ประสิทธิภาพของ DNA จากน้ำลายและเล็บของคนสกัดด้วยวิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol

กาญจนา สุจิรชาโต[1], โชติช่วง พนโสภณกุล[1], รัชนี สุวรรณนุรักษ์[1], จันจิรา เครือดี[1], ศิริขวัญ ระวาดชู[1], วิชาญ เปี้ยวนิ่ม[2*]

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

ได้รับบทความ: 26 ตุลาคม 2563
ได้รับบทความแก้ไข: 12 มีนาคม 2564
ยอมรับตีพิมพ์: 18 มีนาคม 2564

บทคัดย่อ

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างน้ำลายและเล็บมีความสำคัญอย่างยิ่งในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ เพื่อช่วยยืนยันผู้กระทำผิดหรือบุคคลสูญหาย งานวิจัยนี้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของวิธีฟีนอลคลอโรฟอร์มไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ในการสกัดดีเอ็นเอจากน้ำลายและเล็บ จากตัวอย่างอาสาสมัคร 30 ราย แบ่งเป็น ผู้ชาย 15 ราย ผู้หญิง 15 ราย โดยอาสาสมัครแต่ละคนมีอายุมากกว่า 18 ปี โดยนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้วัดปริมาณและความบริสุทธิ์ (A260/280) ของดีเอ็นเอด้วยเครื่องนาโนดร็อป ตรวจสอบคุณภาพโดยพีซีอาร์โดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับโกรทฮอร์โมนของคน และทำการวิเคราะห์ผลร่วมกับเพศและอายุของอาสาสมัคร ด้วยโปรแกรม SPSS ผลจากการศึกษาพบว่าจากตัวอย่างน้ำลาย 100 ไมโครลิตร สามารถสกัดดีเอ็นเอได้ปริมาณเฉลี่ย 264.7 $\pm$ 132.9 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ในปริมาตร 30 ไมโครลิตร ในขณะที่ตัวอย่างเล็บ 10-50 มิลลิกรัม สามารถสกัด DNA ได้ปริมาณ 115.3 $\pm$ 69.2 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ทั้งนี้ความบริสุทธิ์ (A260/280) ของดีเอ็นเอจากน้ำลายเท่ากับ 1.43 $\pm$ 0.11 ส่วนเล็บเท่ากับ 1.54 $\pm$ 0.21 ตามลำดับ และพบว่าน้ำลายและเล็บของผู้ชายมีปริมาณดีเอ็นเอมากกว่าผู้หญิงเล็กน้อย (1.2 เท่า) ปัจจัยด้านอายุไม่มีผลต่อปริมาณและความบริสุทธิ์ของ DNA ที่สกัดได้จากตัวอย่างเล็บและน้ำลาย

ทั้งนี้ผลจากการทดสอบคุณภาพดีเอ็นเอโดยพีซีอาร์โดยการสุ่มตรวจจากตัวอย่างพบว่าดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นน้อยกว่า 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรให้ band จาง ส่วนตัวอย่างที่มีค่า A260/280 น้อยกว่า 1.5 มักไม่ปรากฏ band นอกจากนี้เล็บบางรายที่มีปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเออยู่ในเกณฑ์ดีแต่ไม่สามารถให้ PCR product อาจเกิดจาก PCR inhibitor ผลการศึกษาสรุปว่าวิธีฟีนอลคลอโรฟอร์มไอโซเอมิลแอลกอฮอล์สามารถนำมาใช้สกัดดีเอ็นเอจากน้ำลายและเล็บได้ สำหรับเล็บอาจมีปัญหา PCR inhibitor

คำสำคัญ: สกัดดีเอ็นเอจากน้ำลายและเล็บ / ฟีนอลคลอโรฟอร์มไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

Efficiency of the DNA Extracted from Human Saliva and Nail by Phenol/Chloroform/Isoamyl Alcohol

Kanchana Sujirachato[1], Chotechuang Panasoponkul[1], Rachanee Suwannuraks[1], Chanchira Kruedee[1], Sirikhuan Rawadchoo[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: 26 October 2020
Revised: 12 March 2021
Accepted: 18 March 2021

Abstract

DNA extraction from saliva and nail is crucial in forensic investigation to identify the offender or the lost person for judicial process. The aim of this study is to determine the efficiency of Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol to extract human DNA from saliva and nail. The quantity and quality (A260/280) of extracted DNA were measured by Nanodrop spectrophotometer and polymerase chain reaction (PCR) using primers specific for human growth hormone. The total sample number was 30 categorized into samples acquired from 15 males and 15 females with age of over 18 years. With 30 µl DNA suspension obtained from each sample, the average concentration of DNA was 264.7 ± 132.9 ng/µl from 100 µl saliva, and 115.3 ± 69.2 ng/µl from 10-50 mg nail, respectively. The purity of DNA (A260/280) extracted from nail was slightly better than that of saliva (1.54 ± 0.21 vs 1.43 ± 0.11). In addition, males rendered 1.2 times higher DNA quantity than females both in cases of saliva and nail. Age of the subject had no effect on DNA quantity and quality extracted from both saliva and nail. In conclusion, Phenol/Chloroform/

Isoamyl alcohol was considered as an efficient DNA extraction technique for saliva while showing some limitation for nail specimens possibly due to the presence PCR inhibitor.

