

การประเมินผลของการซ่อมแซมดีเอ็นเอที่เสียหายจากกระบวนการ cytosine deamination
ในตัวอย่าง FFPE หลายชนิด



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ ไม่สังกัดภาควิชา/เทียบเท่า
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Evaluation of repairing damaged DNA from cytosine deamination in various FFPE
samples



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medical Sciences

Common Course

FACULTY OF MEDICINE

Chulalongkorn University

Academic Year 2021

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การประเมินผลของการซ่อมแซมดีเอ็นเอที่เสียหายจาก กระบวนการ cytosine deamination ในตัวอย่าง FFPE หลายชนิด
โดย	น.ส.นรมน แซ่จิว
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ นายแพทย์กรเกียรติ วงศ์ไพศาลสิน

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉันทชาย สิทธิพันธุ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์เผด็จ สิริยะเสถียร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์กรเกียรติ วงศ์ไพศาลสิน)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วิไล อโนมะศิริ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.บุษบา ฤกษ์อำนวยโชค)

นรมน แซ่จิว : การประเมินผลของการซ่อมแซมดีเอ็นเอที่เสียหายจากกระบวนการ cytosine deamination ในตัวอย่าง FFPE หลายชนิด. (Evaluation of repairing damaged DNA from cytosine deamination in various FFPE samples) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. นพ.เกรียงศักดิ์ ไพศาลสิน

ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟิน (Formalin-fixed, paraffin-embedded; FFPE) เป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการรักษาสภาพชิ้นเนื้อสำหรับงานทางนิติพยาธิวิทยา สามารถเก็บรักษาได้อ่อนนุ่มมีห้องได้เป็นระยะเวลาอนาน อย่างไรก็ตามสารเคมีจากกระบวนการตรึงฟอร์มาลินทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ อาทิเช่น DNA crosslinking, การแตกหักของสายดีเอ็นเอ และการเกิดดีอะมิเนชันบนเบสไซโตซีน ซึ่งส่งผลกระทบต่อความสำเร็จในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ หลายงานวิจัยได้ศึกษาความเป็นไปได้ในการซ่อมแซมความเสียหายของดีเอ็นเอด้วยการใช้เอนไซม์เพื่อลดความเสียหายของดีเอ็นเอในตัวอย่าง FFPE ก่อนกระบวนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ แต่ปัจจุบันยังไม่มีรายงานถึงวิธีการที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพในการกู้คืนข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้สำหรับวิธี Sanger sequencing การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความสามารถของ NEBNext[®] FFPE DNA Repair Kit ในการซ่อมแซมดีเอ็นเอในตัวอย่าง FFPE ภายใต้สภาวะการตรึงฟอร์มาลินที่ต่างกัน ประกอบด้วย 10% Neutral Buffered Formalin (10%NBF) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 20% Neutral Buffered Formalin (20%NBF) เป็นเวลา 1 เดือน โดยความเสียหายของดีเอ็นเอจะพิจารณาจากปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอรวมถึงการเปลี่ยนแปลงเบสภายในดีเอ็นเอด้วยวิธี Sanger Sequencing จากผลการทดลองพบว่าตัวอย่าง 20%NBF มีปริมาณดีเอ็นเอที่สามารถวัดด้วยเทคนิค Real-time PCR น้อยกว่าตัวอย่าง 10%NBF และมีการแตกหักของดีเอ็นเอมากกว่า และยังพบว่าดีเอ็นเอที่สกัดจากอวัยวะบริเวณช่องอกและกะโหลกศีรษะมีคุณภาพดีกว่าอวัยวะบริเวณช่องท้อง นอกจากนี้ยังพบการเกิดไซโตซีนดีอะมิเนชันในตัวอย่าง 20%NBF ที่ระยะเวลา 1 เดือนเท่านั้น โดยมีอัตราการเกิดไซโตซีนดีอะมิเนชันอยู่ที่ 51.85% จึงเป็นที่น่าสังเกตว่าจำนวนร้อยละของฟอร์มาลินที่สูงขึ้นและระยะเวลาในการตรึงที่นานขึ้นส่งผลต่อการแตกหักและการเกิดไซโตซีนดีอะมิเนชันบนสายดีเอ็นเอ งานวิจัยนี้จึงเป็นประโยชน์เพื่อใช้เป็นแนวทางการประเมินและจัดการกับตัวอย่าง FFPE สำหรับการวิเคราะห์ดีเอ็นเอทางนิติวิทยาศาสตร์ นอกจากนี้ยังพบว่าชุดซ่อมแซมดีเอ็นเอ NEBNext[®] FFPE DNA Repair Kit ช่วยแก้ความเสียหายของการเกิดไซโตซีนดีอะมิเนชันแต่ไม่สามารถกู้คืนเบสเดิมได้อย่างสมบูรณ์ อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษวิจัยเพิ่มเติมในอนาคตเพื่อเพิ่มความถูกต้องและแม่นยำในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่าง FFPE ที่เสียหายจากกระบวนการเตรียมตัวอย่างในงานทางนิติวิทยาศาสตร์ต่อไป

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์
ปีการศึกษา 2564

ลายมือชื่อนิสิต
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

6074101630 : MAJOR MEDICAL SCIENCES

KEYWORD: DNA Damage DNA fragmentation Cytosine deamination Formalin-fixed paraffin-embedded samples

Naramon Seajew : Evaluation of repairing damaged DNA from cytosine deamination in various FFPE samples. Advisor: Assoc. Prof. KORNIAT VONGPHAISARNIN, M.D.

Formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) sample is the gold standard method of human tissue preservation for forensic pathological investigations, which is highly stable and can be stored for long periods at room temperature. Nevertheless, the chemical from the formalin fixation process caused some sequence artifacts, such as DNA crosslinking, DNA fragmentation, and deamination of cytosine (C) bases which highly disrupted the success of downstream sequencing analysis. Several studies have reported the possibility of DNA damage repairing with DNA repair enzymes to enhance the removal of DNA damage in FFPE samples prior to amplification. So far, there have been no reports of the suitable and effective method to recover DNA sequence data used for Sanger sequencing. Here we evaluated the capabilities of NEBNext® FFPE DNA Repair Kit to repair DNA in FFPE samples under different fixation conditions, including 10% Neutral Buffered Formalin (10%NBF) for 24 hours and 20% Neutral Buffered Formalin (20%NBF) for 1 month. DNA damages were examined by considering the amount of total human DNA quantity and quality together with identification of base DNA alteration by Sanger Sequencing. In this study, 20%NBF samples yield lower quantities of DNA compared to 10%NBF samples detected by Real-time PCR techniques, and greater DNA fragmentation was found. Interestingly, extracted DNA from the thoracic cavity and cranial vault organs showed high DNA quality compared with abdominal cavity organs. Furthermore, cytosine deamination was found only in 20%NBF for 1 month with a cytosine deamination occurrence rate of 51.85%. Notably, a high percentage of formalin and duration of fixation affected the DNA fragmentation as well as the occurrence of cytosine deamination. This study will be useful as guidelines for assessing and handling FFPE samples for forensic DNA analysis. Also, NEBNext® FFPE DNA Repair Kit DNA repair kits repair some cytosine deamination but are unable to recover the original base completely. However, further studies should be taken into account for reducing the DNA damage during the fixation process of FFPE samples in order to increase the accuracy of DNA sequencing analysis from FFPE samples in forensic science.

Field of Study: Medical Sciences

Student's Signature

Academic Year: 2021

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์นายแพทย์เกรียงดิ วงศ์ไพศาลสิน อาจารย์ที่ปรึกษาหลักที่ได้ให้คำปรึกษาและช่วยเหลือให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการนิติพยาธิวิทยา ห้องผ่าชันสูตร แพทย์ประจำบ้านทุกชั้นปี อาจารย์ประจำภาควิชาต่างๆท่านที่ให้ความอนุเคราะห์และความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อตลอดการทำงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการนิติเซโรวิทยา พี่วรรณ พี่อัจฉรา ที่ให้ความช่วยเหลือแนะนำข้อมูลที่เป็นประโยชน์และให้ความอนุเคราะห์ใช้เครื่องมือในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ พี่นักวิจัยประจำห้องปฏิบัติการนิติเซโรวิทยาทุกท่าน พี่นัท พี่วิน พี่ปอม พี่แพท พี่พลอย พี่นั ที่ช่วยให้คำแนะนำต่างๆมากมายตลอดระยะเวลาในการทำงานวิจัย

ขอบคุณเพื่อนๆพี่ๆและน้องๆ นิสิตปริญญาโท ภาควิชานิติเวชศาสตร์ที่ช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ คอยให้กำลังใจและการช่วยเหลือต่างๆมากมาย

ขอบคุณเพื่อนที่โรงเรียน เพื่อนปริญญาตรีและเพื่อนปริญญาโททุกคน ที่คอยเป็นกำลังใจให้และอยู่ด้วยกันมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้กราบขอบพระคุณบิดา-มารดา และครอบครัว ผู้ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจให้เสมอมา

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

นรมน แซ่จิว

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 คำถามของงานวิจัย.....	2
1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.4 สมมติฐานของการวิจัย.....	2
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue.....	3
2.2 ความสำคัญของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่าง FFPE ต่องานทางนิติวิทยาศาสตร์.....	4
2.3 ปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่าง FFPE.....	4
2.4 ประเภทของความเสียหายดีเอ็นเอที่เกิดจากการตรึงชิ้นเนื้อด้วยฟอร์มาลิน.....	6
2.5 การวัดปริมาณดีเอ็นเอที่เกิดความเสียหายจากการตรึงฟอร์มาลิน.....	9
2.6 การซ่อมแซมดีเอ็นเอ (DNA repairing).....	11
2.7 การตรวจพิสูจน์ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (Mitochondrial DNA analysis).....	13
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย.....	16
3.1 รูปแบบการทดลอง.....	16

3.2 รูปแบบการวิจัย	17
3.3 ระเบียบวิธีวิจัย.....	17
3.3.1 ตัวแปรในงานวิจัย (Variable).....	17
3.3.2 กลุ่มประชากรเป้าหมาย (Target population)	17
3.3.3 การคำนวณขนาดตัวอย่าง (Sample size).....	17
3.4. วิธีการดำเนินการวิจัย.....	18
3.4.1 การเตรียมฟอร์มาลินสำหรับการตรึงชิ้นเนื้อ.....	20
3.4.1.1 การเตรียม 10% Neutral Buffered Formalin, pH 7.0.....	20
3.4.1.2 การเตรียม 20% Neutral Buffered Formalin, pH 7.0.....	20
3.4.2 การเตรียมตัวอย่าง Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue	20
3.4.2.1 การเตรียมชิ้นเนื้อ (Tissue processing).....	21
3.4.2.2 การเตรียมบล็อกตัวอย่างชิ้นเนื้อ (Embedding).....	21
3.4.2.3 การตัดชิ้นเนื้อ (Sectioning)	21
3.4.2.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับตัวอย่างที่ตรึงด้วย 10% Neutral Buffered Formalin	22
3.4.2.5 การเตรียมตัวอย่างที่ตรึงด้วย 10% Neutral Buffered Formalin สำหรับใช้ในการทดลอง	22
3.4.2.6 การเตรียมตัวอย่างที่ตรึงด้วย 20% Neutral Buffered Formalin สำหรับใช้ในการทดลอง	22
3.4.3 การสกัดดีเอ็นเอ.....	23
3.4.3.1 สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่าง FFPE	23
3.4.3.2 สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดบน FTA card	23
3.4.4 การวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Real-time PCR.....	24
3.4.5 การซ่อมแซมดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์	25
3.4.6 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Sanger sequencing	25

3.4.6.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายที่ตำแหน่ง Hypervariable region I (HVI) บนไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน.....	25
3.4.6.2 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันด้วยเครื่องแยกสารพันธุกรรมอัตโนมัติโดยใช้หลักการ Capillary Electrophoresis.....	28
3.4.6.3 การทำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันใหญ่บริสุทธิ์.....	28
3.4.6.4 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์.....	28
3.4.7 การวิเคราะห์ผลการทดลอง.....	29
3.4.7.1 การวิเคราะห์ผลการทดลองจากการวัดปริมาณเอ็นเอด้วยวิธี Real-time PCR.....	29
3.4.7.2 การวิเคราะห์ผลการทดลองการเกิด cytosine deamination ก่อนและหลังการซ่อมแซมดีเอ็นเอ.....	30
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	31
4.1 ผลจากการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับตัวอย่างที่ตรึงด้วย 10% Neutral Buffered Formalin.....	31
4.2 ผลการศึกษาในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ตรึงด้วย 10% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	32
4.2.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอที่วัดได้ด้วยเทคนิค Real-time PCR ในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ตรึงด้วย 10% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	32
4.2.2 ผลการวิเคราะห์ค่า Degradation Index (DI) ในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ตรึงด้วย 10% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	35
4.2.3 ผลการวิเคราะห์ PCR inhibitor ในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ตรึงด้วย 10% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	36
4.2.4 ผลจากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนตำแหน่ง HVI ใน Mitochondrial DNA จากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ตรึงด้วย 10% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	37
4.3 ผลการศึกษาตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ตรึงด้วย 20% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 1 เดือน.....	38

4.3.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอที่วัดได้ด้วยเทคนิค Real-time PCR ในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ตรึงด้วย 20% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 1 เดือน.....	38
4.3.2 ผลการวิเคราะห์ค่า Degradation Index (DI) ในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ตรึงด้วย 20% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 1 เดือน.....	39
4.3.3 ผลการวิเคราะห์ PCR inhibitor ในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ตรึงด้วย 20% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 1 เดือน.....	39
4.3.4 ผลจากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนตำแหน่ง HVI ใน Mitochondrial DNA จากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ตรึงด้วย 20% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 1 เดือน.....	40
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการวิจัย	44
5.1 ผลจากการสกัดและวัดปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่าง FFPE	44
5.1.1 ปริมาณดีเอ็นเอและค่า Degradation Index (DI) ในตัวอย่างแต่ละชนิด.....	44
5.1.2 ปริมาณดีเอ็นเอและค่า Degradation Index (DI) ในสภาวะที่ความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่ฟอร์มาลินแตกต่างกัน	45
5.1.3 การตรวจหา PCR inhibitor ในตัวอย่างและการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ HVI บนไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ.....	45
5.2 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง HVI บนไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ	46
สรุปผลการทดลอง.....	47
ข้อเสนอแนะ.....	48
บรรณานุกรม.....	50
ประวัติผู้เขียน.....	56

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงผลการตรวจหาการเกิด cytosine deamination ด้วยเทคนิค Next Generation Sequencing จากตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการซ่อมแซมและไม่ผ่านกระบวนการซ่อมแซม	12
ตารางที่ 2 แสดงการเจือจางตัวอย่างดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA standard) สำหรับการถ่ายภาพมาตรฐานในการวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Real-time PCR.....	24
ตารางที่ 3 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ Hypervariable region I (HVI) สำหรับตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากชิ้นเนื้อบน FFPE block ที่ผ่านการแช่ 10% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	26
ตารางที่ 4 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ Hypervariable region I (HVI) สำหรับตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากชิ้นเนื้อบน FFPE block ที่ผ่านการแช่ 20% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 1 เดือน	27
ตารางที่ 5 แสดงค่าความเข้มข้นดีเอ็นเอที่วัดได้จากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ตรึงด้วย 10% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง, 48 ชั่วโมง, 72 ชั่วโมง และ 1 สัปดาห์	31
ตารางที่ 6 แสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าความเข้มข้นดีเอ็นเอเฉลี่ยระหว่างชิ้นเนื้อทั้ง 5 ชนิด ที่ตรึงด้วย 10% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	34
ตารางที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย Degradation index ระหว่างชิ้นเนื้อทั้ง 5 ชนิด ที่ตรึงด้วย 10% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	36
ตารางที่ 8 แสดงค่าเฉลี่ย IPC Δ CT ในตัวอย่างชิ้นเนื้อแต่ละชนิดที่ตรึงด้วย 10% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	37
ตารางที่ 9 แสดงค่าเฉลี่ย IPC Δ CT ในตัวอย่างชิ้นเนื้อแต่ละชนิดที่ตรึงด้วย 20% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 1 เดือน	40
ตารางที่ 10 แสดงจำนวนตัวอย่างที่สามารถเพิ่มจำนวนได้ด้วยไพรเมอร์ HV1a/HV1b	40
ตารางที่ 11 แสดงการจำแนกรูปแบบความเสียหายของเบสตามแต่ละประเภทของชิ้นเนื้อที่ตรึงด้วย 20% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 1 เดือน (N=5)	41

ตารางที่ 12 แสดงจำนวนและตำแหน่งเบสที่ตรวจพบความเสียหายบริเวณ HVI บนไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ..... 42



สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 แสดงการเกิดปฏิกิริยา crosslink ที่มีสาเหตุมาจากฟอร์มาลดีไฮด์ (a) และตัวอย่างการเกิด crosslink ระหว่างดีเอ็นเอกับโปรตีน	7
ภาพที่ 2 แสดงการเกิด Depurination ที่เป็นสาเหตุให้เกิด Abasic site บนสายดีเอ็นเอ	8
ภาพที่ 3 แสดงการเกิด cytosine deamination บนสายดีเอ็นเอ.....	9
ภาพที่ 4 แสดงจีโนมไมโทคอนเดรียของมนุษย์.....	14
ภาพที่ 5 แสดงผลการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอบน 1% agarose gel ในตัวอย่างดับที่ถูกตรึงด้วย 10% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 24, 48, 72 ชั่วโมง และ 1 สัปดาห์.....	32
ภาพที่ 6 แสดงค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของดีเอ็นเอในตัวอย่างชิ้นเนื้อแต่ละชนิดที่ตรึงด้วย 10% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (N=10).....	33
ภาพที่ 7 แสดงค่าเฉลี่ย Degradation Index ในตัวอย่างชิ้นเนื้อแต่ละชนิดที่ตรึงด้วย 10% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (N=10).....	35
ภาพที่ 8 แสดงค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของดีเอ็นเอในตัวอย่างชิ้นเนื้อแต่ละชนิด ที่ตรึงด้วย 20% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 1 เดือน (N=10).....	38
ภาพที่ 9 แสดงค่าเฉลี่ย Degradation Index ในตัวอย่างชิ้นเนื้อแต่ละชนิดที่ตรึงด้วย 20% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 1 เดือน (N=10)	39
ภาพที่ 10 แสดงตัวอย่างการเกิด Cytosine deamination บริเวณ Hypervariable I บนตำแหน่ง 16260 จากตัวอย่างหัวใจ (a) และตัวอย่างสมอง (b) ที่ผ่านการตรึงด้วย 20%NBF เป็นเวลา 1 เดือน	43

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

การชันสูตรพลิกศพ (Forensic autopsy) เป็นขั้นตอนหนึ่งทางนิติเวชศาสตร์ที่ทำการชันสูตรศพในกรณีที่มีการเสียชีวิตแบบผิดธรรมชาติเพื่อหาสาเหตุของการเสียชีวิต กลไกการเสียชีวิต และเป็นแนวทางให้ทราบถึงพฤติการณ์การเสียชีวิตได้ การชันสูตรพลิกศพเริ่มต้นจากการตรวจสภาพศพ ตรวจบาดแผลและการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ภายนอกของร่างกาย จากนั้นจึงทำการผ่าชันสูตรศพเพื่อตรวจดูการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย ตลอดจนการตัดชิ้นเนื้อเพื่อตรวจหารอยโรคหรือความผิดปกติอื่น ๆ ภายใต้อุปกรณ์จุลทรรศน์ (Microscopic examination) เพื่อนำไปใช้ในการวินิจฉัยและยืนยันโรคที่ตรวจพบ ซึ่งในปัจจุบันฟอร์มาลิน (Formalin) เป็นสารเคมีที่ห้องปฏิบัติการทางพยาธิวิทยานิยมนำมาใช้ในการรักษาสภาพชิ้นเนื้อเนื่องจากมีราคาไม่แพงและสามารถหาได้ทั่วไป การตรึงฟอร์มาลิน (Formalin Fixation) คือการรักษาสภาพของชิ้นเนื้อในระยะยาวเพื่อป้องกันการเน่าสลายซึ่งภายหลังจากการตรึงฟอร์มาลินแล้วชิ้นเนื้อทั้งหมดจะถูกจัดเก็บอยู่บนพาราฟินบล็อกและเรียกดัวย่างชนิดนี้ว่าชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟินหรือ Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) ซึ่งเป็นกระบวนการในการเก็บรักษาตัวอย่างชิ้นเนื้อในระยะยาวเพื่อใช้สำหรับตรวจวินิจฉัยชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา (1) นอกจากนี้จากการศึกษาของ Bagnall และคณะ (2) พบว่าตัวอย่าง FFPE เป็นตัวอย่างทางชีวภาพที่เหมาะสมสำหรับงานทาง Molecular autopsy และถือว่าเป็นอีกทางเลือกสำหรับแหล่งตัวอย่างดีเอ็นเอเพื่อนำไปใช้ในงานทางนิติวิทยาศาสตร์ เช่น การระบุสาเหตุของการเสียชีวิต การระบุตัวบุคคล และการทดสอบความสัมพันธ์ทางเครือญาติ (3)

