

การระบุเนื้อเยื่อสมองโดยใช้ซีพีจีเอ็มทีเลชันตำแหน่งจำเพาะ

ว่าที่ร้อยตำรวจเอกหญิงจรูญญา สามสุวรรณ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
ปีการศึกษา 2556

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

BRAIN TISSUE IDENTIFICATION BY SITE-SPECIFIC CpG METHYLATION

Acting Police Captain Jarunya Samsuwan



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Genetics

Department of Botany

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การระบุเนื้อเยื่อสมองโดยใช้ซีพีจีเอ็มทีเลขตำแหน่งจำเพาะ
โดย	ว่าที่ร้อยตำรวจเอกหญิงจรูญญา สามสุวรรณ
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศน์ย์จิต
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร.อภิวัฒน์ มุทิรางกูร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ต่อศักดิ์ สีลานันท์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศน์ย์จิต)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร.อภิวัฒน์ มุทิรางกูร)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนิกร ธรรมโชติ)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร.นครินทร์ กิจกำธร)

จรรยา สามสุวรรณ : การระบุเนื้อเยื่อสมองโดยใช้ซีพีจีเมทิลเลชันตำแหน่งจำเพาะ.
(BRAIN TISSUE IDENTIFICATION BY SITE-SPECIFIC CpG METHYLATION) อ.ที่
ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต, อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม:
ศ. นพ. ดร.อภิวัฒน์ มุทิรากร, 107 หน้า.

ดีเอ็นเอเมทิลเลชันคือหนึ่งในพันธุศาสตร์ด้านกระบวนการเหนือพันธุกรรม เกิดขึ้นในตำแหน่งที่เป็นซีพีจีไดนิวคลีโอไทด์ พบกระจายอยู่ทั่วทั้งจีโนมมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนแปลงชนิดของเซลล์เพื่อการทำหน้าที่เฉพาะ เป็นผลให้ดีเอ็นเอเมทิลเลชันมีความแตกต่างกันในแต่ละเนื้อเยื่อหรืออวัยวะ ดังนั้นจึงมีการศึกษาหาตำแหน่งซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะต่ออวัยวะที่สำคัญต่อการมีชีวิต โดยมีความมุ่งหวังเพื่อใช้ซีพีจีเมทิลเลชันตำแหน่งจำเพาะนั้นในการระบุเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่เป็นวัตถุพยานจากสถานที่เกิดเหตุ ด้วยเหตุผลคือ นอกจากดีเอ็นเอเมทิลเลชันจะมีความจำเพาะแล้วยังมีความเสถียรสามารถตรวจได้แม้ในวัตถุพยานที่เสื่อมสภาพ โดยผลการตรวจสอบจะเป็นประโยชน์ต่อการสืบสวนสอบสวน ซึ่งงานวิจัยนี้ได้รับริเริ่มทำในหนึ่งในอวัยวะที่สำคัญต่อการมีชีวิตนั่นคือ สมอง โดยค้นหาจากฐานข้อมูลดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่รวบรวมงานทดลองในรูปเมทิลเลชันไมโครแอรเรย์ จำนวน 39 การทดลอง มีตำแหน่งซีพีจีเมทิลเลชันจำนวน 27,578 ตำแหน่ง คัดเลือกได้ตำแหน่ง cg02096975 ยีน *EML2* ที่แสดงความจำเพาะต่อสมองเพื่อใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอเมทิลเลชันสำหรับระบุเนื้อเยื่อสมองในงานวิจัยนี้ ใช้เทคนิค COBRA ในการตรวจวิเคราะห์ โดยทำในเนื้อเยื่อสมองเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อชนิดอื่นอีก 17 ชนิด ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าที่ตำแหน่งดังกล่าวมีเพียงดีเอ็นเอจากสมองเท่านั้นที่แสดงค่าเป็นเมทิลเลชัน แต่ในอวัยวะอื่นแสดงผลไม่เป็นเมทิลเลชัน ทำให้เครื่องหมายดีเอ็นเอตำแหน่งนี้มีความแม่นยำในการระบุเนื้อเยื่อสมอง 100 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังทำการทดลองเพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของเทคนิค COBRA ต่อการระบุเนื้อเยื่อสมองในตัวอย่างที่มีสภาพต่างๆ กัน เพื่อเทียบเคียงกับตัวอย่างที่พบในสถานที่เกิดเหตุ และผลที่ได้จากการทดลองพบว่า COBRA เป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะและความไวสูง และมีขั้นตอนการทำที่รวดเร็ว สามารถตรวจสอบได้แม้ในวัตถุพยานที่เสื่อมสภาพ ซึ่งผลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะเป็ประโยชน์ต่อการนำไปปรับใช้กับงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์

ภาควิชา พฤษศาสตร์

ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา พันธุศาสตร์

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ปีการศึกษา 2556

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

5571932423 : MAJOR GENETICS

KEYWORDS: 1 / DNA METHYLATION SITE SPECIFIC CPG METHYLATION COBRA
TECHNIQUE

JARUNYA SAMSUWAN: BRAIN TISSUE IDENTIFICATION BY SITE-SPECIFIC CpG METHYLATION. ADVISOR: ASST. PROF. PATTAMAWADEE YANATATSANEEJIT, Ph.D., CO-ADVISOR: PROF. APIWAT MUTIRANGURA, Ph.D., 107 pp.

DNA methylation is a major epigenetic modification which commonly occurs at the CpG nucleotide repeats along the whole genome, and it is also responsible for organ development and cellular differentiation. Generally, each CpG site possesses a different methylation status in different tissues. Many researches had been done on the CpG nucleotide to find the specific marker to identify each organ of the human body, since being able to use the CpG methylation profile to identify the tissues at the crime scene could be a break through for the case. Another reason for using the CpG methylation is because it is very stable and able to work with degraded samples. This study will be focused on identifying brain tissue within the sample that indicated the death of the owner. By scanning 39 experimental methylation array databases 27,578 CpG positions, we found that the cg03096975 position of *EML2* was strikingly methylated in the brain tissue. The result was validated using by the COBRA technique, comparing the CpG methylation profile between brain tissue and other 17 organs. The CpG site was methylated in the brain tissue, while non-methylated in the other 17 tissues. The results clearly demonstrated that this marker can distinguish brain tissue from other organs with 100% accuracy, high sensitivity, and fast. This is the first application used CpG methylation (cg03096965 of *EML2*) to identify brain tissue. The COBRA technique had also been tested with different condition of brain tissue compatible to the tissue left at the crime scene, and it was still able to identify the sample. In conclusion, the cg03096965 methylation of *EML2* gene is very specificity and sensitivity to the brain tissue which can be very useful in forensic science.

Department: Botany	Student's Signature
Field of Study: Genetics	Advisor's Signature
Academic Year: 2013	Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยดี เกิดขึ้นจากหลากหลายเหตุปัจจัยและหลากหลายบุคคลผู้อยู่เบื้องหลังข้าพเจ้าขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปฐมวดี ญาณทัศณีย์จิต ที่กรุณาให้คำแนะนำ ให้ข้อคิดเห็น

ช่วยเหลือแก้ไขปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ นพ.ดร. อภิวัฒน์ มุทิตรากร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ที่กรุณาให้คำแนะนำ ชี้แนะแนวทางการดำเนินงาน ให้ความเมตตา รวมทั้งให้ความอนุเคราะห์ด้านสถานที่ อุปกรณ์สารเคมีและสนับสนุนค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทพ. ดร. นครินทร์ กิตกัธร์ ที่กรุณาให้คำแนะนำสั่งสอน ชี้แนะแนวทาง คอยผลักดันและให้โอกาส

ขอขอบพระคุณความกรุณาจากคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ต่อศักดิ์ สีลานันท์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนีกร ธรรมโชติ

ขอขอบพระคุณผู้บังคับบัญชาทุกระดับชั้น ณ ต้นสังกัดกลุ่มงานตรวจเลือดชีวเคมีและเคมีคลินิก สถาบันนิติเวชวิทยาโรงพยาบาลตำรวจ สำนักงานตำรวจแห่งชาติ ที่อนุญาตให้ลาศึกษาต่อในเวลาราชการและขอบคุณเพื่อนข้าราชการตำรวจและผู้ร่วมงานทุกท่านที่เสียสละรับภาระงานแทนระหว่างการลาศึกษาต่อครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ พล.ต.ต.พรชัย สุธีรคุณ ผู้บังคับการสถาบันนิติเวชวิทยา ที่อนุญาตให้เก็บตัวอย่างเพื่อใช้ในงานวิจัยจากกลุ่มงานนิติพยาธิ สถาบันนิติเวชวิทยา โรงพยาบาลตำรวจ

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มงานนิติพยาธิ สถาบันนิติเวชวิทยาที่ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่าง

ขอบคุณนายทัชพล เมืองทรัพย์ที่ให้ความช่วยเหลือในการสร้างฐานข้อมูลทางชีวสารสนเทศ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ นิสิตในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านอนุพันธุศาสตร์มะเร็งและโรคของมนุษย์ ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำและความช่วยเหลือในการดำเนินงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อช้วน สามสุวรรณ และคุณแม่กัณหา สามสุวรรณ และทุกคนในครอบครัวที่สนับสนุนในด้านการเรียน เป็นแรงผลักดัน และเป็นกำลังใจให้เสมอมา

สุดท้ายนี้คุณความดีและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้แก่ผู้มีพระคุณทุกท่านที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญรูป.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	4
ขอบเขตของการวิจัย.....	4
ข้อจำกัดของการวิจัย.....	4
จำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย.....	5
กรอบความคิดในการทำงานวิจัย.....	7
ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย.....	8
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	11
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	25
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	25
สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	26
ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย.....	29
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	47
1. ผลการคัดเลือกกราฟตำแหน่งซีพีจีเมทิลเลขชั้นที่แสดงความจำเพาะในอวัยวะต่างๆ ของมนุษย์ที่ สร้างจากฐานข้อมูลดีเอ็นเอเมทิลเลขชั้น.....	47
2. กลุ่มประชากรตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง.....	61

3. ผลการศึกษาดีเอ็นเอเมทิลเลชัน ของตำแหน่ง cg03096975 ยีน EML2 ด้วยเทคนิค COBRA-EML2 ในตัวอย่างทั้งหมด และการวิเคราะห์ผลที่ได้เพื่อตรวจสอบความไวและความจำเพาะต่อเนื้อเยื่อสมองของตำแหน่ง cg03096975 ยีน EML2.....	62
4. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) ของตำแหน่ง cg03096975 ยีน EML2.....	65
5. การวิเคราะห์ความจำเพาะของตำแหน่ง cg03096975 ยีน EML2 ต่อสมองและประสิทธิภาพของเทคนิค COBRA-EML2.....	66
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	70
สรุปผลการวิจัย.....	70
อภิปรายผลการวิจัย.....	74
ข้อเสนอแนะ.....	75
รายการอ้างอิง.....	76
ภาคผนวก.....	79
ภาคผนวก ก.....	80
ภาคผนวก ข.....	83
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	107

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนตำแหน่ง ซีพีจีเมทิลेशनที่มีความจำเพาะในแต่ละอวัยวะ.....	51
ตารางที่ 2 แสดงจำนวนซีพีจีเมทิลेशन ที่จำเพาะเปรียบเทียบตำแหน่งภายในและภายนอกยีน	52
ตารางที่ 3 แสดงจำนวนซีพีจีเมทิลेशनที่จำเพาะเปรียบเทียบตำแหน่งที่ตั้งในเฮ็กซอน หรืออินทรอน	53
ตารางที่ 4 กลุ่มประชากรตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง	62
ตารางที่ 5 แสดงผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค COBRA-EML2 ในตัวอย่างจากอวัยวะต่างๆ	64



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 แสดงกระบวนการทำงานของ Oligonucleotide beads ในตำแหน่งที่เป็น Unmethylated locus และ Methylated locus ของชุดตรวจ Illumina® Human . Methylation 27 Bead Chip Kit (Bibikova et al., 2009)	15
รูปที่ 2 กระบวนการ Bisulfite treatment.....	23
รูปที่ 3 กระบวนการของเทคนิค COBRA ในตำแหน่งที่เป็น methylated และ unmethylated... ..	23
รูปที่ 4 คำสั่งเพื่อใช้สร้างกราฟด้วยโปรแกรมอาร์จากฐานข้อมูล	30
รูปที่ 5 ตัวอย่างกราฟที่ได้จากการสร้างด้วยโปรแกรมอาร์	31
รูปที่ 6 แสดงการออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการตรวจสอบตำแหน่ง cg03096875 ของยีน EML2 ..	37
รูปที่ 7 ตัวอย่างกราฟที่มีรูปแบบ Methylation pattern	47
รูปที่ 8 ตัวอย่างกราฟที่มีรูปแบบ Unmethylation pattern.....	48
รูปที่ 9 ตัวอย่างกราฟที่มีรูปแบบ Mix profile.....	48
รูปที่ 10 ตัวอย่างกราฟที่มีรูปแบบ Hypermethylation specific.....	49
รูปที่ 11 ตัวอย่างกราฟที่มีรูปแบบ Hypomethylation specific	49
รูปที่ 12 ตำแหน่ง cg01063813 STAT6.....	54
รูปที่ 13 ตำแหน่ง cg03096975 EML2	55
รูปที่ 14 ตำแหน่ง cg16970828 UBE1L	55
รูปที่ 15 ตำแหน่ง cg17506742 IL10RB.....	56
รูปที่ 16 ตำแหน่ง cg19310430 C11orf45.....	56
รูปที่ 17 ตำแหน่ง cg19789466 OAS1	57
รูปที่ 18 ตำแหน่ง cg20427879 EML2	57
รูปที่ 19 ตำแหน่ง cg21844956 TRIM38.....	58
รูปที่ 20 ตำแหน่ง cg22536398 NTN2L.....	58
รูปที่ 21 ตำแหน่ง cg23097006 VSX1.....	59
รูปที่ 22 ตำแหน่ง cg23539753 SP100.....	59
รูปที่ 23 ตำแหน่ง cg25277950 EML2	60
รูปที่ 24 กราฟตำแหน่ง cg03096975 ของยีน EML2.....	60
รูปที่ 25 ตัวอย่างการวิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอในตำแหน่ง cg03096975 ของยีน EML2 ด้วยเทคนิค COBRA-EML2	63
รูปที่ 26 ลำดับนิวคลีโอไทด์จากสมองแสดงผลเป็น CG ที่ตำแหน่ง cg03096975 ยีน EML2 เช่นเดียวกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่รายงานไว้ใน NCBI.....	66
รูปที่ 27 ลำดับนิวคลีโอไทด์จากหัวใจ ตำแหน่ง cg03096975 ยีน EML2	66

รูปที่ 28 การทดลอง Mixed samples 66

รูปที่ 29 การทดลอง Reliability 67

รูปที่ 30 การทดลอง Minimal DNA concentration 67

รูปที่ 31 การทดลอง Each position of brain 68

รูปที่ 32 การทดลอง Aged samples ในวันที่ 5, 15, 25, 30, 35 69

รูปที่ 33 การทดลอง Aged samples ในวันที่ 85, 90, 100 69



บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันเทคโนโลยีทางด้านวิทยาศาสตร์เข้ามามีบทบาทและมีผลกระทบต่อชีวิตมนุษย์เป็นอย่างมาก โดยหนึ่งในนั้นคือความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีพันธุกรรมซึ่งจะเป็นพื้นฐานต่อการเปลี่ยนแปลงทางสังคม เศรษฐกิจ และชีวิตประจำวัน เช่น การดูแลสุขภาพ เกษตรกรรม เภสัชกรรม และทางด้านนิติวิทยาศาสตร์

จากการใช้ความรู้ทางด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ และวิทยาศาสตร์ในสาขาต่างๆ เพื่อการตรวจพิสูจน์ยืนยันตัวบุคคลว่า บุคคลมีชีวิต ศพ โคจรกระดูก เป็นใคร ชิ้นส่วนของศพ เศษชิ้นส่วนกระดูก เลือดหรือเนื้อเยื่อ ตลอดจนจรรยาบรรณต่างๆ ที่เกิดจากสารคัดหลั่งในร่างกายมนุษย์ เป็นเนื้อเยื่อชนิดใด หรือเป็นของใคร ก่อให้เกิดประโยชน์ในกระบวนการทางนิติวิทยาศาสตร์เพื่อการระบุตัวบุคคล และข้อมูลที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ยังนำมาใช้ประโยชน์ในกระบวนการสืบสวนสอบสวน เพื่อยืนยันตัวบุคคลผู้กระทำเหตุซึ่งผิดต่อกฎหมายหรือเพื่อเชื่อมโยงวัตถุพยานต่างๆ เข้ากับผู้เกี่ยวข้องกับคดี (Frumkin et al., 2011) ในทางนิติวิทยาศาสตร์ได้ให้คำจำกัดความตัวอย่างตามที่กล่าวมาข้างต้นว่า วัตถุพยานประเภทชีววัตถุ และดีเอ็นเอ (Deoxyribonucleic acid; DNA) ก็คือสิ่งที่ถูกนำมาใช้เพื่อการตรวจสอบวัตถุพยานประเภทชีววัตถุ ซึ่งผลที่ได้จากการตรวจสอบดีเอ็นเอมีความน่าเชื่อถือและได้รับการยอมรับอย่างเป็นสากล นอกจากนั้นดีเอ็นเอยังมีความเสถียร สามารถใช้ตรวจสอบได้แม้ในตัวอย่างที่เสื่อมสภาพ โดยการตรวจดีเอ็นเอในทางนิติวิทยาศาสตร์ ได้ให้ความสำคัญกับส่วนที่เป็นไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellite) คือเบสซ้ำขนาด 2- 6 เบส ที่มีจำนวนซ้ำไม่เกิน 100 ซ้ำ หรือเรียกว่า short tandem repeat (STR) ซึ่งจะมีความแตกต่างกันในแต่ละบุคคล (polymorphisms) ยกเว้นแฝดร่วมไข่ (คราลักษณ์ คักดีเกียร์ดิชย์ และคณะ, 2555) เป็นส่วนของดีเอ็นเอที่นำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอในชีววัตถุต่างๆ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction; PCR) ในปัจจุบัน

ในขั้นตอนการปฏิบัติงานจริงของเจ้าหน้าที่ผู้ทำหน้าที่ตรวจสอบชีววัตถุ ก่อนถึงขั้นตอนการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อระบุว่าชีววัตถุนั้นเป็นของใคร หรือใครมีส่วนเกี่ยวข้องกับวัตถุพยาน จะต้องผ่านการตรวจสอบเพื่อระบุชนิดของชีววัตถุด้วยเทคนิคทางห้องปฏิบัติการ เช่น การตรวจสอบเพื่อระบุชนิดเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนอวัยวะด้วยวิธีทางพยาธิวิทยา (Pathology) หรือตรวจสอบโปรตีนจากสารคัดหลั่งหรือสารน้ำจากร่างกายโดยใช้ชุดตรวจต่างๆ เพื่อเป็นการคัดเลือกตัวอย่างและเป็นขั้นตอนที่จะให้ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับคดีซึ่งอาจเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์สามารถกำหนดทิศทางการดำเนินงานสืบสวนสอบสวน เพราะผลที่ได้จากการระบุชนิดของชีววัตถุจะมีส่วนช่วยในการเชื่อมโยงพฤติการณ์ทางคดี (An et al., 2012; Frumkin et al., 2011) ยกตัวอย่างเช่น ผลการตรวจสอบวัตถุ

พยานจากที่เกิดเหตุพบคราบอสุจิ จะทำให้สามารถอนุมานในเบื้องต้นได้ว่าคดีนั้นน่าจะเกี่ยวข้องกับ ความผิดทางเพศ หรือหากเจอชิ้นส่วนอวัยวะในที่เกิดเหตุ แต่ไม่พบศพ แล้วตรวจได้ว่าอวัยวะนั้นเป็น อวัยวะที่สำคัญต่อการมีชีวิต เช่น สมอง หัวใจ ไต ตับ ก็สามารถอนุมานในเบื้องต้นได้เช่นกันว่า เจ้าของอวัยวะนั้นน่าจะเสียชีวิตแล้ว ซึ่งมีผลต่อแนวทางการดำเนินคดีต่อไป แต่วัตถุพยานที่ เสื่อมสภาพ เน่าเสีย ที่เป็นผลจากการเก็บที่มีไม่คุณภาพหรือระยะเวลาของชีววัตถุที่สัมผัสกับ สิ่งแวดล้อมจะเป็นอุปสรรคต่อการตรวจวิเคราะห์ของเทคนิคต่างๆที่กล่าวมา เป็นผลให้ขาดความ แม่นยำในการตรวจแยกชนิดของชีววัตถุหรือไม่สามารถตรวจหาชนิดของชีววัตถุได้ (Tak et al., 2012) นักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มจึงพยายามค้นหาวิธีการที่จะใช้เพื่อการพิสูจน์ชนิดของชีววัตถุ เหล่านี้ด้วยการใช้ดีเอ็นเอ เพราะหากสามารถใช้ดีเอ็นเอได้ก็จะเป็นแนวทางเพื่อการแก้ปัญหาสำหรับการ ตรวจวิเคราะห์ในวัตถุพยานที่เสื่อมสภาพได้ โดยมีงานวิจัยจาก Dan Frumkin และคณะ (Frumkin et al., 2011) ซึ่งได้ศึกษาถึงการนำดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) มาใช้เพื่อระบุ ชนิดของของเหลวหรือสารคัดหลั่งจากร่างกาย โดยการทำงานวิจัยในเลือด (จากเส้นเลือดดำ, เลือด ประจำเดือน), น้ำลาย, น้ำอสุจิ, ผิวหนังชั้นหนังกำพร้า, น้ำปัสสาวะ และของเหลวจากช่องคลอด โดย คัดเลือกตำแหน่งซีพีจีไอซ์แลนด์ (CpG islands) เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) จากการสุ่มด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์จากตำแหน่งซีพีจีไอซ์แลนด์ทั่วทั้งจีโนมโดยมีข้อกำหนดให้ เอนไซม์ตัดจำเพาะ HhaI สามารถตัดได้ คัดเลือกมาทั้งหมด 15 ตำแหน่ง และตรวจวิเคราะห์ผลด้วย การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ พีซีอาร์(PCR) และ Capillary electrophoresis (CE) จากผลการวิจัย พบว่าดีเอ็นเอที่มาจากตัวอย่างแต่ละชนิดจะมีรูปแบบดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่แตกต่างกัน และได้มีการ ทดลองทำในตัวอย่างที่เสื่อมสภาพจากการนำไปอบที่ 75 °C เป็นเวลา 10 นาที และในตัวอย่างที่มี อายุ 20 เดือนพบว่าดีเอ็นเอเมทิลเลชันยังสามารถตรวจได้ทั้งในตัวอย่างที่เสื่อมสภาพ และตัวอย่างที่มี อายุ 20 เดือน โดยคณะวิจัยได้ให้ข้อสรุปไว้ว่า ดีเอ็นเอเมทิลเลชันเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มี ประสิทธิภาพสำหรับการใช้ตรวจสอบชนิดของชีววัตถุจากสถานที่เกิดเหตุ กับงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ (Frumkin et al., 2011)

ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน เป็นกลไกหนึ่งของพันธุศาสตร์ด้านกระบวนการเหนือพันธุกรรมที่เกี่ยวข้อง กับการแสดงออกของยีนโดยที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอเมทิลเลชันเป็น กระบวนการทางชีวเคมีที่มีความสำคัญต่อการพัฒนาในสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิดมีความอนุรักษ์สูง ด้วยการเติมหมู่เมทิลที่เบสไซโตซีน (cytosine: C) ที่อยู่ติดกับเบสกวานีน (guanine: G) ซึ่งใน กระบวนการเติมหมู่เมทิลให้กับเบสไซโตซีนนั้น จะมี S-adenosyl-L-methionine (SAM) เป็น โมเลกุลที่ให้หมู่เมทิล และเอนไซม์ดีเอ็นเอเมทิลทรานสเฟอเรส (DNA methyltransferase: DNMTs) เป็นเอนไซม์ที่คอยเติมหมู่เมทิลให้กับดีเอ็นเอ เรียกตำแหน่งซีพีจีไดนิวคลีโอไทด์ (CpG dinucleotide) นี้ว่าซีพีจีเมทิลเลชัน (CpG methylation) (Villeneuve and Natarajan, 2011)

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการใช้ดีเอ็นเอเมทิลเลชันเพื่อตรวจสอบชนิดของเนื้อเยื่อโดยเลือก ตรวจสอบตำแหน่งซีพีจีเมทิลเลชันที่มีความจำเพาะในสมองเพราะสมองเป็นอวัยวะที่สำคัญต่อการมี

ชีวิต ซึ่งในทางกฎหมายจะพิจารณาการสันนิษฐานสภาพความมีชีวิตของบุคคลโดยการพิจารณาจากการทำงานของสมอง กล่าวคือ ถ้าสมองตาย บุคคลนั้นก็สันนิษฐานสภาพความมีชีวิต (ชาตรี เรื่องเดชมรงค์, 2516) การคัดเลือกตำแหน่งซีพีจีเมทิลเลชันเพื่อใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ ในการระบุเนื้อเยื่อสมอง ทำโดยการสร้างฐานข้อมูลดีเอ็นเอเมทิลเลชันของเนื้อเยื่อต่างๆจากการรวบรวมข้อมูลการทดลองที่ค้นหาจากฐานข้อมูลของ NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) โดยกำหนดให้เสร็จสิ้นเมื่อวันที่ 31 ธันวาคม 2555 จากการรวบรวมได้ข้อมูลทั้งหมด 172 การทดลอง ที่ทำการตรวจวัดซีพีจีเมทิลเลชันในเนื้อเยื่อต่างๆ จากนั้นคัดเลือกเฉพาะการทดลองที่ทำในเนื้อเยื่อปกติของมนุษย์ได้ 39 การทดลอง ในเนื้อเยื่อ 22 ชนิด ประกอบด้วย กระจก ไขกระดูก เลือด สมอง ปอด เต้านม หัวใจ ตับ ม้าม กระเพาะอาหาร ลำไส้ ไต ตับอ่อน ต่อมหมวกไต ต่อมลูกหมาก ปากมดลูก ผิวหนัง กล้ามเนื้อ น้ำลาย เยื่อบุกระเพาะปัสสาวะ รังไข่ อัณฑะ เลือกข้อมูลการทดลองที่ใช้ชุดตรวจเมทิลเลชันไมโครแอรเรย์ (methylation microarray) ชนิดเดียวกันคือ คือ Illumina® Human Methylation 27 Bead Chip Kit เพราะมีข้อมูลการทดลองจำนวนมากในฐานข้อมูลของ NCBI และชุดตรวจนี้สามารถตรวจวัดซีพีจีเมทิลเลชัน ได้ถึง 27,578 ตำแหน่ง ครอบคลุมทั่วทั้งจีโนม และครอบคลุมตำแหน่งของยีนมากกว่า 14,000 ยีน ฐานข้อมูลที่ได้นี้จึงสามารถอ้างอิงค่าดีเอ็นเอเมทิลเลชันของซีพีจีตำแหน่งต่างๆบนจีโนมในเนื้อเยื่อแต่ละชนิดได้ จึงมีประโยชน์ในการใช้ หาระดับของดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่มีความจำเพาะเพื่อใช้ตรวจแยกชนิดของเนื้อเยื่อได้ (Bibikova et al., 2009) แล้วจึงทำการคัดเลือกตำแหน่งซีพีจีเมทิลเลชันจำนวน 27,578 ตำแหน่ง เพื่อหาตำแหน่งซีพีจีที่แสดงค่าเป็นเมทิลเลชันอย่างจำเพาะต่อเนื้อเยื่อต่างๆ และคัดเลือกภายในกลุ่มของตำแหน่งซีพีจีที่จำเพาะต่อสมองอีกครั้งเพื่อใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในการระบุเนื้อเยื่อสมอง โดยในงานวิจัยนี้เลือกตำแหน่ง cg03096975 ซึ่งอยู่ในยีน EML2 ของสมองที่แสดงค่าเป็นไฮเปอร์เมทิลเลชัน (hypermethylation) ที่โดดเด่นเมื่อเทียบกับอวัยวะอื่นๆ

เทคนิคที่ใช้เพื่อการศึกษาดีเอ็นเอเมทิลเลชันนั้นมีหลายวิธี ได้แก่ Southern blot, methylation-specific PCR, Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA), Realtime PCR, Pyrosequencing, Capillary electrophoresis โดยการเลือกใช้เทคนิคในงานวิจัยขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ ความไวและความจำเพาะของสิ่งที่ต้องการตรวจวัด ค่าใช้จ่าย ระยะเวลาในการทำงาน ความปลอดภัย ทรัพยากรในด้านต่างๆที่มีอยู่ ซึ่งในงานวิจัยนี้เลือกใช้เทคนิค Combined Bisulfite Restriction Analysis หรือ COBRA เพื่อตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอในตำแหน่ง cg03096973 ของยีน EML2 จึงระบุชื่อเทคนิคเป็น COBRA-EML2 เป็นวิธีการที่ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ Bisulfite treatment, PCR และ restriction enzyme (Xiong et al., 1997) โดยเอนไซม์ที่ใช้คือ BstUI เพราะมีความจำเพาะกับตำแหน่งซีพีจีที่ต้องการศึกษา และออกแบบการทดลองเพิ่มเติมเพื่อเป็นการตรวจสอบความเข้าใจของวิธีทดสอบ (method validation) ในตัวอย่างที่ไม่ทราบชนิด (Blinds samples) ตัวอย่างที่ทำการเจือจางความเข้มข้น ตัวอย่างผสมระหว่างดีเอ็นเอจากสมองและอวัยวะอื่นๆ ในอัตราส่วนต่างๆ ทำการทดลองแบบ เป็นตัวอย่างเนื้อเยื่อสมอง กับ

ตัวอย่างเนื้อเยื่อจากอวัยวะอื่นๆ เพื่อต้องการตรวจสอบความเที่ยงตรง Intra- และ Inter Reliability นอกจากนี้ยังมีการทดสอบในตัวอย่างที่เสื่อมสภาพอีกด้วย โดยมีความมุ่งหวังเพื่อการใช้ประโยชน์กับงานด้านนิติวิทยาศาสตร์

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. คัดเลือกตำแหน่งซีพีจีเมทิลเลชันที่มีความจำเพาะต่อสมองจากตำแหน่งซีพีจีเมทิลเลชันทั่วทั้งจีโนมจากฐานข้อมูลที่สร้างขึ้นเพื่อใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอของสมอง
2. หาเทคนิคเพื่อใช้ในการตรวจแยกเนื้อเยื่อสมองด้วยตำแหน่งซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะต่อเนื้อเยื่อสมอง

ขอบเขตของการวิจัย

ข้อมูลดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่รวบรวมเพื่อใช้ในการสร้างฐานข้อมูลจะคัดเลือกเฉพาะข้อมูลงานทดลองดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ทำในเนื้อเยื่อปกติ ดังนั้น ฐานข้อมูลที่ได้จึงครอบคลุมเฉพาะการใช้เพื่อค้นหาตำแหน่งซีพีจีเมทิลเลชันที่มีความจำเพาะต่อเนื้อเยื่อปกติเท่านั้นไม่สามารถนำมาใช้กับเนื้อเยื่อที่มีความผิดปกติได้ ตำแหน่ง cg 03096975 ของยีน EML2 ที่คัดเลือกเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในการระบุเนื้อเยื่อสมองและไพรเมอร์ที่ถูกรออกแบบมาใช้กับเทคนิค COBRA ด้วยการทดสอบในตัวอย่างสมอง ตัวอย่างจากอวัยวะอื่นๆ และ ยืนยันความถูกต้องเหมาะสมของวิธีการวิเคราะห์ เพื่อนำมาใช้วิเคราะห์ตัวอย่างในหองปฏิบัติการ ด้วยการทดลองใน 5 การทดลอง คือ การทดลอง Mixed samples, การทดลอง Reliability, การทดลอง Minimal DNA concentration, การทดลอง Each position of brain และการทดลอง Aged samples

ข้อจำกัดของการวิจัย

ตำแหน่งซีพีจีเมทิลเลชันและเทคนิคที่ใช้ในการตรวจวัด ของงานวิจัยนี้สามารถใช้ตรวจแยกชนิดของเนื้อเยื่อปกติของในมนุษย์เท่านั้น เนื่องจากตำแหน่งซีพีจีเมทิลเลชันที่คัดเลือกมานั้นเป็นการคัดเลือกจากฐานข้อมูลที่มีข้อมูลครอบคลุมเฉพาะค่าเฉลี่ยดีเอ็นเอเมทิลเลชันในเนื้อเยื่อปกติของมนุษย์ และในงานวิจัยนี้ได้ตรวจสอบความจำเพาะของตำแหน่ง cg 03096975 ของยีน EML2 ใน 7 ส่วนของสมองเท่านั้น คือ ซีรีบรัมส่วนเนื้อสีขาว (Cerebrum white matter), ซีรีบรัมเนื้อสีเทา (Cerebellum white matter), ซีรีเบลลัมส่วนเนื้อสีขาว (Cerebrum gray matter), ซีรีเบลลัมส่วนเนื้อสีเทา (Cerebellum gray matter), พอนส์(Pons), เมดัลลา ออบลองกาตา (Medunlla oblongata) และสไปนอล คอร์ด (Spinal cord)

จำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

1. เมทิลเลชันไมโครแอรเรย์ (Methylation microarray) เป็นเทคนิคที่ใช้การตรวจวัดค่าดีเอ็นเอเมทิลเลชันจากบริเวณที่หลายๆตำแหน่งบนจีโนมพร้อมๆกันในการตรวจวัดหนึ่งครั้ง ซึ่งผลที่ได้จากการตรวจวัดมีความแม่นยำ และน่าเชื่อถือ

2. ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) เป็นปฏิกิริยาการเติมหมู่เมทิลให้กับเบสในสายดีเอ็นเอ เกิดที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของเบสไซโตซีน ในบริเวณที่เบสไซโตซีนอยู่ติดกับเบสกวานีนอาจเรียก ตำแหน่งซีพีจี หรือ ซีพีจีเมทิลเลชัน (CpG, CpG methylation) ซึ่งเป็นกลไกหนึ่งของสภาวะเหนือพันธุกรรมที่ใช้เพื่อการควบคุมการแสดงออกของยีน

3. CU-DREAM เป็นโปรแกรมทางชีวสารสนเทศ ที่ใช้เพื่อคำนวณหาความสัมพันธ์ของกลุ่มยีนจากกลุ่มประชากรระหว่างงานทดลองสองกลุ่มได้ ซึ่งความสัมพันธ์ของกลุ่มยีน สามารถคำนวณในรูปแบบ up- หรือ down- regulation

4. COBRA-EML2 คือเทคนิค Combined Bisulfite Restriction Analysis ที่ใช้ตรวจวัดค่าการเกิดเมทิลเลชัน ณ ตำแหน่ง cg03096975 EML2 gene

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ฐานข้อมูลทางชีวสารสนเทศของค่าดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation database) ที่รวบรวมจากตำแหน่งซีพีจีต่างๆทั่วทั้งจีโนมของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะ 22 ชนิด สามารถนำมาใช้เพื่อค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอ หรือเพื่อเป็นแหล่งอ้างอิงในการตรวจสอบชนิดของเนื้อเยื่อตัวอย่างโดยอาศัยหลักการดีเอ็นเอเมทิลเลชันได้ และการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในรูปแบบดีเอ็นเอเมทิลเลชัน ณ ตำแหน่ง cg03096975 ยีน EML2 ของสมองร่วมกับเทคนิค COBRA-EML2 เพื่อการตรวจสอบดีเอ็นเอจากสมองจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้จริงกับงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์

ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

1. รวบรวมและคัดเลือกข้อมูลค่าดีเอ็นเอเมทิลเลชันในอวัยวะต่างๆ ของมนุษย์
 - 1.1 การสร้างฐานข้อมูลดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation database)
 - 1.2 การสร้างกราฟค่าเมทิลเลชันของซีพีจีแต่ละตำแหน่ง
 - 1.3 การวิเคราะห์และค้นหากราฟของซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะในอวัยวะแต่ละชนิด
 - 1.4 การค้นหาตำแหน่งบนจีโนมของ ซีพีจีตามที่คัดเลือกไว้

2. ประชากร

2.1 กลุ่มประชากรตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

2.2 เกณฑ์การคัดเลือกตัวอย่าง

3. การสกัดดีเอ็นเอ

4. การศึกษาดีเอ็นเอเมทิลเลชันของตำแหน่ง cg03096975 ในยีน EML2 ด้วยวิธีการ Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA-EML2)

4.1 Bisulfite treatment

4.2 การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

4.3 ตรวจสอบดีเอ็นเอเมทิลเลชันโดยการทำให้ Restriction Enzyme Analysis

4.4 การวิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอในตำแหน่งที่สนใจที่เพิ่มจำนวนได้ด้วยเทคนิค PCR ด้วยกระบวนการ เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

5. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) ของตำแหน่ง cg03096975 ยีน EML2

5.1 การเตรียมดีเอ็นเอสำหรับการโคลน

5.2 การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับ pGem-T Easy vectors (Promega, USA) (Ligation)

5.3 การถ่ายโอนยีนโดยวิธี Transformation

5.4 การตรวจสอบหา insert product ใน plasmid โดยวิธี Colony PCR

5.5 การสกัด plasmid โดย Manual Fast Plasmid™ Mini Kit (5prime, USA)

5.6 การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิต PCR

6. การตรวจสอบความจำเพาะของตำแหน่ง cg03096975 ยีน EML2 ต่อสมอและประสิทธิภาพของเทคนิค COBRA-EML2 (method validation)

6.1 การทดลอง Mixed samples

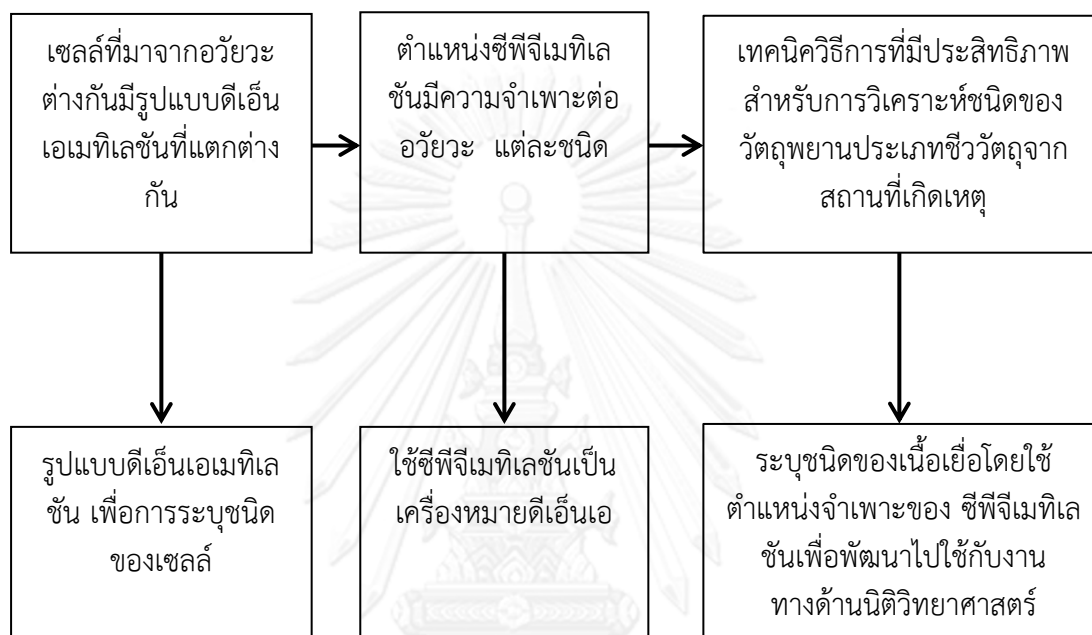
6.2 การทดลอง Reliability

6.3 การทดลอง Minimal DNA concentration

6.4 การทดลอง Each position of brain

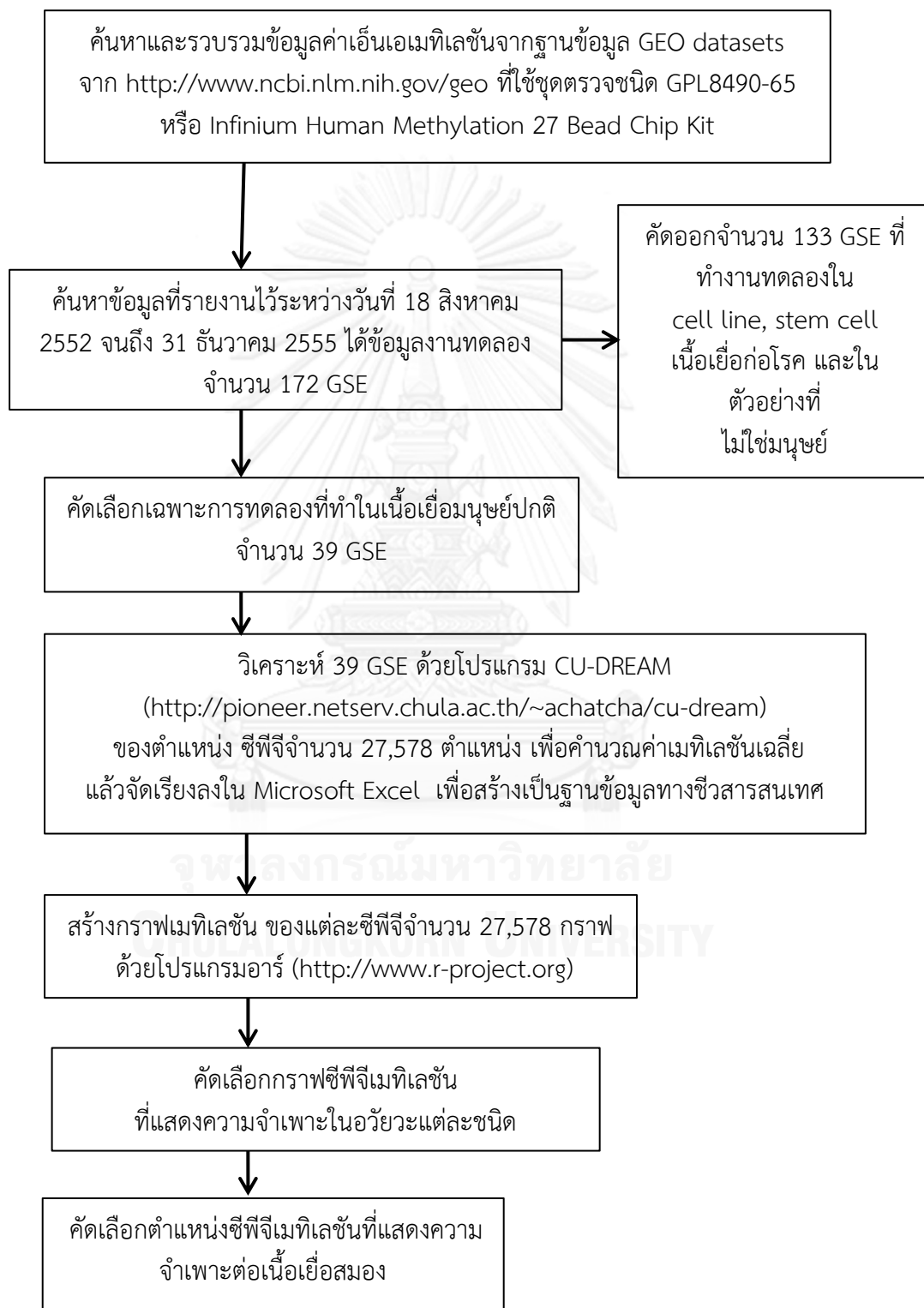
6.5 การทดลอง Aged samples

กรอบความคิดในการทำงานวิจัย

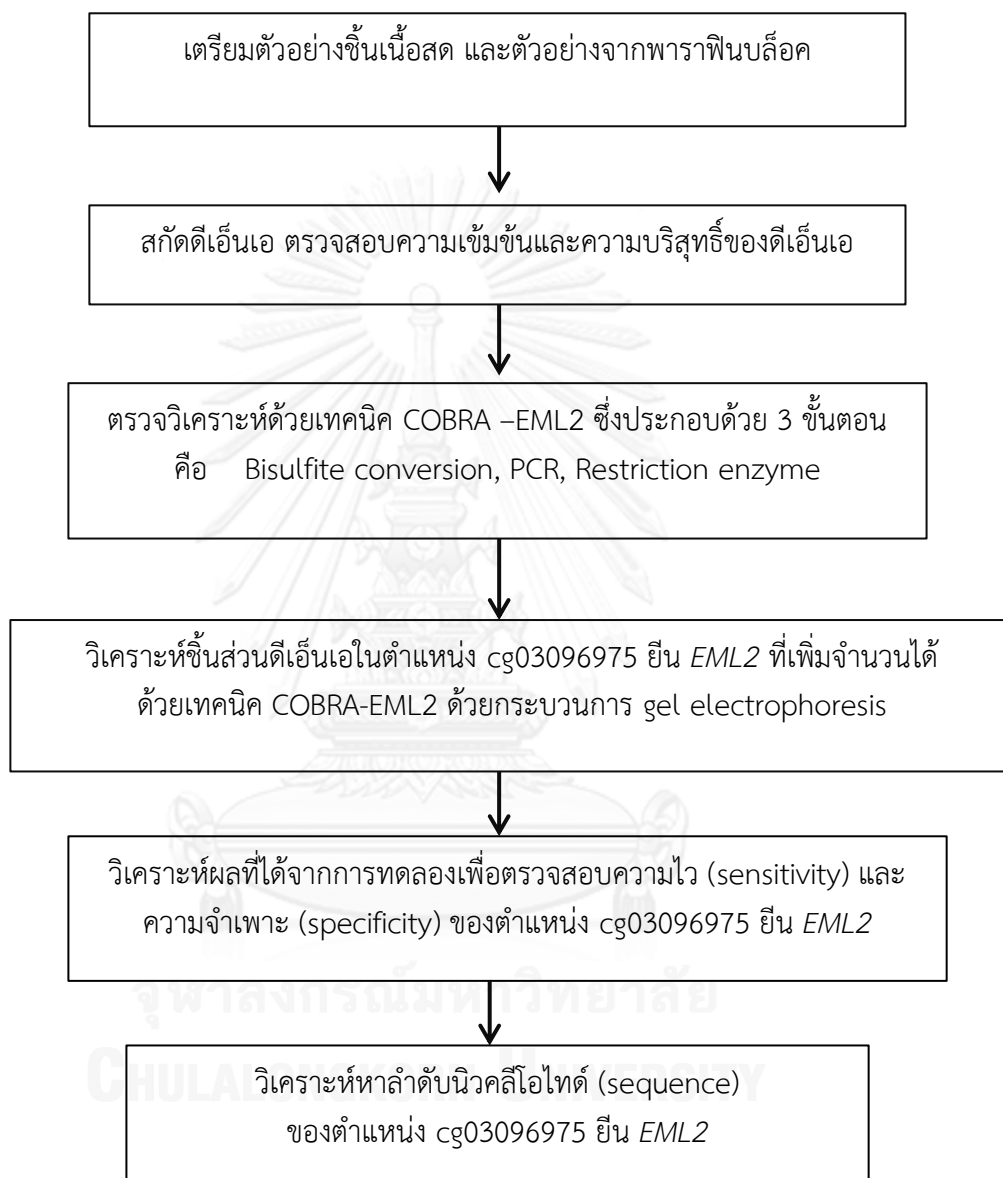


ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

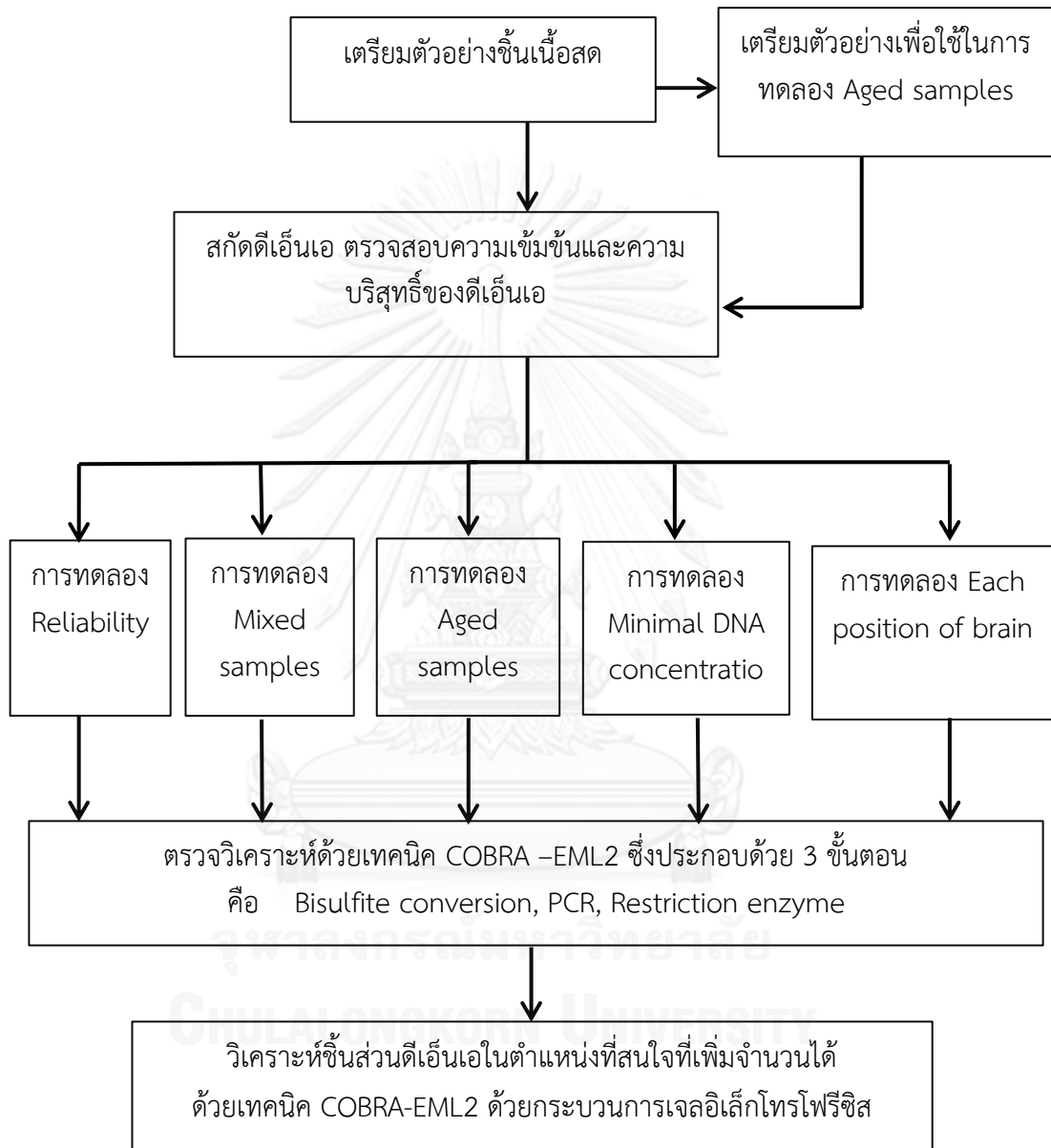
1. การสร้างฐานข้อมูลชีวสารสนเทศและการค้นหาตำแหน่งซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะต่อสมอง



2. ตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันบนตำแหน่ง cg03096975 ยีน EML2 ของสมองเปรียบเทียบกับอวัยวะอื่นๆ



3. การตรวจสอบความจำเพาะของตำแหน่ง cg03096975 ยีน EML2 ต่อสมองและประสิทธิภาพของเทคนิค COBRA-EML2 ในตัวอย่างที่มีรูปแบบต่างๆกัน



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พันธุศาสตร์ด้านกระบวนการเหนือพันธุกรรม (Epigenetics)

เป็นการศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่เกิดจากกระบวนการอื่นนอกเหนือจากการเปลี่ยนแปลงลำดับดีเอ็นเอ แต่มีผลให้ยีนแต่ละยีนแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปจากที่ควรเป็น ตัวอย่างของการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนตามลักษณะนี้ ได้แก่ การเติมหมู่เมทิลบนดีเอ็นเอ เรียกว่า ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน หรือการตัดแปลงฮิสโตน เช่น ถอนหมู่อะเซทิลออกจากฮิสโตน เรียกว่า ฮิสโตนอะดีเซทิลเลชัน (Histone deacetylation) รวมทั้งการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของโครมาติน (chromatin remodeling) อย่างไรก็ตาม กระบวนการเหนือพันธุกรรมที่มีการศึกษามากที่สุดคือดีเอ็นเอเมทิลเลชัน โดยการควบคุมการแสดงออกในลักษณะนี้สามารถผันกลับได้ และสามารถคงอยู่ได้หลังการแบ่งเซลล์ หรืออาจคงอยู่ข้ามไปสู่สิ่งมีชีวิตรุ่นลูกและรุ่นต่อไปได้อีกด้วย (Bird., 2007) ตัวอย่างปรากฏการณ์ทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ การประทับตราทางพันธุกรรม (genetic imprinting) หรือการยับยั้งเอ็กซ์โครโมโซม (X-chromosome inactivation) (Ehrlich et al., 1982) และเกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนชนิดของเซลล์ต้นกำเนิด (stem cell) เพื่อไปทำหน้าที่ต่างๆ (cellular differentiation) ในระหว่างขั้นตอนการเกิดรูปร่างที่แน่นอน (morphogenesis) จะมีการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์หลายๆชนิดซึ่งจะแบ่งตัวและพัฒนาต่อไปกลายเป็นเซลล์ที่มีการกำหนดหน้าที่ชัดเจนในภายหลังหรือคือเซลล์ไซซึ่งปฏิสนธิแล้วได้ไซโกตเพียงเซลล์เดียว แล้วเกิดการเปลี่ยนแปลงกลายเป็นเซลล์หลากหลายชนิดซึ่งทำหน้าที่แตกต่างกันไป เช่น เซลล์ประสาท เซลล์กล้ามเนื้อ เซลล์เยื่อหุ้ม เซลล์ผนังหลอดเลือด และอื่นๆ โดยกลไกนี้เกิดขึ้นเนื่องจากเซลล์มีกระบวนการที่ทำให้ยีนบางยีนทำงาน และยีนบางยีนไม่ทำงานโดยจะช่วยรักษาสมดุลให้กับยีนเพื่อให้มีการแสดงออกที่ถูกต้องในระดับและระยะเวลาที่เหมาะสม (Hall and Georgel, 2007; Yang and Kuroda, 2007; Zilberman and Henikoff, 2007)

ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation)

ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน คือหนึ่งในพันธุศาสตร์ด้านกระบวนการเหนือพันธุกรรม เป็นกระบวนการปกติที่เกิดขึ้นในจีโนมของมนุษย์ เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวเคมีที่มีความสำคัญต่อการพัฒนาหรือการเจริญในสิ่งมีชีวิตประเภทยูคาริโอต ที่เกิดขึ้นหลังจากที่ดีเอ็นเอจำลองตัวเองในวัฏจักรของเซลล์ ด้วยการเติมหมู่เมทิล (-CH₃) ไปยังคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของเบสไซโตซีน (cytosine: C) ที่ตั้งอยู่หน้าเบสกวานีน (guanine: G) เรียกว่า ซีพีจีเมทิลเลชัน (CpG methylation) โดยในกระบวนการเติมหมู่เมทิลให้กับเบสไซโตซีนนั้น จะมี S-adenosyl-L-methionine (SAM) เป็นโมเลกุลที่ให้หมู่

เมทิล และเอนไซม์ดีเอ็นเอเมทิลทรานสเฟอเรส (DNA methyltransferase: DNMTs) (Zhang and Pradhan, 2014) เป็นเอนไซม์ที่คอยเติมหมู่เมทิลให้กับดีเอ็นเอ ตำแหน่งที่เกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันอาจมีการเปลี่ยนแปลงได้โดยเกิดการผันกลับของปฏิกิริยา ซึ่งการสูญเสียหมู่เมทิลที่ดีเอ็นเอสามารถเกิดขึ้นได้ 2 รูปแบบ คือ การสูญเสียหมู่เมทิลแบบ passive demethylation และแบบ active demethylation โดยในการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันแบบ passive demethylation จะเกิดขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยาเมทิลเลชันแบบ maintenance เกิดขึ้นได้ไม่สมบูรณ์ในระหว่างการจำลองตัวของดีเอ็นเอ และดีเอ็นเอเมทิลเลชันแบบ active demethylation จะเป็นการสูญเสียหมู่เมทิลของดีเอ็นเอโดยการทำงานของเอนไซม์ DNA glycosylase (Zhang et al., 2010) นอกจากนี้ปัจจุบันยังพบว่า มีดีเอ็นเอเมทิลเลชันของเบสไซโตซีนที่ไม่ใช่ซีพีจีไดนิวคลีโอไทด์ได้เช่นเดียวกันดังที่พบในลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็น CpHpG และ CpHpH โดยจะพบได้ในเซลล์ต้นกำเนิดหลังการปฏิสนธิแต่เมื่อเซลล์ถูกกำหนดหน้าที่อย่างชัดเจนดีเอ็นเอเมทิลเลชันใน CpHpG และ CpHpH จะถูกกำจัดออกด้วยกระบวนการที่อะมิเนชัน นอกจากนี้ยังพบว่าการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันในรูปแบบนี้จะไม่สามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นต่อไปได้ (เมื่อ H = adenosine; A, thymine; T หรือ C)(Lister et al., 2009; Pradhan and Esteve, 2003)

เอนไซม์ดีเอ็นเอเมทิลทรานสเฟอเรสที่สำคัญในมนุษย์แบ่งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ DNMT1, DNMT3a, DNMT3b มีทั้งหมด 3 ชนิด ทำหน้าที่แตกต่างกันไปคือ DNMT1 จะทำหน้าที่รักษาระดับเมทิลเลชันของดีเอ็นเอให้คงที่โดยการเติมหมู่เมทิลให้กับเบสไซโตซีนในสายดีเอ็นเอที่ถูกสร้างขึ้นใหม่หลังการจำลองตัวของดีเอ็นเอหรือการซ่อมแซมดีเอ็นเอซึ่งจะยังไม่มีหมู่เมทิลโดยเติมหมู่เมทิลให้เฉพาะกับเบสไซโตซีนที่เส้นต้นแบบมีหมู่เมทิลอยู่แล้ว เรียกว่า Hemi methylated template เป็นการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันแบบ maintenance ซึ่งจะทำให้สิ่งมีชีวิตสามารถดำรงรูปแบบในการเติมหมู่เมทิลคงไว้เช่นเดิม ส่วนเอนไซม์ DNMT3a, DNMT3b ทำหน้าที่เป็น De novo methylation โดยจะทำหน้าที่เติมหมู่เมทิลให้กับสายดีเอ็นเอที่สูญเสียหมู่เมทิลไปในระหว่างการจำลองตัวของสายดีเอ็นเอ (DNA replication) หรือการเติมหมู่เมทิลให้กับเบสไซโตซีนในตำแหน่งใหม่ไม่ต้องอาศัยสายดีเอ็นเอต้นแบบ การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันแบบนี้จะทำให้เกิดรูปแบบดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่แตกต่างไปจากเดิม (Pradhan and Esteve, 2003)

ดีเอ็นเอเมทิลเลชันพบได้มากในบริเวณที่มีซีพีจีเรียงต่อกันเป็นจำนวนมาก โดยเรียกบริเวณนี้ว่า CpG-island ซึ่งมักเป็นส่วนโปรโมเตอร์ของยีน ก็จะส่งผลต่อการแสดงออกของยีนโดยตรง คือ หากเซลล์ไม่ต้องการให้ยีนชนิดนั้นทำงานก็จะเติมหมู่เมทิลไปที่ CpG island ทำให้เกิด CpG island hypermethylation (Ma et al., 2013; Madi et al., 2012) ส่งผลให้กลุ่มโปรตีน methyl-CpG binding protein เข้ามาจับกับ 5- methycytosine ซึ่งมีผลต่อโครงสร้างโครมาตินและโปรตีนฮิสโตน ทำให้มีการยับยั้งการแสดงออกของยีน และยังพบว่าการเติมหมู่เมทิลนั้นจะเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของนิวคลีโอไทด์บริเวณโปรโมเตอร์ของยีนทำให้ไม่สามารถจับแบบจำเพาะกับ transcription factor ต่างๆ เช่น โปรตีน c-myc หรือ E2F ได้ ส่งผลต่อกระบวนการถอดรหัสของยีน

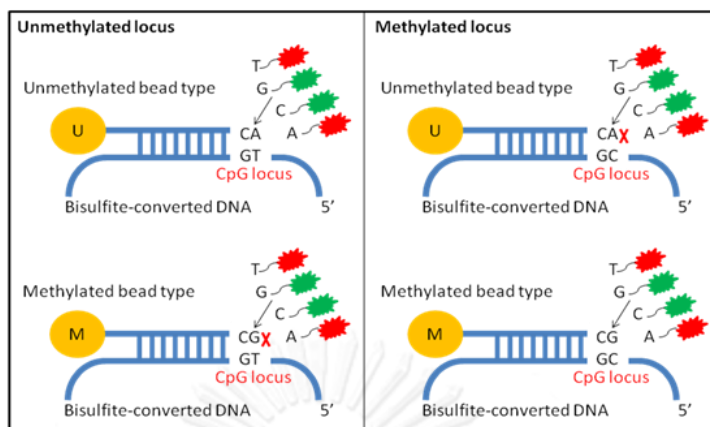
(transcription) ทำให้ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน แต่การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันนั้นสามารถเกิดขึ้นได้ทั่วทั้งจีโนมไม่จำกัดเฉพาะในยีนเพียงอย่างเดียว สามารถเกิดขึ้นที่ลำดับเบสซ้ำในจีโนมซึ่งมีอยู่ประมาณ 45 เปอร์เซ็นต์ของจีโนมทั้งหมด (Wang et al., 2012) ซึ่งในลำดับเบสซ้ำพบว่ามีเบสไซโตซีนที่ติดกับกวานีนอยู่จำนวนมาก (CpG rich sequence) และมีรายงานว่าระดับเมทิลเลชันแต่ละตำแหน่งในจีโนมของเซลล์ที่มาจากอวัยวะที่แตกต่างกันจามีรูปแบบที่แตกต่างกัน ซึ่งยังไม่สามารถอธิบายได้อย่างแน่ชัดถึงเหตุผลว่ามีความเกี่ยวเนื่องเชื่อมโยงกันอย่างไร (Juusola and Ballantyne, 2007)

ชีวสารสนเทศศาสตร์ (Bioinformatics)

เมื่อโลกวิทยาศาสตร์เข้าสู่ยุคของจีโนม นักวิจัยจำนวนมากได้ทำการศึกษาค้นคว้าหาลำดับดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด โดยเทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับการถอดรหัสพันธุกรรมถือเป็นเรื่องที่สามารถทำได้ง่ายด้าย ทำให้ข้อมูลลำดับดีเอ็นเอมีอยู่อย่างมากมาย ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการจัดเก็บข้อมูลเหล่านั้นอย่างเป็นระบบเพื่อความสะดวกต่อการค้นหา และการนำไปใช้ประโยชน์ โดยชีวสารสนเทศศาสตร์ หรือ bioinformatics เป็นการประยุกต์ใช้ความรู้ทางคอมพิวเตอร์เพื่อใช้จัดเก็บ สืบค้น กลั่นกรอง และวิเคราะห์ข้อมูลชนิดต่างๆ ทางชีววิทยา ได้แก่ ลำดับดีเอ็นเอ ลำดับโปรตีน หรือข้อมูลทางชีววิทยาที่เกิดจากเทคโนโลยีทางวิทยาศาสตร์ที่สามารถผลิตข้อมูลจำนวนมากได้ในระยะเวลาอันรวดเร็วที่เรียกว่า high throughput เช่น ข้อมูลไมโครแอรเรย์ เพื่อให้เกิดเป็นฐานข้อมูลที่ถูกต้อง และสามารถสืบค้นได้ง่าย ดังนั้นชีวสารสนเทศศาสตร์ จึงมีลักษณะเป็นสหสาขาวิชา ได้แก่ คณิตศาสตร์ ทางด้านสถิติ เทคโนโลยีคอมพิวเตอร์ สารสนเทศ และ ชีววิทยา โดยเฉพาะสาขาอณูชีววิทยา (molecular biology) ที่ผลิตข้อมูลประเภทลำดับดีเอ็นเอ หรือโปรตีน เป็นจำนวนมากออกมา โดยงานวิจัยในยุคแรกของชีวสารสนเทศศาสตร์ คือการจัดการข้อมูลทางชีววิทยา ประเภทลำดับดีเอ็นเอ และลำดับโปรตีน โดยมีการสร้างฐานข้อมูลจำนวนมากเพื่อเก็บรวบรวมข้อมูลที่นักชีววิทยาสร้างขึ้น และการนำข้อมูลทางด้านชีวสารสนเทศไปใช้ ได้แก่ ใช้เพื่อการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยข้อมูลจากการทดลองทางอณูชีววิทยา ประเภทลำดับดีเอ็นเอ หรือลำดับโปรตีนเพื่อใช้อธิบายถึงความเกี่ยวข้องของสิ่งมีชีวิต การทำนายโครงสร้างสามมิติของโปรตีน และเมื่อเข้าสู่ยุคจีโนม (genomic era) ความต้องการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์เพื่อวิเคราะห์ผลการทดลองจากห้องปฏิบัติการจึงมีมากขึ้น และความสามารถของเทคโนโลยี high throughput ทำให้มีนักวิจัยที่พยายามค้นหาวิธีการใหม่แนวคิดใหม่ เพื่อสร้างเป็นโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่สามารถรองรับความต้องการของนักชีววิทยา และหนึ่งใน high throughput technology ที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างยิ่งก็คือไมโครแอรเรย์ จนเกิดเป็นงานวิจัยทางชีวสารสนเทศศาสตร์ที่เรียกว่า microarray analysis (ประเวศ อรรถจวัฒน์วงศ์, 2010)

เมทิลเลชันไมโครแอเรย์ (methylation microarray)

เมทิลเลชันไมโครแอเรย์เป็นเทคนิคที่มีการพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาและตรวจวัดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน ที่สามารถตรวจวัดแบบคัดกรองได้อย่างรวดเร็ว มีความแม่นยำสูง โดยสามารถตรวจวัดค่าดีเอ็นเอเมทิลเลชันได้ครั้งละหลายๆ ตำแหน่งทำให้ลดระยะเวลาและค่าใช้จ่ายที่ใช้ในการดำเนินงาน (Aporntewan., 2011) โดยหลักการตรวจวัดของเมทิลเลชันไมโครแอเรย์อาศัยการจับกันอย่างจำเพาะเจาะจงของสายดีเอ็นเอสองสายที่เป็นคู่กัน (complementary strands) ดีเอ็นเอในตำแหน่งซีพีจีที่สนใจศึกษาจะถูกทำให้ติดอยู่บนฐานซึ่งเป็นแผ่นกระจกที่มีคุณสมบัติยอมให้ดีเอ็นเอเกาะบนผิวหน้าและสามารถบรรจุขึ้นดีเอ็นเอได้เป็นจำนวนมาก เรียกแผ่นกระจกนี้ว่า แผ่นไมโครแอเรย์ โดยเมทิลเลชันไมโครแอเรย์ชนิด Illumina® Human Methylation 27 Bead Chip Kit (Illumina, USA) คือชุดตรวจเมทิลเลชันไมโครแอเรย์ที่คณะวิจัยเลือกสืบค้นข้อมูลที่ใช้เพื่อการศึกษา บนแผ่นไมโครแอเรย์ชนิดนี้จะมี Oligonucleotide beads ที่ถูกออกแบบให้มีความจำเพาะกับตำแหน่งซีพีจีต่างๆ ในจีโนมเพื่อตรวจสอบว่า ณ ตำแหน่งซีพีจีนั้นๆ มีลักษณะเป็น methylated หรือ unmethylated โดยอาศัยหลักการแบบไฮบริดเดชัน (hybridization) คือการตรวจสอบดีเอ็นเอตำแหน่งเป้าหมายจากการเกิดการเข้าคู่กันของเบสคู่สมด้วยโพรบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะสูงในที่นี้คือ Oligonucleotide beads ซึ่งติดอยู่กับอนุภาคของสารเรืองแสง แบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ Methylation bead type เป็น Methylation probe และ Unmethylation bead type เป็น Unmethylation probe มีกระบวนการทำงานคือ ใช้ดีเอ็นเอตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการ Bisulfite treatment แล้วมาใส่ในชุดตรวจ เมทิลเลชันไมโครแอเรย์ชนิด Illumina® Human Methylation 27 BeadChip Kit (Illumina, USA) ซึ่งชุดตรวจชนิดนี้สามารถตรวจวัดตัวอย่างได้ครั้งละ 12 ตัวอย่าง บนตำแหน่งซีพีจีจำนวน 25,778 ตำแหน่งประกอบด้วยยีนจำนวน 14,475 ยีน ครอบคลุมทั่วทั้งจีโนม แต่ละตำแหน่งจะมี โพรบ 2 ชนิดตามที่กล่าวในข้างต้น โดยที่ปลายด้าน 3' ของ Methylation probe จะจำเพาะกับตำแหน่งซีพีจีที่เป็น methylated ขณะที่ปลายด้าน 3' ของ Unmethylation probe จะจำเพาะกับตำแหน่งซีพีจีที่เป็น unmethylated จากนั้นนำแผ่นไมโครแอเรย์ไปเข้าเครื่องอ่าน จากแถบสีเรืองแสงที่ติดไว้ (Bibikova et al., 2009) ดังแสดงตามรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงกระบวนการทำงานของ Oligonucleotide beads ในตำแหน่งที่เป็น Unmethylated locus และ Methylated locus ของชุดตรวจ Illumina® Human Methylation 27 Bead Chip Kit (Bibikova et al., 2009)

Gene Expression Omnibus (GEO)

Gene Expression Omnibus (GEO) หรือ GEO dataset คือ ฐานข้อมูลที่รวบรวมงานวิจัยที่ใช้ไมโครแอเรย์ในการวัดผล บนเว็บไซต์ NCBI โดยในฐานข้อมูลจะประกอบด้วย

1. งานทดลอง (series) ใช้รหัสคือ GSE
2. แพลตฟอร์ม (platform) หรือชุดตรวจไมโครแอเรย์ที่ใช้ ใช้รหัสคือ GPL
3. ประชากรหรือตัวอย่าง (sample) ใช้รหัสคือ GSM

GEO เป็นฐานข้อมูลงานทดลองสาธารณะที่มีขนาดใหญ่ที่สุด และสามารถเข้าถึงข้อมูลหรือส่งต่อข้อมูลได้ง่ายมีข้อมูลงานวิจัยที่มีความหลากหลายทางพันธุศาสตร์จำนวนมากทั้งในด้านแสดงออกของยีน ดีเอ็นเอเมทิลเลชันหรืออาร์เอ็นเอ (Zhu et al., 2008) ซึ่งคณะวิจัยได้ใช้ฐานข้อมูลนี้เพื่อการรวบรวมข้อมูลค่าดีเอ็นเอเมทิลเลชันจากอวัยวะต่างๆของมนุษย์ เพื่อใช้ในการสร้างเป็นฐานข้อมูล ดีเอ็นเอเมทิลเลชันในเนื้อเยื่อปกติของมนุษย์