Keywords: DNA extraction / Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol

บทนำ

ปัจจุบันเทคนิคชีววิทยาโมเลกุลมีบทบาทอย่างมากในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ โดยเฉพาะการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล เพื่อช่วยยืนยันผู้กระทำผิดในกระบวนการยุติธรรม หรือกรณีบุคคลสูญหาย [1] วัตถุพยานของผู้กระทำผิดหรือผู้ต้องสงสัยที่มีชีวิตมักตรวจจากเลือด ส่วนวัตถุพยานในที่เกิดเหตุอาจเป็นคราบน้ำลายหากมีเครื่องดื่มเข้ามาเกี่ยวข้อง ผลการตรวจบุคคลผู้ต้องสงสัยกับผลวัตถุพยานถ้าตรงกันก็จะทำให้ทราบผู้กระทำผิดที่แท้จริง สำหรับกรณีบุคคลสูญหายที่เสียชีวิตอาจเกิดจากฆาตกรรม หรือภัยธรรมชาติ การพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลจากผู้เสียชีวิตสามารถตรวจหา DNA จากเส้นผมหรือเล็บได้ เนื่องจากเนื้อเยื่ออื่น ๆ อาจเน่าเปื่อยไปตามกาลเวลา แต่ผม เล็บ และกระดูกยังสามารถคงสภาพอยู่ได้นานกว่า อย่างไรก็ตามการสกัด DNA จากน้ำลายและเล็บยังมีผู้ศึกษาน้อยถึงแม้มีประโยชน์ในการประยุกต์ใช้จริงได้มากก็ตาม การทดสอบคุณภาพของ DNA ใช้ Primer ที่จำเพาะกับ Human growth hormone (HGH) gene ทำปฏิกิริยา PCR เพราะจะได้ทราบว่าเป็น DNA ของคน นอกจากนี้น้ำยา Commercial kit ต่าง ๆ ที่ใช้ในการตรวจเนื้อเยื่อเพื่อการปลูกถ่ายอวัยวะ นิยมใช้ HGH เป็น Internal positive control เพื่อทดสอบ PCR condition ด้วยเหตุผลที่ว่า HGH เป็น Non-polymorphic target พบเป็น Single copy gene ทั้ง 2 Haplotype ในการศึกษานี้เห็นด้วย จึงได้ใช้ HGH primer ทดสอบคุณภาพของ DNA โดย PCR

การสกัดดีเอ็นเอจากน้ำลายอาจใช้วิธี Chelex หรือ Phenol/Chloroform [2], QIAamp [3], Commercial kit อื่น ๆ [4] ส่วนเล็บอาจใช้วิธี Phenol/Chloroform [5] หรือ Commercial kit จาก Promega หรือ QIAGEN [6] การใช้คนละวิธีสกัดดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจที่มีความหลากหลายโดยวิธีการ น้ำยาและเครื่องมือต่างกัน สร้างความยุ่งยากแก่ผู้ปฏิบัติงาน วิธี Phenol/Chloroform ถือว่าเป็น Gold standard สำหรับการสกัดดีเอ็นเอจาก Forensic sample การลดปริมาตรน้ำยาจะช่วยลดอันตรายจากพิษของ Phenol

การสกัด DNA สามารถทำได้ทั้งวิธี Manual และ Automate เนื่องจากสิ่งส่งตรวจทางด้าน Forensic มีความหลากหลายด้านคุณลักษณะและธรรมชาติของตัวอย่างมาก ด้วยเหตุนี้วิธี Automate จึงไม่เหมาะในทางปฏิบัติ อย่างไรก็ตามวิธี Manual ต้องอาศัยเครื่องมือและความชำนาญของผู้ปฏิบัติงาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในขั้นตอนของการย่อย Cell membrane และ Nuclear membrane เพื่อปลดปล่อยดีเอ็นเอออกมาแล้วจึงสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากโปรตีนอื่น ๆ

วิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วย Phenol/Chloroform และ Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol เป็นวิธี Manual ที่มีราคาถูกและให้ปริมาณดีเอ็นเอเพียงพอในตัวอย่างหลากหลาย โดยมีหลักการในการแยกดีเอ็นเอออกจากโปรตีนและ Impurity อื่น ๆ ด้วย

ด้วยน้ำยา Organic solvent และการปั่นเหวี่ยง ภายหลังปั่นเหวี่ยง โปรตีนจะอยู่ในชั้น Phenol ส่วนดีเอ็นเอจะอยู่ในชั้น Aqueous วิธีดังกล่าวเป็นวิธีที่ง่ายและราคาถูก [7-11] แต่มีข้อเสียสำคัญเนื่องจาก Phenol และ Chloroform ในชุดน้ำยาสำหรับสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป ซึ่งเป็นสารพิษและสารก่อมะเร็งที่มีอันตราย