แต่อย่างไรก็ตามนอกจากฟอร์มาลินจะมีประสิทธิภาพในการรักษาสภาพชิ้นเนื้อแล้วยังสามารถสร้างความเสียหายและทำให้ดีเอ็นเอเสียหายได้พร้อมกัน ความเสียหายของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นส่งผลกระทบต่อกระบวนการทดสอบทางนิติพันธุศาสตร์ เช่น การวิเคราะห์ Short tandem repeat (STR analysis) และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนั้นในปัจจุบันหลายงานวิจัยจึงพยายามศึกษาวิธีการจัดการกับความเสียหายของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น และการใช้เอนไซม์ในการซ่อมแซมดีเอ็นเอก่อนกระบวนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป็นอีกหนึ่งวิธีที่หลายงานวิจัยสนใจศึกษาในปัจจุบัน (4) เนื่องจากความเสียหายของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากฟอร์มาลินมีหลายรูปแบบจึงไม่สามารถใช้วิธีซ่อมแซมดีเอ็นเอได้เพียงกระบวนการเดียว ดังนั้นปัจจุบันจึงมีชุดน้ำยาสำเร็จรูปสำหรับซ่อมแซมดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ที่หลากหลายมากขึ้น ซึ่งจะเป็นการรวบรวมเอนไซม์หลายชนิดเพื่อทำงานร่วมกันในการจัดการกับความเสียหายของดีเอ็นเอที่เกิดจากฟอร์มาลิน

โดยปี 2018 ได้มีงานวิจัยของ Gordon และคณะ (5) ได้ใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป NEBNext® FFPE DNA Repair ที่รวบรวมเอนไซม์หลายชนิดที่ปรับให้เหมาะสมกับตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่าง FFPE มากขึ้น มาทดสอบกับตัวอย่าง Ancient DNA ซึ่งดีเอ็นเอมีความเสียหายหลักมาจากกระบวนการ Cytosine deamination ซึ่งสามารถพบได้ในตัวอย่างเนื้อเยื่อ FFPE เช่นเดียวกัน และจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Next Generation Sequencing พบว่าชุดซ่อมแซมดีเอ็นเอนี้สามารถลดการเกิด Cytosine deamination ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจนำชุดน้ำยาสำเร็จรูป NEBNext® FFPE DNA Repair Kit มาใช้ในการซ่อมแซมดีเอ็นเอที่เสียหายจากฟอร์มาลินในสภาวะต่างๆ จากชิ้นเนื้อหลายชนิด และทำการวิเคราะห์ผลโดยการเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของเอ็นเอ ค่า Degradation Index (DI) รวมถึงเปรียบเทียบผลที่ได้จากการวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยกระบวนการ downstream ต่าง ๆ ทั้งก่อนและหลังการซ่อมแซมดีเอ็นเอ

1.2 คำถามของงานวิจัย

ความเสียหายของดีเอ็นเอที่เกิดจากกระบวนการ cytosine deamination จากตัวอย่างที่ผ่านการตรึงฟอร์มาลินสามารถถูกซ่อมแซมได้ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป NEBNext® FFPE DNA Repair Kit และสามารถกู้คืนข้อมูลของสารพันธุกรรมได้หรือไม่

1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ประเมินความสามารถในการซ่อมแซมดีเอ็นเอของชุดน้ำยาสำเร็จรูป NEBNext® FFPE DNA Repair Kit ในการกู้คืนข้อมูลของสารพันธุกรรมในตัวอย่างเนื้อเยื่อ FFPE หลายชนิด เพื่อเป็นประโยชน์ในการนำไปใช้วิเคราะห์ผลทางนิติวิทยาศาสตร์อื่น ๆ ต่อไป

2. เพื่อใช้เป็นแนวทางในการเลือกตัวอย่างเนื้อเยื่อจาก FFPE block ที่มีอยู่อย่างจำกัดในการนำมาใช้วิเคราะห์ดีเอ็นเอทางนิติวิทยาศาสตร์ให้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

1.4 สมมติฐานของการวิจัย

ชุดน้ำยาสำเร็จรูป NEBNext® FFPE DNA Repair Mix สามารถซ่อมแซมความเสียหายของดีเอ็นเอที่เกิดจากกระบวนการ cytosine deamination จากตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ผ่านการตรึงฟอร์มาลินได้

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue

การตรึงชิ้นเนื้อ (Fixation) เป็นขั้นตอนแรกของขบวนการเตรียมชิ้นเนื้อเพื่อรักษาและคงสภาพของเซลล์รวมถึงส่วนประกอบของเนื้อเยื่ออื่นๆให้ยังคงสภาพเหมือนตอนที่ยังมีชีวิตอยู่มากที่สุด โดยการตรึงชิ้นเนื้อจะทำทันทีภายหลังจากการตัดเก็บชิ้นเนื้อ เพื่อป้องกันการเกิดการเน่าสลาย (6) โดยประเภทของการตรึงเนื้อเยื่อ (Types of fixation) แบ่งออกเป็น 2 รูปแบบ คือ การตรึงด้วยวิธีทางกายภาพ ได้แก่ การให้ความร้อน (Heating) การใช้คลื่นไมโครเวฟ (Microwaving) และการแช่แข็ง (Cryopreservation) อีกประเภทหนึ่ง คือ การตรึงด้วยการใช้สารเคมี (Fixative) โดยการนำชิ้นเนื้อแช่ใน Fixative ที่อยู่ในรูปของเหลว ซึ่งโดยทั่วไปมักจะมีการเติมบัฟเฟอร์เพื่อเป็นการรักษาสสมดุลความเป็นกรดเบสภายในสารละลาย (7)

สารเคมีที่ช่วยรักษาสภาพชิ้นเนื้อ (Fixative) แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มหลัก ได้แก่ Aldehyde, Oxidizing agents, Alcohol-based และ Metallic group ซึ่งฟอร์มาลิน (Formalin) เป็นสารที่จัดอยู่ในกลุ่ม Aldehyde ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในห้องปฏิบัติการทางพยาธิวิทยาทั่วโลก เนื่องจากมีราคาไม่แพงและสามารถหาได้ทั่วไป การซึมผ่านของฟอร์มาลินเข้าไปในเนื้อเยื่อเป็นกระบวนการทางกายภาพที่สารละลายจะแพร่เข้าไปในชิ้นเนื้อเพื่อไปยังชั้นในสุดของเซลล์ และยังไม่ก่อให้เกิดการหดตัวของเนื้อเยื่อ (Tissue Shrinkage) มากเกินไปหรือทำให้โครงสร้างเซลล์ผิดรูป (8, 9) ซึ่งภายหลังจากการตรึงฟอร์มาลินแล้วชิ้นเนื้อจะถูกจัดเก็บอยู่บนพาราฟินบล็อก หรือที่เรียกกันว่าชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟินหรือ Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) ซึ่งเป็นกระบวนการเก็บรักษาตัวอย่างชิ้นเนื้อในระยะยาวสำหรับใช้ตรวจวินิจฉัยชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา (1) วิธีการเก็บรักษาตัวอย่างในรูปแบบดังกล่าวช่วยให้สามารถเก็บตัวอย่างได้ง่ายที่อุณหภูมิห้องและลดพื้นที่ในการจัดเก็บภายในหน่วยงาน (10) ทำให้หน่วยงานทางพยาธิวิทยามีตัวอย่าง FFPE อยู่ในคลังเป็นจำนวนมาก

นอกจากตัวอย่าง FFPE จะมีประโยชน์ในการใช้ศึกษาพยาธิสภาพของชิ้นเนื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์แล้ว ในปี 2017 ได้มีงานศึกษาของ Bagnall และคณะ (2) พบว่าตัวอย่างเนื้อเยื่อ FFPE เป็นตัวอย่างทางชีวภาพที่เหมาะสมสำหรับงานทาง Molecular autopsy และยังถือว่าเป็นแหล่งของดีเอ็นเออีกทางเลือกหนึ่งนอกเหนือจากการใช้ตัวอย่างเลือด ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาย้อนหลังในงานทางนิติวิทยาศาสตร์ เช่น การระบุตัวบุคคล ใช้เป็นตัวอย่างอ้างอิงสำหรับการระบุตัวบุคคลที่หายไป และการทดสอบความเป็นพ่อลูก (11, 12) ซึ่งในปัจจุบันมีหลายงานวิจัยได้ให้ความสนใจศึกษาในเรื่องนี้เพิ่มมากขึ้น

2.2 ความสำคัญของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่าง FFPE ต่องานทางนิติวิทยาศาสตร์

ปัจจุบันตัวอย่าง FFPE ที่ผ่านการตัดชิ้นเนื้อ (Sectioning) โดยใช้เครื่องตัดชิ้นเนื้อ (Microtome) สำหรับใช้ในการย้อมสีและส่องดูพยาธิสภาพของชิ้นเนื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์แล้ว บล็อกชิ้นเนื้อดังกล่าวจะถูกเก็บเข้าไว้ในคลังของแต่ละหน่วยงานเป็นจำนวนมาก ทำให้หลายงานวิจัย โดยเฉพาะอย่างยิ่งงานวิจัยในทางนิติพันธุศาสตร์ที่พยายามนำตัวอย่าง FFPE มาใช้เป็นแหล่งทางเลือกของสารพันธุกรรมสำหรับการตรวจวิเคราะห์ downstream ในหลายๆรูปแบบ นอกเหนือจากการใช้ตัวอย่างเลือด ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากสำหรับการศึกษาย้อนหลัง (Retrospective study) ในกรณีที่ไม่เหลือตัวอย่างเลือดหรือร่างของผู้เสียชีวิตแล้ว

ซึ่งดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่าง FFPE มักจะถูกนำมาใช้ตรวจวินิจฉัยโรค และการศึกษาทางพันธุกรรมอื่นๆ รวมไปถึงการระบุตัวบุคคล เช่น งานวิจัยของ Liu และคณะ ในปี 2009 (13) ได้ศึกษากรณีของนักธุรกิจต่างชาติที่เข้ามาทำธุรกิจในประเทศจีนและเสียชีวิตลงด้วยมะเร็งกระเพาะอาหารที่โรงพยาบาล โดยลูกชายของผู้ตายพบว่าชื่อของผู้ตายในบัตรประชาชนของคนต่างชาติที่ใช้ในจีนไม่ตรงกับชื่อจริง และเพื่อเป็นการพิสูจน์ความเป็นทายาทตามกฎหมาย จึงมีการทดสอบความเป็นพ่อลูกเกิดขึ้น แต่เนื่องจากร่างของผู้เสียชีวิตได้ถูกเผาไปแล้วจึงเหลือเพียงเนื้อเยื่อจากกระเพาะอาหารของผู้เสียชีวิตที่ถูกผ่าตัดและเก็บไว้ใน paraffin block ที่โรงพยาบาล ตัวอย่างนี้จึงถูกนำมาใช้เป็นแหล่งของดีเอ็นเอและนำมาเปรียบเทียบกับตัวอย่างเลือดของลูกชาย ซึ่งผลการทดสอบพบว่าทั้งสองคนมีความสัมพันธ์เป็นพ่อลูกกัน

แต่อย่างไรก็ตามดีเอ็นเอจากตัวอย่าง FFPE มักพบการแตกหักและการเกิด sequence artifacts ซึ่งเมื่อนำดีเอ็นเอที่เกิดการแตกหักมาใช้ในการระบุตัวบุคคลด้วยเทคนิค STR อาจทำให้มีความเสี่ยงที่จะไม่ได้ full profile STR แต่อย่างไรก็ตามตัวอย่างดีเอ็นเอที่เกิดการแตกหักนี้ยังสามารถแก้ไขได้ด้วยการลดขนาดของ amplicon ให้เล็กลงได้ ซึ่งในทางตรงกันข้ามการเกิด sequence artifact ภายในดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่าง FFPE ยังเป็นเรื่องที่สามารถจัดการได้ยาก โดยดีเอ็นเอมีแนวโน้มที่จะเกิด sequence artifact ในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ซึ่งหากนำตัวอย่างดีเอ็นเอเหล่านี้มาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ต่างๆ ทั้งการตรวจวินิจฉัยโรค หรือการตรวจหาการกลายพันธุ์จากชิ้นเนื้อมะเร็งอาจจะส่งผลให้เกิดการแปลผลที่ผิดพลาดโดยเข้าใจว่า sequence artifact ที่พบเป็น true mutation ได้

2.3 ปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่าง FFPE

Cao และคณะ (14) ได้ตั้งข้อสังเกตว่าในแต่ละหน่วยปฏิบัติการมีวิธีการตรึงชิ้นเนื้อที่แตกต่างกันออกไปทั้งความเข้มข้นของฟอร์มาลินที่ใช้ การรักษาระดับค่าความเป็นกรดเบส รวมไปถึงระยะเวลาที่ใช้ในการตรึงชิ้นเนื้อ ในแต่ละหน่วยปฏิบัติการก็จะมีปรับเพื่อให้เหมาะสมต่อการใช้

งานในแต่ละหน่วยนั้นๆ ซึ่งการที่ฟอร์มาลินจะทำให้ดีเอ็นเอเกิดการเปลี่ยนแปลงนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ดังนี้

1. ชนิดของชิ้นเนื้อ

เนื่องจากองค์ประกอบภายในเซลล์ที่แตกต่างกันอย่างมากในแต่ละอวัยวะทำให้คุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้มีความแตกต่างกันมาก เนื้อเยื่อที่ควรหลีกเลี่ยง เช่น ลำไส้ใหญ่ ลำไส้เล็ก ตับอ่อน และปอด เนื่องจากองค์ประกอบภายในเซลล์เป็น non-homogenous ส่งผลให้ปริมาณของดีเอ็นเอลดลง นอกจากนี้ตัวอย่างชิ้นเนื้อจากอวัยวะที่มีความหนาแน่นของเซลล์สูงอย่างเช่น สมอง กล้ามเนื้อ ม้าม กล้ามเนื้อหัวใจ และตับ ได้รับการพิสูจน์แล้วว่าใช้งานได้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ในระดับโมเลกุล (15)

2. ความเข้มข้นของฟอร์มาลิน

ปัจจุบัน 10% Neutral Buffered Formalin (10% NBF) เป็นปริมาณความเข้มข้นของฟอร์มาลินที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายมากที่สุดในการตรึงชิ้นเนื้อ (16) แต่อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของฟอร์มาลินที่ใช้ในการตรึงชิ้นเนื้อในแต่ละห้องปฏิบัติการสามารถมีความแตกต่างกันได้ขึ้นอยู่กับลักษณะงานรวมไปถึงขนาดและปริมาณของชิ้นเนื้อที่ได้รับ และจากการทำแบบสำรวจของ Japan Pathological Society ในปี 2011 พบว่าจากสถาบันทั้งหมด 324 แห่ง มีเพียง 44% ของสถาบันทั้งหมดที่ใช้ 10% Neutral Buffered Formalin (10) ในการตรึงชิ้นเนื้อ ดังนั้นจึงพบว่ามีอีกหลายสถาบันที่ยังใช้ฟอร์มาลินที่ความเข้มข้นสูงในการตรึงชิ้นเนื้ออยู่ รวมไปถึงในหน่วยนิติพยาธิวิทยา ของภาควิชานิติเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้มีการปรับใช้ความเข้มข้นของฟอร์มาลินเพิ่มขึ้นจาก 10% Neutral Buffered Formalin เป็น 20% Neutral Buffered Formalin เพื่อให้ชิ้นเนื้อถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินได้อย่างสมบูรณ์มากขึ้น เนื่องจากความเข้มข้นของฟอร์มาลินที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ฟอร์มาลินสามารถแพร่เข้าไปในชิ้นเนื้อได้อย่างรวดเร็วในระยะเวลาสั้น แต่อย่างไรก็ตามในแง่ของความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอ การใช้ฟอร์มาลินที่ความเข้มข้นสูงสามารถส่งผลให้ดีเอ็นเอเกิดความเสียหายเพิ่มมากขึ้นได้เช่นเดียวกัน (10)

3. ค่าความเป็นกรดเบส

การตรึงชิ้นเนื้อในฟอร์มาลินเป็นระยะเวลาสั้นส่งผลให้ฟอร์มาลดีไฮด์ที่เป็นส่วนประกอบของฟอร์มาลินเปลี่ยนไปอยู่ในรูปกรดฟอร์มิกจากการออกซิไดซ์กับออกซิเจนในอากาศ ส่งผลให้สารละลายมีความเป็นกรดเพิ่มมากขึ้น ซึ่งความเป็นกรดนี้จะไปทำลายความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอ ดังนั้นฟอร์มาลินที่ใช้ในการตรึงชิ้นเนื้อควรเป็นฟอร์มาลินที่มีส่วนผสมของบัฟเฟอร์เพื่อเป็นการควบคุมค่าความเป็นกรดเบสภายในสารละลายเพื่อชะลอหรือลดการเกิดความเสียหายภายในดีเอ็นเอ โดย Ludyga และคณะ (17) พบว่าการตรึงฟอร์มาลินที่ pH 7 ทำให้ได้ดีเอ็นเอสายยาวมากขึ้นซึ่งต่างจาก

การตรึงฟอร์มาลินที่ pH 4 ซึ่งทำให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สั้นกว่า เนื่องจาก pH 7 ทำให้ลดหรือชะลอการเสียหายของดีเอ็นเอ

4. ระยะเวลาที่ใช้ในการตรึงฟอร์มาลิน

ระยะเวลาที่ใช้ในการตรึงชิ้นเนื้อด้วยฟอร์มาลินที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 24-48 ชั่วโมง เนื่องจากการตรึงฟอร์มาลินที่ระยะเวลาน้อยกว่า 24 ชั่วโมงนั้นจะทำให้เกิดการตรึงแค่บริเวณรอบนอกของชิ้นเนื้อเท่านั้นแต่ตรงกลางของชิ้นเนื้อจะยังไม่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลิน (18) อย่างไรก็ตามระยะเวลาในการตรึงฟอร์มาลินสามารถปรับเปลี่ยนได้ตามความเหมาะสมของลักษณะงานรวมถึงปริมาณและขนาดของชิ้นเนื้อที่ได้รับ ซึ่งในแง่ของตัวอย่าง FFPE จากงานทางพยาธิวิทยาทางคลินิก ระยะเวลาในการตรึงชิ้นเนื้อจะถูกจำกัดไว้เพียงไม่กี่ชั่วโมงเท่านั้น แต่ในตัวอย่างชิ้นเนื้อทางนิติพยาธิวิทยาที่ได้รับภายหลังจากการผ่าชันสูตรนั้นระยะเวลาที่ใช้ในการตรึงชิ้นเนื้อมีความหลากหลาย โดยระยะเวลาในการตรึงฟอร์มาลินอาจอยู่ในช่วงตั้งแต่วันไปจนถึงเดือน (19) ขึ้นอยู่กับชนิด ขนาดและปริมาณของชิ้นเนื้อ ซึ่งระยะเวลาในการตรึงฟอร์มาลินเพิ่มขึ้นช่วยให้ฟอร์มาลินแพร่เข้าไปในชิ้นเนื้อได้อย่างสมบูรณ์มากขึ้น แต่ในทางกลับกันดีเอ็นเอที่อยู่ภายในตัวอย่างก็ถูกทำลายเพิ่มมากขึ้น (16)