Connection Up- and Down- Regulation Expression Analysis of Microarrays (CU-DREAM)

CU-DREAM เป็นโปรแกรมทางชีวสารสนเทศ ที่สามารถคำนวณและประเมินความสัมพันธ์ระหว่าง ข้อมูลการทดลองสองการทดลอง ที่อยู่ในรูปแบบ GSE ในฐานข้อมูล GEO จากเว็บไซต์ NCBI โดยหลักการของ CU-DREAM คือ การหาความสัมพันธ์ระหว่าง กลุ่มประชากรที่มีปัจจัยบางอย่างเกี่ยวข้องกัน ซึ่งในขั้นตอนของการศึกษาจะแบ่งกลุ่มประชากรตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง ออกเป็นสองกลุ่มประชากร คือ กลุ่มทดลอง (experimental group) และกลุ่มควบคุม (control group) จากนั้นนำค่าที่ตรวจวัดได้ เช่น ค่าที่วัดได้จากไมโครแอเรย์ จากแต่ละกลุ่มประชากรมา คำนวณหาค่าเฉลี่ยในแต่ละตำแหน่งตรวจวัด แล้วจึงคำนวณผลต่างระหว่าง 2 กลุ่มประชากร เช่น ศึกษาในยีนเดียวกัน หรือตำแหน่งดีเอ็นเอเมทิลเลชันเดียวกัน แล้วจึงนำผลต่างนั้นมาคำนวณค่าทาง สถิติเพื่อหาความสัมพันธ์ ระหว่างข้อมูลของ 2 กลุ่ม ซึ่งสามารถเลือกดูความสัมพันธ์ได้ทั้ง up- หรือ down-regulation จากการพิจารณาค่า p-value โปรแกรม CU-DREAM สามารถใช้กับ GEO dataset ได้หลายรูปแบบ ได้แก่ เอ็กซ์เพรสชันไมโครแอเรย์ (expression microarray) หรือเมทิลเลชันไมโครแอเรย์ (methylation microarray) แต่ไมโครแอเรย์ที่สามารถใช้ร่วมกับ CU-DREAM นั้น จะต้องเป็นไฟล์ที่มีคอลัมน์ข้อมูลของ Gene Symbol เป็นชื่อของยีนชนิดต่างๆเพื่อใช้ในขั้นตอนการ แปลผล (Aporntewan., 2011)

สถานที่เกิดเหตุ และพยานหลักฐาน

สถานที่เกิดเหตุ คือ สถานที่ที่มีเหตุการณ์ซึ่งส่งผลต่อชีวิตและทรัพย์สินเกิดขึ้น ดังนั้นในการ ตรวจสอบสถานที่เกิดเหตุจึงเป็นหัวใจสำคัญของงานด้านสืบสวนสอบสวน เพราะเป็นบริเวณที่ผู้กระทำความผิดมักทิ้งร่องรอยไว้เสมอ จึงเป็นบริเวณที่สามารถพบพยานหลักฐานต่างๆในคดี ยกตัวอย่างเช่น ศพ ชิ้นส่วนศพ ผู้เสียหาย วัตถุพยาน พยานบุคคล โดยจุดประสงค์ในการตรวจสอบสถานที่เกิดเหตุ คือ ตรวจเก็บและรวบรวมพยานหลักฐานเพื่อตรวจวิเคราะห์ในด้านต่างๆ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อแนวทางการสืบสวนสอบสวนต่อไป (สมศักดิ์ แก้วเกตุ, 2557)

พยานหลักฐาน หมายถึง สิ่งใดๆ ที่สามารถจับต้องได้ตามกฎหมายและเป็นสิ่งที่สามารถ นำเสนอในชั้นศาลเพื่อพิสูจน์ถึงข้อเท็จจริงในคดีได้ โดยตามประมวลกฎหมายวิธีพิจารณาความอาญา มาตรา 226 ให้คำจำกัดความของพยานหลักฐานว่า หมายถึง พยานวัตถุ พยานเอกสาร หรือพยานบุคคล ตลอดจนหลักฐานอื่นๆซึ่งอาจจะใช้เป็นเครื่องพิสูจน์การกระทำผิดได้ (สมศักดิ์ แก้วเกตุ, 2557) ตัวอย่างเช่น

1. บุคคลผู้ได้รู้เห็นพฤติกรรมหรือเหตุการณ์ในการกระทำผิดของคนร้าย ถือเป็นพยานบุคคล

2. เอกสารต่างๆ อันหมายถึง สิ่งต่างๆที่ปรากฏเป็นข้อความที่มีความหมายไม่ว่ากระทำขึ้นโดยชอบ หรือมิชอบด้วยกฎหมายก็ดีและกระทำขึ้นโดยผู้ร้ายหรือบุคคลหนึ่งบุคคลใดก็ตาม ถือเป็นพยานเอกสาร

3. วัตถุต่างๆที่เกี่ยวข้องกับคดีรวมทั้งที่ตรวจพบในสถานที่เกิดเหตุ ถือเป็นพยานวัตถุ (สมศักดิ์ แก้วเกตุ, 2557)

พยานหลักฐานสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท คือ

1. พยานหลักฐานโดยตรง (direct evidence) หมายถึง พยานบุคคล คำให้การของผู้รู้เห็นเหตุการณ์ ผู้เป็นประจักษ์พยานที่รับรู้เห็นเหตุการณ์ด้วยตนเองจากประสาทตา หู จมูก สัมผัสหรือการลิ้มรส (สมศักดิ์ แก้วเกตุ, 2557)

2. พยานแวดล้อม (circumstantial evidence) หมายถึง พยานบุคคลที่ไม่ได้รู้เห็นเหตุการณ์โดยตรง ซึ่งพยานประเภทนี้ไม่สามารถพิสูจน์ข้อเท็จจริงในคดีได้โดยตรง แต่สามารถนำมาใช้เพื่อเชื่อมโยงพฤติการณ์ทางคดี ใช้ตอบปัญหาบางประการ ใช้สันนิษฐานความเป็นไปได้ของมูลเหตุทางคดี (สมศักดิ์ แก้วเกตุ, 2557)

3. พยานหลักฐานที่แท้จริง (real evidence) หมายถึง พยานวัตถุ ซึ่งมีความชัดเจนในตัวเอง โดยพยานหลักฐานประเภทนี้มีความสำคัญที่สุดมีคุณค่าในชั้นศาล ตัวอย่างเช่น รอยลายนิ้วมือแฝง คราบเลือดคราบอสุจิ เส้นผม เส้นขน อาวุธปืน เครื่องกระสุนปืน เศษดินรอยกดประทับของพื้นรองเท้า รอยกดประทับของดอกยางล้อรถที่พบในสถานที่เกิดเหตุ (สมศักดิ์ แก้วเกตุ, 2557)

โดยสามารถแบ่งพยานวัตถุออกได้เป็น 2 ชนิด ตามลักษณะการเก็บ คือ

1. พยานวัตถุที่เคลื่อนย้ายไม่ได้ (fixed or immovable evidence) เป็นพยานวัตถุที่มีขนาดใหญ่ มีน้ำหนักมาก หรือหากทำการเคลื่อนย้ายอาจทำให้คุณสมบัติบางอย่างเปลี่ยนแปลงไป เช่น รอยกดประทับของดอกยางล้อรถ (สมศักดิ์ แก้วเกตุ, 2557)

2. พยานวัตถุที่เคลื่อนย้ายได้ (movable evidence) เป็นพยานวัตถุที่มีขนาดเล็ก มีน้ำหนักเบาสามารถทำการเคลื่อนย้ายได้โดยไม่ทำให้คุณสมบัติเปลี่ยนแปลงไป เช่น อาวุธปืน เครื่องกระสุนปืน (สมศักดิ์ แก้วเกตุ, 2557)

งานด้านสืบสวนสอบสวนในอดีตเจ้าหน้าที่จะมุ่งเน้นการค้นหาพยานบุคคลเป็นอันดับแรก แต่มักเป็นปัญหาในชั้นศาลเนื่องจากการเบี่ยงเบนคำให้การ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากช่วงระยะเวลาที่ผ่านมาไปหลังเกิดเหตุมักมีปัจจัยอื่นๆเข้ามามีอิทธิพลต่อพยานบุคคลนั้น เช่น ความเป็นสมัครพรรคพวกและผลประโยชน์ แต่อย่างไรก็ตามพยานบุคคลก็ยังคงมีความสำคัญ ถ้าหากคำให้การนั้นเกิดขึ้นจากความมีสามัญสำนึก รับผิดชอบตรงไปตรงมา ปราศจากอคติและการแต่งเติม ในปัจจุบันสำนักงานตำรวจแห่งชาติได้ให้ความสำคัญต่อพยานวัตถุมากขึ้น มีการสนับสนุนส่งเสริมงานด้านวิทยาการโดยมีการ

จัดซื้อเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ที่ทันสมัย มีประสิทธิภาพเพื่อใช้ในการตรวจพิสูจน์และวิเคราะห์วัตถุพยานที่ตรวจเก็บได้จากสถานที่เกิดเหตุ ซึ่งส่งผลดีต่อการคลี่คลายคดีและเป็นการเพิ่มคุณค่าของวัตถุพยานประเภทต่างๆให้มากยิ่งขึ้น ยกตัวอย่างคุณค่าของวัตถุพยานในด้านต่างๆ เช่น

- เป็นสิ่งที่พิสูจน์ถึงการเกิดขึ้นจริงของคดี หรือการพิสูจน์ว่ามีการกระทำความผิดเกิดขึ้น ตัวอย่างเช่น การพิสูจน์ในคดีข่มขืน หากสามารถพิสูจน์ได้ถึงการไม่ยินยอมพร้อมใจของฝ่ายหญิง เช่น เสื้อผ้าฉีกขาด ร่างกายปรากฏร่องรอยการต่อสู้ดิ้นรน จากการถูกทำร้ายของฝ่ายหญิง (สมศักดิ์ แก้วเกต, 2557)

- เป็นสิ่งที่สามารถเชื่อมโยงผู้ต้องสงสัยให้เกี่ยวข้องกับผู้เสียหายหรือเกี่ยวข้องกับสถานที่เกิดเหตุ เช่น ผู้ต้องสงสัยถูกชาวบ้านล้อมจับไว้และเจ้าหน้าที่ตำรวจเข้าจับกุมทันทีทันใดภายหลังจากได้ก่อเหตุข่มขืนผู้เสียหายภายในบ้าน ซึ่งภายในบ้านหลังดังกล่าวมีการเลี้ยงแมวไว้ชนแมวจำนวนหนึ่งถูกพบที่เสื้อผ้าของผู้ต้องสงสัย โดยผู้ต้องสงสัยไม่สามารถหาคำอธิบายโต้แย้งที่เหมาะสมได้ (สมศักดิ์ แก้วเกต, 2557)

- เป็นสิ่งที่สามารถบ่งชี้ถึงตัวผู้กระทำความผิด เช่น ผลการตรวจพิสูจน์เปรียบเทียบรอยลายนิ้วมือแฝงที่ตรวจเก็บได้จากพยานวัตถุในสถานที่เกิดเหตุในคดีลักทรัพย์ ผลการตรวจสอบพบว่าตรงกับลายนิ้วมือของผู้ต้องสงสัย ผู้ต้องสงสัยจึงไม่สามารถปฏิเสธการกระทำความผิดได้ (สมศักดิ์ แก้วเกต, 2557)

- เป็นสิ่งที่สามารถป้องกันผู้ถูกกล่าวหาที่บริสุทธิ์ได้ เช่น เด็กกล่าวหาชายผู้หนึ่งว่าได้บังคับให้กินยา จึงทำให้เด็กรู้สึกง่วงซึมและชายผู้หนึ่งได้ทำร้ายร่างกายเด็ก แต่ผลจากการตรวจปัสสาวะและเลือดของเด็กไม่พบสารที่มีผลดังกล่าว ซึ่งแสดงว่าคำให้การของเด็กนั้นไม่ถูกต้อง จึงเป็นการยืนยันความบริสุทธิ์ของชายผู้หนึ่ง(สมศักดิ์ แก้วเกต, 2557)

- เป็นสิ่งที่สามารถยืนยันคำให้การของผู้เสียหาย เช่น หญิงสาวแจ้งความกับตำรวจว่าถูกคนขับรถตู้โดยสารใช้มีดจี้บังคับและพยายามข่มขืน ระหว่างที่ต่อสู้ขัดขืนมีดได้บาดมือของตน ตำรวจจึงได้ตามจับตัวคนขับรถตู้ผู้ถูกกล่าวหา และจากการตรวจพบคราบเลือดติดอยู่ที่บริเวณคอเสื้อของผู้ถูกกล่าวหา แต่เจ้าตัวปฏิเสธว่าคราบเลือดนั้น เป็นของตนซึ่งเกิดขึ้นจากการโกนหนวด แต่จากผลการตรวจพิสูจน์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอพบว่าคราบเลือดนั้นตรงกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอของผู้เสียหาย จึงสามารถยืนยันได้ว่าคำให้การของผู้เสียหายเป็นความจริง (สมศักดิ์ แก้วเกต, 2557)

- เป็นสิ่งที่สามารถทำให้เกิดการรับสารภาพหรือยอมรับการกระทำความผิด เช่น การตรวจสอบเนื้อเยื่อจากเล็บมือศพหญิงสาว และพบว่ามียาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของบุคคลอื่นปะปนอยู่โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเออื่นนั้นเป็นของผู้ชาย ตำรวจจึงทำการเก็บเยื่อกระดูกพุงแก้มของผู้ต้องสงสัยเพศชายจำนวนหนึ่งเพื่อตรวจสอบเปรียบเทียบ พบว่าในจำนวนผู้ต้องสงสัยทั้งหมดมีเพียงคนเดียวที่มีผลลาย

พิมพ์ดีเอ็นเอตรงกันกับผลที่ได้จากเล็บมือศพ ผู้ต้องหาจึงยอมจำนนต่อหลักฐานและยอมให้การรับสารภาพในที่สุด (สมศักดิ์ แก้วเกตุ, 2557)

- ผลการตรวจวิเคราะห์วัตถุพยานโดยวิธีทางวิทยาศาสตร์จะมีความน่าเชื่อถือในชั้นศาล เพราะผลการตรวจทางวิทยาศาสตร์ ยกตัวอย่างเช่นการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ สามารถทำซ้ำได้และไม่ว่าจะทำที่ไหน โดยใคร ก็จะทำให้ผลเหมือนเดิม ดังนั้นจึงมีส่วนช่วยในการตัดสินคดีการตัดสินคดีให้เร็วยิ่งขึ้น และการไม่มีอยู่ของวัตถุพยานซึ่งจะนำชี้ถึงข้อเท็จจริงในสถานที่เกิดเหตุใช้เป็นประโยชน์ยุติข้อโต้แย้งได้ ตัวอย่างเช่น ผู้เสียหายในคดีเพลิงไหม้ ต้องได้รับค่าชดเชยจากบริษัทประกันภัยแต่ถูกบริษัทกล่าวหาว่าเป็นการวางเพลิง เพื่อจะปฏิเสธการจ่ายค่าสินไหมทดแทน แต่ผลจากการตรวจสถานที่เกิดเหตุไม่พบพยานวัตถุที่แสดงถึงการวางเพลิงจึงทำให้ข้อโต้แย้งดังกล่าวยุติลง (สมศักดิ์ แก้วเกตุ, 2557)

ข้อกำหนดของการสิ้นสภาพบุคคลตามกฎหมาย

การตายของบุคคลธรรมดาแบ่งออกเป็น 2 กรณี คือ

1. การตายตามธรรมชาติ (death) คือ การตายโดยที่ร่างกายทุกส่วนหยุดทำงานและสิ้นชีวิตไป โดยที่ การตายตามธรรมชาติจะไม่มีฟื้นคืนชีวิตกลับมา มีสภาพบุคคลอีกต่อไป
2. การตายโดยผลของกฎหมาย (disappearance) หรือการตายโดยการสาบสูญ

ใช้หลักในการวินิจฉัยว่าบุคคลใดตายจากการพิจารณาในทางการแพทย์ โดยการดำรงชีวิตของมนุษย์ จะมีการทำงานสัมพันธ์กัน 3 ระบบ คือ ระบบประสาทส่วนกลาง ได้แก่ สมอง ระบบไหลเวียน ได้แก่ หัวใจ และหลอดเลือด และระบบหายใจ ได้แก่ หลอดลม และปอด (จิตติ ดิงศรัทย์, 2516)

สมองเป็นอวัยวะที่ควบคุมการทำงานของปอดและหัวใจ การหายใจจะเป็นการรับออกซิเจนเข้าไปในกระแสเลือด หัวใจจะทำหน้าที่ในการสูบฉีดเลือดไปเลี้ยงส่วนต่างๆของร่างกายรวมทั้งสมอง หัวใจ และปอดให้มีชีวิตได้ ดังนั้น ถ้าส่วนใดส่วนหนึ่งหยุดก็จะมีผลให้ส่วนอื่นๆหยุดการทำงานตามไปด้วย อย่างไรก็ตามใน ทางชีววิทยา หากคนหยุดหายใจและหัวใจหยุดเต้น เซลล์และอวัยวะต่างๆจะยังไม่ตายทันที และอาจถูกกระตุ้นให้กลับมาทำงานได้ ฉะนั้นในการพิจารณาเรื่องการตายจะต้องพิจารณาระบบทั้งสามหยุดทำงานแล้ว ซึ่งระบบสำคัญที่สุดของร่างกายคือสมอง หากสมองเสียหายไปอย่างถาวรแล้ว หัวใจและการหายใจจะไม่สามารถทำหน้าที่ของตนเองได้ ยกเว้นการใช้เครื่องช่วยเท่านั้น แต่สมองจะไม่มีทางฟื้นคืนกลับมาได้อีก ดังนั้นในทางการแพทย์จึงใช้การตรวจการทำงานของสมอง ด้วยเครื่องตรวจคลื่นสมองไฟฟ้า (electroencephalography) หากพบว่าสมองหยุดทำงาน หัวใจจะหยุดเต้น และไม่สามารถหายใจเองได้ เช่นนั้นจึงจะถือว่าตาย และในกฎหมายไทย การวินิจฉัยว่าบุคคลตายก็จะยึดถือตามหลักทางการแพทย์ เป็นสำคัญ ดังนั้นในทางกฎหมายจึงถือว่า

สมองตาย คือตาย (brain death as the body death) (ชาตรี เรื่องเดชมรงค์, 2516) เพราะฉะนั้น การตรวจพบเศษชิ้นส่วนที่พิสูจน์ได้ว่าเป็นสมองในที่เกิดเหตุ แม้ไม่พบศพก็สามารถยืนยันสภาพความมีชีวิตของเจ้าของสมองนั้นได้

ส่วนประกอบของสมอง

สมองเป็นส่วนหนึ่งของระบบประสาทส่วนกลาง บรรจุอยู่ในช่องกะโหลกศีรษะ โดยทั่วไป สมองมีน้ำหนักประมาณ 1.4 กิโลกรัม โดยเนื้อสมองจะมี 2 ชั้น คือ ส่วนเนื้อสีเทา (gray matter) ซึ่งเป็นที่อยู่ของกระแสประสาทและแอกซอน (axon) ที่ไม่มีเยื่อไมอีลินหุ้ม และในส่วนเนื้อสีขาว (white matter) เป็นที่อยู่ของแอกซอนที่มีเยื่อไมอีลินหุ้ม ประกอบด้วยเซลล์ประสาท (nerve cell) หรือนิวรอน (neuron) ซึ่งเป็นเซลล์ที่เป็นส่วนประกอบหลักของระบบประสาทหน้าที่ควบคุมการทํากิจกรรมทั้งหมดของร่างกาย เป็นอวัยวะชนิดเดียวที่แสดงความสามารถทางด้านสติปัญญานอกจากนั้นยังมีเซลล์อีกชนิดหนึ่งเรียกว่าเซลล์เกลีย (glial) เป็นเซลล์สำคัญรองจากนิวรอน มีหน้าที่ในการลำเลียงอาหารมาให้เซลล์ประสาท คอยดูแลและปกป้องนิวรอนหรือเซลล์ประสาท เป็นเซลล์หลักที่ทำหน้าที่ส่งข้อมูลในรูปแบบสัญญาณไฟฟ้า (action potential) โดยเซลล์เกลียสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ชนิด คือ (Brain cell. 2014: online)

1. ไมโครเกลีย (microglia) ทำหน้าที่เป็นส่วนหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกันในระบบประสาทส่วนกลาง เป็นเซลล์แมโครฟาจ (macrophage) ชนิดพิเศษที่สามารถเกิดกระบวนการฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) ในการจับกินเซลล์ที่ได้รับบาดเจ็บ หรือของเสียต่างๆที่เกิดขึ้นจากการที่เซลล์ถูกทำลาย (Streit et al., 2004)

2. แอสโตรไซต์ (astrocyte) หรือ แอสโตรเกลีย (astroglia) เป็นเซลล์เกลียที่มีจำนวนมากที่สุดมีหน้าที่ควบคุมสารเคมีต่างๆ ที่อยู่รอบเซลล์ประสาท (Liu et al., 2014)

3. โอลิโกเดนโดรไซต์ (oligodendrocyte) เป็นเซลล์ที่สร้างเยื่อไมอีลิน (myelin sheath) ห่อหุ้มแอกซอนที่อยู่ในระบบประสาทกลาง เยื่อไมอีลินนี้เป็นส่วนเยื่อหุ้มเซลล์ของโอลิโกเดนโดรไซต์ที่ไปล้อมรอบแอกซอนทำให้เกิดเป็นฉนวนไฟฟ้าเป็นผลให้การส่งสัญญาณประสาทเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ (oligodendrocyte. 2014: online)

4. เซลล์อีเพนโดมา (ependymal cell) หรือ อีเพนโดโมไซต์ (ependymocyte) เป็นเซลล์เยื่อบุอยู่ในผนังช่องว่างที่บรรจุน้ำหล่อสมองไขสันหลัง ที่ทำหน้าที่ในการโบกพัดน้ำเลี้ยงสมองและไขสันหลัง (cerebrospinal fluid; CSF) และมีส่วนร่วมในกระบวนการดูดซึมสารต่างๆ เข้าสู่เนื้อเยื่อสมองและไขสันหลัง (ependymal cell. 2014: online)

สมองประกอบด้วยส่วนสำคัญ 9 ส่วน ได้แก่

1. ซีรีบรัม (cerebrum) เป็นส่วนของสมองที่อยู่บนสุดของศีรษะ มีรูปร่างเป็นพุ่มตั้งแต่บริเวณหน้าผากไปตามรูปของกะโหลกศีรษะจนถึงบริเวณท้ายทอย มีขนาดใหญ่ ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของสมองทั้งหมด บริเวณเปลือกนอกจะมีลักษณะเป็นรอยหยัก ส่วนเนื้อสีเทาเป็นที่อยู่ของกระแสประสาทและแกนประสาทที่ไม่มีเยื่อไมอีลินหุ้ม ส่วนชั้นในจะเป็นส่วนเนื้อสีขาวเป็นที่อยู่ของแกนประสาทที่มีเยื่อไมอีลินหุ้ม เป็นศูนย์กลางในการควบคุมพฤติกรรมการเรียนรู้ ความจำ ความวิเคราะห์การใช้เหตุผล เป็นต้น (Krieg, 1946)

สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ส่วนย่อย คือ

1.1 สมองด้านหน้า (Frontal Lobe) อยู่ด้านหน้าติดกับกระดูกหน้าผาก ทำหน้าที่เกี่ยวกับการพูด ความจำ ความคิด ความฉลาด และการสั่งงานไปยังกล้ามเนื้อต่างๆ ได้

1.2 สมองข้างศีรษะ (Parietal Lobe) อยู่ติดกับกระดูกโหนกศีรษะ ทำหน้าที่เกี่ยวกับการรู้สึกตัว การเขียน และมีส่วนช่วยรับความรู้สึกจากส่วนต่างๆ ของร่างกาย

1.3 สมองติดขมับ (Temporal Lobe) อยู่ติดกับกระดูกขมับ ทำหน้าที่เกี่ยวกับการดมกลิ่น การได้ยิน การแปลความหมายของคำพูด การอ่านและความเข้าใจ

1.4 สมองส่วนท้ายทอย (Occipital Lobe) อยู่ติดกับกระดูกท้ายทอย ทำหน้าที่เกี่ยวกับการมองเห็น

2. ซีรีเบลลัม (Cerebellum) ตั้งอยู่บริเวณด้านหลังก่อนไปทางด้านล่างของศีรษะเป็นบริเวณของสมองที่ทำหน้าที่ในการประมวลการรับรู้และสั่งการ ควบคุมการทรงตัวของร่างกาย (Boisgontier and Swinnen, 2014)

3. ทาลามัส (Thalamus) ทำหน้าที่เป็นศูนย์รวบรวมกระแสประสาทที่ผ่านเข้าออกภายในสมอง และแยกกระแสประสาทส่งไปยังสมองส่วนที่เกี่ยวข้องกับกระแสประสาทนั้น (Thalamus. 2014: online)

4. ไฮโปทาลามัส (Hypothalamus) เป็นกลุ่มเซลล์สมองขนาดเล็ก มีหน้าที่สำคัญในการสร้างความสมดุลให้กับระบบการทำงานของร่างกาย ได้แก่ การหายใจ การหลับ การตื่น อัตรการเต้นของหัวใจ ความดันเลือด ปริมาณน้ำตาลในกระแสเลือด และควบคุมความสมดุลในการทำงานของระบบประสาทอัตโนมัติ นอกจากนี้ยังควบคุมแรงขับต่างๆ เช่น ความหิว ความกระหาย ความต้องการทางเพศ (Fliers et al., 2006)

5. ระบบลิมบิก (Limbic system) เป็นเซลล์ประสาทที่กระจายอยู่รอบ ทาลามัส และไฮโปทาลามัส ทำหน้าที่ควบคุมความโกรธ และพฤติกรรมก้าวร้าวของมนุษย์และสัตว์ (Anatomy. 2014: online)

6. สมองส่วนกลาง (Midbrain) อยู่บริเวณใต้ทาลามัส ทำหน้าที่ควบคุมกิริยาตอบสนองฉับพลันของการมองเห็น การได้ยิน การกลอกลูกตา การขยายหรือหรีของม่านตา (Anatomy. 2014: online)

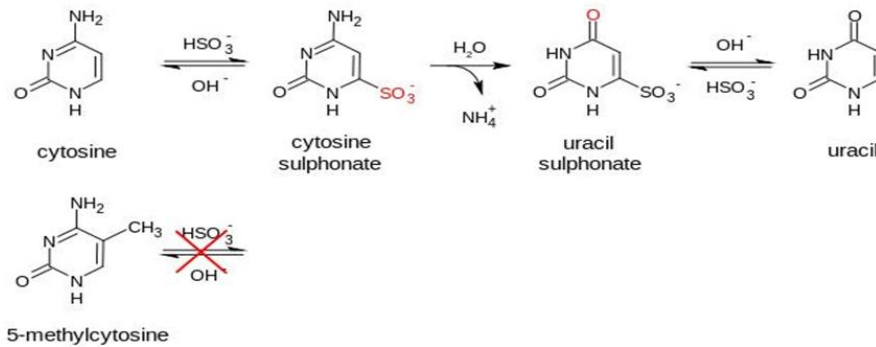
7. พอนส์ (Pons) เป็นส่วนเชื่อมโยงระหว่างสมองส่วนกลางและก้านสมอง ทำหน้าที่ถ่ายทอดสัญญาณจากสมองส่วนหน้าลงมายังซีรีเบลลัม นอกจากนี้ในพอนส์ยังมีศูนย์ควบคุมการหายใจ (pneumotaxic center) ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการเปลี่ยนจังหวะจากหายใจเข้า-ออก มีศูนย์ที่ทำให้ร่างกายหยุดเคลื่อนไหวในขณะนอนหลับ และมีบทบาทในการฝัน (Anatomy. 2014: online)

8. ก้านสมอง (Medulla Oblongata) เป็นส่วนเชื่อมโยงระหว่างพอนส์และไขสันหลัง ทำหน้าที่ควบคุมเกี่ยวกับการหายใจ การเต้นของหัวใจ การบีบตัวของหลอดเลือด และยังควบคุมกิริยาตอบสนองฉับพลัน เกี่ยวกับ การไอ การจาม การอาเจียน การกระพริบตา การขับสารต่างๆ ในทางเดินอาหาร (Anatomy. 2014: online)

9. เรติคิวลาร์ ฟอรัมชัน (Reticular formation) เป็นกลุ่มเซลล์ประสาทบริเวณก้านสมอง ทำหน้าที่ควบคุมสภาวะตื่นตัวของร่างกาย (Anatomy. 2014: online)

Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA)

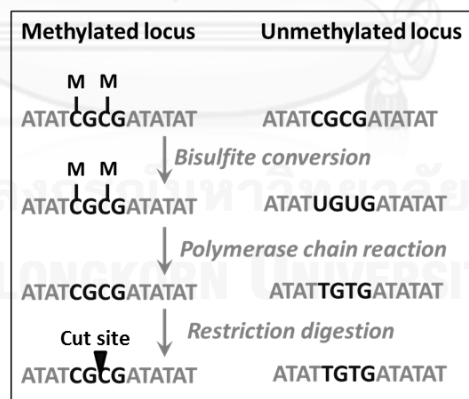
เป็นเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลที่ใช้เพื่อตรวจสอบระดับเมทิลเลชันบนตำแหน่งที่จำเพาะเจาะจงในจีโนม สามารถใช้เพื่อการตรวจวัดในเชิงปริมาณได้ ซึ่งจากการศึกษาทดลองที่ผ่านมา รายงานว่า เทคนิค COBRA เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพ มีความถูกต้องแม่นยำสูง และมีความไวสูง สามารถใช้ได้กับตัวอย่างที่ถูกเก็บไว้ในพาราฟิน (microdisected paraffin-embedded tissue sample) และมีขั้นตอนการดำเนินงานไม่ยุ่งยาก มีการใช้งานอย่างแพร่หลายในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับโรคมะเร็งและด้านกระบวนการเหนือพันธุกรรม (epigenetics) โดยในขั้นตอนการทำประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรก Bisulfite treatment หรือ Bisulfite conversion เป็นการเปลี่ยนเบสไซโตซีนที่ไม่มีหมู่เมทิล (unmethylation cytosine) ให้เป็นเบสยูราซิล (Uracil: U) ด้วยสารโซเดียมซัลไฟต์ (Na₂S) โดยเบสที่เป็นเมทิลเลชันไซโตซีน (methylation cytosine) จะไม่ถูกเปลี่ยนแปลง (Eads and Laird, 2002) แสดงดังรูปที่ 2 ซึ่งเป็นเทคนิคที่จะรักษาตำแหน่งที่เป็นเมทิลเลชันไว้ไม่ให้สูญเสียไปหากต้องผ่านขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR)



รูปที่ 2 กระบวนการ Bisulfite treatment

ที่มา http://en.wikipedia.org/wiki/Combined_bisulfite_restriction_analysis

และขั้นตอนที่สอง คือ bisulfite-specific PCR โดยใช้ดีเอ็นเอที่ได้จากขั้นตอนแรกมาเข้าสู่กระบวนการ PCR จะทำให้ตำแหน่งที่เป็นเบสยูราซิลถูกเปลี่ยนไปเป็นเบสไทมีน (Thymine: T) และตำแหน่งที่เป็นเมทิลเลชันไซโตซีนก็ยังคงเป็นไซโตซีนเช่นเดิม จากนั้นนำผลผลิตที่ได้จากการ PCR เข้าสู่ขั้นตอนที่สาม คือ Restriction Digest คือการวิเคราะห์ตำแหน่งเมทิลเลชันที่สนใจด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เช่น เอนไซม์ BstUI (CGCG) (Xiong and Laird, 1997) ซึ่งแสดงดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 กระบวนการของเทคนิค COBRA ในตำแหน่งที่เป็น methylated และ unmethylated

ยีน EML2 (Echinoderm Microtubule associated protein Like 2)

ยีน EML2 เป็นยีนที่ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 12 ที่ตำแหน่ง q13.32 โดยยังไม่สามารถระบุหน้าที่ได้อย่างแน่ชัดแต่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของไมโครทิวบูล และมีหน้าที่เกี่ยวกับการรับประสาทสัมผัสทางเสียงและการได้ยิน (EML2 Gene protein-coding. 2013: online; EML2 Gene Detail. 2013: online)

การใช้ดีเอ็นเอเมทิลเลชันเพื่อการระบุชนิดของเซลล์ เนื้อเยื่อ อวัยวะ

จากการทบทวนวรรณกรรมในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้ดีเอ็นเอเมทิลเลชันเพื่อการระบุชนิดของเซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะ พบว่าในงานวิจัยที่ผ่านมาจะทำในตัวอย่างประเภทสารคัดหลั่งหรือสารน้ำจากร่างกาย ได้แก่ เลือด เลือดประจำเดือน น้ำลาย น้ำอสุจิ น้ำจากช่องคลอด เป็นต้น โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อหาตำแหน่งดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่จะใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอโดยในการคัดเลือกจะเป็นการเลือกจากหน้าที่การทำงาน (function) เช่น การเลือกยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการที่ต้องการตรวจสอบโดยตรง (Wasserstrom et al., 2013) หรือการเลือกจากตำแหน่ง (position) มักเป็นการเลือกแบบสุ่ม เช่น การเลือกจากตำแหน่งที่เอ็นไซม์ตัดจำเพาะสามารถจดจำได้ (Frumkin et al., 2011) เพื่อใช้กับงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ในการตรวจสอบสารคัดหลั่งเหล่านั้น ซึ่งตามปกติการตรวจสอบสารคัดหลั่งจากร่างกายจะใช้การตรวจสอบโปรตีน แต่ก็เป็นที่ทราบกันว่าโปรตีนจะเสื่อมสภาพได้ง่ายซึ่งจะส่งผลกระทบต่อการศึกษาข้อมูลประกอบแนวทางการดำเนินคดี ดังนั้น การใช้ดีเอ็นเอซึ่งมีคุณสมบัติด้านความเสถียรจะเป็นสิ่งที่ช่วยแก้ปัญหาตัวอย่างเสื่อมสภาพ (Yi et al., 2014) และมีการศึกษาถึงรูปแบบดีเอ็นเอเมทิลเลชันในยีนชนิดเดียวกันในตัวอย่างสารคัดหลั่งที่แตกต่างกัน พบว่ายีนบางตัวแสดงค่าเป็นไฮเปอร์เมทิลเลชันเฉพาะในตัวอย่างชนิดหนึ่ง แต่แสดงค่าเป็นไฮโปเมทิลเลชันในตัวอย่างอื่นๆ จึงเป็นที่มาของข้อสรุปว่า เซลล์ที่มาจากอวัยวะที่แตกต่างกันจะมีรูปแบบดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่แตกต่างกัน (An et al., 2013; Choi et al., 2014; Frumkin et al., 2011)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องมือ

