50 ปี (n = 24)	105.9	8 (33.3%)	16 (66.7%)	1.78	1 (4.2%)	23 (95.8%)	NS

เปรียบเทียบพฤติการณ์การเสียชีวิตกับวิธีสกัด DNA จากเลือดทั้ง 2 วิธี (ตารางที่ 5) พบว่าวิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol มีค่าเฉลี่ยของ DNA เท่ากับ 183.1,

179.9, 311.0 และ 338.6 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ในปริมาตร 300 ไมโครลิตร ในกลุ่มที่เสียชีวิตแบบกะทันหัน อุบัติเหตุจราจร อุบัติเหตุ และถูกฆ่า/ฆ่าตัวตาย ตามลำดับ ขณะที่วิธี Salting-out มีค่าเฉลี่ยของ DNA เท่ากับ 101.6, 102.2, 181.2 และ 180.6 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ในปริมาตร 300 ไมโครลิตร ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าปริมาณ DNA ไม่มีความสัมพันธ์กับพฤติการณ์การเสียชีวิตทั้ง 2 วิธี ($P > 0.05$) สำหรับความบริสุทธิ์ของ DNA พบว่าวิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol มีค่า A260/280 เท่ากับ 1.74, 1.77, 1.77 และ 1.76 ในกลุ่มที่เสียชีวิตแบบกะทันหัน อุบัติเหตุจราจร อุบัติเหตุ และถูกฆ่า/ฆ่าตัวตาย ตามลำดับ ขณะที่วิธี Salting-out มีค่า A260/280 เท่ากับ 1.77, 1.67, 1.83 และ 1.86 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าความบริสุทธิ์ของ DNA ไม่มีความสัมพันธ์กับพฤติการณ์การเสียชีวิตทั้ง 2 วิธี ($P > 0.05$)

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบพฤติการณ์การเสียชีวิตกับปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดโดยวิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol และวิธี Salting-out

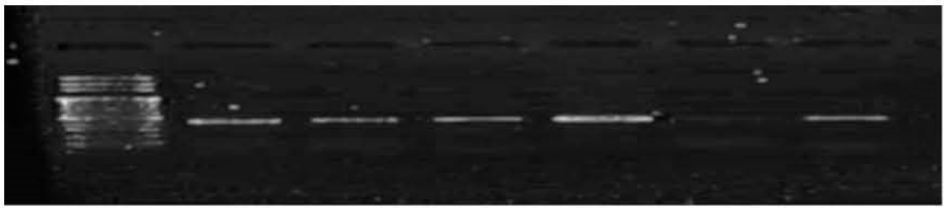
พฤติการณ์การเสียชีวิต/วิธีสกัดดีเอ็นเอ	ปริมาณดีเอ็นเอใน 300 µl (ng/µl)			ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (A260/280)			p value
		จำนวน (%)			จำนวน (%)		
	เฉลี่ย	< 50	≥ 50	เฉลี่ย	< 1.60	≥ 1.60	
Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol							
เสียชีวิตกะทันหัน (n = 25)	183.1	2 (8.0%)	23 (92.0%)	1.74	1 (4.0%)	24 (96.0%)	NS
อุบัติเหตุจราจร (n = 12)	179.9	0 (0%)	12 (100%)	1.77	0 (0%)	12 (100%)	NS
อุบัติเหตุ (n = 8)	311.0	0 (0%)	8 (100%)	1.77	0 (0%)	8 (100%)	NS
ถูกฆ่า/ฆ่าตัวตาย (n = 5)	338.6	0 (0%)	5 (100%)	1.76	0 (0%)	5 (100%)	NS
วิธี Salting-out							
เสียชีวิตกะทันหัน (n = 25)	101.6	7 (28.0%)	18 (72.0%)	1.77	2 (8.0%)	23 (92.0%)	NS
อุบัติเหตุจราจร (n = 12)	102.2	5 (41.7%)	7 (58.3%)	1.67	0 (0%)	12 (100%)	NS
อุบัติเหตุ (n = 8)	181.2	2 (25.0%)	6 (75.0%)	1.83	0 (0%)	8 (100%)	NS
ถูกฆ่า/ฆ่าตัวตาย (n = 5)	180.6	2 (40.0%)	3 (100%)	1.86	0 (0%)	5 (100%)	NS