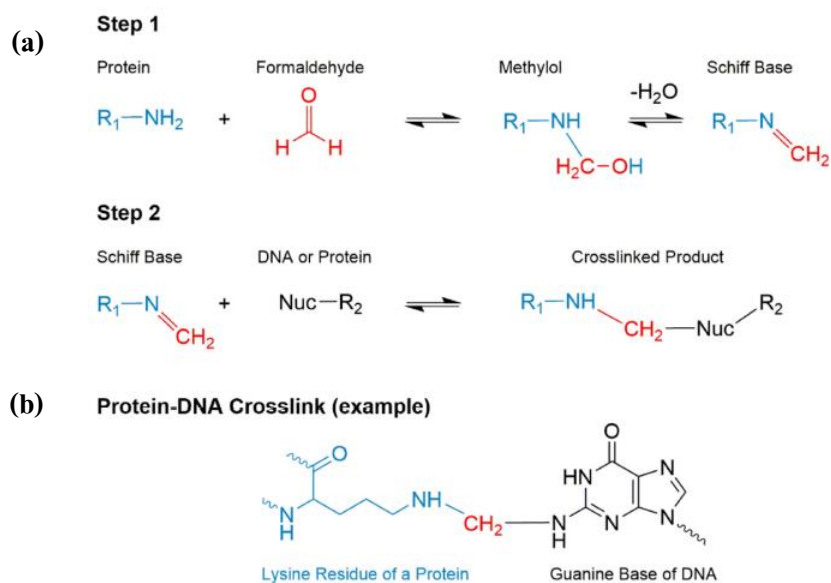
5. การเก็บรักษาตัวอย่าง FFPE block

หลังจากการตรึงชิ้นเนื้อและฝังอยู่บนพาราฟินแล้ว ชิ้นเนื้อดังกล่าวจะถูกนำไปเก็บรักษาไว้ในคลัง โดยอุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาอาจจะต้องมีการปรับให้เหมาะสม เนื่องจากก่อนหน้านี้มีการตั้งสมมุติฐานว่าหากระยะเวลาที่ใช้ในการจัดเก็บนานขึ้นจะส่งผลให้ดีเอ็นเอเกิดความเสียหายเพิ่มขึ้นและทำให้ปริมาณกรดนิวคลีอิกลดลง แม้ว่าระยะเวลาที่ใช้เก็บรักษาจะนำไปสู่การย่อยสลายแต่ก็ไม่ได้แสดงให้เห็นถึงผลกระทบต่อการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในกระบวนการ downstream แต่อย่างใดก็ตามก็มีข้อสังเกตว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างที่เก็บไว้นานมากกว่า 4 ปีจะมีคุณภาพลดลง ซึ่งปัญหานี้ถูกตั้งข้อสังเกตเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Paireder และคณะ (20) ที่ประสบปัญหาการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่เก็บไว้นานมากกว่า 50 ปี

2.4 ประเภทของความเสียหายดีเอ็นเอที่เกิดจากการตรึงชิ้นเนื้อด้วยฟอร์มาลิน

1. การเกิด DNA Crosslinking

ฟอร์มาลดีไฮด์ (Formaldehyde) เป็นส่วนประกอบหลักของฟอร์มาลินที่สามารถทำให้เกิด crosslink ได้หลายรูปแบบกับสารโมเลกุลใหญ่ชนิดอื่น เช่น โปรตีนหรือดีเอ็นเอ สามารถเกิดได้ทั้งระหว่างสายของดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอกับฟอร์มาลดีไฮด์ โปรตีนกับโปรตีน หรือโปรตีนกับดีเอ็นเอ โดยฟอร์มาลดีไฮด์จะทำปฏิกิริยากับหมู่ฟังก์ชันของกรดอะมิโนแล้วเกิดเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า Methylol ที่จะสามารถเกิด crosslink กับกรดอะมิโนตัวอื่นๆต่อไปได้ ดังภาพที่ 1 ซึ่งการเกิด crosslink นี้ส่งผลให้ความเสถียรภายในดีเอ็นเอลดลงและทำให้ดีเอ็นเอเกิดการเสียหาย (21)



ภาพที่ 1 แสดงการเกิดปฏิกิริยา crosslink ที่มีสาเหตุมาจากฟอร์มาลดีไฮด์ (a) และตัวอย่างการเกิด crosslink ระหว่างดีเอ็นเอกับโปรตีน (22)

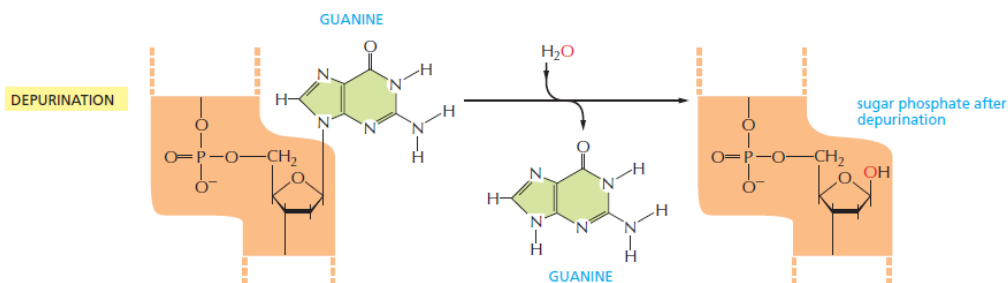
2. การเกิดการแตกหักของสายดีเอ็นเอ (DNA Fragmentation)

การแตกหักของสายดีเอ็นเอเป็นรูปแบบทั่วไปของความเสียหายดีเอ็นเอที่พบได้จากตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ผ่านการตรึงด้วยฟอร์มาลีน โดยการแตกหักของสายดีเอ็นเอจะเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการตรึงฟอร์มาลีนเพิ่มมากขึ้นและค่า pH ที่ลดลงในระหว่างขั้นตอนการตรึงฟอร์มาลีน (17) การแตกหักของสายดีเอ็นเอเป็นชิ้นเล็กกลนี้จะส่งผลกระทบต่อโดยตรงกับจำนวนของดีเอ็นเอแม่แบบที่สามารถเพิ่มจำนวนได้ในกระบวนการทำ PCR amplification ทำให้ดีเอ็นเอบางส่วนไม่ถูกเพิ่มจำนวนเนื่องจากไม่สามารถเกิดการจับกัน (Annealing) ระหว่างดีเอ็นเอแม่แบบกับดีเอ็นเอไพรเมอร์ที่จับจำเพาะได้

3. การเกิด Abasic Sites

Abasic sites หรือ AP site (Apurinic/Apyrimidinic site) คือบริเวณที่เกิดการสูญหายของเบสพิวรีนหรือเบสไพริมิดีนบนสายดีเอ็นเอซึ่งเกิดจากการแตกหักบริเวณ glycosidic linkage ที่มีสาเหตุมาจากสารเคมี, การแผ่รังสี หรือการทำงานของเอนไซม์ เป็นต้น ซึ่งในตัวอย่าง FFPE การเกิด Abasic site มาจากการที่ฟอร์มาลดีไฮด์ถูกออกซิไดซ์กับออกซิเจนในบรรยากาศแล้วเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของกรดฟอร์มิก (Formic acid) ซึ่งส่งผลให้ค่า pH ของฟอร์มาลีนลดลงเกิดความเป็นกรดมากขึ้น โดยพันธะ N-glycosidic ของเบสพิวรีนบริเวณ sugar backbone นั้นมีความไวต่อการเกิดไฮโดรไลซิสที่ค่า pH ต่ำจึงทำให้เกิดกระบวนการ Depurination ขึ้น ดังภาพที่ 2 ส่งผลให้เกิดเป็น Abasic

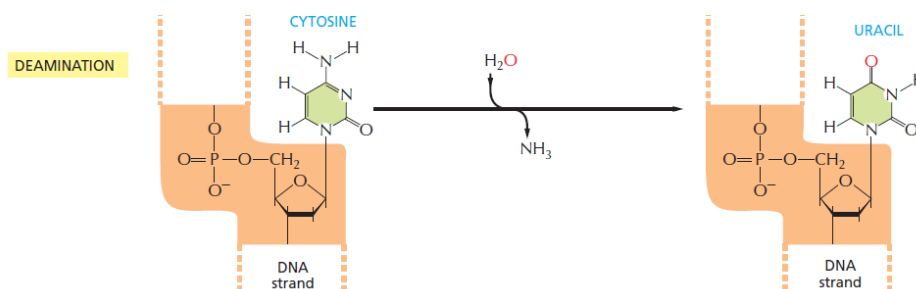
sites ในสายดีเอ็นเอตามมา (21) ซึ่งบริเวณที่เกิด Abasic sites ในสายดีเอ็นเอทำให้ดีเอ็นเอเกิดความไม่เสถียรและนำไปสู่การเสียสภาพของดีเอ็นเอ



ภาพที่ 2 แสดงการเกิด Depurination ที่เป็นสาเหตุให้เกิด Abasic site บนสายดีเอ็นเอ (23)

4.) การสูญเสียหมู่อะมิโน (Deamination)

เกิดจากการสูญเสียหมู่อะมิโนของเบสชนิดหนึ่งส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนรูปไปเป็นเบสอีกชนิดหนึ่ง เช่น Cytosine Deamination เกิดจากการสูญเสียหมู่อะมิโนของเบสไซโตซีน (Cytosine; C) จึงส่งผลให้ไซโตซีนเปลี่ยนเป็นยูราซิล (Uracil; U) ดังภาพที่ 3 ซึ่ง Cytosine Deamination สามารถเกิดขึ้นได้เองภายในเซลล์โดยอัตราการเกิดประมาณ 60-500 events / human genome / วัน โดยการเกิด Uracil lesions ในดีเอ็นเอของเซลล์ที่มีชีวิตสามารถกำจัดได้โดยการใช้เอนไซม์ Uracil-DNA glycosylase (UDG) โดยใช้กลไกการซ่อมแซมแบบ Base excision repair (BER) ที่สามารถทำให้เบส Cytosine กลับมาอยู่ในตำแหน่งที่ถูกต้อง เนื่องจากเบส Guanine ที่ถูกต้องยังอยู่ในตำแหน่งตรงข้ามบนสาย Complementary DNA (cDNA) แต่อย่างไรก็ตามในตัวอย่างชิ้นเนื้อจากผ่าชันสูตรที่กระบวนการ cytosine deamination สามารถเกิดขึ้นในเซลล์ได้ในระหว่างกระบวนการเก็บตัวอย่าง กระบวนการแช่ชิ้นเนื้อในฟอร์มาลิน และการเก็บรักษาตัวอย่างเนื้อเยื่อหลังจากการแช่ฟอร์มาลิน ซึ่งการเกิด Uracil lesions จะไม่ได้รับการซ่อมแซมเนื่องจากขาด DNA repair proteins ที่ใช้ในกลไกการซ่อมแซม ดังนั้นเมื่อดีเอ็นเอแม่แบบที่มีความเสียหายถูกเพิ่มจำนวนจึงส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของ artifact เนื่องจาก DNA polymerase มีการจับคู่เบสผิดบริเวณที่เกิด (24, 25) และเมื่อไม่นานมานี้ การเกิด Uracil lesions ถูกระบุว่าเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิด sequence artifact ในดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่าง FFPE เช่นเดียวกับที่พบในตัวอย่าง Ancient DNA (26) ซึ่งการเกิด sequence artifact ในรูปแบบนี้สามารถลดลงได้ด้วยการใช้เอนไซม์ UDG ก่อนทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส



ภาพที่ 3 แสดงการเกิด cytosine deamination บนสายดีเอ็นเอ (23)

2.5 การวัดปริมาณดีเอ็นเอที่เกิดความเสียหายจากการตรึงฟอร์มัลลิน

กระบวนการทำ FFPE อาจทำให้เกิดการแตกหักและการตัดแปลงทางเคมีใน DNA เช่น การเกิด crosslinking การเกิดดีอะมิเนชัน และการรวมตัว ดังที่กล่าวมาข้างต้น การเกิดการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ส่งผลให้ปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบที่ใช้สำหรับกระบวนการเพิ่มปริมาณเอ็นแอลลดลงและส่งผลกระทบต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ปัจจุบันมีหลายวิธีที่ใช้ในการหาปริมาณดีเอ็นเอซึ่งแต่ละวิธีก็มีทั้งข้อดีและข้อเสีย วิธีการวัดปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้โดยทั่วไป คือ Spectrophotometry และ Fluorometry โดยเครื่องวัดสเปกโตรโฟโตมิเตอร์เป็นวิธีการวัดปริมาณดีเอ็นเอที่ง่ายและรวดเร็วในการวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่มีคุณภาพสูงได้อย่างแม่นยำ เช่น การใช้เครื่อง NanoDrop Spectrophotometer แต่อย่างไรก็ตามการใช้เครื่อง Spectrophotometer ก็ยังมีข้อจำกัดเรื่องของการไม่สามารถวัดความเสียหายและการแตกหักของดีเอ็นเอได้ ทำให้ไม่สามารถคาดการณ์ผลกระทบต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส นอกจากนี้วิธี Spectrophotometry ยังอ่อนไหวต่อการตรวจวัดที่ผิดพลาดจากการมีสิ่งปนเปื้อน เช่น RNA และตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ ส่วนวิธีการหาปริมาณดีเอ็นเอแบบ Fluorometry เช่น การใช้เครื่อง Qubit fluorometer นั้นให้ความไวในการวิเคราะห์สูง และมีความทนทานต่อสิ่งปนเปื้อนที่ดีขึ้น (27) แต่ก็ยังไม่สามารถบอกความเสียหายและการแตกหักของดีเอ็นเอที่เกิดจากการตรึงฟอร์มัลลินเบื้องต้นได้เช่นเดียวกัน เนื่องจากความแม่นยำของการหาปริมาณดีเอ็นเอมีความสำคัญต่อความสำเร็จขั้นตอนเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสและการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเหตุนี้การวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี quantitative Real-time PCR จึงเป็นวิธีการวัดปริมาณดีเอ็นเอที่เกิดความเสียหาย เนื่องจากมีความไวสูง สามารถประเมินระดับการแตกหักของสายดีเอ็นเอและตรวจหาสารยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR inhibitor) ในตัวอย่างได้ ซึ่งเป็นสิ่งที่สำคัญสำหรับตัวอย่างทางนิติวิทยาศาสตร์ที่มักจะพบการปนเปื้อนอยู่บ่อยครั้งทำให้ส่งผลกระทบต่อความสำเร็จในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ (28, 29)

โดยชุดน้ำยาสำเร็จรูป Quantifiler™ HP (Human Plus) DNA Quantification Kit เป็นหนึ่งในชุดน้ำยาที่ห้องปฏิบัติการทางนิติวิทยาศาสตร์นิยมนำมาใช้ในการประเมินดีเอ็นเอของมนุษย์ทั้ง

ในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพเพื่อเพิ่มความสำเร็จในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอในภายหลัง โดยชุดน้ำยาดังกล่าวใช้เทคนิค 5' nuclease assay ที่ประกอบไปด้วย 3 target ได้แก่ Small Autosomal (SA) Target, Large Autosomal (LA) Target และ Internal PCR control (IPC) target

โดย Small Autosomal (SA) Target ที่มี amplicon ขนาด 80 คู่เบส ทำหน้าที่เป็นเป้าหมายหลักที่ใช้ในการบอกปริมาณดีเอ็นเอในจีโนมมนุษย์ทั้งหมดและช่วยให้สามารถตรวจหาการเสื่อมสภาพของตัวอย่างดีเอ็นเอได้ดี ส่วน Large Autosomal (LA) Target ที่มี amplicon ขนาด 214 คู่เบส ทำหน้าที่เป็นเป้าหมายหลักที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้การเสื่อมสภาพของดีเอ็นเอ โดยการเปรียบเทียบอัตราส่วนปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จาก Large Autosomal (LA) Target กับ Small Autosomal (SA) Target ได้เป็นค่าที่เรียกว่า Degradation Index (DI)

Degradation Index (DI) หมายถึงข้อมูลที่สังเกตได้เมื่อปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดใหญ่ที่วัดได้จากตัวอย่างลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดเล็ก โดยค่า Degradation Index จะถูกคำนวณอัตโนมัติด้วยโปรแกรม HID Real-Time PCR Analysis Software ตามสูตรดังนี้

$$\frac{\text{Small autosomal target DNA conc. (ng/}\mu\text{L)}}{\text{Large autosomal target DNA conc. (ng/}\mu\text{L)}}$$

ซึ่งค่าที่ได้จากการคำนวณสามารถแปลผลได้ 3 แบบ คือ หากค่า $DI < 1$ บ่งบอกว่าดีเอ็นเอไม่มีการเสื่อมสภาพหรือถูกยับยั้งของกระบวนการ PCR และหากค่า DI อยู่ในช่วง 1 ถึง 10 บ่งบอกว่าดีเอ็นเอมีการเสื่อมสภาพเล็กน้อยถึงปานกลางและกระบวนการ PCR มีความเป็นไปได้ที่จะถูกยับยั้งสุดท้ายหากค่า $DI > 10$ หรือไม่แสดงค่า บ่งบอกว่าดีเอ็นเอเกิดการเสื่อมสภาพอย่างมีนัยสำคัญและกระบวนการ PCR มีความเป็นไปได้ที่จะถูกยับยั้ง

Internal PCR Control target เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอสังเคราะห์ที่มี amplicon ขนาด 130 คู่เบส โดย IPC target จะพบอยู่ในทุกๆตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบและสามารถเพิ่มจำนวนไปพร้อมกับ target อื่นๆ ได้ เพื่อเป็นการยืนยันว่าส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยาสามารถทำงานได้ตามปกติ ซึ่ง IPC target มีประโยชน์ในการใช้ยืนยันความถูกต้องกรณีที่ผลการวัดปริมาณดีเอ็นเอเป็นลบหรือไม่พบดีเอ็นเอในตัวอย่าง และนอกจากนี้ IPC target ยังมีประโยชน์ในการระบุตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของสารยับยั้งกระบวนการ PCR (PCR inhibitor) ได้อีกด้วย ซึ่งการตรวจพบ PCR inhibitor จะสังเกตได้จากการเปลี่ยนแปลงค่า Cycle threshold (CT) ของ IPC target ในแต่ละตัวอย่างเปรียบเทียบกับค่า Cycle threshold (CT) ของ IPC target ที่ได้จากการทำกราฟดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA standard curve) (30, 31) โดยปกติแล้วค่า Cycle threshold (CT) ของ IPC target จะค่อนข้างคงที่ในทุกๆปฏิกิริยา อย่างไรก็ตามการมีอยู่ของ PCR inhibitor สามารถเพิ่มค่า IPC CT ในตัวอย่างเมื่อเทียบกับค่าเฉลี่ย IPC CT ของกราฟดีเอ็นเอมาตรฐานจากเพลทเดียวกัน

การอภิปรายผลจากค่า IPC CT :

- กรณีไม่พบดีเอ็นเอในตัวอย่าง สามารถระบุได้ก็ต่อเมื่อไม่พบการเพิ่มจำนวนของ Small Autosomal และ Large Autosomal target แต่ IPC target ยังสามารถเพิ่มจำนวนได้และค่า IPC CT จะต้องไม่สูงขึ้นเมื่อเทียบกับค่า IPC CT เฉลี่ยจากการทำกราฟดีเอ็นเอมาตรฐาน
- กรณีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอไม่สำเร็จ สามารถระบุได้ก็ต่อเมื่อไม่สามารถตรวจพบการเพิ่มจำนวน target ทั้งหมดรวมถึง IPC target ซึ่งกรณีนี้อาจเกิดจาก thermal cycling ในการทำ PCR หรือการผสมอัตราส่วน PCR reagent mix ที่ผิดพลาด หรือเกิดจาก PCR inhibitor ในตัวอย่างซึ่งผลการทดลองในกรณีนี้ควรทำซ้ำอีกครั้งเพื่อเป็นการยืนยันผล
- กรณีพบ PCR inhibitor ในตัวอย่าง สามารถระบุได้ก็ต่อเมื่อไม่มีการเพิ่มจำนวนหรือมีการเพิ่มจำนวน IPC target ที่น้อยมากๆ ส่งผลให้ค่า IPC CT ในตัวอย่างเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับค่า IPC CT เฉลี่ยจากการทำกราฟดีเอ็นเอมาตรฐาน เนื่องจากตัวอย่างที่ทดสอบมีการปนเปื้อนของ PCR inhibitor และไปรบกวนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของ IPC target (31)

2.6 การซ่อมแซมดีเอ็นเอ (DNA repairing)