- 1.1 Autoclave (Hydroclave Harvey, USA)
- 1.2 Balance (Precisa, Switzerland)
- 1.3 Centrifuge, refrigerated centrifuge (Beckman, USA)
- 1.4 Centrifuge, microcentrifuge high speed (Fotodyne)
- 1.5 Deep Freeze -20 °C, -80 °C (Revco)
- 1.6 Digital Timer
- 1.7 DNA Thermal cycler 480 (PerkinElmer, Cetus USA)
- 1.8 Electrophoresis chamber set (BIO-RAD, USA)
- 1.9 Freezer -80 °C (Forma Scientific, USA)
- 1.10 Fume Hood (Newlab, USA)
- 1.11 Gel Doc 1000 (BIO-RAD, USA)
- 1.12 Incubator (Mettler, West Germany)
- 1.13 Laminar flow hood (Gelman Science)
- 1.14 Microwave oven
- 1.15 pH meter (Eutech Cybernatics)
- 1.16 Pipette boy (Tecnomara, Switzerland)
- 1.17 Storm 840 and ImageQuaNT software (Molecular dynamic)
- 1.18 Thermo cycler (Touch Down, Hybrid USA)
- 1.19 Thermometer (Precision, Germany)
- 1.20 Vortex mixer (Scientific Industry, USA)

1.21 Water purification equipment (Water pro Ps, Labconco USA)

1.22 Water bath, Thermostat shaking (Heto, Denmark)

2. วัสดุอุปกรณ์

2.1 Beaker : 50 ml, 100 ml, 200 ml, 500 ml, 1,000 ml (Pyrec,USA)

2.2 Cylinder : 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1,000 ml (Pyrex, USA)

2.3 Disposable gloves

2.4 Flash : 250 ml, 500 ml, 1,000 ml (Pyrex,USA)

2.5 Forceps, operation blade

2.6 Glass pipette : 5 ml, 10 ml, 25 ml

2.7 MicrpAmp PCR tube

2.8 Microcentrifuge tube rack (Scientific plastics, USA)

2.9 Parafilm (Amarican National Can, USA)

2.10 Pipette tip : 10 μ l, 200 μ l, 1,000 μ l (AxyGen, USA)

2.11 Plastic wrap

2.12 Reagen bottle : 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1,000 ml (Duran, USA)

2.13 Polypropylene conical tube, sterile : 15 ml, 50 ml (Elkay, USA)

2.14 Sanitary tissue paper (Celox, Thailand)

2.15 Stirring-magnetic bar

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. สารเคมีทั่วไป

1.1 Absolute ethanol (Merck, Germany)

1.2 Acetic acid glacial (Merck, Germany)

- 1.3 Agarose molecular biological grade (Sigma, USA)
- 1.4 Ammonium acetate (Merck, Germany)
- 1.5 Bromophenol blue (USB, Germany)
- 1.6 Chloroform (Merck, Germany)
- 1.7 Diethylpyrocarbonate (DEPC)(Sigma, USA)
- 1.8 Dimethyl sulfoxide (DMSO)(Sigma, USA)
- 1.9 EDTA (USB, Germany)
- 1.10 Ethidium bromide (Gibco BRL, Scotland)
- 1.11 Formaldehyde (Merck, Germany)
- 1.12 Glycine (Amersham Bioscience, Sweden)
- 1.13 Glycogen (USB, Germany)
- 1.14 Hydroquinone (Merck, Germany)
- 1.15 Isopropanol (VWR, France)
- 1.16 Methanol (SK chemicals, Korea)
- 1.17 Nuclease free water (Fermentas, Canada)
- 1.18 Phenol (USB, Germany)
- 1.19 Potassium dihydrogen phosphate (Merck, Germany)
- 1.20 Proteinase K (USB, Germany)
- 1.21 RNase A (DNase-free) (Applichem, Germany)
- 1.22 Sodium metabisulfite (Sigma-aldrich, USA)
- 1.23 Sodium chloride (Merck, Germany)
- 1.24 SYBR green I nucleic acid gel stain (Lonza, USA)
- 1.25 Tris (Tris[hydroxymethyl] aminomethane) (Omnipur, Germany)
- 1.26 TritonX 100 (Bio-RAD, USA)

- 1.27 Trizol reagent (Invitrogen, USA)
- 1.28 Trypan blue (Sigma, USA)
- 1.29 Trypsin EDTA (Gibco, USA)
- 1.30 Tris base (USB, USA)
- 1.31 10 base pair DNA ladder (Promega, USA)
- 1.32 25 base pair DNA ladder (Promega, USA)
- 1.33 100 base pair DNA ladder (Promega, USA)
- 1.34 1K base pair DNA ladder (Promega, USA)

2. สารเคมีสำหรับทำ PCR

- 2.1 10X PCR buffer (Qiagen, Germany)
- 2.2 25mM Magnesium chloride (Qiagen, Germany)
- 2.3 10mM Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs)
- 2.4 Oligonucleotide primers (Biodesign, Thailand)
- 2.5 Hot start Taq DNA polymerase (Qiagen, Germany)

3. สารเคมีที่ใช้ในการตัดดีเอ็นเอ

- 3.1 BstUI
- 3.2 Buffer II

4. ชุดสารเคมีสำเร็จรูปที่ใช้ในงานวิจัย

- 4.1 Fast Plasmid Minikit
- 4.2 EZ-DNA methylation-Gold kit
- 4.3 MiniElute Gel Extraction

ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

1. รวบรวมและคัดเลือกข้อมูลค่าดีเอ็นเอเมทิลเลชันในอวัยวะต่างๆของมนุษย์

คณะวิจัยได้ค้นหาและรวบรวมข้อมูลที่เป็นค่าเมทิลเลชันตัวอย่างในอวัยวะต่างๆของมนุษย์ โดยใช้ฐานข้อมูล GEO dataset (Gene expression omnibus database) ที่รายงานไว้ใน National Center for Biotechnology Information (NCBI) ซึ่งเป็นฐานข้อมูลของงานทดลองที่ใช้ไมโครแอรเรย์ในการวัดผล จากการใช้เทคนิคดังกล่าวจึงทำให้ได้ข้อมูลที่มีคุณภาพความน่าเชื่อถือจำนวนมาก โดยคณะวิจัยได้เลือกค้นหาข้อมูลงานทดลองที่ใช้เทคนิคเมทิลเลชันไมโครแอรเรย์จากชุดตรวจชนิด Infinium® HumanMethylation 27 BeadChip Kit (Illumina) ด้วยเหตุผลคือ มีจำนวนข้อมูลมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดตรวจไมโครแอรเรย์ ชนิดอื่นในฐานข้อมูล GEO dataset และจากการค้นหาข้อมูลที่มีการรายงานไว้ในระหว่างวันที่ 18 สิงหาคม 2552 จนถึง 31 ธันวาคม 2555 ได้ข้อมูลงานทดลองจำนวน 172 GSE (Genomic spatial event database) หรือ 172 งานทดลอง ซึ่งชุดตรวจไมโครแอรเรย์ชนิดนี้สามารถตรวจวัดตำแหน่งซีพีจี ได้จำนวน 27,578 ตำแหน่งครอบคลุมตำแหน่งซีพีจีทั่วทั้งจีโนมของมนุษย์ แต่ในการคัดเลือกข้อมูลจากจำนวนทั้งหมด 172 งานทดลอง คณะวิจัยได้ทำการคัดแยกงานทดลองที่ทำในเซลล์ไลน์ (cell line) สเต็มเซลล์ (stem cell) เนื้อเยื่อที่ก่อโรค และเนื้อเยื่อที่ไม่ใช่มนุษย์ออก และคัดเลือกเพื่อใช้ข้อมูลจากงานทดลองที่ทำในเนื้อเยื่อปกติของมนุษย์ ซึ่ง GEO dataset ที่ถูกคัดเลือกล้วนมีจำนวนทั้งหมด 39 งานทดลอง ประกอบด้วย GSE19711, GSE20067, GSE20080, GSE20712, GSE21232, GSE22249, GSE22595, GSE22867, GSE25062, GSE25706, GSE25869, GSE26033, GSE26126, GSE26989, GSE27130, GSE27284, GSE27899, GSE28746, GSE29490, GSE30229, GSE30601, GSE30760, GSE31788, GSE31835, GSE31979, GSE32867, GSE33065, GSE33510, GSE34008, GSE34355, GSE35146, GSE36002, GSE36166, GSE36194, GSE36353, GSE36637, GSE37988, GSE41037 และ GSE42510 จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ทั้งหมดนี้ไปสร้างเป็นฐานข้อมูลของค่าเมทิลเลชันเฉลี่ยในอวัยวะต่างๆ

1.1 การสร้างฐานข้อมูลดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation database)

นำข้อมูลที่ได้จาก GEO dataset จำนวน 39 งานทดลอง และข้อมูลที่ได้รับความสะดวกเพื่อจาก Professor Kevin L Gunderson (Bibikova et al., 2009) ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CU-DREAM เพื่อคำนวณค่าเมทิลเลชันเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง ของแต่ละงานทดลองบนตำแหน่งซีพีจีเมทิลเลชันแต่ละตำแหน่ง จากนั้นรวบรวมข้อมูลที่ได้มาจัดเรียงลงในโปรแกรม Microsoft Excel เพื่อสร้างเป็นฐานข้อมูลของดีเอ็นเอเมทิลเลชันของอวัยวะต่างๆ จำนวน 22 ชนิดประกอบด้วย กระจก ไขกระดูก เลือด สมอง ปอด เต้านม หัวใจ ตับ ม้าม กระเพาะอาหาร ลำไส้ ไต ตับอ่อน ต่อมหมวกไต ต่อมลูกหมาก ปากมดลูก ผิวหนัง

กล้ามเนื้อ น้ำลาย เยื่อบุกระเพาะปัสสาวะ รังไข่ อัณฑะ โดยในการจัดเรียงจะจัดให้กลุ่มอวัยวะชนิดเดียวกันอยู่ในคอลัมน์ติดกัน เพื่อให้สามารถอ่านค่าเมทิลเลชันในตำแหน่งซีพีจีต่างๆได้เป็นกลุ่มอวัยวะ

1.2 การสร้างกราฟค่าเมทิลเลชันของซีพีจีแต่ละตำแหน่ง

ไฟล์ฐานข้อมูลดีเอ็นเอเมทิลเลชันจะถูกแปลงไฟล์จาก Microsoft Excel (.xls) เป็น Notepad (.txt) ในขั้นตอนนี้ จากนั้นใช้โปรแกรมอาร์ (R Program) เพื่อการสร้างกราฟแสดงค่าเมทิลเลชัน โดยการใช้การเขียนคำสั่งให้กับโปรแกรมดังรูปที่ 4 ซึ่งผลจากคำสั่งจะได้กราฟทั้งหมด 27,578 กราฟ ตามจำนวนซีพีจี ของชุดตรวจ Infinium Human Methylation 27 Bead Chip Kit

```

R C:\Ardata\exGraph_2.R - R Editor
read = read.table("gene_ex.txt", sep = "\t", head = TRUE)
ex = read
rownames(ex) = read[,1]
ext = t(ex)

x_len = length(ext[,1])
cg_len = length(ext[1,])

for (i in 1:cg_len) {
  png(paste(paste('exGraph/plot', i, sep = "_"), 'png', sep = "."), width = 1600, height = 800)
  plot(ext[3:(x_len-2),i], type="line",
        main = ext[1:2,i],
        xlab = "",
        ylab = "exp",
        ylim = c(0,1),
        axes = FALSE )
  axis(side = 1, at = 1:(x_len-4), labels= rownames(ext)[3:(x_len-2)], las=2, adj=1, cex.axis=1)
  axis(side = 2)
  dev.off()
}

```

รูปที่ 4 คำสั่งเพื่อใช้สร้างกราฟด้วยโปรแกรมอาร์จากฐานข้อมูล

2. ประชากร

2.1 กลุ่มประชากรตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้ใช้ตัวอย่างเนื้อเยื่อจากอวัยวะต่างๆ จำนวน 18 อวัยวะ เป็นตัวอย่างที่ได้รับอนุญาตให้ใช้เพื่องานวิจัย และการศึกษาได้ผ่านการพิจารณาจริยธรรมในมนุษย์ ได้รับเอกสารรับรองโครงการวิจัยโดยคณะกรรมการจริยธรรมและวิจัย ของโรงพยาบาลตำรวจ เลขที่หนังสือรับรอง จว 74/2556 โดยเก็บตัวอย่างจากศพ 15 ศพ ประกอบด้วย 2 กลุ่มประชากรตัวอย่าง คือ

1. กลุ่มตัวอย่างเนื้อเยื่อที่เก็บไว้ในพาราฟินบล็อก (Paraffin blocks) ที่ได้มาจากการตรวจศพ (Autopsy) ของงานตรวจชันสูตร กลุ่มงานนิติพยาธิ สถาบันนิติเวชวิทยา โรงพยาบาลตำรวจ สำนักงานตำรวจแห่งชาติ

2. กลุ่มตัวอย่างชันสูตรที่ได้จากการตรวจศพของกลุ่มงานนิติพยาธิ สถาบันนิติเวชวิทยา โรงพยาบาลตำรวจ สำนักงานตำรวจแห่งชาติ

กลุ่มประชากรตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีจำนวนทั้งหมด 106 ตัวอย่าง แบ่งเป็นตัวอย่างจากพาราฟินบล็อก ที่เก็บจากศพ 2 ศพ จำนวน 16 ตัวอย่าง และตัวอย่างชันสูตรที่เก็บจากศพ 13 ศพ จำนวน 90 ตัวอย่าง ใน 18 อวัยวะ ได้แก่ สมอง ไต ตับ ปอด หัวใจ ม้าม ตับอ่อน กระเพาะอาหาร ผิวหนัง ฤๅษน้ำดี ลิ้น ลำไส้เล็ก ต่อมทอมซิล ไส้ติ่ง ไชกระดูก กล้ามเนื้อ เส้นเลือดใหญ่ เส้นประสาท

2.2 เกณฑ์การคัดเลือกตัวอย่าง

ในการคัดเลือกตัวอย่างในส่วนของกลุ่มตัวอย่างจากชันสูตรมีเกณฑ์คัดเลือกตัวอย่างคือ เลือกเก็บตัวอย่างจากศพที่มีระยะเวลาการตายจนถึงชันสูตรชันสูตรไม่เกิน 24 ชั่วโมงโดยสังเกตจากศพจะอยู่ในสภาพแข็งที่หลังตาย (rigor mortis) ศพที่เลือกเก็บตัวอย่างนั้นต้องไม่ผ่านการฉีดน้ำยาฟอร์มาลินมาก่อน และเกณฑ์ในการคัดเลือกข้อสุดท้ายจะเป็นเกณฑ์ที่ใช้ทั้งในการคัดเลือกตัวอย่างชันสูตร และตัวอย่างจากพาราฟินบล็อก คือเนื้อเยื่อจากอวัยวะต่างๆ ที่เลือกเก็บต้องเป็นเนื้อเยื่อปกติ ไม่เป็นโรค โดยใช้ข้อมูลประกอบการคัดเลือกจากความเห็นของแพทย์นิติเวชผู้ตรวจชันสูตรศพ และข้อมูลสาเหตุการตาย อย่างไรก็ตาม ตัวอย่างทั้งหมดจะผ่านการตรวจยืนยันทางกล้องจุลทรรศน์ โดยผู้เชี่ยวชาญทางพยาธิวิทยาอีกครั้ง เก็บตัวอย่างจากศพทั้งในเพศชายและเพศหญิง ในช่วงอายุระหว่าง 20-50 ปี

ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อสดจากกลุ่มงานนิติพยาธิ สถาบันนิติเวชวิทยา โรงพยาบาลตำรวจ เป็นการเก็บแบบปกปิด (Blind technique) ชนิดของเนื้อเยื่อจากอวัยวะ โดยจะใช้รหัสระบุไว้ที่ภาชนะเก็บตัวอย่างเพื่อป้องกันความลำเอียง ในการแปลผล แต่จะมีข้อมูลรายละเอียดระบุไว้ในเอกสารการเก็บตัวอย่างเพื่อการตรวจสอบผลย้อนกลับ ซึ่งประกอบด้วย วันเดือนปี ที่ทำการเก็บตัวอย่าง สาเหตุการตาย ระยะเวลาการตาย ชนิดของเนื้อเยื่อและมีข้อกำหนดในการคัดเลือกชนิดอวัยวะที่จะดำเนินการเก็บคือ ใน 1 ศพ จะเก็บตัวอย่างอวัยวะ 10 ชนิดเป็นอวัยวะที่สำคัญต่อการมีชีวิตร 5 ชนิด ได้แก่ สมอง หัวใจ ไต ตับ ปอด จากนั้นจึงเก็บตัวอย่างจากอวัยวะหรือเนื้อเยื่ออื่นๆคละเคล้ากันไป นำตัวอย่างจากทั้งสองกลุ่มเข้าสู่กระบวนการสกัดดีเอ็นเอ

3. การสกัดดีเอ็นเอ

3.1 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างก่อนการสกัดของกลุ่มตัวอย่างเนื้อเยื่อในพาราฟิน

3.1.1 ตัดตัวอย่างเนื้อเยื่อในพาราฟินบล็อกด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ Microtome ใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml

3.1.2 เติม Xylene 1 ml เพื่อละลายพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อ vortex บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นดูดของเหลวทิ้ง ทำขั้นนี้ซ้ำ 2 ครั้ง

3.1.3 เติม 100% Ethanol 500 μ l vortex ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 rpm ดูดของเหลวทิ้ง ทำขั้นนี้ซ้ำ 2 ครั้ง

3.1.4 ใตเนื้อเยื่อที่พร้อมเข้าสู่ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ

3.2 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างก่อนการสกัดของกลุ่มตัวอย่างชิ้นเนื้อสด

โดยใช้มีดผ่าตัดทำการตัดแบ่งตัวอย่างชิ้นเนื้อสดของอวัยวะต่างๆ มาขนาด 0.5x0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร จากนั้นหั่นชิ้นเนื้อนั้นให้ละเอียดใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml นำตัวอย่างจากทั้งสองกลุ่ม (3.1 และ 3.2) เข้าสู่กระบวนการสกัดดีเอ็นเอด้วย Phenol chloroform

3.3 ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอด้วย Phenol chloroform

3.3.1 เติม Lysis buffer II + SDS 10 % ปริมาตร 500 μ l และ Proteinase K 30 μ l จากนั้นนำหลอดไปบ่มไว้ที่ water bath ตั้งอุณหภูมิ 50°C ที่งไว้ข้ามคืน หรือจนกว่าตัวอย่างจะถูกย่อยจนหมด

3.3.2 เมื่อตัวอย่างเนื้อเยื่อถูกย่อยจนหมดจึงเติม Phenol chloroform ปริมาตร 500 μ l ปั่นที่ปั่นเหวี่ยงตกตะกอน ความเร็ว 12,000 rpm 5 นาที ดูดส่วนใส ด้านบน (supernatant) ทั้งหมด ใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml หลอดใหม่

3.3.3 เติม 10 M แอมโมเนียอะซีเตต ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) 250 μ l และ Ethanol 100% 500 μ l ผสมเบาๆ ด้วยการจับหลอดคว่ำขึ้น-ลง จำนวน 4-5 ครั้ง เก็บที่ -20°C ทิ้งไว้ข้ามคืนเพื่อ ตกตะกอนดีเอ็นเอ

3.3.4 ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 14,000 rpm 15 นาที แล้ว เทของเหลวด้านบนทิ้ง

3.3.5 เติม 70% ethanol 500 μ l ปั่นตกตะกอนที่ 14,000 rpm 15 นาที เท ethanol ทิ้ง

3.3.6 นำหลอด microcentrifuge ที่มีดีเอ็นเออยู่ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ ethanol ระเหยออกไปให้หมดจนแห้ง

3.3.7 เติมน้ำกลั่นลงไป 20-50 μ l นำไปบ่มไว้ใน water bath ที่อุณหภูมิ 50°C เพื่อให้ดีเอ็นเอละลายรวมกับน้ำ

3.3.8 จะได้ดีเอ็นเอที่ละลายอยู่ในน้ำ 20-50 μ l อยู่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml (เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C)

3.4 การตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ด้วยเครื่องวัดปริมาณ ความเข้มข้นสารปริมาณน้อยโดยแรงตึงผิว (Nanodrop spectrophotometer: NanodropND-1000,USA)

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้เนื้อเยื่อของอวัยวะต่างๆ จากทั้ง 2 กลุ่มตัวอย่าง (กลุ่มตัวอย่างขึ้นเนื้อจากพาราฟินบล็อก และกลุ่มตัวอย่างขึ้นเนื้อสด) มาตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ด้วยเครื่องวัดปริมาณความเข้มข้นสารปริมาณน้อยโดยแรงตึงผิว ที่ใช้ปริมาณสารละลายดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร/ตัวอย่าง/ครั้ง โดยทำการวัดที่ค่าการดูดซับแสง (Absorbance) ที่ความยาวช่วงแสง 260 นาโนเมตร (A_{260}) ซึ่งหน่วยความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่วัดได้คือ นาโนกรัม/ไมโครลิตร ส่วนความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้จะดูจากสัดส่วนการดูดซับแสงของตัวอย่างที่ความยาวช่วงแสง 260 นาโนเมตร (A_{260}) และ 280 นาโนเมตร (A_{280}) ซึ่งหากดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์สูง ควรมีค่าเท่ากับ 1.8 ($A_{260}/A_{280} = 1.8$) หากค่าสัดส่วนที่ได้มีค่าน้อยกว่า 1.8 แสดงว่าผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มีการปนเปื้อนจากโปรตีน Phenol

chloroform หรือสารเคมีอื่นๆ

4. การศึกษาดีเอ็นเอเมทิลเลชันของ ตำแหน่ง cg03096975 ในยีน EML2 ด้วยวิธีการ Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA-EML2)

4.1 Bisulfite treatment

หลักการคือ เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดจากเนื้อเยื่อของอวัยวะต่างๆ มาเติมสาร sodium bisulfite โดย sodium bisulfite มีคุณสมบัติในการเปลี่ยนเบสไซโตซีนให้เป็นยูราซิลแต่จะไม่เปลี่ยนเมทิลเลชันไซโตซีน (methycytosine; mC) ดังนั้น ตำแหน่งที่เป็นเมทิลเลชันไซโตซีนจึงยังคงสภาพเช่นเดิม โดยในการดำเนินงานใช้ชุดอุปกรณ์และสารเคมีสำเร็จรูป EZ DNA methylation (Zymo research, Orange, CA, USA) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

- เตรียมสาร CT Conversion โดยใส่น้ำกลั่น 900 μ l, M-Dilution 300 μ l และ M-Dissolving 50 μ l เขย่าให้เข้ากัน 10 นาที
- เติม CT Conversion 130 μ l ในหลอดที่มีดีเอ็นเอ ความเข้มข้น 750 ng/ μ l ปริมาณ 20 μ l
- ขั้นตอนการเตรียมดีเอ็นเอ โดยต้องการความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 750 ng/ μ l ในปริมาตรรวม distilled water 20 μ l
- นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 98 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 10 นาที ,64 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง
- เติม M-Binding buffer 600 μ l ลงใน column ที่บรรจุลงใน collection tube และ pipette ดีเอ็นเอที่เก็บไว้ลงไปผสมรวม
- ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็วเต็มที่ (>10,000 rpm) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที ทิ้งสารใน collection tube
- เติม M-Wash buffer 100 μ l ลงใน column ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็วเต็มที่เป็นเวลา 30 วินาที
- เติม M-Desulphonation 200 μ l ลงใน column บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่อุณหภูมิห้องความเร็วเต็มที่เป็นเวลา 30 วินาที
- เติม M-Wash buffer 200 μ l ลงใน column ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็วเต็มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 วินาที
- ทิ้งสารใน collection tube และย้าย column มาใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml ใหม่ แล้วเติม M-Elution buffer 10 μ l ลงตรงกลาง column ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็วเต็มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 วินาที ดีเอ็นเอที่ได้สามารถนำไปใช้งานได้ทันที หรือเก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 $^{\circ}$ C เพื่อรอใช้งานต่อไป

4.2 การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

หลักการคือ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายคู่ในหลอดทดลองอย่างต่อเนื่องเป็นลูกโซ่ โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ DNA polymerase ที่ทนความร้อนและ dNTP ในส่วนประกอบสารละลายที่เหมาะสม โดยนำดีเอ็นเอที่ผ่านขั้นตอน Bisulfite treatment ไปเพิ่มจำนวนโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับส่วน cg03096975 ในยีน EML2

4.2.1 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับ cg03096975 ของยีน EML2 ออกแบบไพรเมอร์ด้วยข้อมูลลำดับเบสที่อยู่ติดกับ CpG ตำแหน่งจำเพาะที่คัดเลือกมา นั่นคือ ตำแหน่ง cg03096875 ของยีน EML2 เพื่อการตรวจสอบยืนยันข้อมูลที่ได้จาก ฐานข้อมูลดีเอ็นเอเมทิลเลชัน ที่สร้างขึ้น ในการ ทดสอบการเกิดเมทิลเลชันของตำแหน่งดังกล่าวว่ามีความจำเพาะต่อเนื้อเยื่อสมองเท่านั้นหรือไม่ โดยการออกแบบไพรเมอร์อ้างอิงลำดับ sequence จากไฟล์ GPL8490-65 จะออกแบบไพรเมอร์ 2 เส้น คือ สาย Forward และ Reverse ของเส้นดีเอ็นเอแม่แบบ วิธีการออกแบบมีดังนี้

- พิจารณาลำดับ sequence ของยีน EML2 ในส่วนที่มีตำแหน่ง cg03096875 อยู่ คือเป็นตำแหน่งที่ probe มีการตรวจวัด เลือกส่วน 200 bp upstream และ 200 bp downstream
- นำลำดับ sequence ที่เลือกมาใส่ในโปรแกรม Text editor
- เปลี่ยนเบส CG ให้เป็น XY แล้วเปลี่ยน C ให้เป็น T สุดท้ายเปลี่ยน XY กลับเป็น CG อีกครั้งก็จะได้ bisulfite sequence
- ออกแบบไพรเมอร์ให้ครอบคลุมตำแหน่ง cg03096875 โดยหลีกเลี่ยงไม่ให้มีเบส CG อยู่หากหลีกเลี่ยงไม่ได้ให้ใช้ Y ในกรณีที่ไพรเมอร์จะต้องจับกับเบส C หรือ T และ R ในกรณีที่ไพรเมอร์จะต้องจับกับเบส A หรือ G แทน

จากนั้นการออกแบบไพรเมอร์ได้ใช้โปรแกรม OligoCalcบนเว็บไซต์ <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligoCalc.html> เพื่อตรวจสอบอุณหภูมิและความหนาแน่นของเบสซีจี (CG content) ของไพรเมอร์แต่ละเส้น

CGTTATTCGTCGTTATGAGTAGTTT¹TGGAGTTGGGTGAGATTTTTTCGTAGA
 TTATTTTTATTTTTTTTTTCGCGTTTCGGGGTTTAGATTTTAGGTTTTATTTAAT
TTTTGGGATTTAGATCGG²

รูปที่ 6 แสดงการออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการตรวจสอบตำแหน่ง cg03096875
 ของยีน EML2

โดยบริเวณที่ขีดเส้นใต้คือ ตำแหน่ง probe ของชุดตรวจชนิด Infinium Human
 Methylation 27 Bead Chip Kit

เบส CG คือ ตำแหน่ง cg03096875

Sequence ส่วน ตัวเอียง1 คือ Forward primer 5'YGTATTYGTYGTTATGAGTAGTTT 3'

Sequence ส่วน ตัวเอียง2 คือ Reverse primer 5'CCRATCTAAATCCCCAAAATTAATA 3'

ส่วนผสมในการทำ PCR

- 10mM dNTP	0.2 µl
- 10X buffer	1 µl
- 25mM MgCl ₂	0.4 µl
- 20 µM Forward primer	0.15 µl
- 20 µM Reverse primer	0.15 µl
- Hot Start Taq. DNA polymerase enzyme	0.1 µl
- น้ำกลั่น	6.7 µl
- ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ผ่านกระบวนการไบซัลไฟต์ทรีทเมนท์	1 µl

อุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในการทำ PCR

- Pre-denaturation	95°C	15 นาที
- Denaturation	95°C	45 วินาที
- Annealing	52°C	45 วินาที
- Extension	72°C	45 วินาที

ทำซ้ำขั้นตอน Denaturation-Extension 45 รอบ

- Final extension	72°C	7 นาที
-------------------	------	--------

ดำเนินปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) ตามสภาวะการณ์ทำปฏิกิริยาตามที่กำหนด

4.3 ตรวจสอบ ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน โดยการทำให้ Restriction Enzyme Analysis

เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือ BstUI ซึ่งเป็น Type II restriction enzyme จะตัดดีเอ็นเอ สายคู่ที่ตำแหน่งที่มีลำดับเบสจำเพาะเจาะจง สำหรับเอนไซม์นั้นๆ ซึ่งคือตำแหน่ง CGCG โดยตัดภายในลำดับเบสนั้น ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้

- BstUI	0.2 µl
- Buffer II	1.0 µl
- น้ำกลั่น	0.8 µl

จากนั้นเติม mineral oil 1 หยด แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60°C ซ้ำมคืน

4.4 การวิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอในตำแหน่งที่สนใจที่เพิ่มจำนวนได้ด้วยเทคนิค COBRA-EML2 ด้วยกระบวนการ เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

แยกความแตกต่างของขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้และผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้ว ด้วยสนามไฟฟ้าที่เคลื่อนจากขั้วลบไปยังขั้วบวก (electrophoresis) ผ่าน polyacrylamide gel ความเข้มข้น 8% ซึ่งมีส่วนประกอบ ดังนี้

- 40% acrylamide	2 ml
- TEMED	10 μ l
- 10% APS	100 μ l
- 10X TBE	1 ml
- น้ำกลั่น	7 ml

ในสารละลาย 1% TBE buffer โดยนำผลผลิตจากการทำ PCR จำนวน 10 ไมโครลิตร มาผสมกับสี 6x Loading formamide dye buffer ที่ใช้บอกระยะทาง จำนวน 3 ไมโครลิตร แล้วนำมาใส่ในหลุมบน polyacrylamide gel เมื่อใส่ตัวอย่างดีเอ็นเอจนหมด ให้ใส่ดีเอ็นเอ ความเข้มข้นมาตรฐาน 25 bp DNA ladder (Biolabs) (0.5 μ g/ μ l) ปริมาณ 0.5 μ l /หลุมผสมกับสี 6x Loading formamide dye buffer ลงไปในช่องแรกเพื่อใช้บอกขนาดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ แล้วนำไปให้กระแสไฟฟ้า 130 โวลต์เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลไปแช่ใน 1X TBE ที่ผสม SYBR Green เป็นเวลา 40 นาที แล้วจึงนำเจลไปตรวจสอบผลด้วยเครื่อง Storm 840 and โดยใช้ซอฟต์แวร์ ImageQuaNT software (Molecular dynamic) เพื่อตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ โดยผลที่เป็น methylated bands จะมีขนาด 73 และ 53 bp ส่วน unmethylated band จะมีขนาด 126 bp

5. การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) ของตำแหน่ง cg03096975 ยีน EML2

5.1 การเตรียมดีเอ็นเอสำหรับการโคลน

นำดีเอ็นเอที่ต้องการหาลำดับนิวคลีโอไทด์มาทำการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR สำหรับขั้นนี้คณะวิจัยเลือกทำในอวัยวะที่จำเป็นต่อการมีชีวิต 5 อวัยวะ คือ สมอง หัวใจ ไต ตับ ปอด เมื่อได้ PCR product แล้ว จะตรวจขนาดของ PCR product ด้วยเทคนิค เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

5.1.1 การตรวจขนาดดีเอ็นเอโดยวิธี agarose gel electrophoresis

- เตรียม agarose gel 1% โดยละลายเจลใน 1X TAE buffer ต้มให้ละลายโดยใช้ microwave
- เท agarose gel ลงใน gel chamber ที่วาง comb เพื่อให้เกิด well แล้วปล่อยให้แข็งตัวอย่างน้อย 30 นาที

- นำ gel ที่ตั้ง comb ออกแล้วมาวางลงใน gel chamber แล้วเติม 1X TAE buffer ลง ทั้ง 2 ข้างของ gel chamber
- ผสมดีเอ็นเอทั้งหมดกับ 6x Loading formamide dye buffer 3 μ l ให้เข้ากันแล้วเติมลงในแต่ละ well ของ gel โดยเปรียบเทียบกับ 25 bp DNA ladder (Biolabs)
- ทำการ run agarose gel electrophoresis ที่ 130 V เป็นเวลา 45 นาที
- จากนั้นนำแผ่น gel มาย้อมด้วย SYBR Green เป็นเวลา 30 นาที ส่องดูภายใต้แสง UV (UV transilluminator GENE FLASH Syngene Bio Imaging)

5.1.2 การเตรียมดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์จากเจล โดยชุดสกัดสำเร็จรูป MinElute Gel Extraction kit (QIAGEN, Germany)

ตัดเจลภายใต้แสง UV ด้วยมีดผ่าตัดที่สะอาด ตัดชิ้น PCR product ที่ได้จาก COBRA-EML2 โดยไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ BstUI ใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml และแยกระหว่าง อวัยวะ จากนั้นทำการสกัด PCR product ออกจากเจลโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป MinElute Gel Extraction kit (QIAGEN, Germany)

- ชั่งน้ำหนักเจลเติม QG buffer ลงไปปริมาตรเป็น 3 เท่าของน้ำหนักเจล (เช่น เจล 100 mg เติม 100 μ l)
- นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกว่า agarose gel จะละลาย ระหว่างนั้นให้นำมา vortex ทุกๆ 2-3 นาที
- เมื่อเจลละลายหมด ทำการตรวจสอบสีของสารผสม โดยจะต้องมีสีเหลืองเหมือน QG buffer หากเป็นสีส้ม หรือสีม่วง ให้เติม 3M sodium acetate ลงไปครั้งละ 10 μ l จนกว่าสารผสมจะเป็นสีเหลือง (pH 5.0)
- เติม isopropanol 1 เท่า ของน้ำหนักเจล
- เตรียม QIAquick spin column
- ย้ายสารผสมลงไปใน QIAquick spin column

- นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใส ใน collection tube ที่ตั้ง
- เติม QG buffer 500 μ l ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที
- เติม PE buffer 750 μ l ลงใน QIAquick spin column ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
- เทของเหลวใน column ที่ตั้ง แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
- ย้ายส่วน ของ QIAquick column ใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ เติม EB buffer 50 μ l ลงตรงกลาง QIAquick membrane
- ปั่นเหวี่ยงตกตะกอน ที่ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ $^{\circ}$ 4C เป็นเวลา นาที 1
- ได้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ เก็บที่อุณหภูมิ -20° C

5.2 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้ากับ pGem-T Easy vectors (Promega, USA) (Ligation) ก่อนทำการ ligation นำ PCR Product ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์แล้ว มาทำการเชื่อมต่อดีเอ็นเอ โดยเติมสารต่างๆ ดังต่อไปนี้

2X Ligation buffer	5 μ l
pGEM ®T easy vector	1 μ l
PCR purified	3 μ l
T4 ligase	1 μ l
Total volume	10 μ l

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันใน หลอด PCR ขนาด 0.2 ml แล้วนำไปป่มที่ อุณหภูมิ 4° C ค้างคืน