เปรียบเทียบค่าใช้จ่ายน้ำยาและอุปกรณ์สิ้นเปลืองรวมทั้งเวลาที่ใช้ในการสกัด DNA จากเลือดโดยวิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol และวิธี Salting-out (ตารางที่ 6) พบว่าทั้ง 2 วิธี ใกล้เคียงกันคือ วิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol ใช้อุปกรณ์ 19.70 บาท และน้ำยา 13.05 บาท รวมเป็นเงิน 32.75 บาทต่อราย ขณะที่วิธี Salting-out ใช้อุปกรณ์ 19.30 บาทและน้ำยา 12.60 บาท รวมเป็นเงิน 31.90 บาทต่อราย สำหรับเวลาที่ใช้สกัด DNA วิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol ใช้เวลา 4 ชั่วโมง 15 นาที ส่วนวิธี Salting-out ใช้เวลา 4 ชั่วโมง 6 นาที

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบค่าใช้จ่ายและเวลาที่ใช้สกัด DNA โดยวิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol และ Salting-out

ค่าใช้จ่าย/เวลาที่ใช้สกัดดีเอ็นเอ	วิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol	วิธี Salting-out
ค่าใช้จ่ายต่อราย	32.75 บาท	31.90 บาท
อุปกรณ์สิ้นเปลือง	19.70 บาท	19.30 บาท
สารเคมี	13.35 บาท	12.60 บาท
เวลาที่ใช้สกัดดีเอ็นเอ	4 ชั่วโมง 15 นาที	4 ชั่วโมง 6 นาที

ผู้วิจัยได้สุ่มเอา DNA ที่มีค่า A260/280 ระหว่าง 1.5 – 1.6 ทดสอบ PCR พบว่าไม่มีปัญหา ทุกรายให้ PCR Product ขนาด 434 bp โดย Gel electrophoresis และได้สุ่มเอา DNA ความเข้มข้น ต่าง ๆ ทดสอบ PCR โดยใช้ Human growth hormone (HGH) เป็น Primer พบว่า DNA $\geq$ 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ทุกรายปรากฏ Band ขนาด 434 bp ส่วน DNA < 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร บางรายไม่ปรากฏ Band หรือปรากฏ Band จาง และมักพบในรายที่สกัด DNA ด้วยวิธี Salting-out จึงได้แก้ปัญหาโดยเพิ่มปริมาตรให้ปริมาณ DNA ในปฏิกิริยา PCR ไม่น้อยกว่า 50 นาโนกรัม ซึ่งเดิมใช้ 1 ไมโครลิตร เพิ่มเป็น 2-4 ไมโครลิตร (2-4 เท่า) และลดปริมาตรน้ำใน PCR Mixture 2-4 เท่าเช่นกัน พบว่าสามารถแก้ปัญหาได้ (ภาพที่ 4) Lane ที่ 6 M597-SO มี DNA 14.2 นาโนกรัม ไม่ปรากฏ Band ผลิตผล PCR ใน Gel electrophoresis แต่ Lane 7 ซึ่งเป็น Sample เดียวกันได้เพิ่มปริมาตร DNA 4 เท่าโดยใช้ 4 ไมโครลิตรในปฏิกิริยา PCR ปริมาณของ DNA เพิ่มเป็น 56.8 นาโนกรัม ทำควบคู่กัน ผลปรากฏ Band ชัดเจน



ภาพที่ 4 แก้ปัญหา Gel electrophoresis โดยเพิ่มปริมาตรในรายที่มี DNA น้อย

1	2	3	4 = 3X3	5	6	7 = 6X4
MW Marker	M598-PCI	M598-SO	M598-SOx3	M597-PCI	M597-SO	M597-SOx4
DNA, ng/µl	104.9	20.8	62.4	142.4	14.2	56.8
A260/A280	1.83	1.85	1.85	1.73	1.79	1.79
A260/A230	2.27	2.33	2.33	2.26	2.50	2.50
PCR, 434 bp	present	present	present	present	absent	present

ผู้วิจัยได้ทดลองลดปริมาตรของตัวอย่างเลือดเป็น 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.5 มิลลิลิตร แล้วสกัดดีเอ็นเอเปรียบเทียบวิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol และวิธี Salting-out โดยละลายดีเอ็นเอใน DNAse-free water 30 ไมโครลิตร (ตารางที่ 7) พบว่าสามารถลดปริมาตรเลือดเหลือ 0.1 มิลลิลิตร วิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol ได้ DNA มากกว่าวิธี Salting-out (98.7 vs 38.9 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) และทุกรายมีค่า A260/280 มากกว่า 1.50

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอจากเลือดปริมาตรต่าง ๆ ที่สกัดโดยวิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol and Salting-out