เนื่องจากปัญหาความเสียหายของดีเอ็นเอที่ได้รับจากตัวอย่างที่เสื่อมสภาพนั้นทำให้นักนิติวิทยาศาสตร์พยายามในการหาวิธีการจัดการกับปัญหาที่เกิดขึ้นดังกล่าว โดยเริ่มจากการพัฒนาวิธีการสกัดดีเอ็นเอเพื่อให้ได้ในปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น รวมไปถึงการตัดแปลงขั้นตอนในกระบวนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ การเพิ่มจำนวนรอบในการทำ PCR และเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ Polymerase การใช้วิธีการลดขนาดของ STR amplicons โดยใช้หลักการ MiniSTRs , Tri-allelic Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) ในปัจจุบันมีงานวิจัยพยายามศึกษาการซ่อมแซมดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์เพิ่มมากขึ้น โดยส่วนใหญ่จะใช้เอนไซม์หลายชนิดทำงานร่วมกันเพื่อให้ครอบคลุมต่อความเสียหายของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นได้หลายรูปแบบ ทำให้ในปัจจุบันมีการคิดค้นชุดคิดต่างๆโดยใช้หลักการนี้เพื่อให้สะดวกต่อการใช้งานมากยิ่งขึ้น (32) เช่น งานวิจัยของ Liu และคณะ (33) ในปี 2018 ได้มีการทดสอบการซ่อมแซมดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ชนิดต่างๆ โดยทำการทดสอบในตัวอย่างเนื้อเยื่อตับที่ผ่านการแช่ฟอร์มาลิน และจากผลการทดลองพบว่าการใช้ Taq DNA polymerase มีประสิทธิภาพในการซ่อมแซมไม่ดีมากนัก ซึ่งอาจจะเป็นเพราะ Taq DNA polymerase ไม่มี proof reading จึงอาจจะทำให้เกิดความผิดพลาดในการนำเบสที่ถูกต้องมาทำการต่อสายดีเอ็นเอ ส่วนการใช้ DNA polymerase I และ T4 DNA ligase ซึ่งอ้างอิงมาจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ทำในตัวอย่าง Ancient DNA (34, 35) พบว่าเมื่อนำมาใช้กับตัวอย่างดีเอ็นเอที่เสียหายด้วยฟอร์มาลินนั้น เอนไซม์เหล่านี้ยังไม่สามารถทำการซ่อมแซมความเสียหายที่เกิดขึ้นได้ และสองวิธีการสุดท้ายเป็นชุด cocktail enzyme ที่ออกแบบมาเพื่อใช้ในซ่อมแซมดีเอ็นเอโดยเฉพาะ ซึ่งจากผลการทดลองโดยใช้ PreCR™ Repair

Mix ซึ่งมีความสามารถในการซ่อมแซมดีเอ็นเอหลายรูปแบบอย่างเช่น Apurinic/Apyrimidinic sites, Thymine dimers, Nicks และ Gaps พบว่าไม่สามารถซ่อมแซมความเสียหายของดีเอ็นเอที่เสียหายจากฟอร์มาลินได้ ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ผลร่วมกับวิธีการใช้ DNA polymerase I และ T4 DNA ligase แล้วพบว่า การเกิด Nicks และ Gaps ไม่ใช่สาเหตุหลักของการเสียหายดีเอ็นเอที่เกิดจากฟอร์มาลิน ส่วนการซ่อมแซมด้วย Restorase[®] DNA Polymerase พบว่าให้ผลการกู้คืนดีเอ็นเอสามารถทำได้ดีแต่ในตัวอย่างที่เกิดความเสียหายมาก ๆ อย่างเช่น ตัวอย่างที่แช่ฟอร์มาลินนานเกินสองสัปดาห์หรือในตัวอย่างที่ไม่มีการเติมบัฟเฟอร์ในฟอร์มาลินพบการ allele dropout ได้ในรูปแบบ STR เช่นเดียวกัน

และในปี 2018 เช่นเดียวกันได้มีงานวิจัยของ Gorden และคณะ (5) ได้ทำการทดสอบผลกระทบของการซ่อมแซมดีเอ็นเอโดยใช้ NEBNext[®] FFPE DNA Repair Kit (36) ซึ่งเป็นชุดซ่อมแซมดีเอ็นเอที่ประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดซึ่งถูกปรับให้เหมาะสมสำหรับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่าง FFPE โดยงานวิจัยนี้ได้นำมาทดสอบกับ Mitochondrial DNA (mtDNA) ที่ได้จากตัวอย่างกระดูกที่มีความเก่าแก่และเสื่อมสภาพ ผลจากการทดลองพบว่าภายหลังจากการซ่อมแซมดีเอ็นเอด้วย NEBNext[®] FFPE DNA Repair Kit ทำให้การเกิด base misincorporation เนื่องจาก cytosine deamination ลดลงไปถึง 98% จากการวิเคราะห์ด้วย Next Generation Sequencing ดังตารางที่ 1 ซึ่งถือว่าสามารถซ่อมแซมได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ยังไม่เห็นผลการเปลี่ยนแปลงนี้ในการวิเคราะห์ด้วยวิธี Sanger sequencing

ตารางที่ 1 แสดงผลการตรวจหาการเกิด cytosine deamination ด้วยเทคนิค Next Generation Sequencing จากตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการซ่อมแซมและไม่ผ่านกระบวนการซ่อมแซม (5)

Substitution Type	Untreated	Repaired
C → T or G → A	850 (98%)	10 (37%)
Other Transitions	15 (1.7%)	15 (55.5%)
Transversions	2 (< 0.5%)	2 (7.4%)
<i>Total</i>	<i>867</i>	<i>27</i>

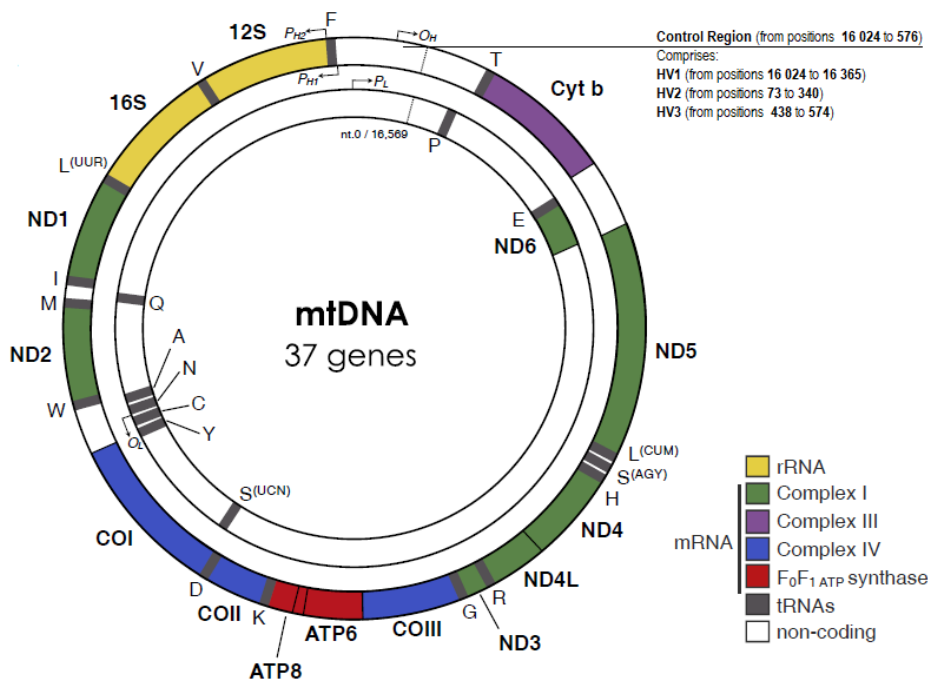
ปัจจุบันหลายงานวิจัย (24, 26, 37) พบว่านอกจากจะพบการเกิด cytosine deamination ได้ในตัวอย่าง ancient DNA แล้วยังสามารถพบได้ในตัวอย่าง FFPE เช่นเดียวกันอีกด้วย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะนำเอาชุดซ่อมแซมดีเอ็นเอดังกล่าวมาทำการศึกษาในตัวอย่าง FFPE และทำการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ รวมไปถึงวิเคราะห์การ

เปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอจากการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Sanger sequencing ซึ่งเป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการทางนิติวิทยาศาสตร์ในปัจจุบัน

2.7 การตรวจพิสูจน์ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (Mitochondrial DNA analysis)

การทำ DNA genotyping โดยส่วนใหญ่แล้วห้องปฏิบัติการทางนิติวิทยาศาสตร์มักจะใช้วิธี Short Tandem Repeats (STRs) ใน nuclear DNA ซึ่งเครื่องหมาย STR หรือไมโครแซตเทลไลต์ (Microsatellite) คือความหลากหลายที่พบได้ในดีเอ็นเอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมซึ่งเป็นเบสซ้ำมีความยาว 1-6 คู่เบส และมีจำนวนซ้ำแต่ละตำแหน่งไม่เกิน 100 ซ้ำ พบกระจายอยู่บริเวณต่าง ๆ ของจีโนม ซึ่งเหมาะสำหรับนำมาใช้ในการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) (38) เพื่อเป็นประโยชน์ในการระบุตัวบุคคล แต่อย่างไรก็ตามการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างดีเอ็นเอทางนิติวิทยาศาสตร์มักจะพบข้อจำกัดของตัวอย่างดีเอ็นเอที่เกิดการแตกหักหรือเสียหายของสายดีเอ็นเออยู่บ่อยครั้งส่งผลให้ปริมาณดีเอ็นเอไม่เพียงพอต่อการตรวจวิเคราะห์ STR ดังนั้นการศึกษาดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย (Mitochondrial DNA) จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการศึกษาในตัวอย่างที่เกิดความเสียหายของดีเอ็นเอมาก ๆ เนื่องจากด้วยปริมาณของ copy number ที่มีมากกว่าดีเอ็นเอในนิวเคลียส

ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย (Mitochondrial DNA) มีลักษณะเป็นวงแหวนเกลียวคู่ (Double stranded circular DNA) มีความยาว 16,569 คู่เบส อยู่ในส่วน matrix ของไมโทคอนเดรียและไม่มีโปรตีนฮิสโตน โดยในดีเอ็นเอที่เป็นวงแหวนเกลียวคู่นั้นประกอบไปด้วยดีเอ็นเอที่เรียกว่าสายหนัก หรือ heavy strand ซึ่งเป็นสายของดีเอ็นเอที่มีเบสพิวรีนสูง หรือมีเบส G จำนวนมาก (G-rich) อีกหนึ่งสายคือสายเบา หรือ light strand เป็นสายดีเอ็นเอที่มีเบสไพริมิดีนสูง หรือมีเบส C จำนวนมาก (C-rich) ภายในจีโนมของไมโทคอนเดรียประกอบไปด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่สามารถถอดรหัสได้ซึ่งสามารถถอดออกมาได้ถึง 37 ยีน และส่วนที่ไม่สามารถถอดรหัสได้ หรือที่เรียกว่า Control region หรือ Displacement loop (D-loop) ซึ่งเป็นส่วนที่สำคัญที่มักจะใช้ในการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ของบุคคลทางสายมารดา เนื่องจากบริเวณนี้เป็นบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงแทนที่สูงในแต่ละบุคคล (Hypervariable region) โดยบริเวณนี้มีความยาวประมาณ 1,121 คู่เบส ครอบคลุมตั้งแต่ลำดับเบสที่ 576 ถึง 16024 ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ส่วน ได้แก่ Hypervariable I region (HVI) บริเวณตำแหน่ง 16024-16365, Hypervariable II region (HVII) บริเวณตำแหน่ง 73-340 และ Hypervariable III region (HVIII) บริเวณตำแหน่ง 438-574 (39, 40) ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 แสดงจีโนมไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของมนุษย์ (39)

ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอมีลักษณะเฉพาะคือมีจำนวนมากในแต่ละเซลล์ (high copy number) โดยสามารถพบได้ประมาณ 1,000 ชุดต่อเซลล์ ขึ้นกับความต้อการในการใช้พลังงานของแต่ละเซลล์ ซึ่งมากกว่าดีเอ็นเอในนิวเคลียสที่มีเพียง 2 ชุดต่อเซลล์ ดังนั้นจึงเป็นประโยชน์อย่างมากต่องานทางนิติวิทยาศาสตร์ โดยไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอจะถูกนำมาศึกษาในกรณีที่ดีเอ็นเอในนิวเคลียสไม่สามารถใช้งานได้อย่างสมบูรณ์เนื่องจากการเสื่อมสลายของตัวอย่าง เช่น ตัวอย่างโครงกระดูกโบราณ ฟัน ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ผ่านการแช่ฟอร์มาลินเพื่อรักษาสภาพของชิ้นเนื้อ รวมไปถึงตัวอย่างที่ไม่มีดีเอ็นเอจากนิวเคลียสอย่างเช่น เส้นผม และไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในนั้นยังคงค่อนข้างทนต่อสภาพแวดล้อมจึงทำให้ดีเอ็นเอส่วนใหญ่ยังสามารถคงสภาพและหลงเหลืออยู่ในตัวอย่าง (41)

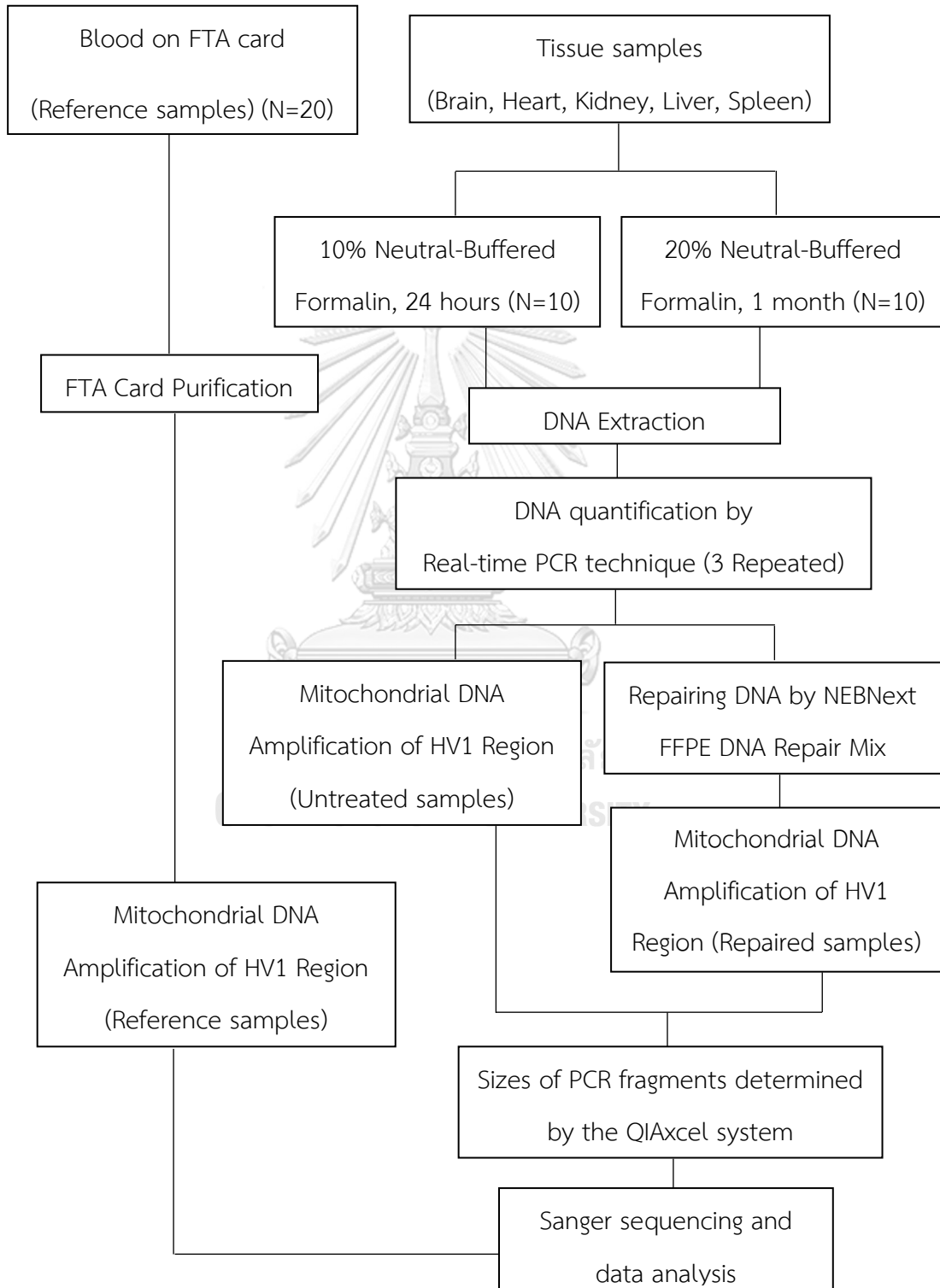
นอกจากการมี high copy number แล้วไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอยังมีคุณสมบัติที่สามารถถ่ายทอดผ่านทางสายมารดาได้ ซึ่งมีประโยชน์ในการใช้พิสูจน์ความเป็นมารดาและบุตร โดยการวิเคราะห์ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในนั้นมุ่งเน้นไปที่บริเวณ Control region ที่ประกอบด้วยตำแหน่ง HVI และ HVII ซึ่งเป็นบริเวณที่มีอัตราการเปลี่ยนแปลงแทนที่ของเบสสูงในแต่ละบุคคล โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณดังกล่าวจะเหมือนกันในบุคคลที่มาจากสายมารดาเดียวกัน (42) ซึ่งในปัจจุบันเทคนิคการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอสำหรับงานทางนิติวิทยาศาสตร์ยังคงใช้วิธีแบบแซงเกอร์ หรือ Sanger Sequencing เป็นวิธีมาตรฐานซึ่งอาศัยหลักการ dideoxynucleotide chain termination ด้วยการนำเอานิวคลีโอไทด์มาติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent dye) ซึ่งแต่ละนิวคลีโอไทด์จะมีการติดฉลากสีที่แตกต่างกัน จากนั้นใช้เอนไซม์ในการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่จาก

ดีเอ็นเอสายต้นแบบ (DNA template) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บันทึกได้ใหม่จะประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์แต่ละตัวที่ติดฉลาก (43) ส่วนการวิเคราะห์และแปลผลลำดับนิวคลีโอไทด์สามารถทำได้โดยการเปรียบเทียบกับตัวอย่างอ้างอิง rCRS 1999 (Revised Cambridge Reference Sequence, 1999) และรายงานผลตำแหน่งที่แตกต่างไปจากลำดับอ้างอิงดังกล่าว (41)



บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 รูปแบบการทดลอง



3.2 รูปแบบการวิจัย

การวิจัยเชิงวิเคราะห์ (Analytical study)

3.3 ระเบียบวิธีวิจัย

3.3.1 ตัวแปรในงานวิจัย (Variable)

3.3.1.1 ตัวแปรอิสระ (Independent Variable) คือ

- ความเข้มข้นของฟอร์มาลินที่ใช้ในการแช่ชิ้นเนื้อ
- ระยะเวลาในการแช่ชิ้นเนื้อในฟอร์มาลิน

3.3.1.2 ตัวแปรตาม (Dependent Variable) คือ

- ความเสียหายของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่าง FFPE

3.3.2 กลุ่มประชากรเป้าหมาย (Target population)

3.3.2.1 เกณฑ์คัดเข้า (Inclusion criteria)

- เนื้อเยื่อที่ได้รับต้องมาจากศพที่ผ่านการผ่าชันสูตรในระยะเวลาไม่เกิน 24 ชั่วโมง หลังการเสียชีวิต
- อายุของศพต้องไม่เกิน 50 ปี

3.3.2.2 เกณฑ์คัดออก (Exclusion criteria)

- เนื้อเยื่อมะเร็ง

3.3.3 การคำนวณขนาดตัวอย่าง (Sample size)

การหาขนาดตัวอย่างประเภทศึกษาความแตกต่างระหว่าง 2 กลุ่มที่ไม่เป็นอิสระต่อกัน (Two related groups)

$$\text{สูตร} \quad n_{\text{pair}} = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2}{d^2}$$

โดยกำหนดให้ $\alpha = 0.05$

$$\beta = 0.10$$

$$Z_{\alpha/2} = Z_{0.05/2} = 1.96 \text{ (two tail)}$$

$$Z_{\beta} = Z_{0.10} = 1.28$$

σ_2 = Variance of difference

d = Difference of mean

ตัวอย่างเนื้อเยื่อตับ

$$n_{\text{pair}} = \frac{(1.96 + 1.28)^2 (0.01)^2}{(0.01)^2} = 9.97$$

จากการทำการศึกษาเบื้องต้น (Pilot Study) ได้ทำการคำนวณค่า n จากสูตรดังกล่าวข้างต้น โดยคำนวณจากค่าความเข้มข้นดีเอ็นเอก่อนและหลังการซ่อมแซมดีเอ็นเอในตัวอย่างเนื้อเยื่อทุกชนิด พบว่า ได้ค่า N สูงสุดอยู่ที่ 9.97 ในตัวอย่างเนื้อเยื่อตับ ดังนั้นจำนวนผู้เสียชีวิตที่ใช้ในการทดลองคือ 10 ราย