5.3 การถ่ายโอนยีนโดยวิธี Transformation

- เตรียมแช่ competent cell ในน้ำแข็งประมาณ 5 นาที

- จากนั้นเตรียมหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml เพื่อผสม ligation (จากข้อ 6.2) ปริมาตร 5 μ l กับ competent cells (50 μ l) ด้วย pipette
- นำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที
- นำไปป้อนที่อุณหภูมิ 42 °C (heat shock) 60 วินาที แล้วนำมาแช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 5 นาที
- เติม SOC medium 950 μ l ผสมให้เข้ากัน นำไป incubate อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 40 นาทีจากนั้นเขย่าอีก 90 นาที
- นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์เป็นเวลา 5 วินาที ตูด SOC medium ออกเหลือประมาณ 50-100 μ l ผสมตัวเซลล์กับ SOC medium ที่เหลือให้เข้ากันแล้วตูดทั้งหมด หยดลงบน LB plate ที่มี ampicillin/IPTG/X-Gal และทำการ spread plate
- นำไปป้อนที่อุณหภูมิ 37°C ค้างคืน
- คัดเลือก colony สีขาวจาก LB plate และใช้ไม้จิ้มฟันที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วแตะ colony มาจุ่มในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml ที่มีน้ำกลั่นอยู่ 40 μ l
- แบ่งทำ PCR 3 μ l ที่เหลือนำมาใส่ในหลอดทดลอง ขนาด 15 ml ที่มีอาหารเหลว LB + Ampicillin อยู่ 3 ml นำไปป้อน ที่ 37 °C ค้างคืน

5.4 การตรวจสอบหา insert product ใน plasmid โดยวิธี Colony PCR

- ใช้ไพรเมอร์ M13 ในการทำ PCR ซึ่งมีลำดับเบส

Forward	5' GTAAAACGACGGCCAG 3'
Reverse	5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'

Master Mix

DEPC-DW	12.7 μ l
0X Buffer	2 μ l
25mM MgCl ₂	1.2 μ l
10mM dNTPs	0.4 μ l

20 μ M Primer M13F	0.3 μ l
20 μ M Primer M13R	0.3 μ l
Taq DNA polymerase (5U)	0.1 μ l
picked colony	3 μ l

ตั้งโปรแกรมปฏิกิริยา PCR ดังนี้

Pre denature 94°C	5 นาที
Denature 94°C	45 วินาที
Annealing 50°C	45 วินาที
Extention 72°C	1 นาที
Final extention 72°C	10 นาที
ทำซ้ำขั้นตอน Denaturation-Extention	35 รอบ

- เก็บ PCR product ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4°C
- ตรวจสอบขนาดของ PCR product โดยวิธี agarose gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับ 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA)
- นำโคลนนิ่งของแบคทีเรียที่มีชิ้นส่วนของ insert ไปทำการสกัด plasmid

5.5 การสกัด plasmid โดย Manual Fast Plasmid™ Mini Kit (5prime, USA)

- เลี้ยง transformant ที่ได้จากข้อ 6.3 ในอาหาร LB broth ที่มี Ampicillin (0.1 mg/ml)
- 3 ml นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C ข้ามคืน
- ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ที่เลี้ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที รินส่วนที่เป็น LB broth ออกโดยระมัดระวังส่วนของเซลล์ที่ตกตะกอนอยู่
- เติม Lysis solution ที่เย็นปริมาตร 400 μ l นำไป vortex ที่ความแรงสูงสุด 30 วินาที
- ปั่นที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที

- ย้ายเซลล์ที่ผสมอยู่กับ Lysis solution ไปใส่ใน Spin Column Assmby
- ปั่นเหวี่ยง Spin Column Assmby ที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 30-60 วินาที
- เติม DILUTED Wash Buffer ปริมาตร 400 μ l ลงใน Spin Column Assembly
- ปั่นเหวี่ยง Spin Column Assembly ที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 30-60 วินาที
- เทของเหลวในส่วน waste tube ที่ต่อกับ Spin Column ทิ้ง แล้วปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
- นำส่วนของ Spin Column ใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml หลอด ใหม่
- เติม elution buffer 50 μ l ลงตรงกลาง Spin Column
- ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ 14,000 เป็นเวลา 1 นาที เอา Spin Column ออก
- ได้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ ที่สามารถใช้ได้ทันที หรือเก็บที่อุณหภูมิ -20°C

5.6 การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิต PCR

นำผลผลิตจากการทำ PCR มาทำการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) ที่บริษัท Bioneer ประเทศเกาหลีใต้ จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับกรดอะมิโนที่มีรายงานไว้ใน National Center for Biotechnology Information (NCBI)

6. การตรวจสอบความจำเพาะของตำแหน่ง cg03096975 ยีน EML2 ต่อสมองและประสิทธิภาพของเทคนิค COBRA-EML2

หัวข้อการทดลองนี้มีความมุ่งหวังเพื่อการยืนยันความถูกต้อง และความเหมาะสมของตำแหน่ง cg03096975 ยีน EML2 และเทคนิค COBRA-EML2 ในตัวอย่างรูปแบบต่างๆ เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติ เงื่อนไข หรือข้อจำกัดของงานวิจัยนี้ โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 5 การทดลอง ได้แก่

6.1 การทดลอง Mixed samples เพื่อเทียบเคียงกับวัตถุพยานที่มีการปนเปื้อนระหว่างสมองกับเนื้อเยื่ออื่นๆ มีขั้นตอนการดำเนินงานทดลอง ดังนี้

6.1.1 เตรียมทำ Bisulfite treatment (ตามข้อ 4.1) ในตัวอย่างดีเอ็นเอ จากสมอง ที่ผ่านการยืนยันด้วยการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วว่า มี ตำแหน่ง cg03096973 ของ ยีน EML2 เป็น methylated และดีเอ็นเอจากอวัยวะอื่นๆ ที่ผ่านการยืนยันแล้วว่าลำดับนี้

วกลีโหนดที่ตำแหน่ง cg03096973 ของยีน EML2 เป็น unmethylated ซึ่งในการทดลองนี้เลือกใช้ดีเอ็นเอจากปอด

6.1.2 ผสมดีเอ็นเอจากสมองและปอด (สมอง: ปอด) ที่ผ่านกระบวนการ Bisulfite treatment แล้วในอัตราส่วนต่างๆ ได้แก่ 0:10, 1:9, 3:7, 5:5, 7:3, 9:1, 10:0 μ l และดำเนินการตามขั้นตอนของ COBRA-EML2 (ตามข้อ 4.2-4.4)

6.2 การทดลอง Reliability เป็นการทดลองเพื่อวัดความเที่ยงตรงของตำแหน่ง cg03096973 ยีน EML2 และเทคนิค COBRA-EML2 ต่อสมอง เพื่อดูผลการวัดแต่ละครั้งว่าได้ผลเหมือนกันหรือแตกต่างกันอย่างไร โดยแบ่งการทดลองออกเป็น Inter- Reliability เป็นการวัดซ้ำแต่ทำคนละวัน โดยวิธีการเดียวกันในห้องปฏิบัติการเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกัน และผู้วิเคราะห์คนเดียวกันและ Intra- Reliability เป็นการวัดซ้ำของตัวอย่างโดยวิธีการเดียวกันในห้องปฏิบัติการเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกัน ผู้วิเคราะห์คนเดียวกัน และในเวลาเดียวกัน มีขั้นตอนการดำเนินงานดังนี้

6.2.1 การทดลอง Inter- Reliability ใช้ดีเอ็นเอผสมระหว่างสมองและปอดในอัตราส่วนต่างๆ (ตามข้อ 6.1.2) รวม 7 อัตราส่วน ดำเนินการตามขั้นตอนของ COBRA-EML2 (ตามข้อ 4.2-4.4) และทำการวัดซ้ำในวันถัดไป โดยวิธีการเดียวกัน ในห้องปฏิบัติการเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกัน และผู้วิเคราะห์คนเดียวกัน

6.2.2 การทดลองเพื่อเป็น Intra- Reliability ใช้ดีเอ็นเอผสมระหว่างสมองและปอดในอัตราส่วนต่างๆ (ตามข้อ 6.1.2) รวม 7 อัตราส่วน โดยทำเป็น 2 ชุด แล้วทำการวัดซ้ำตามขั้นตอนของ COBRA-EML2 (ตามข้อ 4.2-4.4) ในห้องปฏิบัติการเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกัน และผู้วิเคราะห์คนเดียวกัน

6.3 การทดลอง Minimal DNA concentration เป็นการทดลองเพื่อวัดประสิทธิภาพของเทคนิค COBRA-EML2 ต่อตัวอย่างที่มีปริมาณน้อย มีขั้นตอนการดำเนินงาน คือ

6.3.1 ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอจากสมองที่ผ่านการ Bisulfite treatment (ตามข้อ 4.1) มาวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer (Nanodrop ND-1000, USA)

6.3.2 เตรียมเจือจางดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001 ng/ μ l และดำเนินการตามขั้นตอนของ COBRA-EML2 (ตามข้อ 4.2-4.4)

6.4 การทดลอง Each position of brain เป็นการทดลองเพื่อตรวจสอบความจำเพาะของตำแหน่ง cg03096975 ยีน EML2 ต่อสมองในส่วนต่างๆ

เนื่องจากฐานข้อมูลงานทดลองที่รวบรวมจาก GEO dataset ในส่วนของการทดลองที่ทำในสมองเป็นตัวอย่างสมองจาก 2 ตำแหน่ง คือ ซีรีบริม ซีรีเบลลัม และสมองส่วนหน้า ซึ่งจากกราฟเมทิล

เลขชั้น ของตำแหน่ง cg03096975 ยีน EML2 แสดงค่าเป็น ไฮเปอร์เมทิลเลชัน อย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับอวัยวะอื่นๆ จึงต้องการตรวจสอบว่าตำแหน่งซีพีจีเดียวกันนี้จะแสดงความจำเพาะกับตำแหน่งอื่นๆของสมองด้วยหรือไม่ จึงได้ทำการทดลองในสมองตำแหน่งอื่นๆ ได้แก่ ซีรีรัมส่วนเนื้อสีขาว (Cerebrum white matter), ซีรีรัมเนื้อสีเทา (Cerebellum white matter), ซีรีเบลลัมส่วนเนื้อสีขาว (Cerebrum gray matter), ซีรีเบลลัมส่วนเนื้อสีเทา (Cerebellum gray matter), พอนส์ (Pons), เมดัลลา ออบลองกาตา (Medulla oblongata), สไปนอล คอร์ด (Spinal cord) รวม 7 ตำแหน่ง โดยดำเนินการสกัดดีเอ็นเอ และตรวจวัดด้วยเทคนิค COBRA-EML2 (ตามข้อ 3.1-3.4 และ 4.1-4.4)

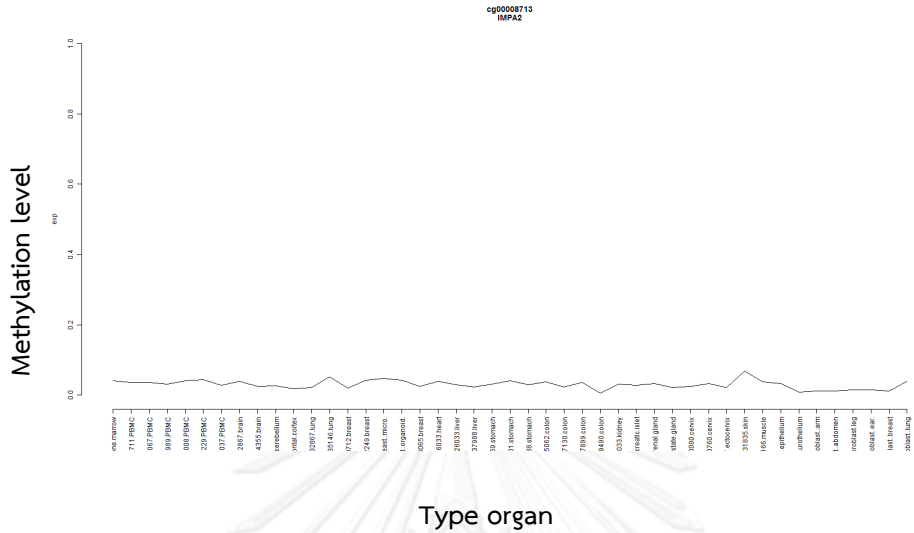
6.5 การทดลอง Aged samples เป็นการทดลองเพื่อตรวจสอบตรวจสอบความแปรผันของรูปแบบ ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน ในตำแหน่ง cg03096975 ยีน EML2 และประสิทธิภาพของเทคนิค COBRA-EML2 ต่อตัวอย่างที่เสื่อมสภาพจากการสัมผัสกับสภาพแวดล้อม ได้แก่ แสงแดด ฝุ่นละออง ในช่วงระยะเวลาต่างๆ เพื่อเปรียบเทียบกับวัตถุพยานที่สามารถพบเจอได้จากสถานที่เกิดเหตุ เพราะในบางครั้งมีคดีเกิดขึ้นแล้วแต่อาจถูกซ่อนเร้นอำพรางจนเวลาผ่านไปในช่วงระยะเวลาหนึ่งพนักงานสอบสวนจึงได้รับแจ้งเหตุเข้าตรวจสอบสถานที่ชีววัตถุในที่เกิดเหตุจะเริ่มเสื่อมสภาพจากการได้สัมผัสกับสิ่งแวดล้อม ดังนั้น ในหัวข้อการทดลองนี้จึงออกแบบการทดลองให้ตัวอย่างที่จะทำการตรวจสอบมีสภาพและสภาวะใกล้เคียงกับชีววัตถุที่จะพบได้จริงจากสถานที่เกิดเหตุ โดยมีขั้นตอนการดำเนินงานคือ

6.5.1 เก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อสมองสดจาก 2 ศพ นำมาหั่นให้มีขนาด 0.5x 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 µl ศพละ 20 หลอด

6.5.2 นำตัวอย่างทั้งหมดใส่กล่องกระดาษที่สามารถปิดฝาได้เพื่อป้องกันตัวอย่างถูกทำลายจากสัตว์ แต่แสงแดด ละอองน้ำและฝุ่นละอองสามารถผ่านเข้าไปในกล่องได้ จากนั้นนำกล่องดังกล่าวไปวางไว้บริเวณที่แดดส่องถึง สำหรับงานวิจัยนี้ ได้ใช้บริเวณระเบียงของห้อง 713 อาคารแพทยพัฒน์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

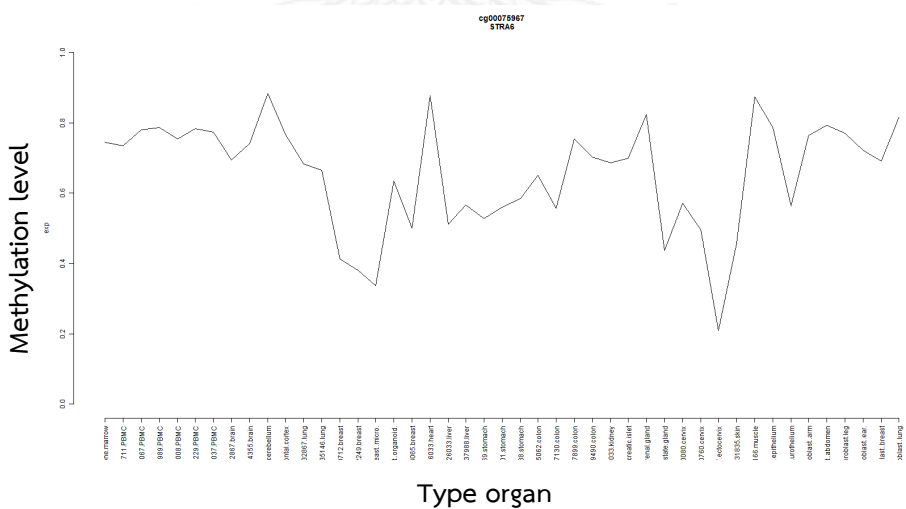
6.5.3 นำตัวอย่างมาสกัดดีเอ็นเอ และตรวจวัดด้วยเทคนิค COBRA-EML2 (ตามข้อ 3.1-3.4 และ 4.1-4.4) ตามช่วงวันต่างๆ ได้แก่ 5, 15, 25, 30, 35, 85, 90 และ 100 วันตามลำดับ

1.1.2 ตำแหน่งซีพีจีทีที่แสดงค่าเป็นไฮโปเมทิลเลชันในทุกๆอวัยวะ ให้ชื่อกราฟรูปแบบนี้ว่า Unmethylation pattern



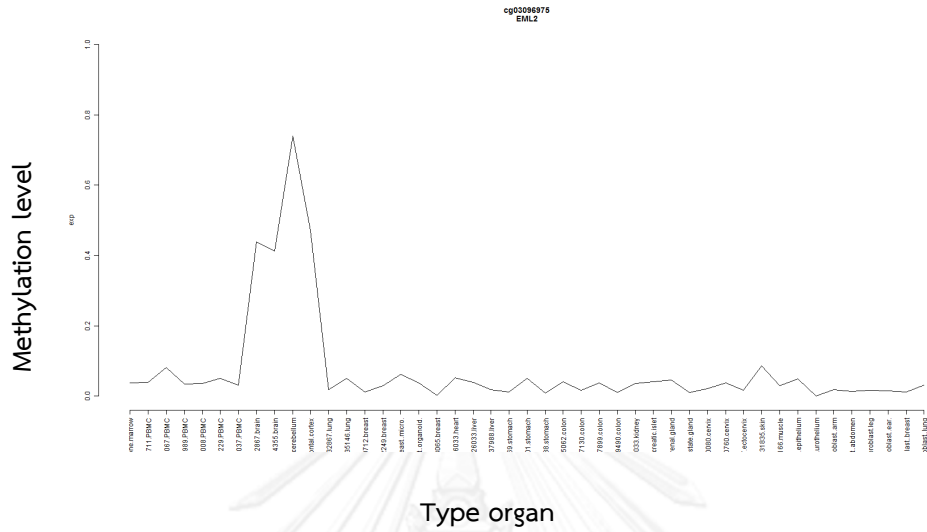
รูปที่ 8 ตัวอย่างกราฟที่มีรูปแบบ Unmethylation pattern

1.1.3 ตำแหน่งซีพีจีทีที่แสดงค่าเป็นไฮเปอร์เมทิลเลชัน ในบางอวัยวะ และเป็นไฮโปเมทิลเลชันในบางอวัยวะ ให้ชื่อกราฟรูปแบบนี้ว่า Mix profile



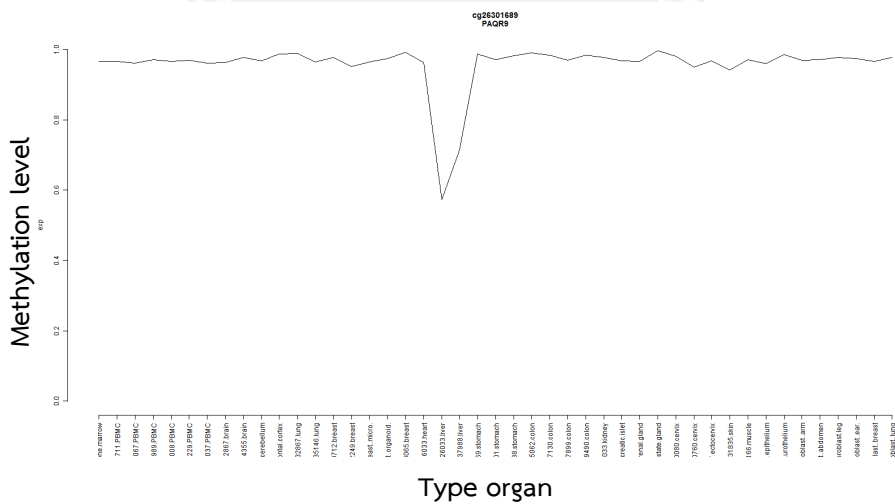
รูปที่ 9 ตัวอย่างกราฟที่มีรูปแบบ Mix profile

1.1.4 ตำแหน่ง ซีพีจีทีที่แสดงค่าเป็น ไฮเปอร์เมทิลเลชันอย่างจำเพาะต่ออวัยวะใดอวัยวะหนึ่ง ให้ชื่อกราฟนี้ว่า Hypermethylation specific



รูปที่ 10 ตัวอย่างกราฟที่มีรูปแบบ Hypermethylation specific

1.1.5 ตำแหน่งซีพีจีทีที่แสดงค่าเป็น ไฮโปเมทิลเลชันอย่างจำเพาะต่ออวัยวะใดอวัยวะหนึ่ง ให้ชื่อกราฟนี้ว่า Hypomethylation specific



รูปที่ 11 ตัวอย่างกราฟที่มีรูปแบบ Hypomethylation specific

ซึ่งคณะวิจัยได้ใช้ตัวอย่างกราฟรูปแบบที่ 4 คือ Hypermethylation specific และ รูปแบบที่ 5 คือ Hypomethylation specific เป็นลักษณะของกราฟต้นแบบในการค้นหาและทำการคัดเลือกกราฟที่มีความจำเพาะในแต่ละกลุ่มอวัยวะ ด้วยเหตุผลคือกราฟทั้งสองรูปแบบนี้แสดงให้เห็นถึงค่าเมทิลเลชันที่มีความแตกต่างอย่างชัดเจนในกลุ่มอวัยวะหนึ่ง เมื่อเทียบกับอวัยวะอื่นๆ



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ผลการคัดเลือกตำแหน่งซีพีจีจากกราฟจำนวน 27,578 กราฟ ได้กราฟที่มีลักษณะเมทิลเลชันอย่างจำเพาะต่อเนื้อเยื่อของอวัยวะต่างๆ รวมจำนวน 222 กราฟ ใน 15 อวัยวะ แบ่งเป็นกลุ่มไฮเปอร์เมทิลเลชัน จำนวน 82 ตำแหน่ง และกลุ่มไฮโปเมทิลเลชัน จำนวน 140 ตำแหน่ง ซึ่งแสดงผลตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนตำแหน่ง ซีพีจีเมทิลเลชันที่มีความจำเพาะในแต่ละอวัยวะ

อวัยวะ	จำนวนตำแหน่งซีพีจีเมทิลเลชันของแต่ละอวัยวะ		
	ไฮเปอร์เมทิลเลชัน	ไฮโปเมทิลเลชัน	รวม
สมอง	12	31	43
หัวใจ	-	2	2
ไต	2	3	5
ตับ	22	34	56
ปอด	2	-	2
กล้ามเนื้อ	3	12	15
ต่อมหมวกไต	3	5	8
ปากมดลูก	-	2	2
รังไข่	-	7	7
ตับอ่อน	8	4	12
ตับอ่อนและไอส์เลตออฟแลงเกอร์ฮานส์	6	1	7
ต่อมลูกหมาก	-	1	1
ม้าม	-	1	1
กระเพาะอาหาร	5	-	5
อัมตะ	19	37	56
รวม	82	140	222

1.1.6 การวิเคราะห์ตำแหน่งซีพีจีเมทิลเลชันที่มีความจำเพาะแต่ละอวัยวะที่อยู่ในหรือภายนอกยีน โดย ซีพีจีที่จำเพาะทั้ง 222 ตำแหน่งนั้น มีซีพีจีที่อยู่ในยีนจำนวนมากถึง 208 ตำแหน่ง คิดเป็น 93.69% ของทั้งหมด ขณะที่ซีพีจีอีกจำนวน 14 ตำแหน่งที่เหลือจะอยู่บริเวณภายนอกหรือระหว่างยีน จึงกล่าวได้ว่าซีพีจีที่มีความจำเพาะต่อเนื้อเยื่อหรืออวัยวะนั้น มักอยู่ในบริเวณยีน (Gene body) แสดงผลดังตารางที่ 2

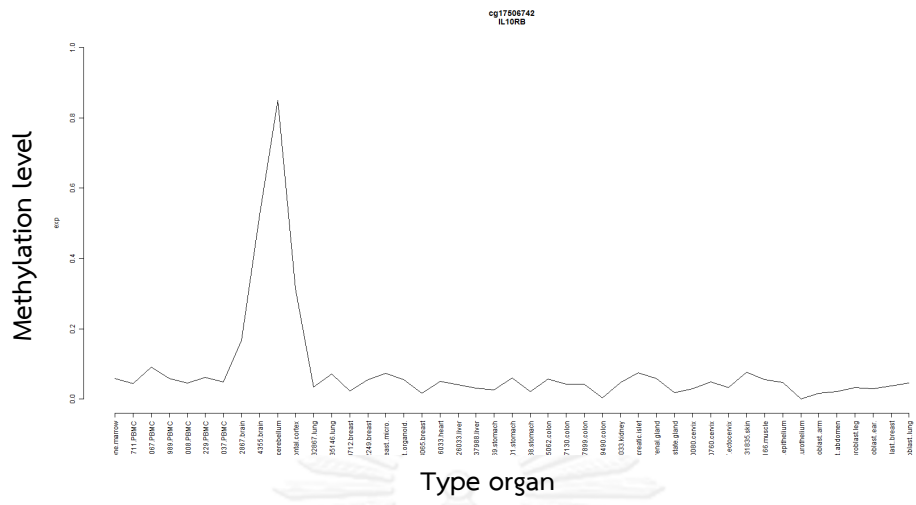
ตารางที่ 2 แสดงจำนวนซีพีจีเมทิลเลชัน ที่จำเพาะเปรียบเทียบตำแหน่งภายในและภายนอกยีน

อวัยวะ	จำนวนตำแหน่งซีพีจีเมทิลเลชันของแต่ละอวัยวะ		
	ภายในยีน	ภายนอกยีน	รวม
สมอง	40	3	43
หัวใจ	2	0	2
ไต	4	1	5
ตับ	55	1	56
ปอด	2	0	2
กล้ามเนื้อ	15	0	15
ต่อมหมวกไต	7	1	8
ปากมดลูก	1	1	2
รังไข่	6	1	7
ตับอ่อน	12	0	12
ตับอ่อนและไอส์เลตออฟแลงเกอร์ฮานส์	7	0	7
ต่อมลูกหมาก	1	0	1
ม้าม	1	0	1
กระเพาะอาหาร	4	1	5
อวัยวะ	51	5	56
รวม	208 (93.69%)	14 (6.31%)	222

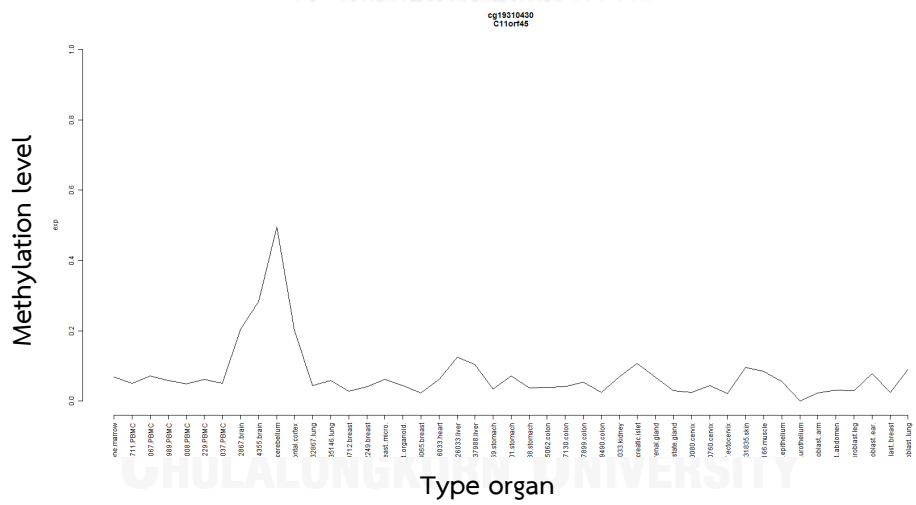
1.6.7 การวิเคราะห์ตำแหน่งซีพีจีเมทิลเลชันที่มีความจำเพาะต่อละอวัยวะและอยู่ภายในยีนจำนวน 208 ตำแหน่งว่าอยู่ในส่วนที่เป็นเอ็กซอน (Exon) หรืออินทรอน (Intron) ของยีนนั้นๆจากการพิจารณาซีพีจีเมทิลเลชันส่วนใหญ่มีการกระจายตัวอยู่ในเอ็กซอน แสดงผลดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะเปรียบเทียบกับตำแหน่งที่ตั้งในเอ็กซอน หรืออินทรอน

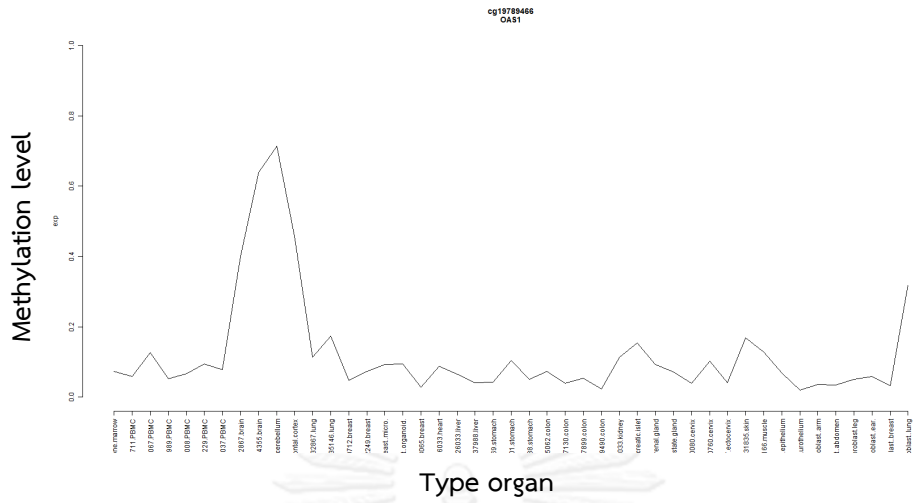
อวัยวะ	จำนวนตำแหน่งซีพีจีเมทิลเลชันของแต่ละอวัยวะ		
	เอ็กซอน	อินทรอน	รวม
สมอง	19	21	40
หัวใจ	0	2	2
ไต	3	1	4
ตับ	27	28	55
ปอด	2	0	2
กล้ามเนื้อ	8	7	15
ต่อมหมวกไต	4	3	7
ปากมดลูก	1	0	1
รังไข่	1	5	6
ตับอ่อน	9	3	12
ตับอ่อนและไอส์เลตออฟแลงเกอร์ฮานส์	5	2	7
ต่อมลูกหมาก	0	1	1
ม้าม	0	1	1
กระเพาะอาหาร	3	1	4
อัมตะ	31	20	51
รวม	113 (54.33%)	95 (45.67%)	208