ในปัจจุบันชุดน้ำยาสำหรับสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปมีให้เลือกใช้หลายยี่ห้อและสามารถช่วยลดภาระงานของผู้ปฏิบัติในกระบวนการเตรียมน้ำยาได้อย่างยิ่ง อย่างไรก็ตาม หลักการสกัดดีเอ็นเอของน้ำยาแต่ละยี่ห้อแตกต่างกัน เช่น Chelex (Biorad ใช้หลักการ Cheleting resin), QIAamp (Qiagen ใช้หลักการ Silica membrane and fast-spin column), DNA IQ™ (Promega ใช้หลักการ Paramagnetic resin) แต่มีข้อเสียร่วมกัน คือมีราคาแพง ในการศึกษานี้จึงทำการศึกษาประสิทธิภาพของวิธี Phenol/Chloroform/ Isoamyl alcohol ในการสกัด DNA จากน้ำลายและเล็บจากคนปกติมีชีวิต ไม่ได้เอาจากผู้เสียชีวิต เพราะถูกจำกัดด้วยช่วงเวลาการศึกษาวิจัย โดยวิธี Microtechnique เพื่อประเมินหาสภาวะที่เหมาะสมให้ได้ดีเอ็นเอที่มีปริมาณและคุณภาพดีพอสำหรับนำไปใช้พิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลได้ นอกจากนี้ได้เปรียบเทียบปริมาณและคุณภาพของ DNA ระหว่างเพศหญิงและชาย รวมทั้งการเปรียบเทียบระหว่างช่วงอายุ เพราะเคยมีรายงานเพศและอายุมีผลต่อปริมาณและคุณภาพของ DNA ที่สกัดจากเลือดและเส้นผม

วัสดุและวิธีการ

อาสาสมัครที่มีสุขภาพแข็งแรงจำนวน 30 ราย ชาย 15 ราย หญิง 15 ราย อายุ 18-25 ปี, 26-50 ปี และมากกว่า 50 ปี ช่วงอายุละ 5 คน ทุกคนได้รับฟังคำบอกกล่าวเกี่ยวกับโครงการศึกษาวิจัยสกัดดีเอ็นเอจากน้ำลายและเล็บ และยินยอมลงนามเข้าร่วมศึกษาวิจัยโดยสมัครใจในแบบฟอร์ม (Informed consent form) ที่เตรียมไว้ บันทึกอายุ เพศ เก็บตัวอย่างน้ำลายคนละ 1-2 ml (บ้วนปากก่อนเก็บ) ใส่ในภาชนะฝาปิด และตัดเล็บนิ้วมือ 10 นิ้วห่อด้วยกระดาษชั่งสาร Label แล้วเก็บในซองพลาสติก Zip bag

การวิจัยนี้ได้รับการรับรองโดยคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน จากคณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล เลขที่ COA. MURA2019/910 Ref.194 ลงวันที่ 8 กันยายน 2563

การเตรียมตัวอย่างน้ำลาย

เตรียมตัวอย่างน้ำลายหลังเก็บภายใน 1 ชั่วโมง ใช้ Autopipette ดูดน้ำลายใส่ใน Microtube 2 หลอด ๆ ละ 100 ไมโครลิตร จุ่มด้านหนึ่งของก้านสำลี (Cotton bud) ลงใน Microtube หลอดแรก ดูดซับน้ำลายให้หมด แล้วจุ่มอีกด้านหนึ่งของก้านสำลีอันเดิมลงในหลอดที่ 2 ดูดซับน้ำลายจนหมด ปล่อย ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องภายในตู้ Biohazard

cabinet แล้วเก็บ Cotton bud ที่มีคราบน้ำลายในถุงพลาสติก Zip bag นำไปไว้ในตู้แช่แข็ง -20°C

การสกัด DNA จากน้ำลายโดยวิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol

ใช้กรรไกรตัดก้าน Cotton swab ที่มีคราบน้ำลายด้านหนึ่งใส่ลงใน Microtube อีกด้านเก็บใน Zib bag ที่ -20°C ใช้เข็มเขี่ยสำลีที่อยู่ในหลอดออกจากก้าน ใส่ Normal saline solution มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที Vortex เป็นครั้งคราว ใช้ Pipette tip เขี่ยเอาสำลีออก นำหลอดปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ดูด Supernatant ทิ้ง ใส่ 0.2 M Na-Acetate 500 ไมโครลิตร, 10% SDS 25 ไมโครลิตร, Proteinase K (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 30 ไมโครลิตร, Vortex 20 วินาที แล้วนำไป Incubate ที่ 37°C นาน 3 ชั่วโมง (Vortex เป็นครั้งคราว) Spin down แล้วใส่ Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (25:24:1, v/v/v) 250 ไมโครลิตร Vortex 20 วินาที นำไปปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ดูด Aqueous phase ชั้นบน ใส่ Microtube หลอดใหม่ ใส่ phenol/chloroform/Isoamyl alcohol 250 ไมโครลิตร ทำซ้ำอีกครั้งหนึ่ง ดูด Aqueous phase ชั้นบนใส่ Microtube หลอดใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย Absolute ethanol 1 มิลลิลิตร และ Glycogen (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 1 ไมโครลิตร ปิดจุก Invert แล้วนำไปวางในตู้แช่แข็ง -20°C นาน 3 ชั่วโมง แล้วปั่นด้วย Refrigerated centrifuge 4°C ที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ดูด Supernatant ทิ้ง ใส่ 70% Ethanol 1 มิลลิลิตร ปั่นล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที ดูด Supernatant ทิ้ง คว่ำหลอดแล้วหงายผึ่งลมให้แห้งหมาด ๆ ละลายดีเอ็นเอใน DNase free water 30 ไมโครลิตร นำไปบ่มใน Waterbath 55°C นาน 10 นาทีเพื่อช่วยละลายดีเอ็นเอ แล้ววัดดีเอ็นเอด้วยเครื่อง NanoDrop เก็บดีเอ็นเอที่ -20°C