3.4. วิธีการดำเนินการวิจัย

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4) ของบริษัท KemAus™, Australia
2. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) ของบริษัท KemAus™, Australia
3. 40% ฟอรั่มัลดีไฮด์ (40% Formaldehyde) ของบริษัท Eternal resin, Thailand
4. FTA Purification Reagent ของบริษัท Whatman™, UK
5. TE Buffer ของบริษัท PanReac AppliChem, Spain
6. พาราฟิน (Paraffin)
7. ไซลีน (Xylene)
8. เอทานอล (Ethanol) ของบริษัท Merck, Germany
9. ชุดน้ำยาสำเร็จรูป QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit ของบริษัท QIAGEN, Germany
10. ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Quantifiler™ HP DNA Quantification Kit ของบริษัท Thermo Fisher Scientific, USA
11. ชุดน้ำยาสำเร็จรูป NEBNext® FFPE Repair Kit ของบริษัท New England Biolabs, USA
12. AMPure XP Beads ของบริษัท Beckman Coulter, USA
13. น้ำยา ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent ของบริษัท Thermo Fisher Scientific, USA
14. ชุดน้ำยาสำเร็จรูป DyeEx 2.0 spin kit ของบริษัท QIAGEN, Germany
15. ชุดน้ำยาสำเร็จรูป BigDye v3.1 Terminator Cycle Sequencing kit ของบริษัท Thermo Fisher Scientific, USA

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. เครื่องชั่งสารเคมี รุ่น Precisa XT220A ของบริษัท Precisa, Switzerland
2. เครื่องกวนสารด้วยแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) รุ่น Thermolyne Nuova II Stirrer ของบริษัท Marshall Scientific, United States
3. กระดาษทดสอบ pH (pH paper) ของบริษัท Thermo Fisher Scientific, USA
4. ตลับชิ้นเนื้อส่วนฐาน (Tissue Cassette Bases) ของบริษัท Citotest scientific, China
5. ฝาปิดตลับชิ้นเนื้อแบบโลหะ (Metal Tissue Cassette Cover)
6. เครื่องเตรียมชิ้นเนื้ออัตโนมัติ (Automated Tissue Processor) รุ่น Intelsint TP300 ของบริษัท MedicalExpo, France
7. เครื่องเตรียมบล็อกชิ้นเนื้อ (Embedding Center) รุ่น Microm EC350 ของบริษัท Thermo Fisher Scientific, USA
8. แม่พิมพ์โลหะสำหรับหล่อบล็อก (Metal Base Mold)
9. คีมคีบ (Forceps)
10. เครื่อง Para trimmer รุ่น Shandon ของบริษัท Thermo Fisher Scientific, USA
11. เครื่องตัดชิ้นเนื้อ (Microtome) รุ่น RM2255 ของบริษัท Leica Biosystems, USA
12. FTA Puncher ขนาด 1.2 มิลลิเมตร
13. เครื่องผสมสาร (Vortex-Genie2) รุ่น G560E ของบริษัท Scientific Industries instruments, USA
14. ไมโครปิเปตต์และทีป รุ่น P10, P20, P100, P200, P1000 มิลลิลิตร ของบริษัท Eppendorf, Germany
15. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ของบริษัท Thermo Fisher Scientific, USA
16. หลอดทดลอง ขนาด 0.2 มิลลิลิตร ของบริษัท Thermo Fisher Scientific, USA
17. 96-well plate ของบริษัท Thermo Fisher Scientific, USA
18. แท่นแม่เหล็ก (Magnetic stand) รุ่น DynamagTM-2 ของบริษัท Thermo Fisher Scientific, USA
19. เครื่องควิบิฟลูออโรมิเตอร์ (Qubit fluorometer 2.0) ของบริษัท Introvergen, USA
20. เครื่อง SpeedVac Vacuum Concentrators รุ่น DNA130 ของบริษัท Thermo Fisher Scientific, USA
21. เครื่อง QIAxcel advanced ของบริษัท QIAGEN, Germany

22. เครื่อง QuantStudio™ 5 Real-Time PCR ของบริษัท Thermo Fisher Scientific, USA

23. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น MiniSpin plus ของบริษัท Eppendorf, Germany

24. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ รุ่น GeneAmp™ PCR System 9700 Fast Thermal Cycler ของบริษัท Applied Biosystems, USA

25. เครื่อง 3130xl Genetic Analyzer ของบริษัท Thermo Fisher Scientific, USA

3.4.1 การเตรียมฟอร์มาลินสำหรับการตรึงชิ้นเนื้อ

3.4.1.1 การเตรียม 10% Neutral Buffered Formalin, pH 7.0

เตรียม 10% Neutral Buffered Formalin ปริมาตร 1 ลิตร มีส่วนประกอบดังนี้

โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4)	4.0	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	6.5	กรัม
น้ำ	900	มิลลิลิตร
40% ฟอร์มัลดีไฮด์ (40% Formaldehyde)	100	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนสารด้วยแม่เหล็กจากนั้นวัดค่า pH ด้วยกระดาษ

ทดสอบ pH เพื่อตรวจสอบความเป็นกลางของสารละลาย

3.4.1.2 การเตรียม 20% Neutral Buffered Formalin, pH 7.0

เตรียม 20% Neutral Buffered Formalin ปริมาตร 1 ลิตร มีส่วนประกอบดังนี้

โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4)	4.0	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	6.5	กรัม
น้ำ	800	มิลลิลิตร
40% ฟอร์มัลดีไฮด์ (40% Formaldehyde)	200	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนสารด้วยแม่เหล็กจากนั้นวัดค่า pH ด้วยกระดาษ

ทดสอบ pH เพื่อตรวจสอบความเป็นกลางของสารละลาย

3.4.2 การเตรียมตัวอย่าง Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue

ตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัยนี้เป็นเนื้อเยื่อศพและเลือดที่ได้รับภายหลังจากการผ่าชันสูตรซึ่งเป็นขั้นตอนกระบวนการทำงานปกติของแพทย์นิติเวชประจำภาควิชาและศูนย์อำนวยการชันสูตรพลิกศพ ซึ่งมีอำนาจในการตรวจเก็บชิ้นเนื้อเพื่อการวินิจฉัยและศึกษาตามกระบวนการกฎหมายวิธี พิจารณาความอาญา มาตรา 148-150 และตามระเบียบของศูนย์อำนวยการชันสูตรฯ ซึ่งตัวอย่างชิ้นเนื้อจะถูกนำมาผ่านกระบวนการการทำ FFPE block โดยหน่วยนิติพยาธิวิทยาก่อนที่จะนำมาทำการวินิจฉัยและศึกษาวิจัยต่อไป ทั้งนี้ผู้วิจัยได้ขอรับการอนุญาตการใช้ตัวอย่างศึกษาจากหัวหน้าศูนย์อำนวยการชันสูตรพลิกศพ ภาควิชานิติเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แล้วโดยการออกเอกสารบันทึก

ข้อความขออนุญาตใช้ตัวอย่างเพื่องานวิจัยไปยังหัวหน้าศูนย์อำนวยการชั้นสูงตรมศึกษา และเพื่อเป็นการเคารพความเป็นส่วนตัวของผู้เสียชีวิตงานวิจัยนี้จะไม่มีการเปิดเผยข้อมูลส่วนตัวที่สามารถระบุถึงตัวผู้เสียชีวิตในเอกสารการตีพิมพ์ และงานวิจัยนี้ผ่านการรับรองการยกเว้นพิจารณาจริยธรรมโครงการวิจัยจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมวิจัยในมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย COE No. 012/2020, IRB No. 166/63

3.4.2.1 การเตรียมชิ้นเนื้อ (Tissue processing)

นำตัวอย่างที่แช่ฟอร์มาลินครบตามเวลาที่ต้องการวางลงบนส่วนฐานของถ้ำขึ้นเนื้อแล้วปิดฝาด้วยฝาปิดแบบโลหะใส่ในตะกร้าเตรียมชิ้นเนื้อ จากนั้นนำเข้าเครื่องเตรียมชิ้นเนื้ออัตโนมัติ โดยเครื่องจะใช้ทำงานประมาณ 1 วัน ในการเตรียมชิ้นสำหรับกระบวนการหล่อบล็อกตัวอย่างชิ้นเนื้อต่อไป (Embedding)

3.4.2.2 การเตรียมบล็อกตัวอย่างชิ้นเนื้อ (Embedding)

นำตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ผ่านเครื่องเตรียมชิ้นเนื้ออัตโนมัติมาทำการเตรียมบล็อกตัวอย่างชิ้นเนื้อ (Embedding) โดยใช้เครื่องเตรียมบล็อกชิ้นเนื้อ (Embedding Center) ที่ประกอบไปด้วย 5 ส่วนคือ แท่นเย็น (cold plate) แท่นร้อน (hot plate) หม้อจ่ายพาราฟิน (paraffin dispenser) อ่างเก็บถ้ำขึ้นเนื้อ (tank storage) และอ่างเก็บแม่พิมพ์ (mold storage) โดยนำเอาถ้ำขึ้นเนื้อออกจากเครื่องเตรียมชิ้นเนื้ออัตโนมัติมาใส่ในอ่างเก็บถ้ำขึ้นเนื้อที่มีพาราฟินหลอมอยู่ จากนั้นนำแม่พิมพ์ (Mold) ที่ใช้สำหรับหล่อบล็อกมาวางไว้บนแท่นร้อนที่อยู่ใต้ตำแหน่งหัวจ่ายพาราฟิน แล้วกดจ่ายพาราฟินลงบนแม่พิมพ์ นำคีมคีบ (forceps) ชิ้นเนื้อออกจากถ้ำขึ้นเนื้อในแม่พิมพ์ ตรวจสอบตำแหน่งการวางชิ้นเนื้อให้อยู่ในระนาบที่ต้องการ จากนั้นค่อยๆย้ายแม่พิมพ์มาวางบนแท่นเย็นแล้วตรวจสอบตำแหน่งการวางชิ้นเนื้ออีกครั้ง โดยระหว่างที่พาราฟินเริ่มแข็งตัวจากความเย็นให้คอยกดชิ้นเนื้อด้านล่างให้แนบไปกับผิวของแม่พิมพ์ซึ่งจะเป็นส่วนของหน้าบล็อก จากนั้นปิดด้านบนของแม่พิมพ์ด้วยส่วนฐานของถ้ำขึ้นเนื้อ แล้วกดจ่ายพาราฟินอีกครั้งเพื่อให้พาราฟินเชื่อมส่วนที่อยู่ในแม่พิมพ์และส่วนถ้ำขึ้นเนื้อเข้าด้วยกัน จากนั้นวางทิ้งไว้ที่แท่นเย็นเพื่อให้พาราฟินแข็งตัวโดยจะเริ่มสังเกตว่าพาราฟินมีสีขุ่นขึ้น เมื่อพาราฟินแข็งตัวสมบูรณ์แล้วจึงแกะบล็อกออกจากแม่พิมพ์ แล้วทำการแต่งขอบบล็อกด้วยเครื่อง Para trimmer ที่มีการใช้ความร้อนในการช่วยกำจัดพาราฟินส่วนเกินที่ล้นขอบบล็อกออกมา จากนั้นเก็บตัวอย่างไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส ป้องกันพาราฟินละลายเพื่อใช้สำหรับขั้นตอนการตัดชิ้นเนื้อด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ (Microtome) ต่อไป

3.4.2.3 การตัดชิ้นเนื้อ (Sectioning)

นำตัวอย่างบล็อกชิ้นเนื้อใส่ในช่องยึดตัวอย่าง (Block holder) ของเครื่องตัดชิ้นเนื้อ (Microtome) แล้วหมุนสกรูให้แน่น จากนั้นปรับตำแหน่งบล็อกให้ขนานกับใบมีดแล้วตัดเล็ม (trim) ชิ้นเนื้ออย่างหยาบโดยปรับความหนาอยู่ที่ 20 ไมโครเมตร เพื่อเปิดหน้าบล็อกจนเห็นทุกส่วนของชิ้นเนื้อ

เนื้อ จากนั้นจึงทำการปรับความหนาให้อยู่ที่ 10 ไมโครเมตร โดยจำนวน section ที่ใช้จะแตกต่างกันออกไปในแต่ละสภาวะที่ใช้ในการทดลองขึ้นอยู่กับปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่วัดได้ในสภาวะนั้นๆ นอกจากนี้ไบโอมิตที่ใช้ในการตัดชิ้นเนื้อจะถูกทำความสะอาดด้วยแอลกอฮอล์ทุกครั้งเมื่อมีการเปลี่ยนตัวอย่างเพื่อเป็นการลดการเกิด Cross Contamination

3.4.2.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับตัวอย่างที่ตรึงด้วย 10% Neutral Buffered Formalin

ทดลองนำตัวอย่างชิ้นเนื้อตับที่ได้รับภายหลังจากการผ่าชันสูตรมาตัดให้มีขนาดความกว้าง 1.5 เซนติเมตร ความยาว 1.5 เซนติเมตร และความหนาประมาณ 0.5 เซนติเมตร แช่ลงใน 10% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง, 48 ชั่วโมง, 72 ชั่วโมง และ 1 สัปดาห์ จากนั้นนำตัวอย่างชิ้นเนื้อดังกล่าวมาจัดเก็บอยู่ในรูป FFPE block ตามขั้นตอนที่ 3.4.2.1 – 3.4.2.3 โดยจำนวน section ของชิ้นเนื้อจะเริ่มตั้งใช้ที่ 3 section ตามคำแนะนำของชุดน้ำยาสกัดดีเอ็นเอที่ใช้ในการทดลองที่ระบุไว้ว่าหากยังไม่ทราบข้อมูลเบื้องต้นของตัวอย่างแนะนำให้เริ่มต้นใช้จำนวน section ไม่เกิน 3 section ต่อหนึ่งปฏิบัติการสกัดดีเอ็นเอ ทั้งนี้อาจใช้ได้มากที่สุดถึง 8 section ขึ้นอยู่กับผลการวัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (44) จากนั้นนำตัวอย่างมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit ตามขั้นตอนที่ 3.4.3.1 แล้ววัดปริมาณดีเอ็นเอด้วย Qubit fluorometer และตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอบน 1% agarose gel ด้วยเทคนิค gel electrophoresis

3.4.2.5 การเตรียมตัวอย่างที่ตรึงด้วย 10% Neutral Buffered Formalin สำหรับใช้ในการทดลอง

นำตัวอย่างชิ้นเนื้อ 5 ชนิด คือ สมอ, หัวใจ, ไต, ตับและม้าม จากผู้เสียชีวิตจำนวน 10 ราย (N=10) ที่ได้ภายหลังจากการผ่าชันสูตรมาตัดให้มีขนาดความกว้าง 1.5 เซนติเมตร ความยาว 1.5 เซนติเมตร และความหนาประมาณ 0.5 เซนติเมตร แช่ลงใน 10% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างชิ้นเนื้อดังกล่าวมาจัดเก็บอยู่ในรูป FFPE block ตามขั้นตอนที่ 3.4.2.1 – 3.4.2.3 โดยตัดชิ้นเนื้อ (Sectioning) จำนวน 3 section ที่ความหนา 10 ไมโครเมตร ต่อหนึ่งปฏิบัติการสกัดดีเอ็นเอ

3.4.2.6 การเตรียมตัวอย่างที่ตรึงด้วย 20% Neutral Buffered Formalin สำหรับใช้ในการทดลอง

นำตัวอย่างชิ้นเนื้อ 5 ชนิด คือ สมอ, หัวใจ, ไต, ตับและม้าม จากผู้เสียชีวิตจำนวน 10 ราย (N=10) ที่ได้ภายหลังจากการผ่าชันสูตรมาตัดให้มีขนาดความกว้าง 1.5 เซนติเมตร ความยาว 1.5 เซนติเมตร และความหนาประมาณ 0.5 เซนติเมตร) ที่แช่อยู่ใน 20% Neutral Buffered Formalin (20%NBF) เป็นระยะเวลา 1 เดือน ตามวิธีการรักษาสภาพชิ้นเนื้อของศูนย์ชันสูตรพลิกศพของ

ภาควิชานิติเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากนั้นนำตัวอย่างชิ้นเนื้อดังกล่าวมาจัดเก็บอยู่ในรูป FFPE block ตามขั้นตอนที่ 3.4.2.1 – 3.4.2.3 โดยตัดชิ้นเนื้อ (Sectioning) จำนวน 8 section ที่ ความหนา 10 ไมโครเมตร ต่อหนึ่งปฏิบัติการสกัดดีเอ็นเอ

3.4.3 การสกัดดีเอ็นเอ

3.4.3.1 สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่าง FFPE

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่าง FFPE ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (44) โดยเริ่มต้นจากการกำจัดพาราฟินด้วยการเติมไซลีน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง ผสมสาร ให้เข้ากันเป็นเวลา 10 วินาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็น เวลา 2 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง จากนั้นเติม 96-100% เอทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมสารให้เข้ากัน แล้วปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ดูดส่วนใสทิ้งแล้ว บ่มที่อุณหภูมิห้องหรือไม่เกิน 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (หรือจนกว่าเอทานอลระเหย หมด) จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ ATL ปริมาตร 180 ไมโครลิตร และเอ็นไซม์โปรตีนเนสเค (proteinase K) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (หรือจนกว่าตัวอย่างจะ เกิดการสลายตัวสมบูรณ์) จากนั้นบ่มต่อที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเติม บัฟเฟอร์ AL ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และ 96-100% เอทานอล ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงใน ตัวอย่างแล้วผสมสารให้เข้ากัน จากนั้นย้ายสารทั้งหมดใส่ใน QIAamp MinElute column ที่อยู่ใน Collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเปลี่ยน Collection tube ใหม่ จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ AW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 8000 รอบ ต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเปลี่ยน Collection tube ใหม่ เติมบัฟเฟอร์ AW2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเปลี่ยน Collection tube ใหม่ ปั่น เหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้เมมเบรนแห้ง จากนั้นย้ายคอลัมน์ใส่ในหลอด หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์ ATE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำดีเอ็นเอที่ สกัดได้เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนการวัดปริมาณดีเอ็นเอต่อไป

3.4.3.2 สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดบน FTA card

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดบน FTA card เพื่อใช้เป็นตัวอย่างอ้างอิงสำหรับการ วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ puncher ขนาด 1.2 มิลลิเมตร กดลงบน FTA card ในตำแหน่งที่ มีเลือดจำนวน 1 punch เติม FTA Purification Reagent ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้า กัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดส่วนใสทิ้ง ทำซ้ำวิธีการเดิมอีก 2 ครั้ง จากนั้นเติม บัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดส่วนใสทิ้ง ทำซ้ำอีก

1 ครั้ง จากนั้นทิ้งให้ FTA แห่งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมงหรือให้ความร้อนที่ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อใช้สำหรับการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอต่อไป

3.4.4 การวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Real-time PCR

วัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Real-time PCR โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Quantifiler™ HP DNA Quantification Kit (31) เริ่มต้นจากการเตรียมดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA standard) สำหรับทำกราฟมาตรฐาน (Standard curve) ที่ความเข้มข้น 50, 5, 0.5, 0.05 และ 0.005 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร โดยทำการเจือจาง Quantifiler™ THP DNA Standard ด้วย Quantifiler™ THP DNA Dilution Buffer ตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงการเจือจางตัวอย่างดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA standard) สำหรับการทำกราฟมาตรฐานในการวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Real-time PCR

Standard	ความเข้มข้น (ng/μL)	ปริมาณสารที่ใช้	Dilution factor
Std. 1	50.000	10 μL [100 ng/μL stock] + 10 μL Quantifiler™ THP DNA dilution buffer	2X
Std. 2	5.000	10 μL [Std. 1] + 90 μL Quantifiler™ THP DNA dilution buffer	10X
Std. 3	0.500	10 μL [Std. 2] + 90 μL Quantifiler™ THP DNA dilution buffer	10X
Std. 4	0.050	10 μL [Std. 3] + 90 μL Quantifiler™ THP DNA dilution buffer	10X
Std. 5	0.005	10 μL [Std. 4] + 90 μL Quantifiler™ THP DNA dilution buffer	10X

จากนั้นเตรียม PCR mix ที่ประกอบด้วย Quantifiler™ HP Primer Mix ปริมาณ 8 ไมโครลิตร และ Quantifiler™ THP PCR Reaction Mix ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ต่อการเตรียม 1 ปฏิกริยา ผสมสารให้เข้ากันแล้วเติม PCR mix ปริมาตร 18 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของ 96-well plate จากนั้นเติมตัวอย่างดีเอ็นเอ, ดีเอ็นเอมาตรฐานแต่ละความเข้มข้น และน้ำกลั่นสำหรับเป็น negative control ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ปิดเพลทด้วย Optical Adhesive Cover แล้วปั่นเหวี่ยงที่