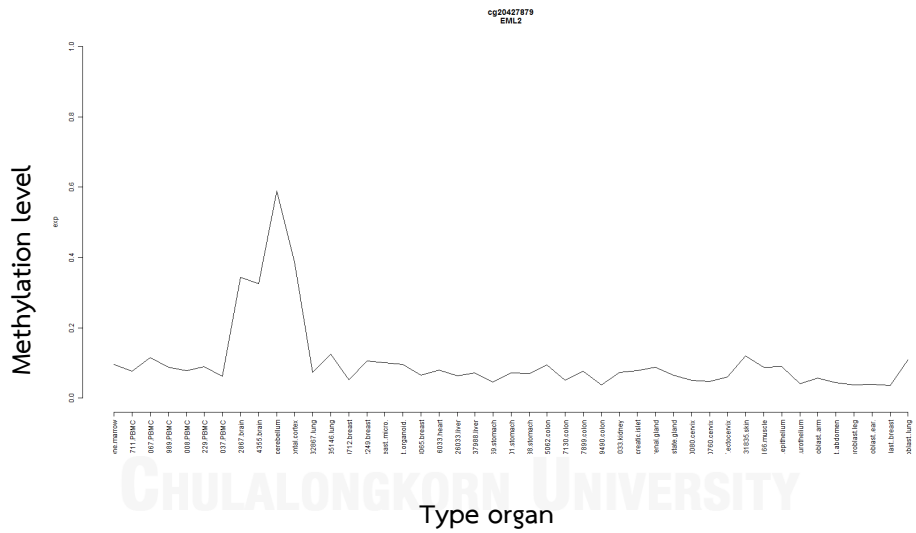
รูปที่ 15 ตำแหน่ง cg17506742 IL10RB



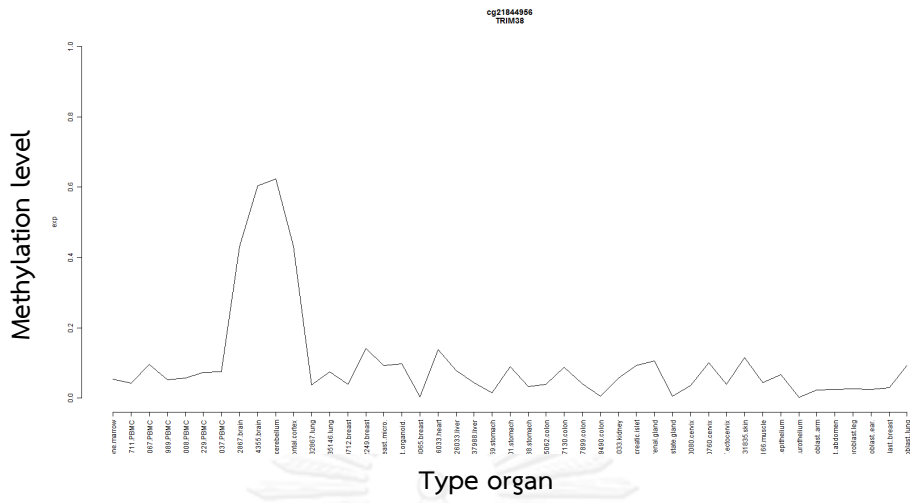
รูปที่ 16 ตำแหน่ง cg19310430 C11orf45



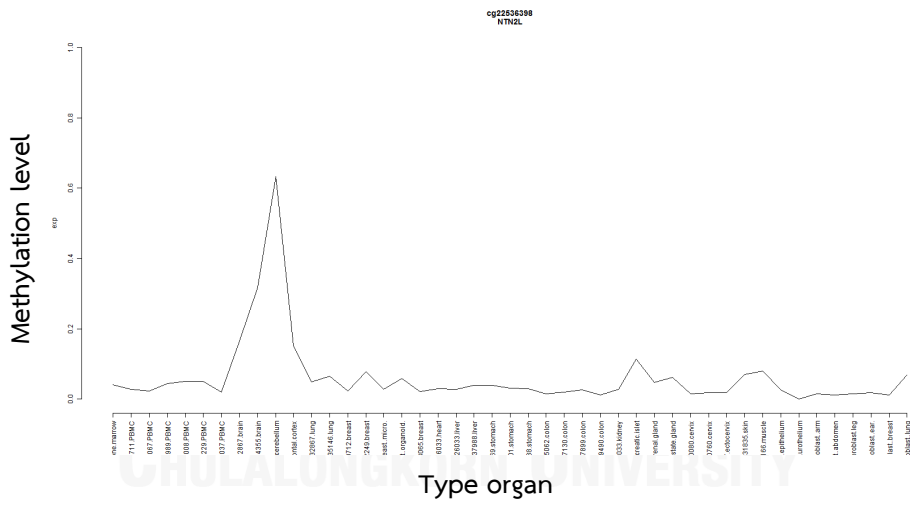
รูปที่ 17 ตำแหน่ง cg19789466 OAS1



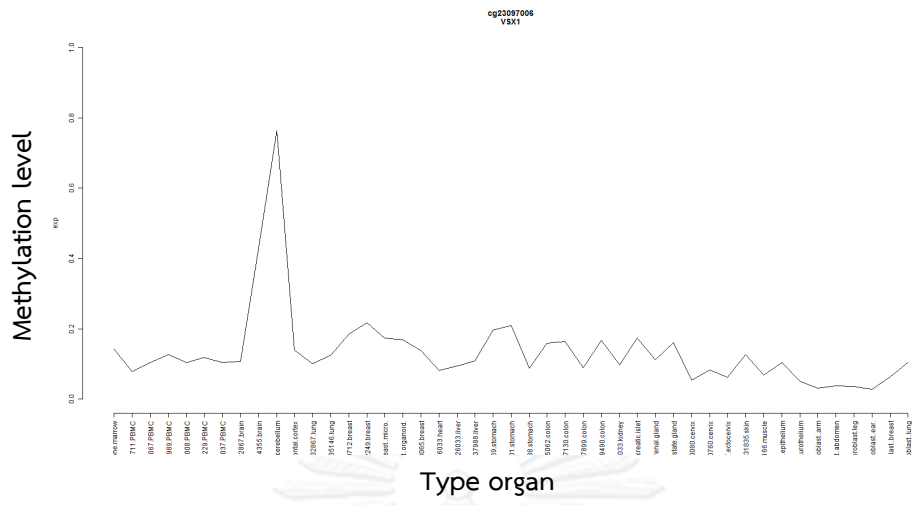
รูปที่ 18 ตำแหน่ง cg20427879 EML2



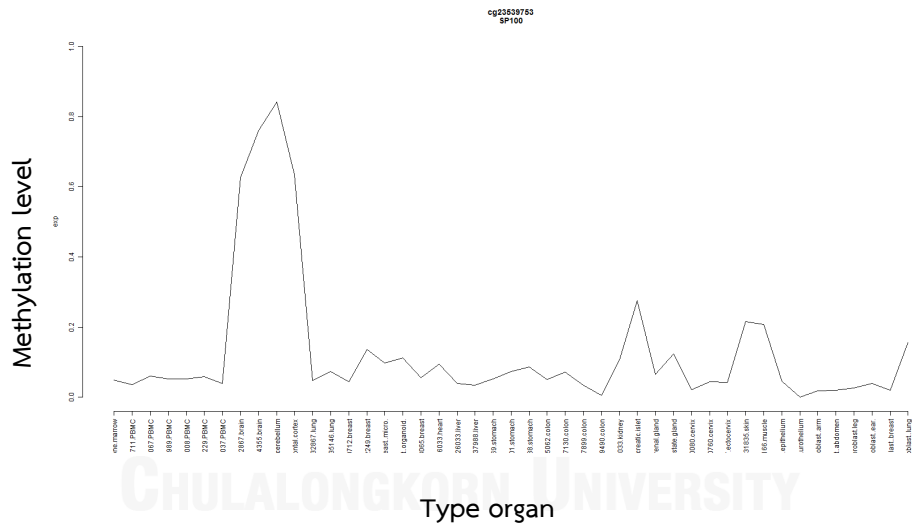
รูปที่ 19 ตำแหน่ง cg21844956 TRIM38



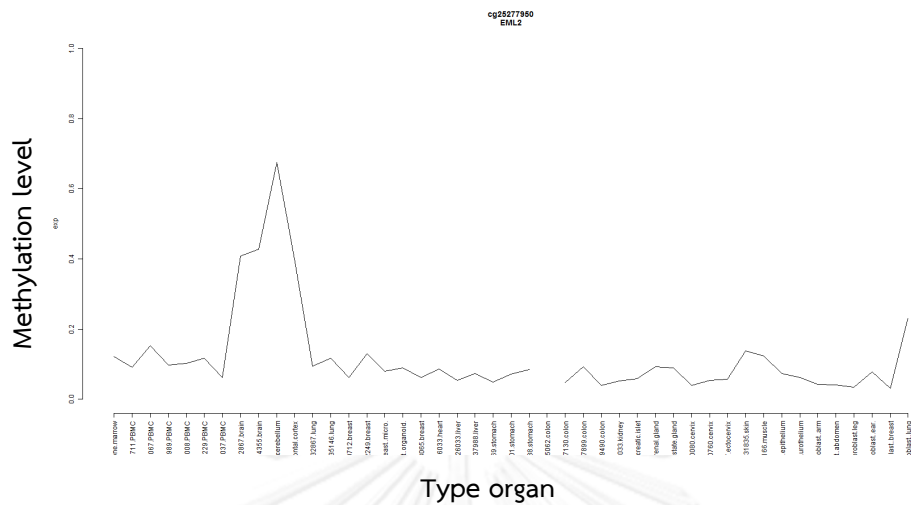
รูปที่ 20 ตำแหน่ง cg22536398 NTN2L



รูปที่ 21 ตำแหน่ง cg23097006 VSX1

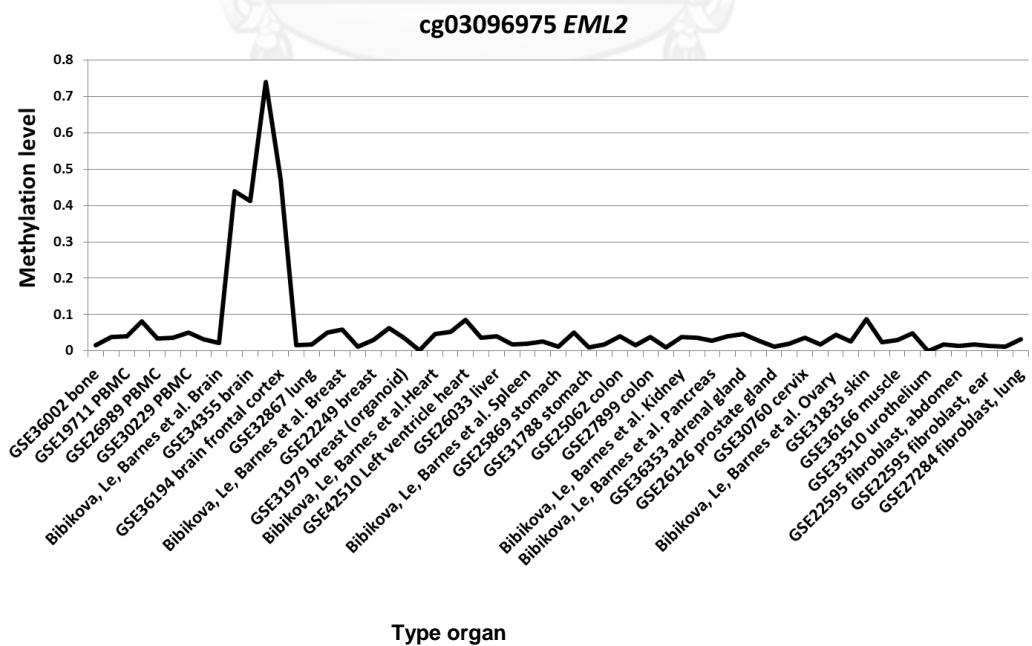


รูปที่ 22 ตำแหน่ง cg23539753 SP100



รูปที่ 23 ตำแหน่ง cg25277950 EML2

คัดเลือกหนึ่งตำแหน่งเพื่อใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอเมทิลเลชันเพื่อและใช้ระบุเนื้อเยื่อสมอง ซึ่งตำแหน่งที่เลือกศึกษาในงานวิจัยนี้ คือ ตำแหน่ง cg03096975 ของยีน EML2 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่แสดงค่าเป็น ไฮเปอร์เมทิลเลชันในเนื้อเยื่อสมองสูงถึงเกือบ 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับอวัยวะอื่น ๆ ดังแสดงในรูปที่ 27



รูปที่ 24 กราฟตำแหน่ง cg03096975 ของยีน EML2

ซึ่งเป็นการวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ยจากโปรแกรม CU-DREAM ในกลุ่ม 3 ข้อมูลคือ ข้อมูลที่ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก Infinium® HumanMethylation 27 BeadChip Kit จากงานวิจัย Genome-wide DNA methylation profiling using Infinium assay เป็นข้อมูลที่ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก Professor Kevin L Gunderson (Bibikova et al., 2009), GSE 34355 ที่ทำการทดลองในสมองส่วนซีรีบรัม จำนวน 4 ตัวอย่าง และ GSE 36194 ที่ทำการทดลองในส่วนซีรีเบลลัม จำนวน 355 ตัวอย่าง และ สมองกลีบหน้า จำนวน 369 ตัวอย่าง

2. กลุ่มประชากรตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองทั้งหมดมีจำนวน 106 ตัวอย่าง ใน 18 อวัยวะ จากศพ 15 ศพโดยลำดับที่ 1-13 เป็นตัวอย่างจากชิ้นเนื้อสด และลำดับที่ 14-15 เป็นตัวอย่างจากพาราฟินบล็อกทั้งหมดเป็นตัวอย่างที่ผ่านการตรวจสอบเพื่อยืนยันชนิดของอวัยวะทางกล้องจุลทรรศน์ โดยผู้เชี่ยวชาญทางพยาธิวิทยาแล้ว

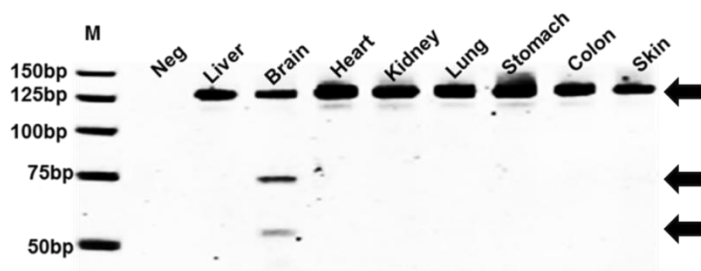
ตารางที่ 4 กลุ่มประชากรตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

ลำดับที่	เพศ	อวัยวะ																	
		สมอง	ไต	ปอด	ตับ	ม้าม	ตับอ่อน	หัวใจ	กระเพาะอาหาร	ผิวหนัง	ถุงน้ำดี	ไต	ลำไส้เล็ก	ไส้ติ่ง	ต่อมทอนซิล	ไขกระดูก	กล้ามเนื้อ	เส้นเลือดใหญ่	เส้นประสาท
1	ชาย	X	X	X	X	X	X	X	X	X									
2	ชาย	X	X	X	X	X		X		X		X	X						
3	ชาย	X	X	X	X	X	X	X			X		X						
4	ชาย	X	X	X	X	X		X	X		X								
5	ชาย	X	X	X	X	X		X	X				X						
6	ชาย	X	X	X	X	X	X					X	X						
7	หญิง	X	X	X	X	X	X	X					X						
8	ชาย	X	X	X	X	X		X	X				X	X					
9	ชาย	X	X	X	X	X		X	X				X	X					
10	ชาย	X	X		X			X											
12	ชาย	X																	
12	ชาย	X																	
13	ชาย	X																	
14	ชาย	X	X	X	X	X											X		
15	หญิง	X	X	X	X		X						X			X	X	X	X

3. ผลการศึกษาดีเอ็นเอเมทิลเลชัน ของตำแหน่ง cg03096975 ยีน EML2 ด้วยเทคนิค COBRA-EML2 ในตัวอย่างทั้งหมด และการวิเคราะห์ผลที่ได้เพื่อตรวจสอบความไวและความจำเพาะต่อเนื้อเยื่อสมอง ของตำแหน่ง cg03096975 ยีน EML2

ดำเนินการทดลองเพื่อระบุเนื้อเยื่อสมองโดยใช้ตำแหน่ง cg03096975 ของยีน EML2 เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค COBRA-EML2 และได้แสดงตัวอย่างผลการทดลองดังรูปที่ 28 ซึ่งเป็นการทำการทดลองในกลุ่มตัวอย่างชั้นเนื้อสด 8 ชนิด ได้แก่ ตับ สมอง หัวใจ ไต ปอด กระเพาะ

อาหาร ลำไส้ และผิวหนัง ด้วยเทคนิคCOBRA-EML2 และวิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยกระบวนการ เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส จากรูป M คือ Marker ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 126bp คือ unmethylation band ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 73bp และ 53bp คือ methylation band ซึ่งจะเห็นว่าไม่มีเพียงดีเอ็นเอจากสมอง เท่านั้นที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 73bp และ 53bp



รูปที่ 25 ตัวอย่างการวิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอในตำแหน่ง cg03096975 ของยีน EML2 ด้วยเทคนิค COBRA-EML2

และผลจากการทำการทดลองในตัวอย่างจากพาราฟินและชิ้นเนื้อสดที่ผ่านการคัดเลือกซึ่ง ประกอบด้วย 18 อวัยวะ จำนวนทั้งหมด 106 ตัวอย่าง ได้ผลการทดลองตามตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค COBRA-EML2 ในตัวอย่างจากอวัยวะต่างๆ

ลำดับ	เพศ	อวัยวะ																	
		สมอง	ไต	ปอด	ตับ	นม	ตับอ่อน	หัวใจ	กระเพาะอาหาร	ผิวหนัง	ถุงน้ำดี	ลิ้น	ลำไส้เล็ก	ไส้ติ่ง	ต่อมทอนซิล	ไขกระดูก	กล้ามเนื้อ	เส้นเลือดใหญ่	เส้นประสาท
1	ชาย	M	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
2	ชาย	M	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
3	ชาย	M	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
4	ชาย	M	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
5	ชาย	M	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
6	ชาย	M	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
7	หญิง	M	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
8	ชาย	M	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
9	ชาย	M	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
10	ชาย	M	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
12	ชาย	M																	
12	ชาย	M																	
13	ชาย	M																	
14	ชาย	M	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
15	หญิง	M	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U

หมายเหตุ 1. ลำดับที่ 1-13 เป็นตัวอย่างจากชิ้นเนื้อสด และลำดับที่ 14-15 เป็นตัวอย่างจากพาราฟินบล็อก
 2. ให้ M แทน methylation และ U แทน unmethylation

ผลการตรวจสอบความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ด้วยการตรวจสอบวินิจฉัย (diagnostic test) จากการทดลองในตัวอย่างทั้งหมด 106 ตัวอย่าง แบ่งเป็นสมอง 15 ตัวอย่าง และอวัยวะอื่นๆ 91ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค COBRA-EML2 ที่ตำแหน่ง cg03096975 ยีน EML2 จากผลการทดลองพบว่าสมองทั้ง 15 ตัวอย่างถูกระบุได้ด้วยวิธีการนี้ ในขณะที่อวัยวะอื่นๆก็ถูกระบุเช่นกันว่าไม่ใช่สมอง จากผลการทดลองนำมาคำนวณหาค่าความไวและความจำเพาะ ด้วยการตรวจสอบวินิจฉัย ได้ดังนี้

$$\begin{aligned} \text{ความไว} &= \text{ผลบวกจริง} / \text{ผลบวกทั้งหมด} \times 100 \\ &= 15/15 \times 100 \\ &= 100 \% \\ \text{ความจำเพาะ} &= \text{ผลลบจริง} / \text{ผลลบทั้งหมด} \times 100 \\ &= 91/91 \times 100 \\ &= 100 \% \end{aligned}$$

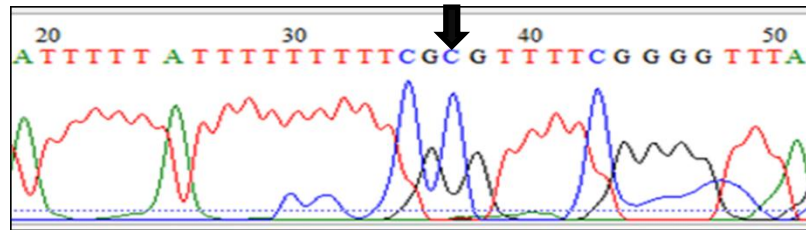
โดยผลบวกจริง หมายถึง การตรวจสอบเนื้อเยื่อสมองแล้วสามารถบอกได้ว่าเป็นเนื้อเยื่อสมองในที่นี้คือการวิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยกระบวนการเจลอิลีกโตรโฟรีซิส เห็นชิ้นดีเอ็นเอขนาด 73bp และ 53bp ในตัวอย่างสมองเท่านั้น และ ผลลบจริง หมายถึง การตรวจสอบเนื้อเยื่อจากอวัยวะอื่นแล้วสามารถบอกได้ว่าไม่ใช่สมอง ซึ่งการวิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยกระบวนการเจลอิลีกโตรโฟรีซิส เห็นเฉพาะชิ้นดีเอ็นเอขนาด 126bp เท่านั้น

4. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) ของตำแหน่ง cg03096975 ยีน EML2

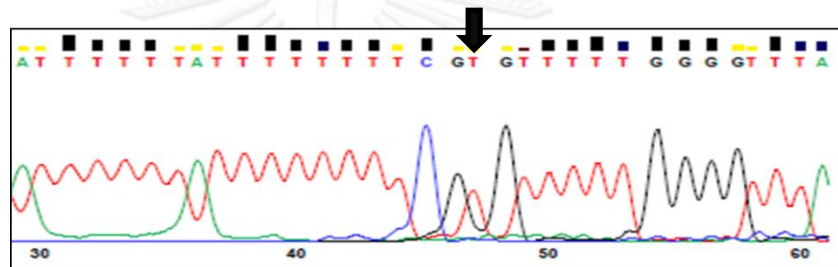
ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณที่ออกแบบไพรเมอร์ให้คล้องตำแหน่ง cg03096975 ยีน EML2 (ตำแหน่ง **CG**) ตามที่รายงานไว้ใน NCBI คือ

```
CGTTATTCGTCGTTATGAGTAGTTTTGGAGTTGGGTGAGATTTTTTCGTAGATTATTTTTATTT
TTTTTCCGGTTTTCGGGTTTAGATTTTAGGTTTTATTTAATTTTTGGGATTAGATCGG
```

ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณตำแหน่ง cg03096975 ยีน EML2 (ตำแหน่งที่ถูกครีซ) ที่ได้จากการส่งตัวอย่างดีเอ็นเอ จาก สมอง หัวใจ ไต ตับ ปอด ไปตรวจวิเคราะห์ยังบริษัท Bioneer ประเทศเกาหลีใต้ ในรูปที่ 26 ลำดับนิวคลีโอไทด์จากสมอง ที่ตำแหน่ง cg03096975 ยีน EML2 แสดงผลเป็น CG เช่นเดียวกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่รายงานไว้ใน NCBI และรูปที่ 27 ลำดับนิวคลีโอไทด์จากหัวใจ ไต ตับ ปอด ตำแหน่ง cg03096975 ยีน EML2 ก็แสดงผลเป็น TG เหมือนกันทั้งหมด



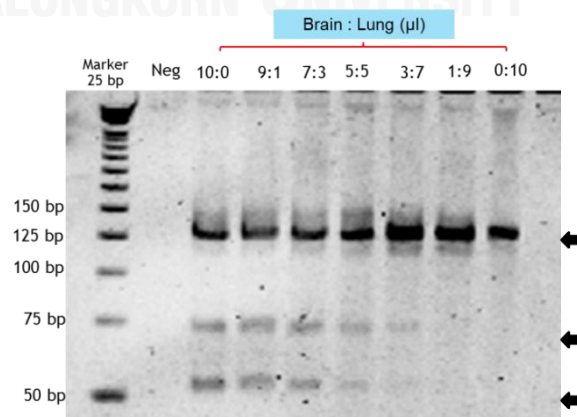
รูปที่ 26 ลำดับนิวคลีโอไทด์จากสมองแสดงผลเป็น CG ที่ตำแหน่ง cg03096975 ยีน EML2 เช่นเดียวกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่รายงานไว้ใน NCBI



รูปที่ 27 ลำดับนิวคลีโอไทด์จากหัวใจ ตำแหน่ง cg03096975 ยีน EML2 แสดงผลเป็น TG เหมือนกันทั้งหมด

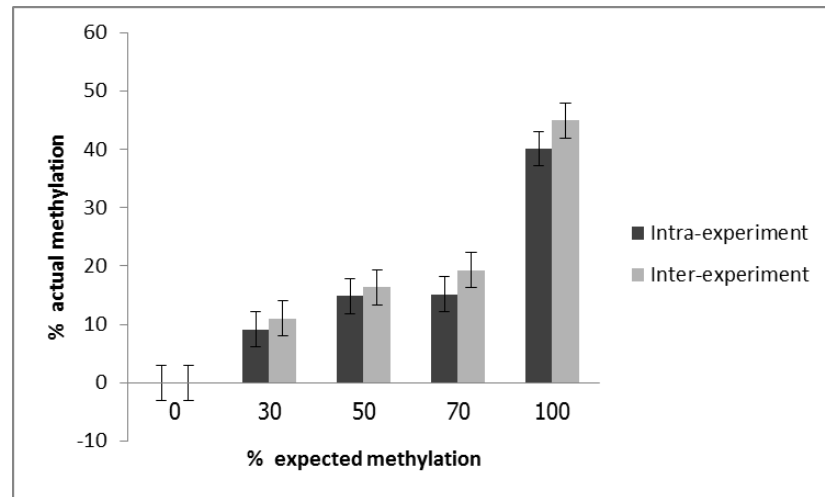
5. การวิเคราะห์ความจำเพาะของตำแหน่ง cg03096975 ยีน EML2 ต่อสมองและประสิทธิภาพของเทคนิค COBRA-EML2

5.1 ผลวิเคราะห์จากการทดลอง Mixed samples



รูปที่ 28 การทดลอง Mixed samples

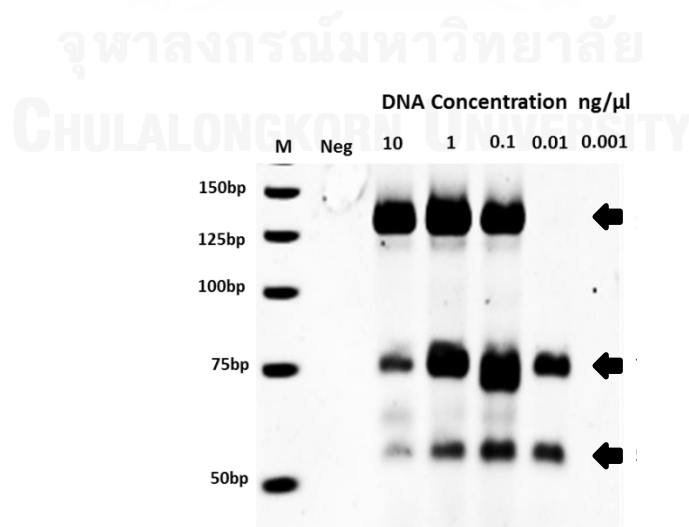
5.2 ผลวิเคราะห์จากการทดลอง Reliability



รูปที่ 29 การทดลอง Reliability

จากแผนภูมิรูปที่ 29 แสดงผลการทดลองจากการทำ Inter- และ Intra- Reliability ในตัวอย่างที่มีเปอร์เซ็นต์สมอง 0, 30, 50, 70 และ 100 และเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์เมทิลเลชันที่ตรวจวัดได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า การตรวจวัดดีเอ็นเอจากสมองของเทคนิค COBRA-EML2 เป็นเทคนิคที่มีความเชื่อมั่นสูง สามารถวัดสิ่งเดียวกันหลายๆครั้ง แล้วได้ค่าของการตรวจวัดที่ใกล้เคียงกัน

5.3 ผลวิเคราะห์จากการทดลอง Minimal DNA concentration

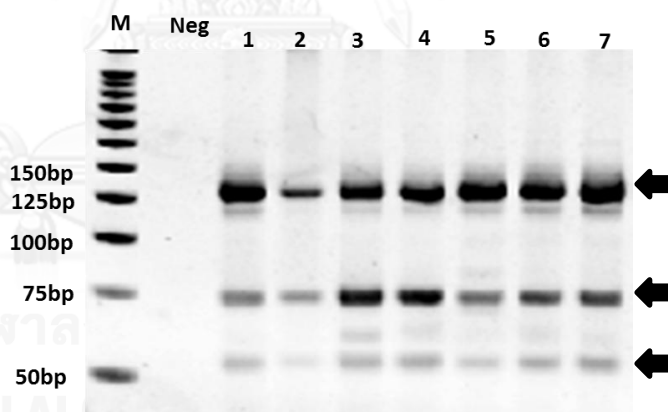


รูปที่ 30 การทดลอง Minimal DNA concentration

รูปที่ 30 เป็นการทดลองในตัวอย่างที่เจือจางความเข้มข้นครั้งละ 10 เท่า ทำทั้งหมด 7 ความเข้มข้น คือ 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 และ 0.00001 ng/ μ l ด้วยเทคนิค COBRA-EML2 และวิเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอด้วยกระบวนการ เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส จากรูป M คือ Marker ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 126bp คือ unmethylation band ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 73bp และ 53bp คือ methylation band และผลที่ได้คือ เทคนิค COBRA-EML2 สามารถตรวจวัดได้ถึงความเข้มข้นน้อยที่สุด 0.01 ng/ μ l

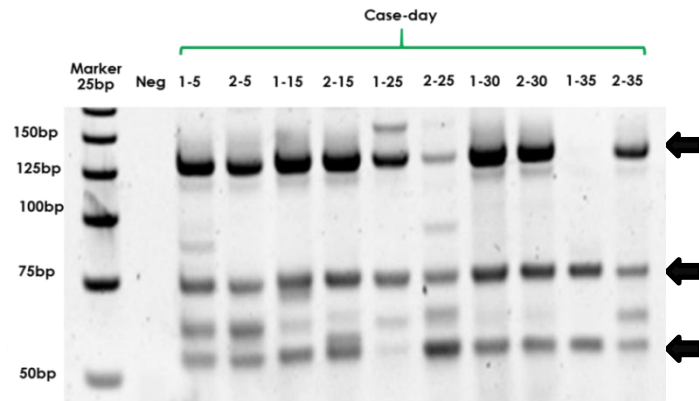
5.4 ผลวิเคราะห์จากการทดลอง Each position of brain

ทำการทดลองในตัวอย่าง 7 ตัวอย่างจาก 7 บริเวณของสมอง โดย 1 คือ Cerebrum white matter, 2 คือ Cerebrum gray matter, 3 คือ Cerebellum white matter, 4 คือ Cerebellum gray matter, 5 คือ Pons, 6 คือ Medulla oblongata และ 7 คือ Spinal cord ด้วยเทคนิค COBRA-EML2 และวิเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอด้วยกระบวนการ เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ให้ผลเหมือนกันตามรูปที่ 12 คือ ทั้ง 7 ตำแหน่ง แสดงชิ้นดีเอ็นเอขนาด 73bp และ 53bp ซึ่งหมายความว่า ตำแหน่ง cg03096975 ยีน EML2 มีความจำเพาะต่อทั้ง 7 บริเวณที่ครอบคลุมทั่วทั้งสมอง

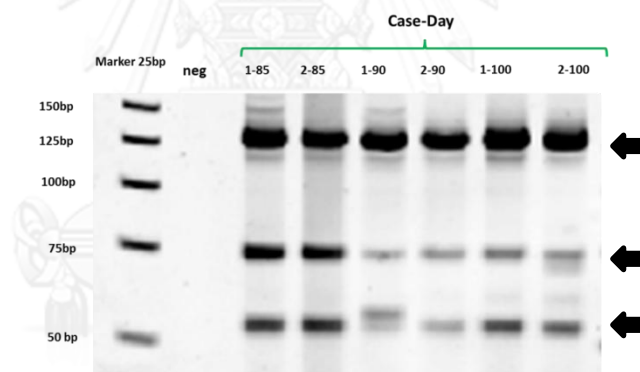


รูปที่ 31 การทดลอง Each position of brain

5.5 ผลวิเคราะห์จากการทดลอง Aged sample



รูปที่ 32 การทดลอง Aged samples ในวันที่ 5, 15, 25, 30, 35



รูปที่ 33 การทดลอง Aged samples ในวันที่ 85, 90, 100

จากรูป 32 และ 33 เป็นการทดลองในตัวอย่างสมองที่เก็บจากศพ 2 ศพที่เสื่อมสภาพจากการสัมผัสกับสภาพแวดล้อมในช่วงเวลาต่างๆ จากรูปแสดงผลในช่วงวันที่ 85-100 วิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยกระบวนการ เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดย M คือ Marker ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 126bp คือ unmethylation band ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 73bp และ 53bp คือ methylated band จะเห็นว่าสามารถตรวจสอบได้แม้ในตัวอย่างที่มีอายุถึง 100 วัน

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

จากการคัดเลือกและรวบรวมข้อมูลงานทดลองที่ทำในเนื้อเยื่อหรืออวัยวะของมนุษย์ 22 ชนิด โดยใช้ชุดตรวจไมโครแอรเรย์ในการวัดผลดีเอ็นเอเมทิลเลชัน เพื่อสร้างเป็นฐานข้อมูลทางชีวสารสนเทศของตำแหน่ง ซีพีจีเมทิลเลชันได้จำนวน 27,578 ตำแหน่ง ตามประสิทธิภาพของชุดตรวจไมโครแอรเรย์ (Illumina® Human Methylation 27 Bead Chip Kit) ที่เลือก โดยมีเป้าหมายเพื่อใช้ฐานข้อมูลดังกล่าวค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ที่อยู่ในรูปแบบดีเอ็นเอเมทิลเลชันสำหรับการระบุเนื้อเยื่อ หรืออวัยวะ ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ทำการคัดเลือกตำแหน่งซีพีจีเมทิลเลชันที่แสดงความจำเพาะต่อเนื้อเยื่อจากอวัยวะต่างๆ ได้จำนวน 222 ตำแหน่ง ใน 15 อวัยวะ และจากผลการวิเคราะห์ตำแหน่งของซีพีจีเมทิลเลชันทั้ง 222 ตำแหน่ง ว่าตั้งอยู่ภายใน หรือภายนอกยีน และอยู่ในส่วนที่เป็นเอ็กซอน หรืออินทรอน พบว่า ซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะส่วนใหญ่มีตำแหน่งอยู่ภายในยีน บริเวณที่เป็นเอ็กซอน ทั้งรูปแบบที่เป็น ไฮเปอร์เมทิลเลชัน (Hypermethylation) และ ไฮโปเมทิลเลชัน (Hypomethylation) ซึ่งจากผลการวิเคราะห์นี้สอดคล้องกับหลายๆ งานวิจัย ที่รายงานว่าซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะต่ออวัยวะมักพบในบริเวณที่อยู่ภายในยีน และกระจายตัวอย่างอิสระอยู่ทั่วทั้งจีโนม ในจำนวนนี้เลือกหนึ่งตำแหน่ง คือ cg03096975 ยีน EML2 ที่แสดงค่าเป็นไฮเปอร์เมทิลเลชันในสมองอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับอวัยวะอื่นๆ อีก 21 อวัยวะ ซึ่งนอกจากเพื่อการใช้ตำแหน่งดังกล่าวเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในการระบุเนื้อเยื่อสมองแล้ว ผลการทดลองที่ได้จะเป็นการยืนยันด้วยว่าฐานข้อมูลดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่สร้างขึ้นนั้นมีความน่าเชื่อถือมากน้อยเพียงใด โดยทำการทดลองในตัวอย่างจำนวน 110 ตัวอย่าง จาก 18 อวัยวะ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของโพลบที่ใช้ในการตรวจวัดของตำแหน่งนี้คือ `(G)TTTCGGGGTTTAGATTTTAGGTTTTATTTAATTTTTGGGTTTAGAT` (`CG` คือตำแหน่ง cg03096975) ส่วนยีน EML2 มีข้อมูลว่าเป็นยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการรับรู้ทางประสาทสัมผัสของเสียงและการมองเห็น (EML2 Gene protein-coding, 2013: online ; EML2 Gene Detail, 2013: online) แต่เนื่องจากตำแหน่ง cg03096975 ไม่ได้ตั้งอยู่ในส่วนที่เป็นโปรโมเตอร์ของยีนแต่เป็นตำแหน่งที่ตั้งอยู่ในส่วนของเอกซอน จึงถือเป็นตำแหน่ง ซีพีจีเมทิลเลชันที่ไม่ได้เกี่ยวข้องกับการแสดงออกโดยตรง ดังนั้นในการพิจารณาของงานวิจัยนี้จะพิจารณาในมุมมองของรูปแบบ ซีพีจีเมทิลเลชันที่แสดงผลเป็นไฮเปอร์เมทิลเลชัน ซึ่งจากผลการวิเคราะห์นี้สอดคล้องกับหลายๆ งานวิจัย ที่มีการเลือกตำแหน่งดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยเทคนิคต่างๆ เช่น การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและพบว่าตำแหน่งดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ได้ไม่เกี่ยวข้องกับการทำงานของยีนโดยตรงแต่เป็นรูปแบบการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน ที่จำเพาะต่ออวัยวะต่างๆ (Zilberman and Henikoff, 2007) โดยเทคนิคที่ใช้เพื่อการตรวจสอบคือ Combined Bisulfite Restriction Analysis หรือ COBRA เพื่อตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอในตำแหน่ง cg03096973 ยีน EML2 จึงระบุชื่อเทคนิคเป็น COBRA-EML2 ในงานวิจัยนี้ โดย

เทคนิคนี้เป็นเทคนิคในการตรวจว่าค่าดีเอ็นเอเมทิลเลชันจากไบอัลไฟต์ดีเอ็นเอ ที่ใช้เวลาน้อยและค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานไม่แพง

ผลการทดลองในตัวอย่างทั้งหมด 106 ตัวอย่าง แบ่งเป็นสมอง 15 ตัวอย่าง และอวัยวะอื่นๆ 91 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค COBRA-EML2 ที่ตำแหน่ง cg03096975 ยีน EML2 พบว่าสมองทั้ง 15 ตัวอย่างถูกระบุว่าเป็นสมองได้ด้วยวิธีการนี้ ในขณะที่อวัยวะอื่นๆก็ถูกระบุเช่นกันว่าไม่ใช่สมอง จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความไว และความจำเพาะ ด้วยวิธีการตรวจสอบวินิจฉัย (diagnostic test) ซึ่งให้ผลเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ นั่นหมายถึง การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ cg03096975 ยีน EML2 ตรวจสอบทางห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิค COBRA-EML2 จะสามารถระบุตัวอย่างที่เป็นสมอง ว่าเป็นสมองได้ทุกตัวอย่าง และสามารถระบุตัวอย่างอื่นๆไม่ใช่สมองได้ทุกตัวอย่างเช่นกัน และแม้ในงานวิจัยนี้จะทำการทดลองในสมองเพียง 15 ตัวอย่าง แต่เครื่องหมายดีเอ็นเอ cg03096975 ยีน EML2 ได้ผ่านการตรวจสอบจากตัวอย่างสมองจำนวนทั้งสิ้น 728 ตัวอย่าง ที่รวบรวมไว้ในฐานข้อมูลดีเอ็นเอเมทิลเลชัน ซึ่งนับได้ว่าเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอและเทคนิควิธีการที่มีประสิทธิภาพสูง และจากผลการทดลองที่ได้นี้ก็พิสูจน์ให้เห็นว่าฐานข้อมูลดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่สร้างขึ้นสามารถใช้เป็นฐานข้อมูลอ้างอิงเพื่อการคัดเลือกตำแหน่ง ซีพีจีเมทิลเลชันที่สามารถตรวจแยกค่าเมทิลเลชันของอวัยวะชนิดต่างๆได้ เช่นเดียวกับงานวิจัยในหัวข้อ Genome-wide DNA methylation profiling using Infinium assay ซึ่งเป็นงานวิจัยที่แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของชุดตรวจ Illumina® Human Methylation 27 Bead Chip Kit ที่สามารถตรวจแยกค่าเมทิลเลชันของอวัยวะชนิดต่างๆได้เช่นกัน ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่ง cg03096975 ยีน EML2 เพื่อยืนยันว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอของตำแหน่ง cg03096975 ยีน EML2 ที่เลือกมานั้นมีผลตรงกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่รายงานไว้ใน NCBI ผลที่ได้คือมีเพียงดีเอ็นเอจากสมองเท่านั้นที่แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง ซีพีจีดังกล่าวเป็นเมทิลเลชันตรงกับข้อมูลใน NCBI ในขณะที่ดีเอ็นเอจากหัวใจ ไต ตับ ปอด แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง ซีพีจีเดียวกันเป็น อันเมทิลเลชัน