ปริมาตรของเลือด	ปริมาณดีเอ็นเอใน 30 µl (ng/µl)		ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (A260/280)	
	PCI	Salting-out	PCI	Salting-out
0.1 ml	98.7	38.9	1.52	1.91
0.2 ml	212.6	96.3	1.67	1.88
0.3 ml	324.3	195.7	1.83	1.85
0.5 ml	607.3	461.0	1.84	1.83

PCI = Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol

วิจารณ์และสรุป

นิติวิทยาศาสตร์เป็นการนำวิทยาศาสตร์มาใช้ในการพิสูจน์หลักฐานเพื่อใช้ในกระบวนการยุติธรรม การสังเกต ตั้งข้อสงสัย และพิสูจน์โดยการใช้วัตถุพยานหรือสภาพแวดล้อมขณะเกิดเหตุ ช่วยลำดับเหตุการณ์และระบุตัวผู้กระทำความผิดได้ [15]

การตรวจดีเอ็นเอเป็นการตรวจที่มีความน่าเชื่อถือมากที่สุด โดยเป็นวิธีที่มีความไวและจำเพาะ การตรวจดีเอ็นเอทางนิติวิทยาศาสตร์ในอดีตมีปัญหามาก เพราะวัตถุพยานมีปริมาณน้อยไม่เพียงพอสำหรับวิเคราะห์ต่อเพื่อสืบหาเอกลักษณ์บุคคล หลังจากมีการพัฒนาเทคนิค PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำเร็จ มีการนำเทคนิคนี้มาประยุกต์ใช้ในงานด้านต่าง ๆ ปรากฏว่าได้ผลดี บริษัทต่าง ๆ จึงมีการผลิตเครื่องมือและน้ำยาสำเร็จรูปเพื่ออำนวยความสะดวกแก่ผู้ปฏิบัติงาน รวมทั้งเครื่องมืออัตโนมัติ แต่ราคาเครื่องมือและน้ำยามีราคาแพง ผู้ปฏิบัติงานจำเป็นต้องมีทักษะทางด้านชีววิทยาโมเลกุล นอกจากนี้ความหลากหลายของวัตถุพยานทางนิติวิทยาศาสตร์แตกต่างจากงานด้านอื่น ๆ จึงต้องมีวิธีการพิเศษสกัดดีเอ็นเอที่จำเพาะสำหรับแต่ละวัตถุพยาน การคาดคะเนจำนวนสิ่งส่งตรวจจึงยาก อาจทำให้น้ำยาสำเร็จรูปหมดอายุ การสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี Manual อาจเหมาะสำหรับ Sample size ที่ไม่ใหญ่มาก เลือดเป็นวัตถุพยานที่พบบ่อยที่สุด การศึกษานี้เพื่อเปรียบเทียบวิธีสกัดดีเอ็นเอจากเลือดปริมาณน้อย ๆ โดย Microtechnique เพื่อให้ได้วิธีที่เหมาะสม ไม่ยุ่งยากมาก

ราคาไม่แพง และได้ดีเอ็นเอคุณภาพดีและมีปริมาณเพียงพอสำหรับการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลต่อไป

การสกัด DNA ในปัจจุบันที่ใช้อยู่ เช่น Chelex® (Commercial kit) และ Phenol-Chloroform ถูกนำมาใช้ในงานประจำของห้องปฏิบัติการทางนิติวิทยาศาสตร์ Riemann et al. [16] ได้แนะนำให้ใช้วิธี Manual เพื่อลดค่าใช้จ่ายเพราะเครื่องอัตโนมัติมีราคาแพง รวมทั้งจำนวนตัวอย่างมีน้อย ในระยะหลังนี้ภาระงานที่ต้องพิสูจน์เพิ่มขึ้นอย่างมาก ในปี ค.ศ. 2017 Steven และ Jaiprakash [3] จึงได้เสนอให้นำเครื่องอัตโนมัติมาใช้สำหรับสกัด DNA แต่ข้อเสียคือต้นทุนสูง