3,000 รอบต่อนาที่ เป็นเวลา 20 วินาที จากนั้นนำเพลทใส่ในเครื่อง QuantStudio™ 5 Real-Time PCR แล้วอ่านผลด้วยโปรแกรม HID Real-Time PCR Analysis Software

3.4.5 การซ่อมแซมดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์

ซ่อมแซมดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์โดยใช้ชุดน้ำยา NEBNext® FFPE Repair Mix (36) โดยเติม 10X FFPE DNA Repair Buffer ปริมาตร 6.5 ไมโครลิตร และ NEBNext FFPE DNA Repair Mix ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในตัวอย่างดีเอ็นเอ ปริมาตร 53.3 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วย AMPure XP Beads ปริมาตร 186 ไมโครลิตร ปิดเตตส์สารขึ้นลงอย่างน้อย 10 ครั้ง แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที วางหลอดทดลองลงบนแท่นแม่เหล็ก (magnetic stand) เพื่อแยกอนุภาคแม่เหล็ก (magnetic bead) ออกจากส่วนใส จากนั้นดูดส่วนใสทิ้งและระวังอย่าให้รบกวนส่วนของอนุภาคแม่เหล็กซึ่งมีดีเอ็นเอจับอยู่ จากนั้นเติม 80% เอทานอล ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองขณะวางอยู่บนแท่นแม่เหล็ก บ่มต่อที่อุณหภูมิห้อง 30 วินาที แล้วปิดเตตส์ส่วนใสทิ้ง จากนั้นซ้ำอีกครั้ง แล้วเปิดฝาหลอดทดลองทิ้งไว้เพื่อให้อนุภาคแม่เหล็กแห้งเป็นเวลา 5 นาที นำหลอดทดลองออกจากแท่นแม่เหล็ก แล้วเติม 0.1X TE ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นวางหลอดทดลองกลับลงไปบนแท่นแม่เหล็กอีกครั้ง รอจนกว่าสารละลายใสแล้วจึงปิดเตตส์ส่วนใสปริมาตร 32 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่โดยที่ระวังอย่าให้รบกวนส่วนอนุภาคแม่เหล็ก

3.4.6 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Sanger sequencing

3.4.6.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายที่ตำแหน่ง Hypervariable region I

(HVI) บนไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

1. ตัวอย่างถูกตรึงด้วย 10% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายที่ตำแหน่ง HVI บนไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากชิ้นเนื้อบน FFPE block ที่ผ่านการแช่ 10% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เป็นดีเอ็นเอแม่แบบและใช้ไพรเมอร์ ดังตารางที่ 3 เพื่อให้ได้ชิ้นส่วนบริเวณดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการโดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA thermal cycler) และเตรียมส่วนผสมประกอบสำหรับปฏิกิริยาดังนี้ 1X PCR buffer, 50 μ M dNTP, 1.5mM MgCl₂, 2.5U AmpliTaq DNA polymerase, 0.2 μ M Forward primer, 0.2 μ M Reverse primer และดีเอ็นเอที่สกัดได้ประมาณ 3-10 นาโนกรัม จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำปราศจากไอออน ให้เป็น 50 ไมโครลิตร

ตารางที่ 3 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ Hypervariable region I (HVI) สำหรับตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากชิ้นเนื้อบน FFPE block ที่ผ่านการแช่ 10% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (45)

PCR	Primer Position	Sequence	Region Amplified
1F	L15997	5'- CAC CAT TAG CAC CCA AAG CT -3'	HVI 15997-16401
1R	H16401	5'- TAG TTT CAC GGA GGA TGG TG-3'	

ผสมสารละลายต่าง ๆ ให้เข้ากันดี โดยใช้ปิเปตต์และสารละลายต้องอยู่ในภาวะเย็นตลอดเวลาโดยเตรียมในภาชนะน้ำแข็ง จากนั้นนำหลอดสารละลายผสมที่ได้ใส่ลงในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยตั้งค่าอุณหภูมิและเวลา ดังนี้

Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที	} 32 รอบ
Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที	
Annealing	ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที	
Final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที	

จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องแยกสารพันธุกรรมอัตโนมัติโดยใช้หลักการ Capillary Electrophoresis

2. ตัวอย่างที่ถูกตรึงด้วย 20% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 1 เดือน

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายที่ตำแหน่ง HVI บนไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากชิ้นเนื้อบน FFPE block ที่ผ่านการแช่ 20% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 1 เดือน เป็นดีเอ็นเอแม่แบบและใช้ไพรเมอร์ ดังตารางที่ 4 เพื่อให้ได้ชิ้นส่วนบริเวณดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการโดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA thermal cycler) และเตรียมส่วนผสมสำหรับปฏิกิริยา ดังนี้ 1X PCR buffer, 200µM dNTP, 1.5mM MgCl₂, 10U AmpliTaq DNA polymerase, 0.4µM Forward primer, 0.4µM Reverse primer และดีเอ็นเอที่สกัดได้ประมาณ 0.1-1 นาโนกรัม จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 50 ไมโครลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน

ตารางที่ 4 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ Hypervariable region I (HVI) สำหรับตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากชิ้นเนื้อบน FFPE block ที่ผ่านการแช่ 20% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 1 เดือน (40)

PCR	Primer Position	Sequence	Region Amplified
1F	L15971	5'-TTA ACT CCA CCA TTA GCA CC-3'	HV1a 15971-16258
1R	H16258	5'-TGG CTT TGG AGT TGC AGT TG-3'	
2F	L16140	5'-TAC TTG ACC ACC TGT AGT AC-3'	HV1b 16140-16410
2R	H16414	5'-CAC GGA GGA TGG TGG TCA AG-3'	

ผสมสารละลายต่าง ๆ ให้เข้ากันดี โดยใช้ปิเปตต์และสารละลายต้องอยู่ในภาวะเย็นตลอดเวลาโดยเตรียมในภาชนะที่แห้ง จากนั้นนำหลอดสารละลายผสมที่ได้ใส่ลงในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยตั้งค่าอุณหภูมิและเวลา ดังนี้

ค่าอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ใช้กับไพรเมอร์คู่ที่ 1 (1F และ 1R)

Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที	
Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที	} 38 รอบ
Annealing	ที่อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที	
Final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที	

ค่าอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ใช้กับไพรเมอร์คู่ที่ 2 (2F และ 2R)

Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที	
Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที	} 38 รอบ
Annealing	ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที	
Final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที	

จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องแยกสารพันธุกรรมอัตโนมัติโดยใช้หลักการ Capillary Electrophoresis

3.4.6.2 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องแยกสารพันธุกรรมอัตโนมัติโดยใช้หลักการ Capillary Electrophoresis

นำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมาทำการวิเคราะห์ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอตามน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้ชุดน้ำยา QIAxcel DNA High Resolution Kit ด้วยเครื่อง QIAxcel[®] Advanced (46) โดยเริ่มจากการนำ Gel cartridge วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 20 นาที จากนั้นใช้ tower paper เช็ดทำความสะอาดบริเวณปลาย Capillary ก่อนใส่ลงในเครื่อง QIAxcel[®] Advanced แล้วเสียบ Smart Key ลงในช่องเสียบ เติมน้ำฟอสเฟตชนิดต่างๆลงใน Buffer tray โดยเติม Wash buffer ปริมาตร 8 มิลลิลิตร ที่ตำแหน่ง Wash Park (WP) และ Wash Inject (WI) เติมน้ำ Separation Buffer ปริมาตร 18 มิลลิลิตร ลงในช่อง Buffer (BUF) จากนั้นเติมน้ำ QX Alignment marker ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ลงใน QX 0.2 ml 12-tube strip แล้ววางลงใน Buffer tray จากนั้นนำ Buffer tray วางลงในเครื่อง แล้วนำตัวอย่างดีเอ็นเอ ปริมาตร 15 ไมโครลิตร วางลงใน Sample plate holder จากนั้นสั่งให้เครื่องเริ่มทำงานโดยใช้คอมพิวเตอร์และวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม QIAxcel[®] ScreenGel software

3.4.6.3 การทำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสให้บริสุทธิ์

นำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูป ExoSAP-IT[™] PCR Product Cleanup Reagent (47) โดยเติมน้ำยา ExoSAP-IT reagent ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA thermal cycler) โดยใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อใช้สำหรับขั้นตอนการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

3.4.6.4 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในตัวอย่างโดยใช้ชุดน้ำยา BigDye v3.1 Terminator Cycle Sequencing kit (48) และเตรียมส่วนประกอบสำหรับปฏิกิริยา ดังนี้

5X Sequencing Buffer	ปริมาตร 2 ไมโครลิตร
BigDye [™] Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
3.2µM Sequencing Primer	ปริมาตร 1 ไมโครลิตร

ผสมสารละลายต่าง ๆ ให้เข้ากันดี โดยใช้ปิเปตต์และสารละลายต้องอยู่ในสถานะเย็นตลอดเวลาโดยเตรียมในภาคน้ำแข็ง จากนั้นนำหลอดสารละลายผสมที่ได้ใส่ลงในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยตั้งค่าอุณหภูมิและเวลา ดังนี้

Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที	} 25 รอบ
Denaturation	ที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที	
Annealing	ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วินาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที	

จากนั้นทำการล้างสีย้อม (dye terminator) ในส่วนที่ไม่เกิดการจับกับผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอโดยใช้ชุดน้ำยา DyeEx 2.0 spin kit (49) โดยเริ่มต้นจากการทำให้เจลเรซินที่อยู่ในคอลัมน์เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องเขย่าสาร คลายเกลียวฝาของคอลัมน์แล้ววางลงใน collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที แล้วย้ายส่วนคอลัมน์มาไว้ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นหยุด sequencing reaction ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงตรงกลางเจลซ้ำๆ เพื่อให้เจลค่อยๆ ติดเข็มสาร ปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที แล้วนำสารที่ได้ไปทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง SpeedVac Vacuum Concentrator เพื่อใช้ในขั้นตอนการทำ Capillary Electrophoresis ต่อไป

การทำ Capillary Electrophoresis นั้นทำโดยใช้เครื่อง Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer โดยนำเอาสารที่ผ่านการทำให้แห้งแล้วมาเติม Hi-Di™ Formamide ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากันแล้วปั่นเหวี่ยงสั้นๆ จากนั้นดูดสารละลายทั้งหมดใส่ใน 96-well plate แล้วนำเข้าเครื่อง Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer เพื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และอ่านผลลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม SeqScape™ Software v2.7

3.4.7 การวิเคราะห์ผลการทดลอง กรมมหาวิทยาลัย

3.4.7.1 การวิเคราะห์ผลการทดลองจากการวัดปริมาณเอ็นเอด้วยวิธี Real-time PCR

จากการวัดปริมาณเอ็นเอด้วยวิธี Real-time PCR โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Quantifiler™ HP DNA Quantification Kit และอ่านผลด้วยโปรแกรม HID Real-Time PCR Analysis Software นั้นค่าที่ได้จะประกอบไปด้วยค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอส่วน Small Autosomal (SA) target ขนาด 80 bp และ Large Autosomal (LA) target ขนาด 214 bp และค่า Degradation Index (DI) ที่จากการคำนวณอัตราส่วนระหว่างความเข้มข้น Small Autosomal (SA) target ส่วนด้วยความเข้มข้นของ Large Autosomal (LA) target ซึ่งค่าที่ได้จากการคำนวณสามารถแปลผลได้ 3 แบบ คือ หากค่า $DI < 1$ บ่งบอกว่าดีเอ็นเอไม่มีการเสื่อมสภาพหรือถูกยับยั้งของกระบวนการ PCR และหากค่า DI อยู่ในช่วง 1 ถึง 10 บ่งบอกว่าดีเอ็นเอมีการเสื่อมสภาพเล็กน้อยถึงปานกลางและกระบวนการ PCR

มีความเป็นไปได้ที่จะถูกยับยั้ง สุดท้ายหากค่า $DI > 10$ หรือไม่แสดงค่า บ่งบอกว่าดีเอ็นเอเกิดการเสื่อมสภาพอย่างมีนัยสำคัญและกระบวนการ PCR มีความเป็นไปได้ที่จะถูกยับยั้ง

โดยงานวิจัยนี้ได้ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของความเข้มข้นดีเอ็นเอและค่า Degradation Index (DI) ระหว่างตัวอย่างชิ้นเนื้อแต่ละชนิด ในแต่ละสภาวะที่ใช้ในการทดลอง และจากข้อมูลที่ได้ถูกนำมาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างตัวแปรด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way ANOVA) โดยใช้โปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติสำเร็จรูป IBM SPSS statistics เวอร์ชัน 22

นอกจากนี้ยังทำการตรวจหา PCR inhibitor ในแต่ละตัวอย่างเพื่อเป็นการยืนยันว่าขั้นตอนการวัดปริมาณด้วยวิธี Real-time PCR ไม่ได้ถูกรบกวนด้วย PCR inhibitor แต่อย่างใด โดยทำการคำนวณจากค่า Cycle threshold (CT) ของ IPC target ในแต่ละตัวอย่างลบด้วยค่า Cycle threshold (CT) ของ IPC target ที่ได้จากการทำกราฟดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA standard curve) ดังนั้นหากค่า $IPC \Delta CT$ สูงขึ้นแสดงให้เห็นว่าในตัวอย่างมีการปนเปื้อนของ PCR inhibitor ซึ่งค่าดังกล่าวจะถูกคำนวณอัตโนมัติด้วยโปรแกรม HID Real-Time PCR Analysis Software และจะเกิด Flag แจ้งเตือนในกรณีที่ค่า $IPC \Delta CT$ มีค่าเกินช่วง ± 2 ขึ้นไป (30)

3.4.7.2 การวิเคราะห์ผลการทดลองการเกิด cytosine deamination ก่อนและหลังการซ่อมแซมดีเอ็นเอ

จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Sanger sequencing และอ่านผลลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม SeqScape™ Software v2.7 นี้ งานวิจัยนี้ได้ทำการตรวจหาการเกิด cytosine deamination จากตำแหน่งเบส Cytosine (C) และ Guanine (G) ทุกตำแหน่งบนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่าง FFPE แล้วทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากตัวอย่างเลือดบน FTA card ซึ่งการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์จะอยู่ในรูป Cytosine (C) เปลี่ยนเป็น Thymine (T) หรือ Guanine (G) เปลี่ยนเป็น Adenine (A)

และจากการซ่อมแซมดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์อีกครั้ง ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่าง FFPE และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากตัวอย่างเลือดบน FTA card โดยจะถือว่าการเกิดการซ่อมแซมความเสียหายของดีเอ็นเอเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ก็ต่อเมื่อเบส ณ ตำแหน่งที่เกิด cytosine deamination ถูกเปลี่ยนกลับมาเป็นเบส Cytosine (C) และ Guanine (G) ดังเดิมในตัวอย่างหลังการซ่อมแซมดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลจากการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับตัวอย่างที่ตรึงด้วย 10% Neutral Buffered Formalin

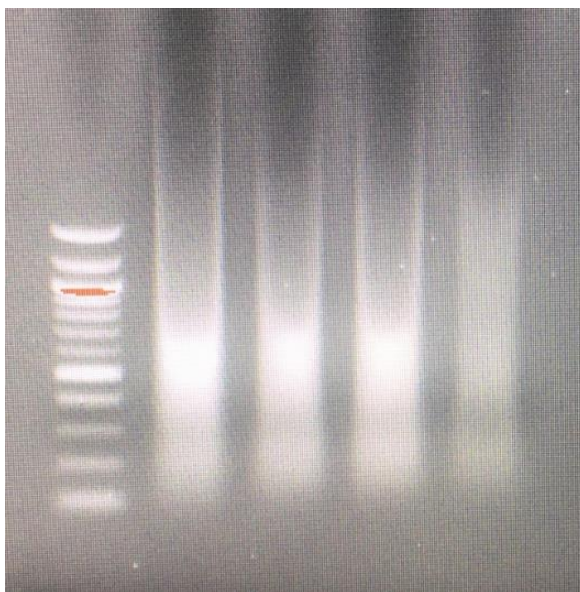
จากการทดลองนำตัวอย่างชิ้นเนื้อตับที่ได้รับภายหลังจากการผ่าชันสูตรมาแช่ใน 10% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง, 48 ชั่วโมง, 72 ชั่วโมง และ 1 สัปดาห์ แล้วสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit โดยกำหนดให้ขนาดของชิ้นเนื้อและจำนวน section ของชิ้นเนื้อเท่ากันในทุกช่วงเวลา แล้วนำมาวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วย Qubit fluorometer พบว่าที่ระยะเวลาที่ใช้ในการแช่ฟอร์มาลินที่ 24 ชั่วโมง มีความเข้มข้นดีเอ็นเอ 36 ng/ μ l ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง มีความเข้มข้นดีเอ็นเอ 28 ng/ μ l ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง มีความเข้มข้นดีเอ็นเอ 23 ng/ μ l และที่ระยะเวลา 1 สัปดาห์ มีความเข้มข้นดีเอ็นเอ 9.4 ng/ μ l ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงค่าความเข้มข้นดีเอ็นเอที่วัดได้จากตัวอย่างชิ้นเนื้อตับที่ตรึงด้วย 10% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง, 48 ชั่วโมง, 72 ชั่วโมง และ 1 สัปดาห์

ระยะเวลาที่ใช้ในการแช่ฟอร์มาลิน	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/ μ l)
24 ชั่วโมง	36
48 ชั่วโมง	28
72 ชั่วโมง	23
1 สัปดาห์	9.4

และจากการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอบน 1% agarose gel ด้วยเทคนิค gel electrophoresis พบว่าตัวอย่างดีเอ็นเอเริ่มเกิดการแตกหักตั้งแต่ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง ไปจนถึง 1 สัปดาห์ โดยปรากฏเป็น smear band บน agarose gel ดังภาพที่ 5 และความเข้มของ band จะเริ่มจางลงตามระยะเวลาในการแช่ฟอร์มาลินที่เพิ่มขึ้น และยังสอดคล้องกับผลการวัดความเข้มข้นดีเอ็นเอด้วย Qubit fluorometer

M 24 hr 48hr 72hr 1 week



ภาพที่ 5 แสดงผลการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอบน 1% agarose gel ในตัวอย่างดับที่ถูกรังด้วย 10% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 24, 48, 72 ชั่วโมง และ 1 สัปดาห์

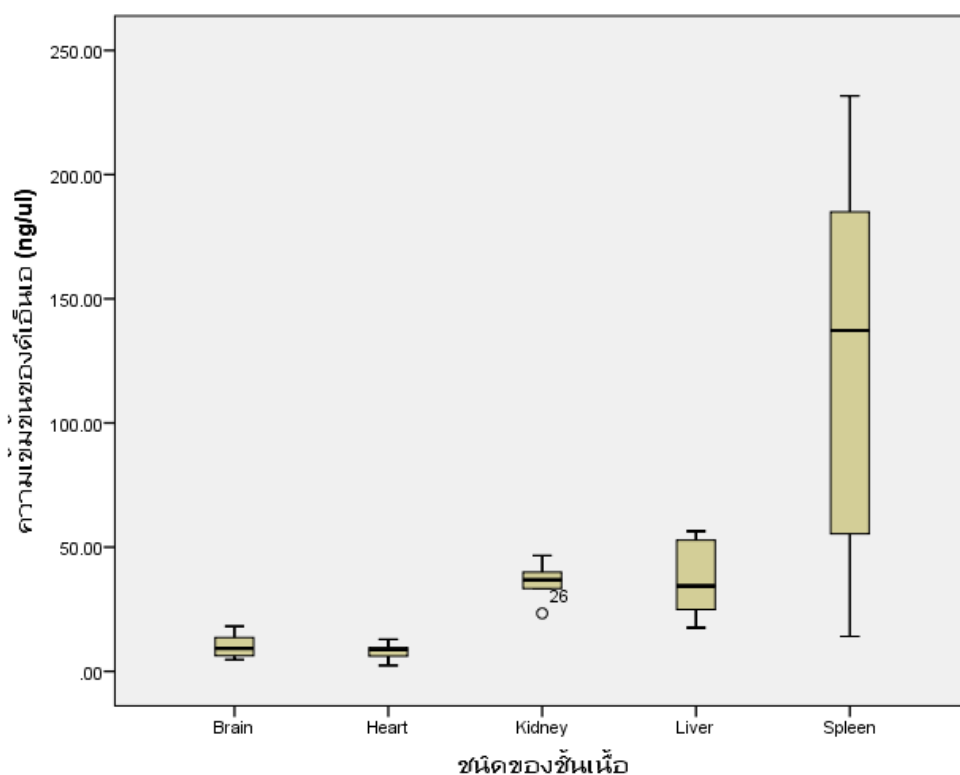
ซึ่งจากผลการทดลองการหาสถานะที่เหมาะสมสำหรับตัวอย่างที่ตรึงด้วย 10% Neutral Buffered Formalin ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน พบว่าตัวอย่างที่แช่ในฟอร์มาลินเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีความเข้มข้นดีเอ็นเอสูงที่สุดเมื่อเทียบกับระยะเวลาอื่นๆ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจนำเอาตัวอย่างในสถานะดังกล่าวมาทำการศึกษาต่อไป อย่างไรก็ตามสามารถตรึงชิ้นเนื้อด้วยฟอร์มาลินได้นานถึง 72 ชั่วโมงแต่ไม่ควรนานถึง 1 สัปดาห์