จากจุดมุ่งหมายเริ่มต้นของงานวิจัยนี้คือการใช้ดีเอ็นเอเมทิลเลชันเพื่อการตรวจสอบวัตถุพยานประเภทชีววัตถุเพื่อใช้กับงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ ซึ่งผลที่ได้จากการทดลองในขั้นแรก คือ ตำแหน่ง cg03096975 ยีน EML2 และเทคนิค COBRA-EML2 สามารถใช้เพื่อตรวจสอบเนื้อเยื่อสมองได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่การทดลองในขั้นแรกเป็นการทดลองในตัวอย่างที่ได้รับการควบคุมทั้งคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ แต่หากจะนำเครื่องหมายดีเอ็นเอและเทคนิคดังกล่าวไปใช้เพื่อตรวจสอบวัตถุพยานจากสถานที่เกิดเหตุ ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ไม่สามารถควบคุมได้ทั้งคุณภาพและปริมาณจึงจำเป็นต้องมีการตรวจสอบความจำเพาะของตำแหน่ง cg03096975 ยีน EML2 ต่อสมอง และประสิทธิภาพของเทคนิค COBRA-EML2 (method validation) ในตัวอย่างที่มีรูปแบบต่างๆกัน โดยออกแบบการทดลองออกเป็น 5 การทดลอง คือ

1. การทดลอง Mixed samples

ในการทดลองนี้นอกจากจะเป็นการทดลองเพื่อเทียบเคียงกับชีววัตถุที่มีการปนเปื้อนซึ่งสามารถพบเจอได้จากสถานที่เกิดเหตุแล้วยังเป็นการตรวจสอบความใช้ได้ของเทคนิค COBRA-EML2 เป็นกระบวนการยืนยันความถูกต้องของวิธีการ ซึ่งจากการทดลองเทคนิคดังกล่าวสามารถตรวจวัดได้ในตัวอย่างที่มีดีเอ็นเอจากสมองอยู่เพียง 30 เพอร์เซ็นต์แสดงให้เห็นว่าที่เครื่องหมายดีเอ็นเอตำแหน่ง cg03096975 ยีน *EML2* และเทคนิค COBRA-EML2 มีจำเพาะและความไวสูง

2. การทดลอง Reliability

จากการทดลอง Reliability เป็นการประมาณค่าความเชื่อมั่น คือ มีความสม่ำเสมอ แน่นอนคงที่ และวัดได้ในสิ่งที่ต้องการวัด โดยใช้เทคนิคการวัดซ้ำในการตรวจสอบ โดยออกแบบการทดลองให้เป็น Intra-Reliability เพื่อวัดความสอดคล้องของผลที่ได้จากการทดลองซ้ำๆที่ทำภายใต้สภาวะเดียวกัน วันเดียวกันในห้องปฏิบัติการเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกัน และผู้วิเคราะห์คนเดียวกัน และ Inter-Reliability การวัดความสอดคล้องของผลที่ได้จากการทดลองที่ทำคนละวันโดยวิธีการเดียวกันในห้องปฏิบัติการเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกัน และผู้วิเคราะห์คนเดียวกัน โดยการทดลองนี้ทำในตัวอย่างที่มีเปอร์เซ็นต์สมอง 0, 30, 50, 70 และ 100 และเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์เมทิลเลชันที่ตรวจวัดได้ จากการทำทั้งสองการทดลองพบว่าให้ผลไม่แตกต่างกันหรือแตกต่างกันน้อยมากซึ่งแสดงถึงการตรวจวัดดีเอ็นเอจากสมองของเทคนิค COBRA-EML2 เป็นเทคนิคที่มีความเชื่อมั่นสูงสามารถวัดสิ่งเดียวกันหลายๆครั้ง แล้วได้ค่าของการตรวจวัดที่ใกล้เคียงกัน

3. การทดลอง Minimal DNA concentration

จากการทดลอง Minimal DNA concentration ในตัวอย่างที่เจือจางความเข้มข้นลงครั้งละ 10 เท่า ทำทั้งหมด 7 ความเข้มข้น คือ 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 และ 0.00001 ng/ μ l ตรวจวัดด้วยเทคนิค COBRA-EML2 โดยความเข้มข้นของดีเอ็นเอน้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้คือ 0.01 ng/ μ l ซึ่งจากการทดลองนี้ก็แสดงให้เห็นว่าหากใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอประเภทดีเอ็นเอเมทิลเลชันร่วมกับเทคนิค COBRA เพื่อระบุชนิดของตัวอย่างจากสถานที่เกิดเหตุในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ จะสามารถตรวจสอบได้แม้ในตัวอย่างที่มีปริมาณจำกัด แต่จากการทดลองในหัวข้ออื่นๆจะได้ขึ้นดีเอ็นเอของสมองที่เกิดจากการวิเคราะห์ด้วยกระบวนการ เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่มีขนาด 126bp คือ unmethylation band ขึ้นดีเอ็นเอขนาด 73bp และ 53bp คือ methylation band เสมอ แต่ในการทดลองนี้ที่ดีเอ็นเอความเข้มข้น 0.01 ng/ μ l ซึ่งเป็นความเข้มข้นน้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยเทคนิค COBRA-EML2 ไม่เห็นขึ้นดีเอ็นเอขนาด 126bp หรือคือ unmethylation band สามารถอธิบายได้ว่าในเซลล์สมองที่ประกอบไปด้วย Glial cell และ Neuron cell (Brain cell. 2014: online) ซึ่งในเวลานี้ยังไม่รู้ว่าเซลล์ชนิดใดที่เป็นอันเมทิลเลชันและเซลล์ใดเป็นเมทิลเลชัน จึงอาจ

เป็นไปได้ที่เซลล์บางกลุ่มเป็น อันเมทิลเลชันแต่ในเซลล์ส่วนใหญ่เป็นเมทิลเลชัน ดังนั้น เมื่อเจือจางความเข้มข้นจนถึง 0.01 ng/ μ l จึงไม่เห็นซันดิเอ็นเอที่เป็นอันเมทิลเลชัน

4. ผลวิเคราะห์จากการทดลอง Each position of brain

จากการทดลอง Each position of brain ในตำแหน่งต่างๆของสมอง 7 ตำแหน่ง ได้แก่ ซีรีรัมส่วนเนื้อสีขาว (Cerebrum white matter), ซีรีรัมเนื้อสีเทา (Cerebellum white matter), ซีรีเบลลัมส่วนเนื้อสีขาว (Cerebrum gray matter), ซีรีเบลลัมส่วนเนื้อสีเทา (Cerebellum gray matter), พอนส์(Pons), เมดัลลา ออบลองกาตา (Medunlla oblongata), สไปนอล คอร์ด (Spinal cord) ผลที่ได้คือทั้ง 7 ตำแหน่งให้ผลตรงกัน แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะของรูปแบบการเกิดเมทิลเลชันในตำแหน่ง cg 03096975 ยีน *EML2* ที่มีต่อสมอง

5. จากการทดลอง Aged samples

จากการทดลอง Aged samples เพื่อตรวจสอบความแปรผันของรูปแบบ DNA methylation ที่ตำแหน่ง cg03096975 ยีน *EML2* และประสิทธิภาพของเทคนิค COBRA-EML2 ต่อตัวอย่างที่เสื่อมสภาพจากการสัมผัสกับสภาพแวดล้อม ในช่วงระยะเวลาต่างๆ ได้แก่ 5, 15, 25, 30, 35, 85, 90 และ 100 วัน ตามลำดับ ผลที่ได้คือรูปแบบดีเอ็นเอเมทิลเลชัน ไม่มีการเปลี่ยนแปลงแม้ในตัวอย่างสมองที่เสื่อมสภาพจากการสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมถึง 100 วัน เช่นเดียวกับการทดลองที่ทำการตรวจสอบ ตำแหน่งดีเอ็นเอเมทิลเลชัน จำนวน 4 ตำแหน่ง ในตัวอย่างสุจิ เลือด เลือดประจำเดือน และของเหลวจากช่องคลอดที่ถูกเก็บด้วยไม้พันสำลีแล้วผึ่งให้แห้งแล้วเก็บไว้เป็นเวลา 75 วัน ทำการทดลองเปรียบเทียบกับตัวอย่างสด ผลที่ได้คือทั้ง 4 ตำแหน่งที่ทำการตรวจสอบในตัวอย่างที่มีอายุ 75 วัน และตัวอย่างสดมีผลไม่แตกต่างกัน (An et al., 2013)โดยผลที่ได้จากการทดลองนี้เป็นประโยชน์ต่อการตรวจสอบวัตถุพยานจากที่เกิดเหตุที่เสื่อมสภาพเนื่องจากการพบเจอหลักฐานหลังจากเกิดเหตุแล้วช่วงระยะเวลาหนึ่งในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์

จากผลที่ได้จากการทดลองทั้ง 5 การทดลองสามารถสรุปได้คือ ตำแหน่ง cg03096975 ยีน *EML2* ที่ใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อการตรวจวัดด้วยเทคนิค COBRA-EML2 สามารถใช้ตรวจวัดได้ในตัวอย่างที่มีการปนเปื้อน ตัวอย่างที่มีปริมาณน้อย ผลที่ได้จากการตรวจวัดสามารถทำซ้ำได้มีความแม่นยำสูง โดยดีเอ็นเอเมทิลเลชัน ณ ตำแหน่งดังกล่าวจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงแม้ตัวอย่างนั้นจะเสื่อมสภาพจากการสัมผัสกับสิ่งแวดล้อม และแสดงความจำเพาะต่อสมองอย่างน้อย 7 บริเวณ ซึ่งสามารถใช้กับงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

อภิปรายผลการวิจัย

จากการคัดเลือกตำแหน่งซีพีจีทีที่แสดงความจำเพาะต่ออวัยวะต่างๆ จากฐานข้อมูลดีเอ็นเอเมทิลเลชันได้ตำแหน่งซีพีจีทีที่แสดงความจำเพาะต่อสมองในรูปแบบไฮเปอร์เมทิลเลชัน จำนวน 12 ตำแหน่ง และซีพีจีทีทุกตำแหน่งนั้นสามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอเมทิลเลชันเพื่อระบุเนื้อเยื่อสมองได้ แต่ในงานวิจัยนี้ได้มีการคัดเลือกภายในกลุ่มเพื่อหาตำแหน่งซีพีจีทีที่ดีที่สุด กล่าวคือ แสดงความจำเพาะต่อสมองมากที่สุดตามข้อกำหนดที่ใช้เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือก ซึ่งตำแหน่งนั้นคือ cg03096975 ของยีน *EML2* และจากการตรวจสอบดีเอ็นเอเมทิลเลชันในตำแหน่ง cg03096975 ของยีน *EML2* ในตัวอย่างทั้งหมด 106 ตัวอย่าง แบ่งเป็นสมอง 15 ตัวอย่าง และอวัยวะอื่นๆ 91 ตัวอย่าง ในรูปแบบชิ้นเนื้อสด และพาราฟินบล็อก เป็นตัวอย่างที่เก็บจากทั้งศพเพศหญิงและเพศชาย ที่มีอายุระหว่าง 20 -50 ปี จากการพิจารณารูปร่างลักษณะของศพพบเป็นชาวเอเชียทั้งหมด ซึ่งเป็นเผ่าพันธุ์ mongoloid) แต่ฐานข้อมูลดีเอ็นเอเมทิลเลชันเป็นการรวบรวมผลงานวิจัยจากทั่วโลกย่อมต้องมีการทดสอบในมนุษย์เผ่าพันธุ์อื่นเช่น เผ่าพันธุ์ caucasoids จากผลการวิจัยที่ได้ให้ข้อสรุปแล้วว่า ที่ตำแหน่ง cg03096975 ของยีน *EML2* มีความจำเพาะต่อเนื้อเยื่อสมอง โดยไม่ขึ้นกับเพศ อายุ(ศึกษาเฉพาะ ช่วง 20-50 ปี) หรือเผ่าพันธุ์ และจากผลการวิจัยนี้จึงสอดคล้องกับข้อมูลที่ได้จากฐานข้อมูลดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่สร้างขึ้น นั้นยอมแสดงว่าที่ตำแหน่ง cg03096975 ของยีน *EML2* สามารถใช้ระบุเนื้อเยื่อสมองได้จริง ซึ่งก่อนหน้านั้นในหัวข้อวิจัยที่ทำการทดลองเพื่อหาตำแหน่ง ซีพีจีเมทิลเลชันเพื่อใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ ในการตรวจสอบสารน้ำจากร่างกาย ได้แก่ sequencing และ MSRE-PCR (Frumkin et al., 2011) รวมถึงอีกหนึ่งงานวิจัยที่ทำในสารคัดหลั่งเช่นกันนอกจากนั้นยังมีการรวมผลการตรวจระหว่าง DNA methylation ที่จะสามารถบอกได้ว่าตัวอย่างที่ทำการตรวจคือตัวอย่างชนิดใด กับผลการตรวจ STR เพื่อบอกว่าเป็นตัวอย่างของใคร เข้าด้วยกัน ด้วยวิธีการ Bisulfite treatment แล้วทำ pyrosequencing และ วิธีการที่ใช้ restriction enzyme ร่วมกับ capillary electrophoresis (An et al., 2013) ผลที่ได้จากงานวิจัยทั้งสองหัวข้อแสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอเมทิลเลชันมีความจำเพาะต่อเนื้อเยื่อแต่ละชนิด แต่จะเห็นว่างานวิจัยที่ผ่านมาจะเป็นการศึกษาดีเอ็นเอเมทิลเลชัน เพื่อระบุชนิดของเนื้อเยื่อ จะเป็นงานวิจัยที่ทำในสารคัดหลั่งหรือสารน้ำจากร่างกาย แต่การทำในอวัยวะต่างๆ มักเป็นการมุ่งเน้นเพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคหรือสาเหตุการเกิดโรค เช่น มะเร็ง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นงานวิจัยที่ริเริ่มการนำดีเอ็นเอเมทิลเลชัน มาใช้เพื่อระบุชนิดของเนื้อเยื่อ และเนื่องจากมีความมุ่งหวังเพื่อการใช้งานด้านนิติวิทยาศาสตร์ จึงได้ออกแบบการทดลองเพิ่มขึ้น อีก 5 การทดลอง ได้แก่ การทดลอง Mixed samples การทดลอง Reliability การทดลอง Minimal DNA concentration การทดลอง Each position of brain และการทดลอง Aged samples โดยผลที่ได้จากทั้ง 5 การทดลองเป็นเสมือนการยืนยันความจำเพาะของตำแหน่ง cg03096975 ยีน *EML2* ครอบคลุมถึง 7 ส่วนของสมอง และไม่มีการเปลี่ยนแปลงแม้ตัวอย่างนั้นจะเสื่อมสภาพ ซึ่งแสดงให้เห็น

ว่าดีเอ็นเอมีความเสถียร มากกว่าโปรตีน หรือ mRNA ที่มีการใช้เพื่อระบุชนิดของเนื้อเยื่อได้เช่นกัน นอกจากนี้ยังเป็นการบ่งชี้ถึงประสิทธิภาพของเทคนิค COBRA-EML2 ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ซึ่งสามารถตรวจวัดได้ในตัวอย่างที่มีการปนเปื้อน ตัวอย่างที่มีปริมาณน้อย และผลที่ได้จากการตรวจวัดมีค่าความเชื่อมั่นสูง สม่่าเสมอคงที่จากการวัดสิ่งเดียวกันหลายๆครั้งได้ และหากในอนาคตสามารถพัฒนาวิธีการตรวจที่จะรวมการตรวจดีเอ็นเอเมทิลเลชัน เพื่อใช้ในการระบุชนิดของเนื้อเยื่อจากอวัยวะต่างๆ เข้ากับ การตรวจ microsatellites ก็จะทำให้ได้ผลการตรวจที่รวดเร็วและชัดเจนมากขึ้น คือสามารถระบุชนิดของตัวอย่าง และตัวบุคคลได้ในคราวเดียว ซึ่งนับเป็นข้อมูลทางพันธุศาสตร์ที่เป็นประโยชน์ต่อกระบวนการยุติธรรม และนิติวิทยาศาสตร์

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้จึงเป็นงานวิจัยที่ริเริ่มการนำดีเอ็นเอเมทิลเลชันมาใช้เพื่อระบุชนิดของเนื้อเยื่อในการรวบรวมข้อมูลเพื่อสร้างฐานข้อมูลดีเอ็นเอเมทิลเลชันนั้น หากสามารถเพิ่มข้อมูลงานทดลองหรือ GSE เกี่ยวกับค่าเมทิลเลชันในอวัยวะต่างๆ ที่ใช้ชุดตรวจไมโครแอเรย์ชนิด Illumina® Human Methylation 27 Bead Chip Kit ได้ ก็จะมีผลต่อการเพิ่มความแม่นยำและความครอบคลุมของข้อมูลจากฐานข้อมูลนี้ นอกเหนือจากนี้ จากผลการทดลองความจำเพาะของตำแหน่ง cg03096975 ยีน *EML2* ต่อสมองเป็นการศึกษาเพียงตำแหน่งเดียวซึ่งอาจไม่เพียงพอต่อการนำไปใช้ให้มีประสิทธิภาพสูงสุดจึงควรใช้ตำแหน่ง ซีพีจีเมทิลเลชันมากกว่า 1 ตำแหน่ง เพื่อเพิ่มความแม่นยำในการตรวจสอบ และป้องกันความคลาดเคลื่อนของผลการทดลองที่อาจเกิดจากปัจจัยต่างๆ เช่น เกิดการเสื่อมสภาพตรงบริเวณ ซีพีจีที่จำเพาะนั้น และเพิ่มการตรวจสอบในตัวอย่างมนุษย์ที่มีอายุ ช่วง 0-19 ปี เนื่องจากรูปแบบดีเอ็นเอเมทิลเลชันซึ่งเกี่ยวข้องกับกาแสดงออกของยีน ดังนั้นจึงอาจมีความแตกต่างกันในแต่ละช่วงอายุ (Leeb and Wutz, 2012)

รายการอ้างอิง

- An, J.H., Choi, A., Shin, K.J., Yang, W.I., and Lee, H.Y. (2013). DNA methylation-specific multiplex assays for body fluid identification. *International journal of legal medicine* 127, 35-43.
- Bibikova, M., Le, J., Barnes, B., Saedinia-Melnyk, S., Zhou, L., Shen, R., and Gunderson, K.L. (2009). DNA methylation profiling using Infinium assay. *Epigenomics* 1, 177-200.
- Boisgontier, M.P., and Swinnen, S.P. (2014). Proprioception in the cerebellum. *Frontiers in human neuroscience* 8, 212.
- Choi, A., Shin, K.J., Yang, W.I., and Lee, H.Y. (2014). Body fluid identification by integrated analysis of DNA methylation and body fluid-specific microbial DNA. *International journal of legal medicine* 128, 33-41.
- Eads, C.A., and Laird, P.W. (2002). Combined bisulfite restriction analysis (COBRA). *Methods in molecular biology* 200, 71-85.
- Ehrlich, M., Gama-Sosa, M.A., Huang, L.H., Midgett, R.M., Kuo, K.C., McCune, R.A., and Gehrke, C. (1982). Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic acids research* 10, 2709-2721.
- Fliers, E., Unmehopa, U.A., and Alkemade, A. (2006). Functional neuroanatomy of thyroid hormone feedback in the human hypothalamus and pituitary gland. *Molecular and cellular endocrinology* 251, 1-8.
- Frumkin, D., Wasserstrom, A., Budowle, B., and Davidson, A. (2011). DNA methylation-based forensic tissue identification. *Forensic science international Genetics* 5, 517-524.
- Hall, J.A., and Georgel, P.T. (2007). CHD proteins: a diverse family with strong ties. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 85, 463-476.
- Juusola, J., and Ballantyne, J. (2007). mRNA profiling for body fluid identification by multiplex quantitative RT-PCR. *Journal of forensic sciences* 52, 1252-1262.
- Krieg, W.J. (1946). Fibers of the medullary center of the human cerebrum. *The Anatomical record* 94, 477.
- Leeb, M., and Wutz, A. (2012). Establishment of epigenetic patterns in development. *Chromosoma* 121, 251-262.
- Lister, R., Pelizzola, M., Dowen, R.H., Hawkins, R.D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., Nery, J.R., Lee, L., Ye, Z., Ngo, Q.M., *et al.* (2009). Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462, 315-322.
- Liu, C., Zhang, Y., Zhang, K., Bian, C., Zhao, Y., and Zhang, J. (2014). Expression of estrogen receptors, androgen receptor and steroid receptor coactivator-3 is

- negatively correlated to the differentiation of astrocytic tumors. *Cancer epidemiology*.
- Ma, L.L., Yi, S.H., Huang, D.X., Mei, K., and Yang, R.Z. (2013). Screening and identification of tissue-specific methylation for body fluid identification. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 4, e37-e38.
- Madi, T., Balamurugan, K., Bombardi, R., Duncan, G., and McCord, B. (2012). The determination of tissue-specific DNA methylation patterns in forensic biofluids using bisulfite modification and pyrosequencing. *Electrophoresis* 33, 1736-1745.
- Pradhan, S., and Esteve, P.O. (2003). Mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases and their expression. *Clinical immunology (Orlando, Fla)* 109, 6-16.
- Streit, W.J., Mrak, R.E., and Griffin, W.S. (2004). Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *Journal of neuroinflammation* 1, 14.
- Tak, Y.K., Kim, W.Y., Kim, M.J., Han, E., Han, M.S., Kim, J.J., Kim, W., Lee, J.E., and Song, J.M. (2012). Highly sensitive polymerase chain reaction-free quantum dot-based quantification of forensic genomic DNA. *Analytica chimica acta* 721, 85-91.
- Villeneuve, L.M., and Natarajan, R. (2011). Epigenetic mechanisms. *Contributions to nephrology* 170, 57-65.
- Wang, D., Yan, L., Hu, Q., Sucheston, L.E., Higgins, M.J., Ambrosone, C.B., Johnson, C.S., Smiraglia, D.J., and Liu, S. (2012). IMA: an R package for high-throughput analysis of Illumina's 450K Infinium methylation data. *Bioinformatics (Oxford, England)* 28, 729-730.
- Wasserstrom, A., Frumkin, D., Davidson, A., Shpitzen, M., Herman, Y., and Gafny, R. (2013). Demonstration of DSI-semen--A novel DNA methylation-based forensic semen identification assay. *Forensic science international Genetics* 7, 136-142.
- Xiong, Z., and Laird, P.W. (1997). COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic acids research* 25, 2532-2534.
- Yang, P.K., and Kuroda, M.I. (2007). Noncoding RNAs and intranuclear positioning in monoallelic gene expression. *Cell* 128, 777-786.
- Yi, S.H., Xu, L.C., Mei, K., Yang, R.Z., and Huang, D.X. (2014). Isolation and identification of age-related DNA methylation markers for forensic age-prediction. *Forensic science international Genetics* 11C, 117-125.
- Zhang, G., and Pradhan, S. (2014). Mammalian epigenetic mechanisms. *IUBMB life*.
- Zhu, Y., Davis, S., Stephens, R., Meltzer, P.S., and Chen, Y. (2008). GEOmetadb: powerful alternative search engine for the Gene Expression Omnibus. *Bioinformatics (Oxford, England)* 24, 2798-2800.

Zilberman, D., and Henikoff, S. (2007). Genome-wide analysis of DNA methylation patterns. *Development (Cambridge, England)* 134, 3959-3965.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

1. Phenol-chloroform-isoamyl alcohol (อัตราส่วน 25:24:1 โดยปริมาตรต่อปริมาตร)

Phenol 25 ส่วน

Chloroform 24 ส่วน

Isoamyl 1 ส่วน

ผสมให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. Ethanol (95%, 90%, 70%)

Absolute ethanol 950, 900, 700 ml

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 ml

ผสมให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิห้อง

3. 0.5M EDTA: Disodium ethylenediamine tetraacetate.2H₂O (pH 8.0)

EDTA 186.6 g

ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับ pH เป็น 8.0 ด้วย NaOH

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 ml

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 psi นาน 20 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

4. Lysis Buffer II

5M NaCl 15 ml

0.5M EDTA (pH 8.0) 48 ml

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 ml

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 psi นาน 20 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

5. 10% SDS

$\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$ 10 g

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 ml

ผสมให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิห้อง

6. Proteinase K (20m/ml)

Proteinase K 10 g

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ml

ผสมให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

7. 10M Ammonium acetate ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$)

$\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 77 g

น้ำกลั่น 80 ml

ปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 psi นาน 20 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

8. 10X Tris borate buffer (10XTBE)

Tris-base 100 g

Boric acid 55 g

0.5M EDTA (pH 8.0) 40 ml

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 ml

ผสมให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิห้อง

9. 10% APS (Ammonium persulfate, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$)

$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ 1 g

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 10 ml

ผสมให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1M Tris (pH 8.0)

Tris-base 12.11 g

ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับ pH เป็น 8.0 ด้วย HCl

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 ml

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 psi นาน 20 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

10. 6X loading dye

Bromphenol blue 0.25 g

Xylene cyanol 0.25 g

Glycerol 50 ml

1M Tris (pH 8.0) 1 ml

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 ml

ผสมให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ข

ข้อมูลของงานทดลองที่ในการสร้างฐานข้อมูล

รายชื่อ GSE ที่นำมาในการสร้างฐานข้อมูล

Series	Title
GSE19711	Genome wide DNA methylation profiling of United Kingdom Ovarian Cancer Population Study (UKOPS)
GSE20067	Genome wide DNA methylation profiling of diabetic nephropathy in type 1 diabetes mellitus
GSE20080	Epigenome analysis of normal and preinvasive cervical smear samples
GSE20712	Epigenetic portraits of human breast cancers (methylation data)
GSE21232	DNA methylation profiling of male human pancreatic islets identifies loci for type 2 diabetes
GSE22249	Epigenetic portraits of human breast cancers (methylation data 2)
GSE22595	Methylation Pattern of Human Dermal Fibroblasts
GSE22867	DNA Methylation Profiling of Glioblastoma: Impact on Gene Expression and Clinical Outcome (Illumina)
GSE25062	Genome-scale analysis of aberrant DNA methylation in colorectal cancer
GSE25706	Epigenome analysis of patients with various myeloid malignancies including differential levels of 5-hydroxymethylcytosine
GSE25869	DNA methylation represents one of the key regulator that transcriptional control of highly expressed genes in gastric cancer.
GSE26033	A Genome-wide Study of DNA Methylation Patterns and Gene Expression Levels in Multiple Human and Chimpanzee Tissues
GSE26126	DNA methylation profiling reveals novel biomarkers and important roles for DNA methyltransferases in prostate cancer

- GSE26989 DNA methylation analysis of ovarian cancers and normal peripheral blood lymphocyte DNA by Illumina Infinium platform
- GSE27130 Anti-cancer drug sensitive DNA methylation marker research
- GSE27284 Prognostic Gene Expression Signature of Carcinoma Associated Fibroblasts in Non-Small Cell Lung Cancer [methylation profiling]
- GSE27899 Methylation profiling in Ulcerative colitis
- GSE28746 Epigenome analysis of male identical twin pairs discordant for sexual orientation, age 21 to 55.
- GSE29490 A Genome-wide DNA Methylation Study in Colorectal Carcinoma
- GSE30229 Peripheral blood DNA methylation profiles are predictive of head and neck squamous cell carcinoma
- GSE30601 Epigenetic analysis of gastric cancer
- GSE30760 Cervical cancer
- GSE31788 Aberrant DNA methylation epigenotype expanding to non-polycomb target genes, induced by Epstein-Barr virus infection in human gastric cancer [Illumina Methylation]
- GSE31835 Global methylation analysis of psoriatic (involved and uninvolved) and control skin
- GSE31979 Genome-wide methylation analysis detects genes specific to breast cancer hormone receptor status and risk of recurrence
- GSE32867 DNA methylation and gene expression in lung adenocarcinoma
- GSE33065 Genome-wide DNA methylation profiling of CpG islands in breast cancer
- GSE33510 DNA methylation analyses of urothelial carcinoma reveal distinct epigenetic subtypes and an association between gene copy number and methylation status

- GSE34008 Epigenome analysis of genomic DNA isolated from whole blood of non-diabetic control and type-2 diabetic individuals
- GSE34355 Clonal Selection Drives Genetic Divergence of Metastatic Medulloblastoma [Illumina Infinium HumanMethylation27 Beadchip v1.2]
- GSE35146 Epigenome analysis of normal and IPF lung tissue samples
- GSE36002 Integrative analysis reveals relationships of genetic and epigenetic alterations in osteosarcoma [methylation]
- GSE36166 Epigenetic analysis of healthy young men following a control and high-fat overfeeding diet
- GSE36194 North American Brain Expression Consortium: DNA Methylation
- GSE36353 Genome wide DNA Methylation analysis of benign and malignant adrenocortical tumors
- GSE36637 Aberrant promoter methylation and expression of UTF1 during cervix carcinogenesis
- GSE37988 Methylation in Taiwanese HCC tumor and adjacent tissues
- GSE41037 Aging effects on DNA methylation modules in blood tissue
- GSE42510 Alterations in cardiac DNA methylation in human dilated cardiomyopathy

รายชื่อซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะต่ออวัยวะต่างๆและยีน

Tissue	Type	Gene	Probe ID	Site in gene	
adrenal	methylation	CTSZ	cg01663968	intra	intron
			cg13021192	intra	exon
		TNFRSF10C	cg27090216	intra	exon
	unmethylation	MYO9B	cg01103836	intra	exon
		AGRP	cg04176254	intra	exon
		CYP11A1	cg17790333	intra	intron
		FAIM2	cg25936385	inter	intron
		ELA1	cg27114026	intra	intron
brain	methylation	SLC5A5	cg01655355	intra	intron
		EML2	cg03096975	intra	exon
			cg20427879	intra	intron
		SP100	cg05091653	intra	exon
		CSMD2	cg05382123	inter	exon
		CASP4	cg08469834	intra	intron
		DHRS4L2	cg10677787	intra	intron
		TUBA6	cg12073537	intra	exon
		GPR30	cg16127845	intra	intron
		IER3	cg17067528	intra	intron
		IL10RB	cg17506742	intra	intron
		TRIM38	cg21844956	intra	exon
	unmethylation	NPFF	cg01657380	intra	exon
		STMN4	cg02130905	intra	intron
		NLGN2	cg03169180	intra	intron
		BLK	cg03860768	intra	exon
		GPR148	cg04037952	intra	exon
		FAT2	cg04443324	intra	exon
	RIT2	cg04711324	intra	exon	

Tissue	Type	Gene	Probe ID	Site in gene	
brain	unmethylation	40148	cg04761824	intra	intron
		KIAA0802	cg05104081	intra	intron
		FABP7	cg05798712	intra	exon
		C16orf45	cg07977490	intra	intron
		FLJ37538	cg08626653	intra	intron
		SLC35A4	cg08948050	inter	exon
		DLGAP4	cg09276978	intra	exon
		MYT1	cg10071275	intra	exon
			cg16772207	intra	intron
		ZNF574	cg11719283	intra	exon
		ABHD7	cg15156367	intra	intron
		C10orf11	cg17238009	intra	exon
		ELAVL4	cg18242139	intra	exon
		MAPK4	cg18450227	intra	exon
		TCF20	cg20051177	intra	intron
		MGC27121	cg20189782	intra	intron
			cg26790059	intra	exon
		GARNL3	cg20864636	intra	intron
		ANK3	cg22150335	intra	intron
		AKAP6	cg24812523	intra	intron
		C3orf40	cg25552889	intra	exon
		MGC2747	cg25903122	intra	intron
GRM4	cg26424956	intra	exon		
ACD	cg26698580	inter	exon		
cervix	unmethylation	PADI1	cg17502536	inter	intron
		KRTHA2	cg23674788	intra	exon
heart	unmethylation	MYBPC3	cg10335931	intra	intron
		C3orf45	cg17272094	intra	intron

Tissue	Type	Gene	Probe ID	Site in gene			
kidney	methylation	SPAG5	cg08062469	intra	exon		
		OXR1	cg16326979	intra	exon		
	unmethylation	CDH16	cg14221831	intra	exon		
		B3GALT7	cg19201019	intra	intron		
		PAQR5	cg20082641	inter	exon		
liver	methylation	ESR1	cg00655307	intra	exon		
			cg02720618	intra	intron		
			cg11251858	intra	exon		
			cg20253551	intra	exon		
		DSU	cg02668581	intra	exon		
			cg12620499	intra	exon		
		IGF2AS	cg04112019	intra	intron		
			cg10501065	intra	intron		
			cg16817891	intra	intron		
			cg04807655	intra	intron		
			methylation	TIAM1	cg15853125	intra	exon
					cg05163588	intra	intron
LIMK1	cg05163588			intra	intron		
GSTP1	cg09038676			intra	exon		
SCYL1	cg10628098			intra	intron		
NQO1	cg10708675			intra	exon		
GPAM	cg12137206			intra	intron		
AMIGO2	cg13640200			intra	intron		
PAR6A	cg15426734			intra	intron		
LRFN4	cg20358834			intra	exon		
PTK7	cg21663580			intra	intron		
RASSF5	cg23520347			intra	exon		
PACS1	cg25034557		intra	intron			
	unmethylation	C14orf68	cg00239071	intra	exon		

Tissue	Type	Gene	Probe ID	Site in gene	
liver	unmethylation	LOC55908	cg00881370	intra	exon
			cg05718253	inter	exon
		INHBC	cg03399971	intra	exon
		DAK	cg03483654	intra	exon
		ANGPTL7	cg04508649	intra	intron
		SLC10A1	cg05633152	intra	exon
		CCL16	cg05766474	intra	intron
		SERPINA10	cg05788638	intra	exon
		LOC284912	cg05976325	intra	intron
		URO1	cg06765947	intra	intron
		HGFAC	cg07364841	intra	intron
		THPO	cg09736922	intra	intron
		PROZ	cg09878269	intra	intron
		F9	cg10339201	intra	exon
		ITIH1	cg10356463	intra	intron
		CYP2D6	cg10840135	intra	exon
		CYP2D7P1	cg11221132	intra	exon
			cg19622372	intra	intron
		CA5A	cg11667117	intra	exon
			cg12343082	intra	intron
MASP2	cg12888113	intra	exon		
		NDST1	cg15467759	intra	intron
		AGXT2	cg16297030	intra	exon
		AGXT	cg16358738	intra	exon
		PGLYRP2	cg17915429	intra	intron
		AKR1D1	cg20647137	intra	exon
		HPR	cg20672044	intra	intron
		APOC3	cg20691580	intra	intron

Tissue	Type	Gene	Probe ID	Site in gene	
liver	unmethylation	OKL38	cg22309489	intra	exon
		SERPINF2	cg25803583	intra	intron
		ITIH3	cg26099316	intra	exon
		APCS	cg26353877	intra	intron
		APOC2	cg27436184	intra	exon
lung	methylation	MGC10471	cg15078027	intra	exon
		FLJ23577	cg15128898	intra	exon
muscle	methylation	EPHA1	cg02376703	intra	intron
		TBX1	cg02887841	intra	intron
		C1orf89	cg05588972	intra	intron
	unmethylation	CASQ1	cg00327483	intra	exon
		MYOG	cg01194444	intra	exon
			cg02810134	intra	exon
		TNNC2	cg08201421	intra	intron
			cg03555203	intra	exon
		ZNF537	cg08458170	intra	exon
			CHRND	cg11695684	intra
		MYOZ3	cg13214422	intra	exon
		STAC3	cg14747072	intra	intron
			cg25189085	intra	intron
		KRTHB4	cg24461814	intra	exon
CLCN1	cg26756862	intra	intron		
ovary	unmethylation	NR5A1	cg00691625	intra	intron
			cg16666160	intra	exon
		BPESC1	cg03552688	inter	intron
		FLJ25102	cg06785822	intra	intron
		FASLG	cg10161121	intra	intron
		SSTR3	cg14297029	intra	intron