การสกัด DNA จากเล็บโดยวิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol[7]

นำเล็บออกมา 2-3 ชิ้นใส่ในหลอด 15 มิลลิลิตร ล้างด้วยน้ำเกลือ (Sterile) 5 มิลลิลิตร เขย่าแล้วดูดน้ำเกลือทิ้ง 3 ครั้ง เอา Forceps คีบเล็บแล้วใช้กรรไกรตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ลงบนกระดาษชั่งสารซึ่งวางอยู่บน Petri dish (Sterile) เทเล็บใส่ใน Microtube นำไปชั่ง (น้ำหนัก Tube+เล็บ ลบด้วยน้ำหนัก Tube = น้ำหนักเล็บ ประมาณ 20-40 มิลลิกรัม) ใส่ 1X Lysis buffer* 0.5-0.75 มิลลิลิตร ให้ท่วมเล็บและใส่ Proteinase K (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 40 ไมโครลิตร Vortex นำไปบ่มใน Water bath 37°C นาน 2 ชั่วโมง Spin down เติม Proteinase K 20 ไมโครลิตร Vortex แล้วบ่มต่อที่ 37°C นาน 3 ชั่วโมง Spin down สกัดดีเอ็นเอโดยใส่ Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (25:24:1, v/v/v) 300 ไมโครลิตร Vortex 20 วินาที ปั่น 12,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ดูด Aqueous

phase ชั้นบนใส่ในหลอดใหม่ สกัดซ้ำอีกครั้ง แล้วใส่ Chloroform/Isoamyl alcohol (24:1, v/v) 300 ไมโครลิตร Vortex 20 วินาที ปั่น 12,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ดูด aqueous phase ชั้นบน (~300 ไมโครลิตร) ใส่ในหลอดใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติม 3M Na-acetate, pH 7.5 (1/10 Volume) 30 ไมโครลิตร, Absolute ethanol (2.5 volume) 800 ไมโครลิตร และ Glycogen (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 1 ไมโครลิตร ปิดจุก Invert แล้วนำไปวางในตู้แช่แข็ง -20°C อย่างน้อย 3 ชั่วโมง ปั่นด้วย Refrigerated centrifuge 4°C ที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ดูด Supernatant ทิ้ง ใส่ 70% Ethanol 1 มิลลิลิตร ปั่นล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ดูด Supernatant ทิ้ง คว่ำหลอดแล้วหงายผึ่งลมให้แห้งหมาด ๆ ละลายดีเอ็นเอใน DNAse-free water 30 ไมโครลิตร นำไปบ่มใน Waterbath 55°C นาน 10 นาที เพื่อช่วยละลายดีเอ็นเอ แล้ววัดดีเอ็นเอด้วยเครื่อง NanoDrop เก็บดีเอ็นเอที่ -20°C

*1X Lysis buffer ประกอบด้วย 2% SDS, 100 mM NaCl, 40 mM DTT, 10 mM Tris pH 7.5, 10 mM Na2EDTA pH 8.0

ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ

1. โดยเครื่องนาโนดร็อปสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Nanodrop Spectrophotometer)

ดีเอ็นเอที่สกัดได้ 1 ไมโครลิตร วัดปริมาณ ความบริสุทธิ์ของ DNA (A260/280) รวมทั้งการปนเปื้อน (A260/230) ด้วยเครื่องนาโนดร็อป 3 ครั้ง หาค่าเฉลี่ย บันทึกข้อมูลในคอมพิวเตอร์ ด้วยโปรแกรม Microsoft Excel

2. โดยโพลีเมอเรสเชนรีแอคชั่น (พีซีอาร์)

ดีเอ็นเอที่สกัดได้ 1 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ใน MasterMix 12 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยชุดน้ำยา Perfect*Taq*™ Plus MasterMix (5 Prime, Germany) และ Primer สำหรับ Human growth hormone (HGH-S และ HGH-AS จาก 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'

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

3. การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

รายงานค่าปริมาณ ความบริสุทธิ์ (A260/280) และการปนเปื้อน (A260/230) ของดีเอ็นเอที่สกัดจากน้ำลายและเล็บโดย Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol ที่อ่านจากเครื่อง Nanodrop (ค่า Mean, Minimum, Maximum, และ S.D.) และการปรากฏ PCR product ใน Agarose gel electrophoresis

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอกับเพศ และอายุ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป IBM SPSS Version 25 ค่า P-value น้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีความสำคัญทางสถิติ

ผลการศึกษา

ผลการเปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดจากน้ำลาย 100 ไมโครลิตรและเล็บ 10-50 มิลลิกรัม (เฉลี่ย 39.5 มิลลิกรัม) โดยวิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol แสดงผลดังตารางที่ 1 พบว่าน้ำลาย 100 ไมโครลิตร ได้ปริมาณดีเอ็นเอเฉลี่ย 264.7 ± 132.9 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ในปริมาตร 30 ไมโครลิตร (ช่วงระหว่าง 41.6 - 645.7 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) ส่วนใหญ่มีดีเอ็นเอมากกว่า 200 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (19 ใน 30 รายหรือ 63.3%) ขณะที่เล็บ 10-50 มิลลิกรัม ได้ปริมาณดีเอ็นเอเฉลี่ย 115.3 ± 69.2 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ในปริมาตร 30 ไมโครลิตร (ช่วงระหว่าง 34.5 – 365.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) ส่วนใหญ่มีดีเอ็นเอ 50-100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (15 ใน 30 รายหรือ 50%) รายที่มีดีเอ็นเอน้อยกว่า 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรพบในตัวอย่างน้ำลาย 1 ราย (3.3%) และเล็บ 2 ราย (6.7%) ปริมาณดีเอ็นเอ (yield) ที่ได้จากน้ำลาย 100 ไมโครลิตร เท่ากับ 7.94 ไมโครกรัม ส่วนเล็บ 40 มิลลิกรัมได้ดีเอ็นเอ 3.46 ไมโครกรัม ปริมาณดีเอ็นเอจากน้ำลาย 100 ไมโครลิตร สูงกว่าเล็บ 40 มิลลิกรัม อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.0001$)

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดจากน้ำลาย 100 µl และเล็บ 10-50 mg โดยวิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol

ปริมาณดีเอ็นเอ ที่สกัดได้ใน 30 µl	จำนวนราย (%)		P value
	น้ำลาย 100 µl	เล็บ 10-50 mg	
< 50 ng/µl	1 (3.3%)	2 (6.7%)	NS
50 - 100 ng/µl	2 (6.7%)	15 (50.0%)	< 0.0001
101 - 200 ng/µl	8 (26.7%)	11 (36.6%)	NS
> 200 ng/µl	19 (63.3%)	2 (6.7%)	< 0.0001
Mean ± S.D. (ng/µl)	264.7 ± 132.9	115.3 ± 69.2	
Range (ng/µl)	41.6 - 645.7	34.5 - 365.5	
Yield (µg)	7.94	3.46	

NS = not significant

ผลการเปรียบเทียบความบริสุทธิ์ (A260/280) และการปนเปื้อน (A260/230) ของดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol ดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่าค่าเฉลี่ย A260/280 ของน้ำลายเท่ากับ 1.43 ± 0.11 (ช่วงระหว่าง 1.20 – 1.64) ส่วนค่าเฉลี่ย A260/280 ของเล็บเท่ากับ 1.54 ± 0.21 (ช่วงระหว่าง 1.09 – 1.81) ค่า A260/280 > 1.5 พบในเล็บ 19 ราย (63.3%) แต่พบในน้ำลาย 9 ราย (30.0%) เมื่อเปรียบเทียบรายที่มีค่า A260/280 > 1.5 พบว่าเล็บมีความบริสุทธิ์ของ DNA สูงกว่าน้ำลายอย่างมีนัยสำคัญ (P = 0.0048)

การปนเปื้อนของดีเอ็นเอวัดจากค่า A260/230 ควรมีค่ามากกว่า 2 ในการศึกษานี้พบว่าดีเอ็นเอจากน้ำลายมีค่าเฉลี่ย A260/230 เท่ากับ 1.70 ± 0.22 (ช่วงระหว่าง 1.15 – 2.14) ส่วนเล็บมีค่าเฉลี่ย A260/230 เท่ากับ 1.21 ± 0.27 (ช่วงระหว่าง 0.67 -1.71) ทั้งน้ำลายและเล็บมีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอจาก Organic solvent (Phenol) เมื่อเปรียบเทียบจำนวนดีเอ็นเอที่มีการปนเปื้อนพบว่าเล็บมีจำนวนการปนเปื้อนของดีเอ็นเอสูงกว่าน้ำลายอย่างมีนัยสำคัญ (P < 0.0001)

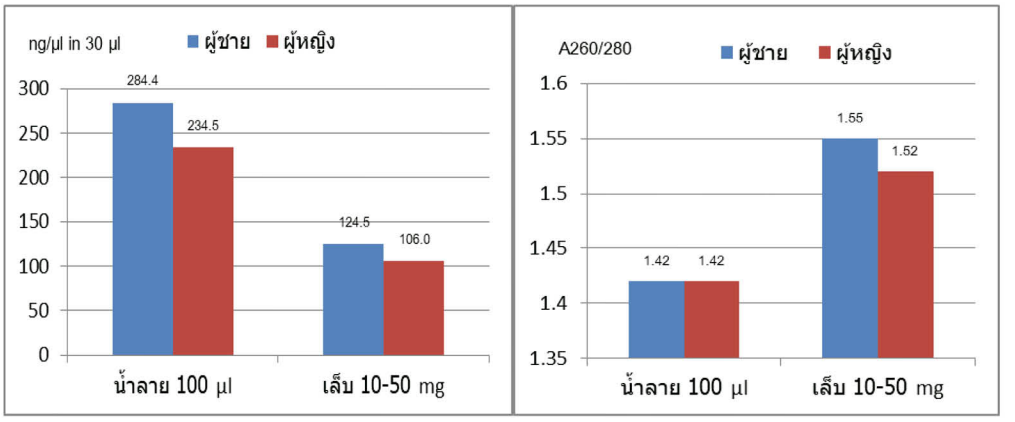
ตารางที่ 2 เปรียบเทียบความบริสุทธิ์และการปนเปื้อนของดีเอ็นเอที่ได้จากน้ำลายและเล็บที่สกัดด้วย Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol

ค่าความบริสุทธิ์ (A260/280)	จำนวนราย (%)		P value
	น้ำลาย 100 µl	เล็บ 10-50 mg	
≤ 1.40	11 (36.7%)	6 (20.0%)	NS
1.41 - 1.50	10 (33.3%)	5 (16.7%)	NS
> 1.50	9 (30.0%)	19 (63.3%)	0.0048
Mean ± S.D	1.43 ± 0.11	1.54 ± 0.21	
ค่าการปนเปื้อน (A260/230)	**จำนวนราย (%)**		**P value**
	น้ำลาย 100 µl	**เล็บ 10-50 mg**	
≤ 1.40	4 (14.3%)	21 (75%)	< 0.0001
1.41 - 1.60	4 (14.3%)	6 (21.4%)	NS
> 1.60	20 (71.4%)	1 (3.6%)	< 0.0001
Mean ± S.D	1.70 ± 0.22	1.21 ± 0.27	

NS = not significant

ผลการเปรียบเทียบปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดจากน้ำลาย 100 µl และเล็บ 10-50 mg ของผู้ชายและผู้หญิงแสดงในภาพที่ 1 พบว่าผู้ชายได้ปริมาณดีเอ็นเอสูงกว่าผู้หญิงเล็กน้อยทั้งจากน้ำลายและเล็บประมาณ 1.2 เท่า คือ น้ำลายของผู้ชายได้ดีเอ็นเอเฉลี่ย 284.4 ng/µl ขณะที่น้ำลายของผู้หญิงได้ดีเอ็นเอเฉลี่ย 234.5 ng/µl ส่วนเล็บของผู้ชายได้ ดีเอ็นเอเฉลี่ย 124.5 ng/µl และเล็บของผู้หญิงได้ดีเอ็นเอเฉลี่ย 106.0 ng/µl เมื่อเปรียบเทียบจำนวนผู้ชายและผู้หญิงในกลุ่มที่มีปริมาณดีเอ็นเอน้อยกว่า 50 ng/µl และในกลุ่มที่มีดีเอ็นเอมากกว่า 50 ng/µl ไม่พบความแตกต่างระหว่างผู้ชายและผู้หญิงกับปริมาณดีเอ็นเอทั้งจากน้ำลายและเล็บ

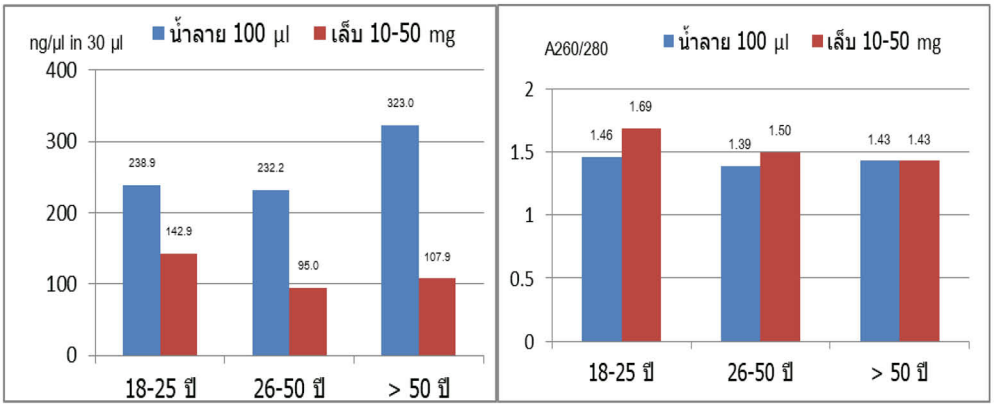
สำหรับความบริสุทธิ์ของ DNA พบว่าค่าเฉลี่ย A260/280 ของดีเอ็นเอจากน้ำลายของผู้ชายและผู้หญิงไม่แตกต่างกันคือ 1.42 ส่วนค่าเฉลี่ย A260/280 ของดีเอ็นเอจากเล็บของผู้ชายสูงกว่าผู้หญิงเล็กน้อยคือ ค่าเฉลี่ย A260/280 ของดีเอ็นเอจากเล็บของผู้ชายเท่ากับ 1.55 ส่วนของผู้หญิงเท่ากับ 1.52 เมื่อเปรียบเทียบจำนวนผู้ชายและผู้หญิงในกลุ่มที่มีค่า A260/280 น้อยกว่า 1.5 และในกลุ่มที่มีค่า A260/280 มากกว่า 1.5 ไม่พบความแตกต่างระหว่างผู้ชายและผู้หญิงกับความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอทั้งจากน้ำลายและเล็บ



ภาพที่ 1 เปรียบเทียบปริมาณและความบริสุทธิ์ของ DNA ที่สกัดจากน้ำลายและเล็บของผู้ชายและผู้หญิง