4.2 ผลการศึกษาในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ตรึงด้วย 10% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.2.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอที่วัดได้ด้วยเทคนิค Real-time PCR ในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ตรึงที่ด้วย 10% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากการสกัดและวัดปริมาณดีเอ็นเอในตัวอย่างเนื้อเยื่อสมอง, หัวใจ, ไต, ตับ และม้าม จากผู้เสียชีวิตจำนวน 10 ราย พบว่าความเข้มข้นดีเอ็นเอจาก Small Autosomal Target ที่มีขนาด 80 bp และ Large Autosomal Target ที่มีขนาด 214 bp มีความหลากหลายระหว่างเนื้อเยื่อแต่ละชนิด โดยที่ Small Autosomal (SA) Target ทำหน้าที่เป็นเป้าหมายหลักที่ใช้ในการบอกปริมาณดีเอ็นเอในจีโนมมนุษย์ทั้งหมด ซึ่งผลจากการวัดปริมาณดีเอ็นเอพบว่าม้ามมีความเข้มข้นดีเอ็นเอเฉลี่ยมากที่สุดคือ 122.19 ± 75.90 ng/ul และแตกต่างจากตัวอย่างอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

รองลงมาคือตัวอย่างตับและไตที่มีความเข้มข้นดีเอ็นเอเฉลี่ย คือ 37.81 ± 14.53 ng/ul และ 36.74 ± 6.67 ng/ul พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) สุดท้ายตัวอย่างสมองและหัวใจเป็นกลุ่มที่มีความเข้มข้นดีเอ็นเอเฉลี่ยน้อยที่สุดและไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) คือ 9.96 ± 4.51 ng/ul และ 7.90 ± 3.25 ng/ul ตามลำดับ ดังภาพที่ 6 และตารางที่ 6



ภาพที่ 6 แสดงค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของดีเอ็นเอในตัวอย่างชิ้นเนื้อแต่ละชนิดที่ตรึงด้วย 10% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (N=10)

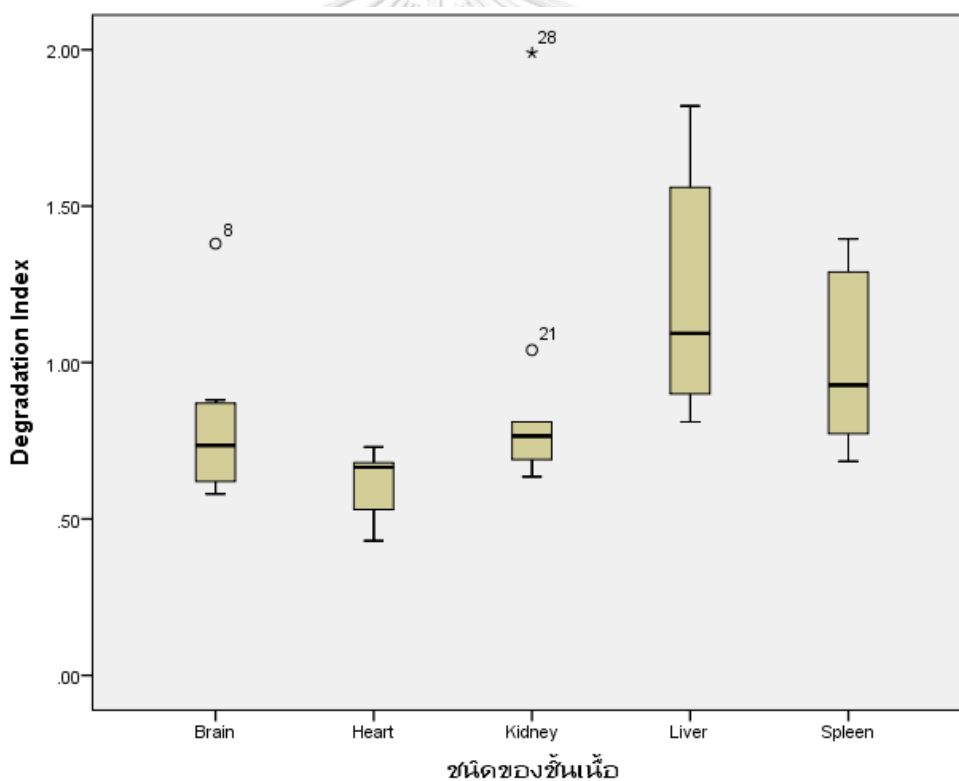
ตารางที่ 6 แสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าความเข้มข้นดีเอ็นเอเฉลี่ยระหว่างชิ้นเนื้อทั้ง 5 ชนิด ที่ตรึงด้วย 10% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(I) ชนิดของชิ้นเนื้อ	(J) ชนิดของชิ้นเนื้อ	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Brain	Heart	2.05948	1.75703	.767	-3.3096	7.4286
	Kidney	-26.78207*	2.54500	.000	-34.5903	-18.9739
	Liver	-27.84992*	4.81026	.001	-43.4781	-12.2217
	Spleen	-112.23958*	24.06536	.008	-193.0394	-31.4398
Heart	Brain	-2.05948	1.75703	.767	-7.4286	3.3096
	Kidney	-28.84155*	2.34489	.000	-36.2213	-21.4618
	Liver	-29.90940*	4.70745	.001	-45.4332	-14.3856
	Spleen	-114.29906*	24.04503	.007	-195.0889	-33.5092
Kidney	Brain	26.78207*	2.54500	.000	18.9739	34.5903
	Heart	28.84155*	2.34489	.000	21.4618	36.2213
	Liver	-1.06785	5.05470	.999	-17.0521	14.9164
	Spleen	-85.45751*	24.11541	.038	-166.2829	-4.6321
Liver	Brain	27.84992*	4.81026	.001	12.2217	43.4781
	Heart	29.90940*	4.70745	.001	14.3856	45.4332
	Kidney	1.06785	5.05470	.999	-14.9164	17.0521
	Spleen	-84.38966*	24.45843	.041	-165.4375	-3.3419
Spleen	Brain	112.23958*	24.06536	.008	31.4398	193.0394
	Heart	114.29906*	24.04503	.007	33.5092	195.0889
	Kidney	85.45751*	24.11541	.038	4.6321	166.2829
	Liver	84.38966*	24.45843	.041	3.3419	165.4375

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

4.2.2 ผลการวิเคราะห์ค่า Degradation Index (DI) ในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ตรึงด้วย 10% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากการคำนวณค่า Degradation Index (DI) ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงระดับความเสียหายของดีเอ็นเอในตัวอย่างที่แช่ใน 10%NBF เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าตัวอย่างตับและม้ามมีค่า DI เฉลี่ยอยู่ที่ 1.208 ± 0.360 และ 1.009 ± 0.272 ตามลำดับ ซึ่งค่าที่ได้อยู่ในช่วง 1 ถึง 10 แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอจากตัวอย่างตับและม้ามเกิดความเสียหายอยู่ในระดับเล็กน้อยถึงปานกลาง ส่วนตัวอย่างไต สมอง และหัวใจที่มีค่า DI เฉลี่ยอยู่ที่ 0.884 ± 0.405 , 0.789 ± 0.233 และ 0.622 ± 0.010 ตามลำดับ (ภาพที่ 7) ซึ่งมีค่าน้อยกว่า 1 แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอจากตัวอย่างชิ้นเนื้อทั้ง 3 ชนิดค่อนข้างมีความสมบูรณ์เมื่อผ่านการแช่ฟอร์มาลินเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทั้งนี้จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าค่า DI ที่ได้จากตัวอย่างตับ, ม้ามและไตไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) (ตารางที่ 7)



ภาพที่ 7 แสดงค่าเฉลี่ย Degradation Index ในตัวอย่างชิ้นเนื้อแต่ละชนิดที่ตรึงด้วย 10% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (N=10)

ตารางที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย Degradation index ระหว่างชิ้นเนื้อทั้ง 5 ชนิด ที่ตรึงด้วย 10% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(I) ชนิดของชิ้นเนื้อ	(J) ชนิดของชิ้นเนื้อ	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Brain	Heart	.16700	.13144	1.000	-.2210	.5550
	Kidney	-.09467	.13144	1.000	-.4827	.2933
	Liver	-.41937*	.13144	.026	-.8074	-.0314
	Spleen	-.21987	.13144	1.000	-.6079	.1681
Heart	Brain	-.16700	.13144	1.000	-.5550	.2210
	Kidney	-.26167	.13144	.526	-.6497	.1263
	Liver	-.58637*	.13144	.001	-.9744	-.1984
	Spleen	-.38687	.13144	.051	-.7749	.0011
Kidney	Brain	.09467	.13144	1.000	-.2933	.4827
	Heart	.26167	.13144	.526	-.1263	.6497
	Liver	-.32470	.13144	.174	-.7127	.0633
	Spleen	-.12520	.13144	1.000	-.5132	.2628
Liver	Brain	.41937*	.13144	.026	.0314	.8074
	Heart	.58637*	.13144	.001	.1984	.9744
	Kidney	.32470	.13144	.174	-.0633	.7127
	Spleen	.19950	.13144	1.000	-.1885	.5875
Spleen	Brain	.21987	.13144	1.000	-.1681	.6079
	Heart	.38687	.13144	.051	-.0011	.7749
	Kidney	.12520	.13144	1.000	-.2628	.5132
	Liver	-.19950	.13144	1.000	-.5875	.1885

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

4.2.3 ผลการวิเคราะห์ PCR inhibitor ในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ตรึงด้วย 10% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากการตรวจหา PCR inhibitor ในแต่ละตัวอย่างแช่ใน 10% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยการคำนวณจากค่า Cycle threshold (CT) ของ IPC target ในแต่ละตัวอย่างลบด้วยค่า Cycle threshold (CT) ของ IPC target ที่ได้จากการทำกราฟตีเอ็นเอมาตรฐาน

หรือในที่นี้เรียกจะเรียกค่าความต่างนี้ว่าค่า IPC Δ CT ซึ่งโปรแกรม HID Real-Time PCR Analysis Software จะเกิด Flag แจ้งเตือนในกรณีที่ค่า IPC Δ CT มากกว่าช่วง ± 2 ขึ้นไป พบว่าค่าเฉลี่ย IPC Δ CT จากตัวอย่างสมอง, หัวใจ, ไต, ตับ และม้ามที่แช่ใน 10% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีค่า 0.7754 ± 0.4457 , 0.5906 ± 0.5928 , 0.7790 ± 0.6575 , 0.2792 ± 0.5247 และ 0.6531 ± 0.4294 ตามลำดับ ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงค่าเฉลี่ย IPC Δ CT ในตัวอย่างชิ้นเนื้อแต่ละชนิดที่ตรึงด้วย 10% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ชนิดของชิ้นเนื้อ	ค่าเฉลี่ย IPC Δ CT	ค่า Standard Deviation
สมอง	0.7754	0.4457
หัวใจ	0.5906	0.5928
ไต	0.7790	0.6575
ตับ	0.2792	0.5247
ม้าม	0.6531	0.4294

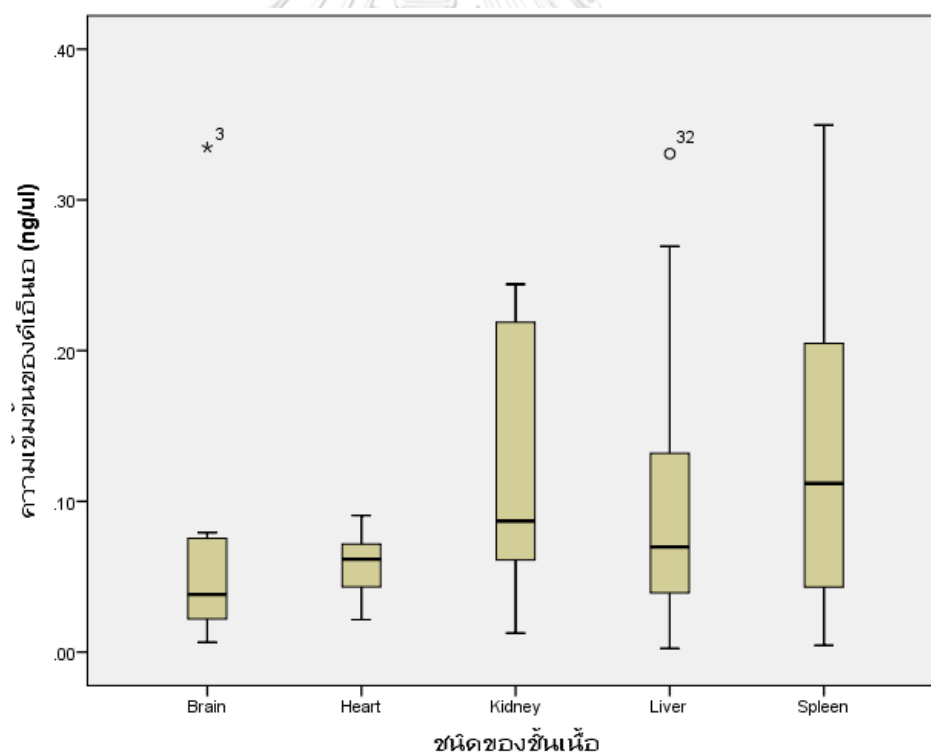
4.2.4 ผลจากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนตำแหน่ง HVI ใน Mitochondrial DNA จากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ตรึงด้วย 10% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากการนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างชิ้นเนื้อทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ สมอง หัวใจ ไต ตับ และม้าม จากจำนวนผู้เสียชีวิตทั้งหมด 10 ราย มาทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณตำแหน่ง Hypervariable I (HVI) บนไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอเพื่อตรวจหาความเสียหายของดีเอ็นเอที่เกิดจาก Cytosine Deamination พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างที่แช่ใน 10% NBF เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถเพิ่มจำนวน Mitochondrial DNA บริเวณ Hypervariable I (HVI) ด้วยไพรเมอร์ขนาด 445 bp ได้ในทุกตัวอย่างและจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยังไม่พบการเกิด Cytosine Deamination

4.3 ผลการศึกษาตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ตรึงด้วย 20% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 1 เดือน

4.3.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอที่วัดได้ด้วยเทคนิค Real-time PCR ในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ตรึงด้วย 20% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 1 เดือน

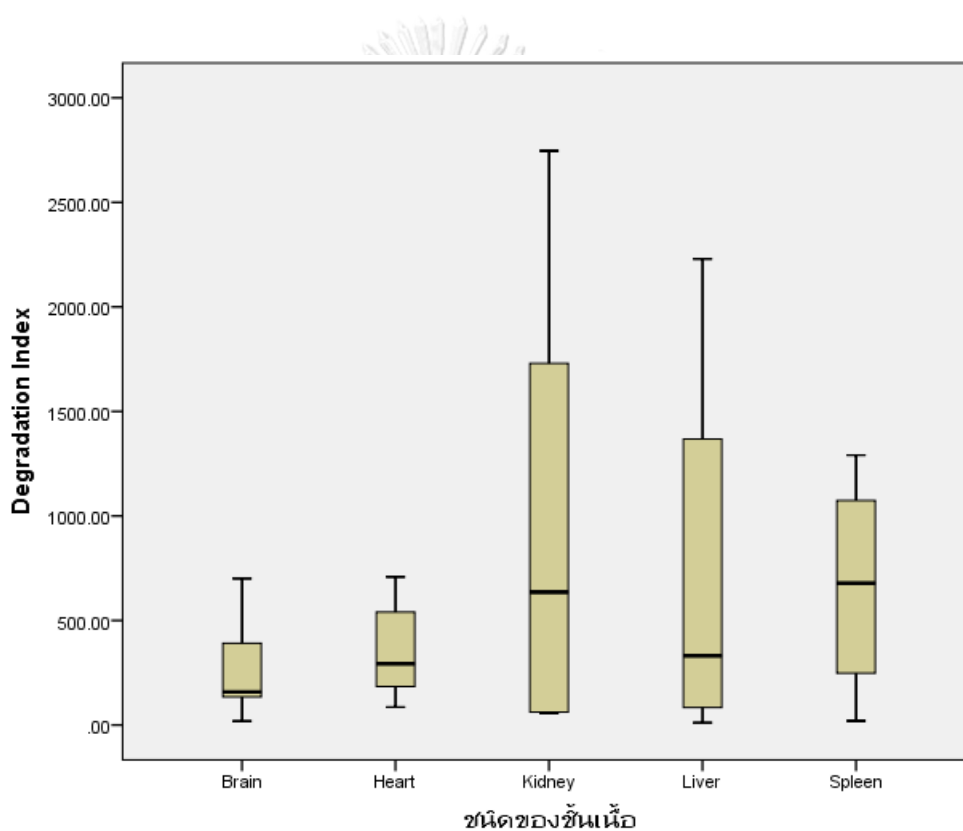
นอกจากนี้เมื่อวัดปริมาณดีเอ็นเอในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ถูกแช่ที่ 20% Neutral Buffered Formalin พบว่าปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ลดลงอย่างมาก โดยตัวอย่างส่วนใหญ่ไม่สามารถวัดปริมาณดีเอ็นเอส่วนที่เป็น Large autosomal target ขนาด 214 bp ได้เนื่องจากมีปริมาณน้อยกว่า 0.005 ng/ul ซึ่งเกินขีดจำกัดที่ชุดวัดปริมาณดีเอ็นเอสามารถวัดได้ ดังนั้นค่าที่วัดได้ส่วนใหญ่จึงมาจากการทำนายจากกราฟมาตรฐาน (Standard curve) อย่างไรก็ตามยังสามารถวัดความเข้มข้นดีเอ็นเอได้จากส่วน Small autosomal target ที่มีขนาด 80 bp ซึ่งพบว่าปริมาณความเข้มข้นดีเอ็นเอเฉลี่ยของสมอง, หัวใจ, ไต, ตับ และม้ามอยู่ที่ 0.070 ± 0.961 , 0.057 ± 0.020 , 0.115 ± 0.087 , 0.109 ± 0.110 และ 0.128 ± 0.105 ng/ul ตามลำดับ (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 แสดงค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของดีเอ็นเอในตัวอย่างชิ้นเนื้อแต่ละชนิดที่ตรึงด้วย 20% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 1 เดือน (N=10)

4.3.2 ผลการวิเคราะห์ค่า Degradation Index (DI) ในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ตรึงด้วย 20% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 1 เดือน

ส่วนตัวอย่างที่แช่ใน 20%NBF พบว่าค่า DI ที่ได้มีความหลากหลายในตัวอย่างแต่ละชนิดส่งผลให้ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานค่อนข้างสูง โดยค่า DI เฉลี่ยตัวอย่างสมอง, หัวใจ, ไต, ตับ และม้าม คือ 275.84 ± 261.06 , 353.55 ± 230.72 , 977.72 ± 1119.02 , 725.91 ± 1023.64 และ 661.92 ± 504.32 (ภาพที่ 9) ซึ่งค่า DI เฉลี่ยในตัวอย่างทั้งหมดที่สามารถคำนวณได้มีค่ามากกว่า 10 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างดีเอ็นเอเกิดความเสียหายอย่างชัดเจน และจากการทดสอบทางสถิติพบว่าค่า DI เฉลี่ยในตัวอย่างแต่ละชนิดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)



ภาพที่ 9 แสดงค่าเฉลี่ย Degradation Index ในตัวอย่างชิ้นเนื้อแต่ละชนิดที่ตรึงด้วย 20% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 1 เดือน (N=10)

4.3.3 ผลการวิเคราะห์ PCR inhibitor ในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ตรึงด้วย 20% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 1 เดือน

จากการตรวจหา PCR inhibitor ในแต่ละตัวอย่างแช่ใน 20% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 1 เดือน โดยการคำนวณจากค่า Cycle threshold (CT) ของ IPC target ในแต่ละตัวอย่าง