Tissue	Type	Gene	Probe ID	Site in gene	
ovary	unmethylation	GMEB2	cg24674220	intra	intron
pancreas	methylation	ITPKB	cg01259619	intra	intron
		MXD3	cg02693857	intra	exon
		TACC1	cg04017769	intra	exon
		ZNF681	cg05520656	intra	exon
		CKB	cg05786809	intra	intron
		HSF4	cg06621126	intra	exon
		EXOSC6	cg09594067	intra	exon
		GPX1	cg15900980	intra	exon
	unmethylation	CTRL	cg02126424	intra	exon
		ELA2A	cg05221264	intra	intron
		AQP12A	cg06356454	intra	exon
		BHLHB8	cg07740640	intra	exon
pancreas & islet	methylation	ACE	cg02131967	intra	intron
		ITPKB	cg16340268	intra	exon
		FRY	cg16941656	intra	exon
		LDHA	cg20429911	intra	intron
		BTBD6	cg23034818	intra	exon
		TNFAIP8	cg23917399	intra	exon
	unmethylation	RBPSUHL	cg16757724	intra	exon
prostate	unmethylation	CXorf2	cg07356189	intra	intron
spleen	unmethylation	C1orf54	cg15120247	intra	intron
stomach	methylation	KCNK9	cg01717150	inter	intron
		C10orf59	cg06812977	intra	exon
			cg06981182	intra	exon
		NEU1	cg14976276	intra	exon
NKD2	cg26054540	intra	intron		
testis	methylation	C6orf27	cg00728602	intra	exon

Tissue	Type	Gene	Probe ID	Site in gene	
testis	methylation	SLC25A22	cg02973416	intra	exon
		WFDC1	cg04195127	intra	exon
		RIN1	cg05998426	intra	exon
		FAM63A	cg06433658	intra	exon
		P2RX7	cg07602200	intra	exon
		OASL	cg11301598	intra	exon
	methylation	GRIN2D	cg11953334	intra	intron
		BAK1	cg14666892	intra	exon
		MC1R	cg14696348	intra	exon
			cg16790239	intra	exon
		FAM57B	cg16152813	intra	exon
		PRND	cg16977257	inter	intron
		PTK6	cg18248891	inter	intron
		GPR162	cg19286986	intra	exon
		IKBKE	cg22577136	intra	intron
		CHRND	cg23398241	intra	exon
		GNG13	cg24889366	intra	intron
		TSPAN1	cg26294850	intra	intron
		unmethylation	H1T2	cg00601486	intra
	SYCP3		cg01127428	intra	intron
	H2-ALPHA		cg02774486	intra	intron
	DDX4		cg02899723	intra	intron
	DND1		cg03136712	intra	exon
			cg16949889	intra	exon
	SSX2		cg03712237	intra	intron
	SLC25A31	cg04382920	intra	intron	
MOV10L1	cg05070690	intra	exon		
ACTL7B	cg05156613	intra	exon		

Tissue	Type	Gene	Probe ID	Site in gene	
testis	unmethylation	C3orf24	cg05291178	intra	intron
		BCL10	cg05475904	intra	exon
		PNLDC1	cg06479512	intra	intron
		CETN1	cg06490951	intra	exon
		PPP2R2A	cg10207787	inter	intron
		RNF113B	cg11675413	intra	exon
			cg23934633	inter	exon
		MGC26816	cg11851098	intra	intron
		FLJ35894	cg12441964	intra	intron
		PRKACG	cg12493160	intra	exon
		ZNF690	cg12784172	intra	exon
		AP3B2	cg13140464	inter	exon
		MAEL	cg13249256	intra	exon
				PPM1G	cg15296858
CT45-2	cg16144006			intra	intron
ANKRD7	cg16192029			intra	intron
C5orf14	cg17067942			intra	intron
RNF17	cg17806989			intra	intron
SLC25A2	cg19215261			intra	intron
LDHAL6B	cg19636871			intra	exon
PEG10	cg19781251			intra	exon
HIST1H4G	cg19801560			intra	exon
CXorf2	cg23106779			intra	intron
DNAI2	cg24274272			intra	exon
TCEB3B	cg24883732			intra	exon
FLJ14768	cg26770281			intra	exon
C15orf2	cg27394486			intra	exon

รายชื่อซีพีจีเมทิลที่จับจำเพาะต่ออวัยวะต่างๆ และยีน

Tissue	Type	Gene	Probe ID	SourceSeq
adrenal	methylation	CTSZ	cg01663968	TCCGCTGGGGCGCAGGTGGGCACCGGCGGGGAGGCAGCCCTGGGGGACG
			cg13021192	GGATCCAGAGCGGGAGCCGGCCGGGATCTGGGACTCGGAGCGGGATCCG
	unmethylation	TNFRSF10C	cg27090216	CGGCACGAACCTAGCCAAAGATTTCTGATAGATTTTGGGAGTTTGACC
			cg01103836	TGGCGTCCTTGATGACGTCGGAGGTGGTGTCTCCTTGGTGGCAGTCACG
			cg04176254	CGGGATTCCTTGCCTAGAGATTCCTCCGGCCACCCCGTGCCTTGGCTTATA
			cg17790333	ACACAGGTTGTCTGCAGTCTTGACCAATGGCTGCCAGGGCATGGACTCCG
			cg25936385	CGCACAGGTTATGGCCGTAAAAAGCACATAAAAGACCAAGAAATGCTGGAA
			cg27114026	AAATTTCCCTAAGTCCAGGCCAGCACCCCTGTCCCAGGGCAGGTGGGACG
			cg01655355	CGAGCTGCTCCCGTAAGCCCAAGGGCGACCTCCAGCTGTACGCCGTGAGC
			cg03096975	GTCTGGGTCCCAGGGGTGGGTGAACCTGAGATCTAAGCCCCGGGAGCG
cg20427879	CTCCACAGCCACCCCTGGAGCCGGAGGGTCCCACCGGGTCAACATCCCG			
brain	methylation	SP100	cg05091653	AAATTAACACTCCAGGTTAAACACTGGCTTACTTTTAAACATCAGACG
			cg05382123	CGCCGCCCTTGTGGTGCCTAAAGAACCAACCGAAGCAGCCAGAACTCCTCA
			cg08469834	CGGAGGTCATATGTTTCCAGATGTCTTTGAGCCAGAAAGATTAATTC

Tissue	Type	Gene	Probe ID	SourceSeq
brain	methylation	DHRS4L2	cg10677787	GGCTGGTGAGTGATCAAAGCGCTCTCCGTTCAAGTTGCCGTGTAGGGCTCG
		TUBA6	cg12073537	CGGACTCCTTGGTAGTCTGTAGTGGAGATCCTTGTGGCCGTCCCTTCG
		GPR30	cg16127845	CGCCTCAGGCTGCAGCAGCCGCAATTACTCATACTCAGCGGACAAAAGGATC
		IER3	cg17067528	GACATGCACAAATCCTAGGCGCCAACTGCACGTTGTGAGTGTGTGAGTCCG
		IL10RB	cg17506742	CGCAACTAGGCTGCTGCCGTCCGATCTGTAAACAGGAGAAAAGCCCAT
		TRIM38	cg21844956	CGTCTTCAGAAAGAAATTCGTGTGGCTTCAAGAGACTGATCAAAATTGTGA
		NPFF	cg01657380	CGCTTTGTCAGAGCCAGGCCCTGGGGAGCCTTAGACGAAACCCCTAATCCC
		STMN4	cg02130905	ATTTAAAGGACCTAAAGATCCTGGAAATCATTCATTAATACCCCCAGCTCG
		NLGN2	cg03169180	CGCTAAAAGCCCTGCCCTGTGGCCAATCAAAGCCTAGCCTTAGTGACCAG
		BLK	cg03860768	ACCTCCATGCTGACTCTACAAAGGTAATTTGCCCTGCCGTGTGGACAAAACG
		GPR148	cg04037952	ATGTTAGCCGGGAGCAGGTAGTGGGCTCCTGTCCGAGCCCGTTGGTTCCG
		FAT2	cg04444324	TTCTCCCAAGACCCTATGTGGAGAGCTTCGAGAAAAATGGGCACTACCTCG
		RIT2	cg04711324	TTTAGTACGAGGTAAGAACCATCAGCGTCCGGCTGGCTGGTGGTCTCCG
		40148	cg04761824	CCCAAAGGCGAGTCCCTCAATAATGCCATCTTTGTTGCAGCAGAAACATCG
KIAA0802	cg05104081	CTTACAAACACCAAGTCAGAAAAGCGACTAAACATCAGACACAACTGCACG		
FABP7	cg05798712	CGGGGATCTTCTGGTCTAAATTGCCACTGCAGCTCAGAAGACCCCTTACAC		
	unmethylation			

Tissue	Type	Gene	Probe ID	SourceSeq	
brian	unmethylation	C16orf45	cg07977490	CCCAAAGTGCAATGCAAAACATATGGAACATGACATAGGCATCCACTGTCCG	
		FLJ37538	cg08626653	CGCAAAGTAGGCCCTGGGCATAACTCTGCCTGTAGGTGTCCAGTCTCTGT	
		SLC35A4	cg08948050	CGGGTGGCCAGGCCAAAATGAAAGGCTTGGGGTTCCATGGTGTCAAAAA	
		DLGAP4	cg09276978	TGATCAGAGGTGCCGGCAGGAAGCAGCTTGGGACAGGGGGCTTGCCACCCG	
		MYT1	cg10071275	TGGAGCCCCAAGGGTTTCATGGGTAGCGTATTTACAAAAGGAGCCTCCTCCG	
		ZNF574	cg16772207	CATTAGCAGCGGTGGCAGGGCTGGCGGAGGAGGCTCCCTTTGTAAATACG	
		ABHD7	cg11719283	TCCCTTGTGGGGTTTGTGGCCCTCAGCCCACTTCTCTGGACAGTCTTGACG	
		C10orf11	cg15156367	AACTTACAGAGAGCTGC AACCCAGGGATACAACGAAATGCTTCAACAACG	
		ELAVL4	cg17238009	TCTGGCTGAAAGACCCGCAACTTTCACCTTGTGAGAACCTTTAGCCAGCG	
		MAPK4	cg18242139	ATCTAGTCAATACCATAACCATCTTTATGGCAAAATATGGGGTCTCG	
		TCF20	cg18450227	GGGCACTGACCTGCAAGGTGAGCTGTTCAAGTTCAAGTTGCGGTGGCGTACATCG	
		MGC27121	cg20051177	TGTATTAGGGTGTACTACTGAACTGCGGGTTTTTAACACTGGCTGCTGATCG	
		GARNL3	cg20189782	TTTCTTCAGATCAGCATCAATCACCATGGCAACCAGCAGGCAICTGTACG	
		ANK3	cg26790059	CGCTGCAAGCATCAGGTAAGACATATAGATGGCTCTTCTTTGGAAATGGAA	
				cg20864636	GTTGAGCTCTGGGCAGACACAGCATTTAGTCAACAGCCATTTGGGCATCCG
				cg22150335	CATGTATGGAACAATGCCCATGCCATATATAAAGTGAAGCACACTTTCCG

Tissue	Type	Gene	Probe ID	SourceSeq
brian	unmethylation	AKAP6	cg24812523	CTACATAATTTAAATCCTATATGACTCTTACAGGCCCTTTGTCTTAACCCG
		C3orf40	cg25552889	CTGGAGTGCAGCTGGTCAACAACACATCTCTAAAAATCTTGTCTAGCCTACG
		MGC2747	cg25903122	CGGGCCATATGGTGTCTGTCTGGCACAACAATGTGACTCAGCTCTGCTGT
		GRM4	cg26424956	CGGGACAAGGATCAGAGCCCTTCTGCAACCCCGGCCACTGCCTGCTGTCT
cervix	unmethylation	ACD	cg26698580	CGGCTGCACAAGCATGGTTTCAAGCCGCCCTGGCTTTCTACATCCGAGA
		PAD11	cg17502536	CGGGTGAACCTGCGTGGAAATTAATAACTCTACCACCTTACTAGCAGTGAGA
		KRTHA2	cg23674788	CGTTAAGGAAC'TGCATGGT'TTCC'TTCTCATTTGCCATTTGAAGGCCCTTCG
		MYBPC3	cg10335931	GAGCATGCTGGGCCCATAAACCCCTAAAGGCTAACGGGTCAGGAGCATCCTCG
kidney	methylation	C3orf45	cg17272094	ATGCTCTGTCA'TGGGCCAT'AAACAT'GGAGCCAT'GGAGCAGACAGTCCCTACG
		SPAG5	cg08062469	TAGGTCC'TTAT'GCCCAT'TAAAAT'GAGCTACT'ACACGGCAT'TCGGCATAGCG
		OXR1	cg16326979	CTGGGTCAGGTCTGATGGGCCGGTGGCGGCTAGTGGTGGCCGCCACCG
		CDH16	cg14221831	CGCCCAAAGACTGGCTCCCTTGGTCCAGCTGCCAAGCAAGAAAGAGACTCC
liver	methylation	B3GALT7	cg19201019	TGTTGGATCCAAAGTTCCGGTTAGGCACCCAAAGCAAGCTATTAGAACTACG
		PAQR5	cg20082641	CGGTTCAGGATCCGTAAAAATGGCCGGAGATAATTGACTGCAACCTATTTC
		ESR1	cg00655307	CGGCCAGGGACTGTTGCCTTGCCCTTGACATTTGGCTTAAACATCAC'TCCAG
			cg02720618	GGAGGTGTTTTC'CCCCCA'CAAA'TAAC'TGCT'GCTTTGTCTGGT'TTTC'CAACG

Tissue	Type	Gene	Probe ID	SourceSeq
liver	methylation	ESR1	cg11251858	GCCATCCCAGATGCTTTGGTGTGGAGGGTCATGGTCATGGTCCGTGGCCG
			cg20253551	CGCCCTTCCCTGCAGCCCCACGGCCAGCAGGTGCCCTACTACTCTGGAGAAC
		DSU	cg02668581	CGCCCCGTACCGCCCTCTAAAGGTGAAGCAGGGACTCCAGCCAGTCCCTC
			cg12620499	GCTGAGAACCGTGTGCTGCTGCTGCGGTGCGAGTGTGGAGGAGCGCG
		IGF2AS	cg04112019	ATTGGAATCCCCCGAGGATCAAGGGCTAATTTGTTGAGCTCAAGCTTCCCG
			cg10501065	CGGGTCACAATAAATTTCTTTGGACGTTAATTTCCGGGGACGTCAAAACAC
			cg16817891	GGAAC'TGGGCTTTCCCCAGCCGGAGTGGACAGACTTTCCCTGAAAAATTCG
		TIAM1	cg04807655	C'TAAGTCAGGGACCGAGACGCAAAACATAGACACAAAGGATGCACAAAGCACG
			cg15853125	GCCTTACGCTTACCTGCTGGGCAGAGTAAGTGACTCGGGCAGGGTTACAG
		LIMK1	cg05163588	GAGGACCAGGAAAGTCAGCGCC'TGGCTCAAAGGTCACAGAGCCCGGCAGGCG
		GSTP1	cg09038676	CGCCCTACACCCTGGTCTAATTTCCAGTTTCGAGGTAGGAGCATGTGTCTG
		SCYL1	cg10628098	GGAGGGTTTAAAGTGACTTACCCCGCGCGGAGTACTGATCTTAGTACC
		NQO1	cg10708675	ACAGAGGCCCTCAAAAATCTGGCTGGGGTGTAAAGGCAAGCCCATCTGCG
		GPAM	cg12137206	GAACTGCCAGGCAGGTGTGGGCTGCGGGAGGCTACTCGGGCCCGGAGCG
		AMIGO2	cg13640200	CGCCAAGTGCAGTTGACTGTCTGGGTTTACAAAATAAACCCAGAAAGCAGC
PARD6A	cg15426734	CGGCTGCCCGCTTTTGGCGCAGCC'TTAAAGCCAGACTTCAAGTCCAGTACC		

Tissue	Type	Gene	Probe ID	SourceSeq
liver	methylation	LRFN4	cg20358834	AGGGCCCGGAGCAGGGCTTTGTCTGGTGTCTGCAGAGTGAGGTTCG
		PTK7	cg21663580	CGC GCCG CAGGTC TGTCCGGCATCGGGCCCAAAC CAGCAACTCTTACCCT
		RASSF5	cg23520347	TAGGGCTTACGCCAAGCGGAGGCCCGGGGAGGGGTGCCACCTCCCTCCG
	unmethylation	PACS1	cg25034557	AATAATATCAA GAGATCTATACCACATCCATGTATGTACAGCTCCCGGCG
		C14orf68	cg00239071	CTGTTACCTCCGATGGCTCCAGCGACAAAATCCATGAACAAGGTGTGGCG
		LOC55908	cg00881370	CGAGGAGTTCAAGCTGCATCTTCCAGCCTGCCTGACAGAGAACCATCACC
		INHBC	cg05718253	CGTCCAAAGCC TGAGGCCAGACCCTCCCGGCCATCGGCAACTGTTACTCA
		DAK	cg03399971	CGCCCAACACTGAACCGCCCTGTGTCCAGAGCTGCTTGTAGGACTGCACCT
		ANGPTL7	cg04508649	AAGGCGTGATTTGTGCCAGTCGACTGGAGTTCCTTCCGCAGCTTGTATCG
		SLC10A1	cg05633152	CAGCATGGATTACATTAACAGGCCCTCCCTGGGTGAGTAGCGTCTCTTTCCG
		CCL16	cg05766474	CGCCCCACAGACCCTGGCACTGAGCGTCATCCTGGTGTTCATGTTGTTCTT
		SERPINA10	cg05788638	CGTGAAGAAATGGGCGAATGTGTGTCAAGCTACCCTTACATGCCCTATCTTA
		LOC284912	cg05976325	AGTCTGCAGTGGTAGCCCCAGTAAATTCCTGGGTGCTCCTGGACATATATCG
		UROC1	cg06765947	CGCCTGGCTTCAATFAGCTATTTGTTGAATGAACGAATGATTTAGCAGGAA
		HGFAC	cg07364841	CGCTGCAAGTGCCCTACCTGAGGCCAGTGACCCCTCCGACCTGCACATGGC
				CGCATCCAGACCCAA CAGAGGTCCAGAGAGAGGGGGCAGCCCCCAGACCC

Tissue	Type	Gene	Probe ID	SourceSeq
liver	unmethylation	THPO	cg09736922	CGCCTGCCTGGGCCACTTCTGCCCAATCAAGAAGGGAGCCACCAGACAC
		PROZ	cg09878269	CGGGAAAGGGCCAAATAGTGTCTGTCACTACAGCTCAGCACCATTTGTAGC
		F9	cg10339201	ACTAATCGACCATTACCACTTTCACAATCTGCTAGCAAAAGGTTATGCAAGC
		ITIH1	cg10356463	CGCAGTTCTACACAGAGGGACATGGTCTGGAGCCCCCATCAGTAGTTTAAAC
		CYP2D6	cg10840135	GCTGGCAAACCTGCTGCATGTGGACTTCCAGAAACACACCATACTGCTTCG
		CYP2D7P1	cg11221132	CGGGCTGGGCAACCTTGTCTGCATGTGGACTTCCAGAAACACACCATACTGC
			cg19622372	CGGCAAGGACCCTTGAGCAGCCCATACCTTGCCCTGGCCTTGACTCTGCCA
		CA5A	cg11667117	CAAAGTTATTGCTGGTTTGCCATGCACAGGAAACGCTGAGAACACCCATCG
			cg12343082	CGCCAGTCCACAGTGGTCCCTGATCAAAGTGAGAACAGACAGCAGGGAACA
		MASP2	cg12888113	CGGCGCTGGACCCCTGACTGCACCCCCCGGCTACCGCCTGCGCCTCTACTTT
		NDST1	cg15467759	CGGTGCCGAAACCAAGGTTGCATGATTTGGAGCAAGCTTTTAATATCTC
		AGXT2	cg16297030	GACTCTAATCTGGAGACATTTGCTGAGACCCCTTGTGCCTGGTCACTTCCG
		AGXT	cg16358738	TGAGTGGGTTCCCTGGTCTGGAACACAGTACTGGATGCCCTTCCCTTGATCTCG
		PGLYRP2	cg17915429	CGCCTTCTGCAGAGCCAAAGAGGTTTGGTCCCAGGACTCTGCCCCCTGACT
		AKR1D1	cg20647137	CGGTGACTTGCAGCACTGAGATCATTGTGGAGAACCTTGACTGTAGGAGT
		HPR	cg20672044	CGTAGCTGTGAGCATAGGATGGGGCATACAGCAGGCCACTTAAACAAATACT

Tissue	Type	Gene	Probe ID	SourceSeq	
liver	unmethylation	APOC3	cg20691580	CAAAGACACACAGCATGTTGGCTGGACTGGACGGAGATCAGTCCAGACCG	
		OKL38	cg22309489	GACGTGGACTTTCCTCCCTGCCATCTTGTATTACCTGTTAGGTGATATATCG	
		SERPINF2	cg25803583	GGTGGGGGCCGTGGGAAAGGTCCGGTCTCCATCTGCTTGTCTCCTTTCCG	
		ITIH3	cg26099316	CGCTCCTTATATGAGCAAGCCTGGTGTTTTCCAAAGCAGGGTCAGTGACCT	
		APCS	cg26353877	CGGGATAAAAGAAAATAAATGACCTTCAGTATAAATGCAGGGAAAAG	
		APOC2	cg27436184	GCGTGGGTGGAGTCAGCAGGTCCCATGATGGCCCTCACCTGAGAGCTTCG	
lung	methylation	MGC10471	cg15078027	GAGCGGGCGAGGCAGCAGCTCACCGTGATTTGGCTGAAAGGACGATACG	
		FLJ23577	cg15128898	GCCGTGGATAAGCTTCCATAGCAAAAGGTTGCCCTTGGCTACAGGAGGACG	
muscle	methylation	EPHA1	cg02376703	CGCCCGCAGTCTCATTCGGGTCAAGACGCCTCCGGTTCTTGAATTTGATT	
		TBX1	cg02887841	CGGCTGCCATATACCTACCTCGCTTGAATTCGGACCCCGGACCCCGTTGCT	
		C1orf89	cg05588972	CGGAGTCATAGAGAAAGGATCCACAAACCAGAGGAAAAAGCCCTAGTCCA	
		CASQ1	cg00327483	TCCATGAGTGCTACAGACAGGATGGGGCCCAAGGCTGTGCCGGTCTGCG	
		MYOG	cg01194444	AGGGAGCTGAGCAGGGCCCTGGAGGCCTCGATGTACTGGATGGCACTGCG	
	TNNC2	unmethylation		cg02810134	CTTGTCTTACCATGGTTGCTGGTGACCGGGACTCCTCTGTTCACAGGTCG
				cg08201421	GGGCCCTTGACAGAGAAAATTAAGCCCTCAAGCAGGTGGCAGGCCCTTGACG
			ZNF537	cg03555203	TAGCAGCAGCAGCAGCTGTGGCAGCGGGAGCTTCGACTGGCACCAAGCGG

Tissue	Type	Gene	Probe ID	SourceSeq		
muscle	unmethylation	ZNF537	cg08458170	CGCTTTCAAAAGTCAGCCATTCGGTCACCTGGTCTCACTGATGTGTGACTCG		
		CHRD	cg11695684	CGGCTGATCCGGCACCTGTTCCTCAAGAGAAAGGGCTACAACAAGGAGCTCCG		
		MYOZ3	cg13214422	CGGAAAGCTACCAGCAGCTGACCCCTCAACATTTCCAGGTGACTTTGGTGTG		
		STAC3	cg14747072	CATGAACAGAAACTGTCCCTTCTGAAATTCAGCCATTATTCACCTGTTCCG		
			cg25189085	CGCCTAAAACCCAAAAGACTCACAGACAAGGAGAGAAAATGAAGAAGCTGA		
		KRTHB4	cg24461814	GTGGGCAACTTCAGCTCTTGTTCAGCAATGACACCACAGAACTTGAATCG		
		CLCN1	cg26756862	ACCAGTAGTAGGCTTCCAGCTCCATGTCACTGGTCCCTCTATAAAATATCG		
		ovary	unmethylation	NR5A1	cg00691625	TGACTCTGCAGGCCCTCTCGCCCTTCTTTGTGGTGTTCCTTCATTTACG
					cg16666160	CGCACCCACAGTCGCCACCCTCCACCTGGGCTGCCGGAGCCTCCCCCTG
				BPESC1	cg03552688	CGCAATTAATAAGGCATGAAAGTGCCAGACAGCAAGGTTTCAGTTCTAGAAT
FLJ25102	cg06785822			TTCTGTCAAAAAGGTCGGCCAAATGGGGCCATTCGTAGTTCAGAAACCG		
FASLG	cg10161121			TTCCGGCCCACAATTTCTTGATAACAGCCTTCAAAGGCCCTCAGTTGCTGTCCG		
SSTR3	cg14297029			GTGACCTCCCGGTCGGCTGCAGGGGCAGGGCGGTTAGTCTCAGAAATCTCG		
GMEB2	cg24674220			CGTGGTCTTGACCTTAAAGGGCAAGGGAAAGAAAAGTGAACCTACAGGATA		
ITPKB	cg01259619			CGCCCCGCACACAGCATACCTTAGGAGCCAAGGACTTGGACCTCGCTTCTC		
MXD3	cg02693857			GCACTTTTGTTCAAAAGTAACTGCACACGGTGCACAAAACACAGGGGCCCG		

Tissue	Type	Gene	Probe ID	SourceSeq	
pancreas	methylation	TACC1	cg04017769	CGCTCCACAGGGCCCCGACGGCACTCGTTTAAACCACATCCGGGCCCTCT	
		ZNF681	cg05520656	TCTCACCAATTTCTAGGTTTCCGGGGACCTGGCGTCTTAGCTATGGATCG	
		CKB	cg05786809	CGCTTGGGTTCCATCCGCATCCCTCGAGCCTGCCCGCTAGTCCAGCCAGCC	
		HSF4	cg06621126	CAGCTCGGGGGGTCAGGGTCGGGGCACTCACACCTTGGAAATGACTACG	
		EXOSC6	cg09594067	AGTGGATCGGGCAGGGCGTTGGGGGAAGGGTTTCGCACGCCAAGAACCG	
		GPX1	cg15900980	CGCTGCCCGCTGGTTGCCCTGGGCCAGACCAGACATGCCCTGCTGCTCCTTC	
		CTRL	cg02126424	CGGCATTCCTGCCATCAAAACGGCACTGAGCTTCAGCCAGAGGATGTCA	
		ELA2A	cg05221264	CGCAGCAAGTGTAGTTTACATTTGTTGGGTCGCTGCTTCCCTGACTCAAGA	
		AQP12A	cg06356454	GGCGGTGGGTGCGGGTGCAGCTCGGGCCCTGCTGCCTGGAGATGAGGACG	
		BHLHB8	cg07740640	GTAATTCCTGGCCAGCGTGAGCGTCTCGATCTTTGGAGAGCTTCTTTGTCCG	
pancreas & islet	methylation	ACE	cg02131967	CGGCCCTCGGCTCGATCTTCCAGCCCGACCCCGGAGCCTCCCGCCTC	
		ITPKB	cg16340268	CACCAGGCTATTGAGCGCATAGCAGTACACAGCCATAGTACTGGGTCCCG	
		FRY	cg16941656	GGTGGGCTTTCCTCGGTTTCGCTACCTGGCTGGAGCCGAGCTGGTGGCGG	
		LDHA	cg20429911	GCTTTTTTGGCTCTATGGGCTCCGAGAACTGGACCTCGAGTTTGTGCACCG	
		BTBD6	cg23034818	GGTGGACCTGCTTGTGTTGGCCATTTGCATTCGGAGTCTGCCCTCTGGCCG	
		TNFAIP8	cg23917399	TGCTTCGGAGTGCATTAATGTTCAGGATAACCAAGCTGCAGGGGGGATTAACCG	

Tissue	Type	Gene	Probe ID	SourceSeq
pancreas & islet	unmethylation	RBPSUHL	cg16757724	GGGGTGTGCAGGGTTCAGCGACAGCAGCAGCTGGACTCGTCCAGAGGGCG
prostate	unmethylation	CXorf2	cg07356189	CGCCGTGCCCAAAGTCAGACATCCGGATCCCAAGTGTGTCTTTGGTT
spleen	unmethylation	C1orf54	cg15120247	CTTTTATGTTTCCCATGTTCAATCAATTCAGAAAACCCTTAGCAACATACG
stomach	methylation	KCNK9	cg01717150	GCTGCCACAGCAGCCTCGCCAGCTGGCTGGGACCAGGCGGGAGGTGGCG
		C10orf59	cg06812977	CGCTCTTTTGGTTCGGTGTCCCTGGGCCGACCTGGGCCCTGAGCTTTCCCT
testis	methylation	NEU1	cg14976276	CAACAATAGCCACACCAATTTCCAGGCTTTTCTGGGCAGGGGCAGGGCG
		NKD2	cg26054540	AGCTAGACTCCACAGAGTCGGGAGTCAGCTGACCCGGACCCCTTAAAGCG
		C6orf27	cg00728602	GGGGCGTGGCGCGCGGATGGGAAACTGCAGTCGAAAGCACGGTGAGCCG
		SLC25A22	cg02973416	CGTACAGGGCACTTAGGTCAGAGTTATAATTAACCGAGGCTCAGCAGAG
		WFDC1	cg04195127	CCGAGGTGAAGGTTACGAGTCCCTGAGGATCTGTGGGTGTGAGCCAGCCG
		RIN1	cg05998426	CGGGATTTCTCGCCAGCCTCGCAGGCAATGCCCGTTTCAGATATTTCTT
		FAM63A	cg06433658	CGCACATCCCCAGTGAGTAACACTTCTCTGAGGGCGGTCCGCCCTGTACAC
		P2RX7	cg07602200	CCTCCGGGCCCTGACTACAAAGCTGGTTTTTCAAAGGAAAGTTTGTGGTTTT
		OASL	cg11301598	CGTGGAAGAACCACTTAATGGTGCCATAATTCATGCTCTGGATCCGAGTG
		GRIN2D	cg11953334	GTGTGCTATACAGTTTCTGTGCATCAGTGCCATCTGTCCCGAGAGTACCG
				GGAAGTTGGGCCCCGGACATTCAGAGGCTGTGCGGGTGTCTCTTTGCCG

Tissue	Type	Gene	Probe ID	SourceSeq	
testis	methylation	BAK1	cg14666892	GCTGATTGGAGCCGGGTGCCCTGGCACCTCTATGATCACTGGAGTCTCG	
		MC1R	cg14696348	GTGGCTGTTGGTGCAGGGCCTGTGGTGCCCTCCGACGGGAAATGGCGCG	
			cg16790239	CATGTGGCCGCCCTCAGTGGAGGGGCTCTGAGAACGACTTTTAAAAACG	
		FAM57B	cg16152813	GGCTGGGCACGGAGTCTCTATGATGATGCCATGTGCGGTGTCTGTGCCG	
		PRND	cg16977257	CGGTGATTTGCGTCAGAGCAATTTTGAAAACCAAAATTAACGGTTGTTA	
		PTK6	cg18248891	CGCCCATGGCGCTGGGGCCCAAGGCCACAGGTCCTCCAGGCAGCCCT	
		GPR162	cg19286986	GGAGGGCGGGCGAGCTGGAGCGGCGAGGCGAGCGGGAGCCCGAGAGAGCCG	
		IKBKE	cg22577136	CGCTCTATGTGAGAGCACCGCTGCCAAACAAGCCCAACCCCTGCACCCGG	
		CHRNA	cg23398241	CGGGAGTCCCAGCCTGGGATCTTTGCCTCATGTCTCTGGGCTCCTGCCCC	
		GNG13	cg24889366	TCAATTGTCCCTCCGCTGTACCTTTTCAAGGTAGGTCGGATGAACAGGCG	
		TSPAN1	cg26294850	CGTACATCAGATATTATCTGTTGTTTGTAGTTGCTGGGAGTCAGTCCA	
		unmethylation	H1T2	cg00601486	CGCCCTGGGCCCCAGTGGCGAATCCCGAGGACACTCAGCCACTCAGCTGCCA
			SYCP3	cg01127428	GGCCAGAGGCTGCCCTTGACCAGTGAGGTAATCTTACCCTCCTGGCGTCG
			H2-ALPHA	cg02774486	GTGCTTTCTGACCAGGGTTGAAACAGCTACTGCGCTGCCCTCTGTGGGTCG
			DDX4	cg02899723	CCTGTGGGTACAAGGCTGGCTGAGGGCTACTTGTGTCCACGTTCTCTCG
DND1	cg03136712		CGGGGCTCGCCGGCCCCCAAGTCCGACCGGCTTACCCTACAATCCCCT		

Tissue	Type	Gene	Probe ID	SourceSeq
testis	unmethylation	DND1	cg16949889	CGGGCTAGGCATCACTGACACACGACACTCCGTGGTTGAGGCATTTTA
		SSX2	cg03712237	C'TTGTAGAAAGGTTCCGTCCCTGGAGCCGGACTGATAGAAGCCACATCCG
		SLC25A31	cg04382920	GTGTCAGGTGTACGTTGTCAGGCGTCACTGGCTGGAGCCGTTGGAGCG
		MOV10L1	cg05070690	CGGGATCCCCGTTCCGCTCAGGAGGCTTCCGACCCACAGCATCCCCGCC
		ACTL7B	cg05156613	CGCCAGCTCCGGGACACAGGTGGGCCACTCAGCTCAAGATGAAGCCCA
		C3orf24	cg05291178	CGCTCTCGTCCCATGTTGGTTCTGCCGAATATTTAGGCTGACTCCTGACC
		BCL10	cg05475904	CGCCATAGTAGTTAAAAATAAGGTCTGGGATAGTCTCTCTTCATCAGTC
		PNLDC1	cg06479512	CGGGTGTTTAAATGTACGATTTGCTACAGAGGTTTGATTGCAATTGCAA
		CETN1	cg06490951	TGAGCTCGGGCTTAGGTGCCACCTTCTCTTTTGGCCGGTGGAGGCAGCG
		PPP2R2A	cg10207787	CGGGAGTCTTAGGCACTGCGGACACTAAGAGTGATTTCTAAGAGAAACCT
		RNF113B	cg11675413	CGCCACCTTCTCCAGGAAGGACGGCCGACCAAGCAGACCAGGTATGCACC
		MGC26816	cg23934633	C'TCATCC'TAAAAACACAGGCGCTTGAAATGCGTATTTAAAAAGCAACACACG
		FLJ35894	cg11851098	GGACAGGTACTGGGTGTGTATCTCCTCCTACTTCCACGAACAAGGTGTCCG
		PRKACG	cg12441964	CTGGCATCTGTGCTGTGTGTTCTCCCTTTTGTGGCACCTCGCTAATCG
		ZNF690	cg12493160	C'GAGTTCTTAGCCAAAAGCCAGAGGAGATTTCTCTACAGATGGGAAACC
			cg12784172	GTCAGGAAC'TGCTCTAGCACCAACAGTTC'TACAATCTGCTCCTTGGTGCG

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ นามสกุล	ว่าที่ร้อยตำรวจเอก หญิง จริญญา สามสุวรรณ
สถานที่เกิด	จังหวัดพังงา
วุฒิการศึกษา	ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ทั่วไป) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ปี พ.ศ. 2550
ประสบการณ์การทำงาน	ตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอเพื่อระบุความสัมพันธ์ พ่อ แม่ ลูก และตรวจวิเคราะห์หลักฐานทางคดีด้วยเทคนิคทาง ห้องปฏิบัติการเป็นวิทยากรแก่ผู้สนใจผู้เข้าฝึกอบรมใน หลักสูตรต่างๆ
ตำแหน่งหน้าที่ปัจจุบัน	ข้าราชการตำรวจ ตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ (สบ1) สังกัดกลุ่มงานตรวจเลือดชีวเคมีและเคมีดินป็น นต.รพ.ตร.