การศึกษานี้พบว่าวิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol ได้ปริมาณ DNA สูงกว่าวิธี Salting-out อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 1) เหมือนการศึกษาของ Hue et al. [17] และ Ghaheri et al. [18] อาจเนื่องจากมีการเติม Na-acetate ทำให้ DNA ตกตะกอนเพิ่มขึ้น ซึ่งแตกต่างกับงานวิจัยของ Mohammadi et al. [7] ที่รายงานว่าวิธี Salting-out ได้ DNA มากกว่า จากการสกัด DNA จากเลือดปริมาตร 0.7 มิลลิลิตรตามอ้างอิง [8,13] ส่วนใหญ่ได้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอมากกว่า 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรในปริมาตร 300 ไมโครลิตร และได้ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอดีพอ ๆ กันทั้ง 2 วิธี (A260/280 มากกว่า 1.5) (ตารางที่ 2) การปนเปื้อนของสารเคมีที่ใช้สกัด DNA (A260/230) ที่ยอมรับของ Nanodrop ควรอยู่ระหว่าง 2.0 – 2.2 DNA ที่สกัดได้ในการศึกษานี้โดยภาพรวมทั้ง 2 วิธีได้ DNA ที่บริสุทธิ์และไม่มีการปนเปื้อนของสารเคมีที่ใช้ในการสกัด DNA อย่างไรก็ตามในบางตัวอย่างพบว่ามีค่า A260/230 ต่ำกว่า 2 เล็กน้อยซึ่งแสดงว่าอาจมีการปนเปื้อนของ phenol อยู่บ้าง แต่ก็สามารถนำมาใช้เป็น Template สำหรับปฏิกิริยา PCR ได้ ส่วนตัวอย่างที่มีค่า A260/230 ต่ำกว่า 2 มาก (O.D. 1.61) จะไม่นำมาใช้เป็น Template

ปริมาตร DNA 30 ไมโครลิตรเพียงพอสำหรับการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล ดังนั้นในงานวิจัยนี้ได้ทดลองลดปริมาตรเลือดลงหลาย ๆ ระดับ พบว่าตัวอย่างเลือด 0.1 มิลลิลิตร สามารถให้ DNA เพียงพอสำหรับการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล (ตารางที่ 7) การสกัด DNA โดยวิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol จึงเหมาะกับเลือดปริมาณน้อย ๆ เช่น ตัวอย่างจากวัตถุพยาน

ทั้ง 2 วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย ใช้เวลาน้อย (ประมาณ 4 ชั่วโมง) ค่าใช้จ่ายไม่สูง (ประมาณ 32 บาทต่อราย) (ตารางที่ 6) และ DNA มีคุณภาพดี (ภาพที่ 2 และ 3) เหมาะสำหรับสกัด DNA จากเลือดโดยวิธี Manual ความเห็นตรงกับนักวิจัยอื่น ๆ [4,11] ถึงแม้ Phenol มีพิษทำให้เกิดการกัดกร่อน แต่ก็สามารถควบคุมได้ด้วย Good Laboratory practice โดยการสวมหน้ากาก (Mask) ถุงมือ (Glove) เสื้อกาวน์ (Gown) และเตรียมน้ำยา Phenol และ

Chloroform ในตู้ดูดควัน (Fume hood) วัสดุปนเปื้อนสารพิษ เช่น Microtube, Pipette-tip ใส่ถุงแยกทิ้ง ส่วนภาชนะที่ปนเปื้อนสารพิษ ให้กลั้วน้ำมาก ๆ เพื่อให้เจือจาง

น้ำยา Phenol/Chloroform ในบางการศึกษาใส่ Isoamyl alcohol ในบางการศึกษาก็ไม่ใส่ สำหรับการศึกษานี้ได้ใส่ Isoamyl alcohol เพื่อช่วยป้องกันการเกิดฟอง และยังช่วยให้ได้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์มากขึ้น ในการปฏิบัติงานเนื่องจากเป็นวิธี Microtechnique ปริมาณดีเอ็นเอน้อยมาก (นาโนกรัม) มองไม่เห็นด้วยตา จะทราบปริมาณดีเอ็นเอก็ในขั้นตอนสุดท้ายที่อ่านด้วยเครื่องนาโนดร็อป เพื่อป้องกันการข้ามขั้นตอนเพราะมีขั้นตอนเยอะ จึงควรมี Checklist ในการปฏิบัติงาน

ผู้ชายได้ปริมาณ DNA มากกว่าผู้หญิง ทั้ง 2 วิธี ($p < 0.001$) (ตารางที่ 3) เนื่องจากดีเอ็นเออยู่ในนิวเคลียส เม็ดเลือดขาวเท่านั้นที่มีนิวเคลียส แต่ไม่พบรายงานว่าผู้ชายมีเม็ดเลือดขาวมากกว่าผู้หญิง พบแต่รายงานว่าผู้ชายมีระดับ Hemoglobin (Hb) และเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Hematocrit) สูงกว่าผู้หญิงในโลหิตวิทยา ในกลุ่มที่ศึกษานี้ส่วนใหญ่มีอายุมากช่วง 8 – 88 ปี (เฉลี่ย 49.2 ปี) อาจเนื่องจาก Circulatory cell-free DNA ของผู้ชายสูงกว่าของผู้หญิง จึงพบว่าปริมาณ DNA ในผู้ชายสูงกว่าผู้หญิง