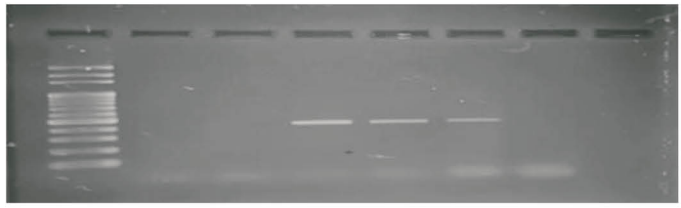
ผลการเปรียบเทียบปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดจากน้ำลายและเล็บของคนที่มีอายุต่าง ๆ กันแสดงในภาพที่ 2 พบว่าน้ำลายของคนอายุมากกว่า 50 ปีได้ปริมาณดีเอ็นเอ มากกว่าคนอายุน้อย 1.3 เท่า ค่าเฉลี่ยของดีเอ็นเอจากน้ำลายของคนอายุมากกว่า 50 ปี เท่ากับ 323.0 ng/µl ขณะที่ค่าเฉลี่ยดีเอ็นเอจากน้ำลายของคนอายุ 18-25 ปีเท่ากับ 238.9 ng/µl ซึ่งแตกต่างจากเล็บคือเล็บของคนอายุน้อยได้ปริมาณดีเอ็นเอมากกว่าเล็บของคนอายุมาก 1.3 เท่า ค่าเฉลี่ยของดีเอ็นเอจากเล็บของคนอายุ 18-25 ปี เท่ากับ 142.9 ng/µl ขณะที่ค่าเฉลี่ยของดีเอ็นเอจากเล็บของคนอายุมากกว่า 50 ปีเท่ากับ 107.9 ng/µl เมื่อเปรียบเทียบจำนวนคนในกลุ่มที่มีปริมาณดีเอ็นเอน้อยกว่า 50 ng/µl และในกลุ่มที่มีดีเอ็นเอมากกว่า 50 ng/µl ไม่พบความแตกต่างระหว่างอายุทั้งดีเอ็นเอจากน้ำลายและเล็บ

สำหรับความบริสุทธิ์ของ DNA ทั้งน้ำลายและเล็บของคนอายุน้อยมีค่า A260/280 สูงกว่าคนอายุมาก คือในกลุ่มคนอายุ 18-25 ปี ค่าเฉลี่ย A260/280 ของน้ำลายเท่ากับ 1.46 ขณะที่ค่าเฉลี่ย A260/280 ของเล็บเท่ากับ 1.69



ภาพที่ 2 เปรียบเทียบปริมาณและความบริสุทธิ์ของ DNA ที่สกัดจากน้ำลายและเล็บช่วงอายุต่าง ๆ

จากการตรวจดีเอ็นเอจากน้ำลายและเล็บโดยทำปฏิกิริยา PCR ใช้ Primer ที่จำเพาะกับ Human growth hormone แล้ว Run agarose gel electrophoresis (ภาพที่ 3) พบว่ารายที่ดีเอ็นเอน้อยกว่า 50 ng/µl ให้ band จาง ส่วนดีเอ็นเอที่ค่า A260/280 ต่ำกว่า 1.5 มักไม่ปรากฏ PCR product ที่ 434 bp (lane ที่ 1 และ 2) นอกจากนี้ยังพบว่าดีเอ็นเอจากเล็บบางรายที่ผลความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ที่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ด้วยเครื่อง Nanodrop แต่ไม่สามารถทำปฏิกิริยา PCR โดยตรวจไม่พบ band ขนาด 434 bp (lane ที่ 6: DNA จากเล็บ 279.2 ng/µl, A260/280 = 1.78)



	1	2	3	4	5	6
MW Marker	SS23	SS16	SS18	N1	N2	N7
DNA, ng/µl	91.5	198.1	307.5	71.8	151.1	279.2
A260/A280	1.35	1.44	1.56	1.75	1.81	1.78
PCR, 434 bp	Absent	Absent	Present	Present	Present	Absent

ภาพที่ 3 PCR product บน Agarose gel electrophoresis

วิจารณ์และสรุป

การศึกษานี้พบว่าวิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol ใช้สกัดดีเอ็นเอจากน้ำลาย 100 µl ได้ดีเอ็นเอเฉลี่ย 264.7 ± 132.9 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ในปริมาตร 30 ไมโครลิตร (Yield 7.94 ไมโครกรัม) ซึ่งเพียงพอต่อการนำไปใช้พิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล อย่างไรก็ตามความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (A260/280) จากน้ำลายเฉลี่ย 1.43 (ช่วงระหว่าง 1.20 – 1.64) อาจมีปัญหาในการนำไปใช้เทคนิค PCR ในรายที่มีค่า A260/280 น้อยกว่า 1.5 ซึ่งด้วยกว่าคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากการใช้น้ำยาสำเร็จรูปอื่นๆแต่มีค่าใช้จ่ายที่ถูกกว่ามาก [2-4]

สำหรับการสกัดดีเอ็นเอจากเล็บโดยวิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol ในการศึกษานี้พบว่าเล็บ 40 มิลลิกรัม ได้ดีเอ็นเอ 115.3 ± 69.2 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ในปริมาตร 30 ไมโครลิตร (Yield 3.46 ไมโครกรัม) ซึ่งเพียงพอต่อการนำไปใช้พิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล ส่วนความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (A260/280) ของเล็บเฉลี่ย 1.54 ± 0.21 (ช่วงระหว่าง 1.09 – 1.81) จึงอาจมีปัญหาในการนำไปใช้เทคนิค PCR ในรายที่มีค่า A260/280 น้อยกว่า 1.5 เช่นเดียวกับน้ำลาย คุณภาพของดีเอ็นเอในการศึกษานี้น้อยกว่าการศึกษาที่ใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป [5,6] อาจเนื่องจากวิธี Phenol/Chloroform ต้องอาศัยทักษะ ประสบการณ์ และความชำนาญของผู้ปฏิบัติมากกว่าการใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป แนวทางการปรับปรุง ต้องระมัดระวังการดูดชั้น Aqueous phase หลังปั่นแยกชั้นสกัดดีเอ็นเอด้วย Phenol/Chloroform ไม่ให้ปนเปื้อน Organic phase ซึ่งเป็น Protein และ Impurity อื่น ๆ

สิ่งส่งตรวจที่มาจาก Keratinous tissue เช่น ผมและเล็บ อาจพบปัญหา PCR inhibitor ทำให้มีอัตราสำเร็จในการนำสิ่งส่งตรวจดังกล่าวมาใช้ตรวจเอกลักษณ์บุคคลโดย PCR น้อย [12] เช่นเดียวกับการศึกษาครั้งนี้ก็พบเช่นกัน (ภาพที่ 1) ดีเอ็นเอจากเล็บที่วัดปริมาณและความบริสุทธิ์ยอมรับได้ด้วยเครื่อง Nanodrop Spectrophotometer แต่ไม่สามารถให้ PCR product ดังนั้นจึงขอแนะนำว่าการศึกษาวิธีสกัดดีเอ็นเอควรตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเครื่อง Nanodrop Spectrophotometer และ PCR ควบคู่กัน การแก้ปัญหาเรื่อง PCR inhibitor ถ้าเป็นไปได้อาจต้องหลีกเลี่ยงใช้สิ่งส่งตรวจอื่นแทน หรือถ้าไม่สามารถหาวัตถุพยานอื่นอาจต้องหาวิธีการอื่นในการสกัดดีเอ็นเอ

ในการศึกษาครั้งนี้น้ำลายของผู้ชายให้ปริมาณดีเอ็นเอมากกว่าผู้หญิง 1.2 เท่า คล้ายคลึงกับผลการสกัด DNA จากเลือด [10] และเส้นผม [11] นอกจากนี้ผลจากการศึกษาพบน้ำลายของคนอายุมากกว่า 50 ปีได้ปริมาณดีเอ็นเอ มากกว่าคนอายุน้อย (18-25 ปี) ปัจจัยด้านอายุไม่มีผลต่อปริมาณและความบริสุทธิ์ของ DNA ที่สกัดได้จากตัวอย่างเล็บและน้ำลาย

ผลจากการศึกษาทั้งหมดจึงสรุปได้ว่าวิธีฟีนอลคลอโรฟอร์มไอโซเอมิลแอลกอฮอล์สามารถนำมาใช้สกัดดีเอ็นเอจากน้ำลายและเล็บได้ แต่ควรพิจารณาตามคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้รายตัวอย่าง อย่างไรก็ตามการประยุกต์ใช้เทคนิคดังกล่าวกับตัวอย่างเล็บอาจมีข้อจำกัดที่มากกว่าเนื่องจากปัญหาของ PCR inhibitor

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้งบประมาณสนับสนุนจากภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

เอกสารอ้างอิง

1. Seubwai W, Khunkitti W. Application of molecular biology techniques on forensic sciences. Srinagarind Med J 2014;29:321-6.
2. Sweet D, Lorent M, Valenzuela A, Lorent JA, Alvarez JC. Increasing DNA extraction yield from saliva stains with a modified Chelex method. Forensic Sci Int 1996;83:167-77.
3. Ng DPK, Koh D, Choo SGL, Ng V, Fu Q. Effect of storage conditions on the extraction of PCR-quality genomic DNA from saliva. Clinica Chimica Acta 2004;343:191-4.
4. Looi ML, Zakaria H, Osman J, Jamal R. Quantity and quality assessment of DNA extracted from saliva and blood. Clin Lab 2012; 58:307-12.
5. Piccinini A, Cucurachi N, Betti F, Capra M, Coco S, D'Avila F, et al. Forensic DNA typing of human nails at various stages of decomposition. Int Congr Ser 2006;1288;586-8.
6. Bozzo WR, Colussi AG, Ortiz MI, Laborde L, Pilili J, Carini G, et al. Analysis of DNA from fingernail samples in criminal cases. Forensic Sci Int Genet Suppl Ser 2015;5:e601-2.
7. 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.
8. 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.

9. 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.
10. กาญจนา สุจิรชาโต, ปิยะ วงศ์ญาณิน, มณีรัตน์ ปัสสะ, ศุภาวรรณ เพชรโต, ภัทรภณ หมั่นกิจ, วิชาญ เปี้ยวนิ่ม. ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณ DNA ที่สกัดจากเลือดของผู้เสียชีวิต โดยวิธี Salting-out กับวิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol. วารสารก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์ 2563;20:134-51.
11. Sujirachato K, Tirawatnapong S, Mimae N, Inon S, Kaewdouengdee A, Worasuwannarak W. The study of the yield of DNA extracted from hairs of postmortem cases. Rama Med J 2020;43:9-18.
12. Bengtsson CF, Olsen ME, Brandt LO, Bertelsen MF, Willerslev E, Tobin DJ, et al. DNA from keratinous tissue, part I: hair and nail. Ann Anat 2012;194:17-25.