อายุและพฤติการณ์การเสียชีวิตไม่มีผลต่อปริมาณและความบริสุทธิ์ของ DNA ที่สกัดจากเลือดทั้ง 2 วิธี (ตารางที่ 4 และ 5) ถึงแม้ปริมาณ DNA ในกลุ่มอุบัติเหตุและถูกฆ่าหรือฆ่าตัวตายสูงกว่ากลุ่มตายกะทันหันและอุบัติเหตุจราจร ความเครียดไม่ว่าเกิดจาก Physical stress หรือ Emotional stress อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเพิ่มของจำนวนเม็ดเลือดขาวในเลือดในกลุ่มอุบัติเหตุและถูกฆ่าหรือฆ่าตัวตาย ทำให้ได้ DNA มากกว่า

ทั้ง 2 วิธีมีทั้งข้อดีและข้อเสีย เมื่อเปรียบเทียบกันแล้วมีความเห็นว่าวิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol น่าจะเหมาะกับงานทางนิติวิทยาศาสตร์ เพราะสิ่งส่งตรวจมีความหลากหลายมาก นอกจากเลือดก็มี ผม เล็บ น้ำลาย กระดูก ฯลฯ ซึ่งมีโปรตีนอื่น ๆ ปะปนมากกว่าเลือด การสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol มีการแยกชั้น DNA และโปรตีนชัดเจน จะช่วยกำจัด impurity ได้ดีกว่า

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์ และน้ำยา สำหรับการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. 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;42:647-8.
2. Lahiri K, Nurnberger JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. Nucleic Acids Res 1991;19:5444.
3. Steven LB, Jaiprakash SG. DNA extraction methods in forensic analysis. Encyclopedia Anal Chem 2017;2-18.
4. Grimberg J, Nawoschik S, Belluscio L, McKee R, Turk A, Eisenberg A. A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood. Nucleic Acids Res 1989;17:8390.
5. Santella RM. Approaches to DNA/RNA extraction and whole genome amplification. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2006;15:1585-7.
6. Cortes DC, Haupt LM, Lea RA, Griffiths LR. Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives. J Biorepository Sci Applied Med 2014;2:1-9.
7. Mohammadi N, Kazemi B, Roozkhosh G, Masoomi K, Farghadan MT. A simple, inexpensive and safe method for DNA extraction of frigid and clotted blood samples. Novel Biomed 2015;3:119-23.
8. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988;16:12-5.
9. Nasiri H, Forouzandeh M, Rasaee MJ, Rahbarizadeh F. Modified salting-out method: high-yield, high-quality genomic DNA extraction from whole blood using laundry detergent. J Clin Lab Anal 2005;19:229-32.
10. Shams SS, Vahed SZ, Soltanzad F, Kafil V, Barzegari A, Atashpaz S, et al. Highly effective DNA extraction method from fresh, frozen, dried and clotted blood samples. BioImpacts 2011;1:183-7.
11. Gaaib JN, Nassief AF, Al-Assi AH. Simple salting-out method for genomic DNA extraction from whole blood. Tikrit J Pure Sci 2011;16:9-11.

12. Cortes DC, Haupt LM, Lea RA, Griffiths LR. Comparison of genomic DNA extraction techniques from whole blood samples: a time, cost and quality evaluation study. Mol Biol Rep 2012;39:5961-6.
13. Cigliero SS, Edalucci E, Fattorini P. DNA extraction from blood and forensic samples. in Stanta G, editor. Guideline for molecular analysis in archive tissue. Springer; 2011.
14. Green MR, Sambrook J. Analysis of DNA. in Molecular cloning. A laboratory manual. 4th ed. New York: CSH Press; 2012.
15. Chooluk S, Jankangram W. Reviewed history of forensic science. KKU Sci J 2017;45:675-89. (in Thai)
16. Riemann K, Adamzik M, Frauenrath S. Comparison of manual and automated nucleic acid extraction from whole-blood samples. J Clin Lab Anal 2007;21:244-8.
17. Hue NT, Chan NDH, Phong PT, Linh NTT, Giang NDT. Extraction of human genomic DNA from dried blood spots and hair roots. Inter J Biosci Biochem Bioinformatics 2012;2:21-6.
18. Ghaheri M, Kahrizi D, Yari K. Comparative evaluation of four DNA extraction protocols from whole blood sample. Cell Mol Biol 2016;62:120-4.