ลบด้วยค่า Cycle threshold (CT) ของ IPC target ที่ได้จากการทำกราฟดีเอ็นเอมาตรฐาน หรือค่า IPC Δ CT พบว่าค่าเฉลี่ย IPC Δ CT จากตัวอย่างสมอง, หัวใจ, ไต, ตับ และม้ามที่แช่ใน 20% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 1 เดือน มีค่า -0.7814 ± 0.2267 , -0.8675 ± 0.1678 , -0.9550 ± 0.2489 , -0.9899 ± 0.1893 และ -0.9467 ± 0.2847 ตามลำดับ ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงค่าเฉลี่ย IPC Δ CT ในตัวอย่างชิ้นเนื้อแต่ละชนิดที่ตรึงด้วย 20% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 1 เดือน

ชนิดของชิ้นเนื้อ	ค่าเฉลี่ย IPC Δ CT	ค่า Standard Deviation
สมอง	-0.7814	0.2267
หัวใจ	-0.8675	0.1678
ไต	-0.9550	0.2489
ตับ	-0.9899	0.1893
ม้าม	-0.9467	0.2847

4.3.4 ผลจากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนตำแหน่ง HVI ใน Mitochondrial DNA จากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ตรึงด้วย 20% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 1 เดือน

จากตัวอย่างทั้งหมด 50 ตัวอย่าง ที่ได้จากชิ้นเนื้อทั้งหมด 5 ชนิด คือ สมอง หัวใจ ไต ตับ และม้าม จากผู้เสียชีวิตจำนวน 10 ราย ซึ่งถูกแช่อยู่ใน 20% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 1 เดือน พบว่ามีตัวอย่าง 11 ตัวอย่างที่สามารถเพิ่มจำนวนไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง HVI ได้ โดย 10 ตัวอย่างสามารถเพิ่มจำนวนได้ด้วยไพรเมอร์ HV1b และ 1 ตัวอย่าง สามารถเพิ่มจำนวนได้ด้วยไพรเมอร์ HV1a ดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงจำนวนตัวอย่างที่สามารถเพิ่มจำนวนได้ด้วยไพรเมอร์ HV1a/HV1b

ประเภทของชิ้นเนื้อ	HVI POSITION (341 bp : 16024-16365)	
	HV1a (287 bp: 15971-16258)	HV1b (270 bp: 16140-16414)
สมอง (N=10)	-	3
หัวใจ (N=10)	-	3
ไต (N=10)	1	2
ตับ (N=10)	-	2
ม้าม (N=10)	-	-
รวม	1	10

เมื่อนำมาทำการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ามีเพียง 5 ตัวอย่างจากผู้เสียชีวิตจำนวน 4 ราย ที่สามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ โดยแบ่งเป็นตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากไต 2 ตัวอย่าง สมอง 2 ตัวอย่าง และหัวใจ 1 ตัวอย่าง ในขณะที่ตัวอย่างอื่นๆไม่สามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ เนื่องจากปริมาณ PCR product ไม่เพียงพอต่อการตรวจวิเคราะห์ และจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ามีตำแหน่งที่เกิด Damaged bases ทั้งหมด 27 ตำแหน่ง และสามารถแบ่ง Substitution type ออกได้เป็น 2 แบบ คือ การเกิด cytosine deamination (C→T หรือ G→A) จำนวน 14 ตำแหน่ง คิดเป็นร้อยละ 51.85 และการเกิด transition ในรูปแบบอื่นๆ (T→C หรือ A→G) จำนวน 13 ตำแหน่ง คิดเป็นร้อยละ 48.15 ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 แสดงการจำแนกรูปแบบความเสียหายของเบสตามแต่ละประเภทของชิ้นเนื้อที่ตรึงด้วย 20% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 1 เดือน (N=5)

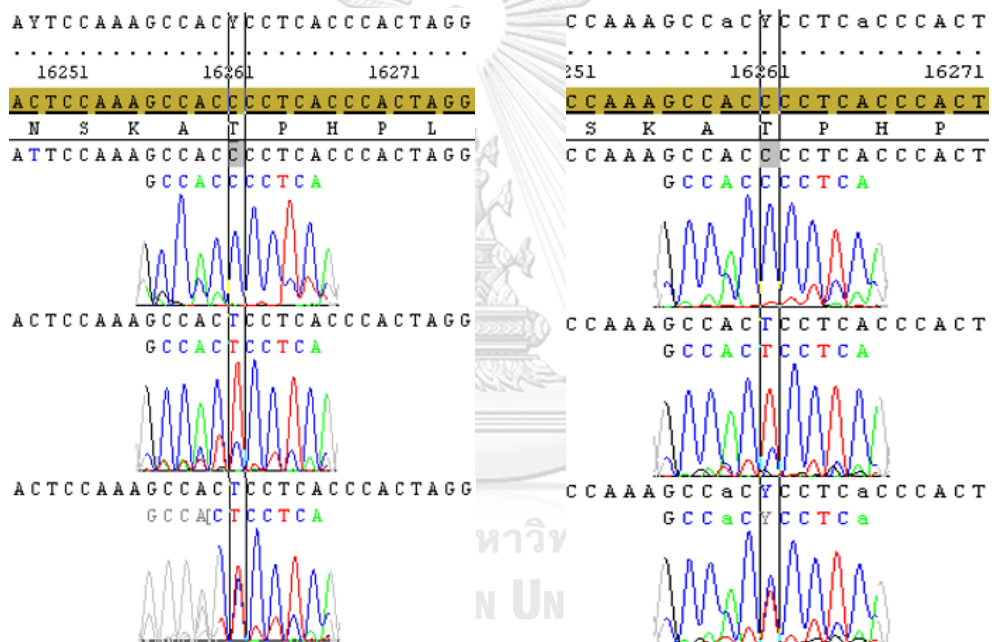
ตัวอย่าง	C→T หรือ G→A	T→C หรือ A→G
สมอง (n=2)	5	7
หัวใจ (n=1)	5	2
ไต (n=2)	4	4
รวม	14 (51.85%)	13 (48.15%)

และจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้ทั้งหมด 27 ตำแหน่งดังกล่าว พบว่ามีบางตำแหน่งบน HVI ที่พบการเกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสได้บ่อยทั้งการเกิด cytosine deamination และ transition รูปแบบอื่นๆ ดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 แสดงจำนวนและตำแหน่งเบสที่ตรวจพบความเสียหายบริเวณ HVI บนเมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ

No.	Sample ID	Sample type	Amplified region	Damaged bases	Damaged sites																		
					16108	16162	16189	16217	16223	16234	16260	16274	16290	16291	16297	16298	16300	16335	16355				
1	R5-p	Reference sample	16140-16414	-	N/A	N/A	C	T	T	T	C	C	G	C	C	C	C	C	T	G	A	C	
	H5-p	FFPE heart tissue	16140-16414	7	N/A	N/A	T	T	T	C	C	C	G	C	C	C	T	C	A	A	A	A	T
2	R12	Reference sample	15971-16258	-	T	G	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	K12	FFPE kidney tissue	15971-16258	2	C	A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
3	R13	Reference sample	16140-16414	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	T	T	T	G	T	C	C	C	T	A	A	A	A	C
	B13	FFPE brain tissue	16140-16414	6	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	C	C	C	G	C	C	C	C	C	A	A	A	A	T
4	R15	Reference sample	16140-16414	-	N/A	N/A	N/A	C	C	C	C	A	C	C	T	T	T	T	A	A	G	N/A	N/A
	B15	FFPE brain tissue	16140-16414	6	N/A	N/A	N/A	T	C	C	C	G	C	C	C	C	C	C	A	A	A	A	N/A
	K15	FFPE kidney tissue	16140-16414	6	N/A	N/A	N/A	T	C	C	C	G	C	C	C	C	C	C	A	A	A	A	N/A

เมื่อทำการซ่อมแซมดีเอ็นเอด้วย NEBNext® FFPE DNA Repair kit ในตัวอย่างที่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 5 ตัวอย่าง พบว่ามีตัวอย่างที่สามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์หลังผ่านกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอได้ 4 ตัวอย่าง คือ H5-p, B13, B15 และ K15 โดยชุดซ่อมแซมดีเอ็นเอสามารถซ่อมแซมดีเอ็นเอที่เสียหายได้เพียง 2 ตำแหน่งเท่านั้น คือตำแหน่ง 16260 จากตัวอย่างหัวใจ (H5-p) และสมอง (B13) แต่ยังไม่สามารถเปลี่ยนเบสที่เกิดความเสียหายนั้นกลับคืนมาเป็นเบสเดิมได้อย่างสมบูรณ์จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี sanger sequencing ส่งผลให้ Electropherogram ณ ตำแหน่งที่เกิดความเสียหายเกิดเป็นพีค 2 พีคซ้อนกัน ระหว่างพีคของเบสเดิมและพีคของเบสที่เกิดการเปลี่ยนแปลงไปในระดับความสูงของพีคที่ใกล้เคียงกัน ดังภาพที่ 10



(a) ตำแหน่ง 16260 (ตัวอย่างหัวใจ)

(b) ตำแหน่ง 16260 (ตัวอย่างสมอง)

ภาพที่ 10 แสดงตัวอย่างการเกิด Cytosine deamination บริเวณ Hypervariable I บนตำแหน่ง 16260 จากตัวอย่างหัวใจ (a) และตัวอย่างสมอง (b) ที่ผ่านการตรึงด้วย 20%NBF เป็นเวลา 1 เดือน

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

5.1 ผลจากการสกัดและวัดปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่าง FFPE

จากผลการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่าง FFPE พบว่ามีปัจจัยหลายประการที่ส่งผลต่อปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ไม่ว่าจะเป็นประเภทของชิ้นเนื้อที่ได้รับ ความเข้มข้นและระยะเวลาในการตรึงฟอร์มาลิน

5.1.1 ปริมาณดีเอ็นเอและค่า Degradation Index (DI) ในตัวอย่างแต่ละชนิด

ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่วัดได้มีความหลากหลายในชิ้นเนื้อแต่ละชนิด โดยพบว่าม้ามมีค่าความเข้มข้นดีเอ็นเอเฉลี่ยสูงที่สุดเมื่อเทียบกับชิ้นเนื้อประเภทอื่นจากทั้งสองสถานะที่ทำการทดลอง ทั้งนี้คาดว่ามาจากความหนาแน่นของเซลล์ที่แตกต่างกันในแต่ละอวัยวะ จึงส่งผลให้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความแตกต่างกัน (15) ซึ่งภายในม้ามประกอบไปด้วยเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์เม็ดเลือดขาวอยู่เป็นจำนวนมาก (50) ส่งผลให้มีความหนาแน่นของเซลล์สูงและสามารถสกัดดีเอ็นเอได้ในปริมาณมากเมื่อเทียบกับอวัยวะอื่นที่มีขนาดพื้นที่ผิวเท่ากัน

เมื่อวิเคราะห์ค่า Degradation Index (DI) ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงระดับความเสียหายของดีเอ็นเอที่เกิดจากการคำนวณอัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นของ Small Autosomal target และ Large Autosomal target พบว่าในตัวอย่างตับที่แช่ใน 10%NBF เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เป็นเพียงตัวอย่างเดียวที่มีค่า DI เฉลี่ยมากกว่า 1 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอเริ่มมีการเสียหายเล็กน้อย โดยคาดว่า เป็นผลมาจากการเกิด Autolysis หรือการสลายตัวของเซลล์ภายในตัวอย่าง โดยอัตราการเกิด Autolysis ในแต่ละอวัยวะภายในร่างกายนั้นจะแตกต่างกันไปตามองค์ประกอบและการทำงานของเอนไซม์ที่อยู่ภายในอวัยวะชนิดนั้นๆ กล่าวคือภายในตับมี Catabolic enzyme อยู่ในปริมาณมากจึงมีแนวโน้มที่จะเกิดการ Autolysis ได้เร็วกว่าในอวัยวะที่มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นกล้ามเนื้อ อย่างเช่นหัวใจ ดังนั้นจึงทำให้หัวใจมีแนวโน้มที่จะมีการเสื่อมสลายที่ช้ากว่า (51)

นอกจากนี้สังเกตเห็นว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากหัวใจและสมองซึ่งเป็นอวัยวะที่มาจากบริเวณช่องอก (Thoracic cavity) และส่วนกะโหลกศีรษะ (Cranial vault) มีค่า DI เฉลี่ยน้อยกว่าค่าที่ได้จากอวัยวะที่อยู่ในช่องท้อง (Abdominal cavity) อย่างเช่น ไต, ตับ และม้าม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากอวัยวะส่วนช่องอกและศีรษะมีคุณภาพดีเอ็นเอที่ดี โดยคาดว่า เป็นผลมาจากการเกิด Putrefaction ซึ่งมักจะเกิดในช่องท้องเป็นลำดับแรก จึงทำให้อวัยวะในส่วนนี้เกิดการเน่าภายหลังการเสียชีวิตได้รวดเร็วเนื่องจากจุลชีพที่อยู่ในช่องได้ทำการย่อยสลายสารชีวโมเลกุลที่มีโครงสร้างซับซ้อนต่างๆภายในร่างกายให้เปลี่ยนไปอยู่ในรูปของแก๊ส ของเหลวและสารโมเลกุลขนาดเล็ก (51,

52) จึงเป็นสาเหตุให้ตีเอ็นเอจากอวัยวะบริเวณช่องท้องมีโอกาสเกิดการแตกหักได้มากกว่าบริเวณช่องอกและศีรษะ

5.1.2 ปริมาณตีเอ็นเอและค่า Degradation Index (DI) ในสถานะที่ความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่ฟอร์มาลินแตกต่างกัน

เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณตีเอ็นเอที่สกัดได้จากทั้ง 2 สถานะ คือ 10% Neutral Buffered Formalin ระยะเวลา 24 ชั่วโมง และ 20% Neutral Buffered Formalin ระยะเวลา 1 เดือน พบว่าปริมาณตีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่าง 10% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มากกว่าปริมาณตีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่าง 20% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 1 เดือน นอกจากนี้ตัวอย่าง 20% Neutral Buffered Formalin พบว่ามีค่า DI มากกว่า 10 ซึ่งแปลผลได้ว่าตัวอย่างตีเอ็นเอที่สกัดได้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรง โดยตีเอ็นเอสายยาวเกิดการแตกหักออกเป็นตีเอ็นเอสายสั้นเพิ่มมากขึ้นซึ่งเป็นผลมาจากการแช่ฟอร์มาลินที่ความเข้มข้นสูงเป็นเวลานาน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Amemiya และคณะ (10) พบว่าตีเอ็นเอจะเกิดการแตกหักเพิ่มขึ้นเมื่อตัวอย่างถูกแช่ในฟอร์มาลินมากกว่า 7 วัน และความเข้มข้นของฟอร์มาลินต่ำมีความสามารถในการรักษาความสมบูรณ์ของชิ้นส่วนตีเอ็นเอได้ดี

5.1.3 การตรวจหา PCR inhibitor ในตัวอย่างและการเพิ่มจำนวนตีเอ็นเอบริเวณ HVI บนไมโทคอนเดรียลตีเอ็นเอ

จากการตรวจหา PCR inhibitor โดยการคำนวณค่า $IPC \Delta CT$ ที่เกิดจากการนำค่า $IPC CT$ ของแต่ละตัวอย่างลบด้วยค่าเฉลี่ย $IPC CT$ ของกราฟมาตรฐาน โดยในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่แช่ใน 10% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าไม่มีการปนเปื้อนของ PCR inhibitor ในทุกๆตัวอย่าง โดยค่า $IPC \Delta CT$ ที่คำนวณได้อยู่ในช่วง 0.2792 - 0.7790 ซึ่งค่าความแตกต่างที่ได้ไม่เกินช่วง ± 2 ซึ่งเป็นค่า threshold ที่โปรแกรม HID Real-Time PCR Analysis Software กำหนดไว้ในกรณีที่ค่า $IPC \Delta CT$ มากเกินไป แสดงให้เห็นว่า $IPC target$ สามารถเพิ่มจำนวนไปพร้อมกับ $target$ อื่นๆ ในตัวอย่างได้และไม่ถูกยับยั้งการเพิ่มจำนวนด้วย PCR inhibitor และพบว่าตัวอย่างทั้งหมดที่ผ่านการวัดปริมาณตีเอ็นเอและตรวจหา PCR inhibitor สามารถเพิ่มจำนวนตีเอ็นเอบริเวณ HVI บนไมโทคอนเดรียลตีเอ็นเอได้ทุกตัวอย่าง

เช่นเดียวกันกับการตรวจหา PCR inhibitor ในตัวอย่างชิ้นเนื้อเยื่อที่ตรึงด้วย 20% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 1 เดือน ที่ไม่พบการปนเปื้อนของ PCR inhibitor ในทุกๆตัวอย่าง โดยค่า $IPC \Delta CT$ ที่คำนวณได้อยู่ในช่วง -0.7814 ถึง -0.9899 ซึ่งค่าความแตกต่างที่ได้ไม่เกินช่วง ± 2 ซึ่งเป็นค่า threshold ที่โปรแกรม HID Real-Time PCR Analysis Software กำหนดไว้ และเมื่อวิเคราะห์ร่วมกับผลการเพิ่มจำนวนตีเอ็นเอจาก Small autosomal target และ Large autosomal target ซึ่งในสถานะนี้พบว่าหลายตัวอย่างไม่สามารถวัดการเพิ่มจำนวนของ Large autosomal

target ได้ แต่อย่างไรก็ตาม IPC target ในตัวอย่างเหล่านี้ยังสามารถเพิ่มจำนวนและแสดงค่า IPC CT ในทุกๆตัวอย่างได้ ซึ่งค่า IPC CT ที่ได้ไม่นับสูงขึ้นเมื่อเทียบกับค่า IPC CT เฉลี่ยจากการทำกราฟมาตรฐาน แสดงให้เห็นว่า IPC target ยังสามารถเพิ่มจำนวนไปพร้อมกับ target อื่นๆ และไม่ถูกยับยั้งการเพิ่มจำนวนด้วย PCR inhibitor แต่อย่างใด ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันความถูกต้องของที่ผลได้จาก การวัดปริมาณดีเอ็นเอในตัวอย่างว่าไม่ได้รับผลกระทบจาก PCR inhibitor อย่างแท้จริง

5.2 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง HVI บนไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอจากตัวอย่างเนื้อเยื่อที่แช่ใน 10% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไม่พบการเกิด cytosine deamination ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าของ Prentice และคณะ (53) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ของการเกิด cytosine deamination กับระยะเวลาการตรึงฟอร์มาลินที่ 2, 15, 24 และ 48 ชั่วโมง โดยพบการเกิด cytosine deamination เพิ่มขึ้นในตัวอย่างที่ผ่านการตรึงฟอร์มาลินเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แม้ว่าจะมีการใช้เอนไซม์ UNG เพื่อลดการเกิด artifact ได้ แต่งานวิจัยดังกล่าวได้แนะนำให้ใช้ตัวอย่างที่ผ่านการแช่ฟอร์มาลินในระยะเวลา 24 ชั่วโมงหรือน้อยกว่านั้น เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์มากขึ้น พบการเกิด cytosine deamination น้อยลง และลดขั้นตอนในการซ่อมแซมดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ดังกล่าว

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่แช่ใน 20% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าสามารถตรวจพบการเกิด Cytosine Deamination ในตัวอย่างซึ่งแสดงให้เห็นว่าระยะเวลาและความเข้มข้นของฟอร์มาลินมีผลต่อการเกิดกระบวนการ Cytosine Deamination ในดีเอ็นเอ (10) และเมื่อทำการซ่อมแซมความเสียหายของดีเอ็นเอด้วยชุด NEBNext® FFPE DNA Repair kit พบว่าชุดซ่อมแซมดีเอ็นเอดังกล่าวสามารถซ่อมแซมดีเอ็นเอที่เสียหายจาก cytosine deamination ในตัวอย่างได้ แต่ยังไม่สามารถเปลี่ยนเบสในตำแหน่งดังกล่าวให้กลับมาเป็นเบสเดิมได้อย่างสมบูรณ์ และจากการซ่อมแซมดีเอ็นเอในตัวอย่างที่มีดีเอ็นเอต้นแบบในปริมาณน้อยและมีความเสียหายสูงนั้นส่งผลให้การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ภายหลังการซ่อมแซมดีเอ็นเอมีโอกาสไม่ประสบความสำเร็จ เนื่องจากขั้นตอนการซ่อมแซมดีเอ็นเอเป็นขั้นตอนที่จะต้องทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ซึ่งการ Cleanup ดีเอ็นเอด้วยการใช้ AMPure XP Beads ในขั้นตอนการซ่อมแซมดีเอ็นเอที่ bead มีความจำเพาะต่อดีเอ็นเอขนาด 100 bp ขึ้นไป (54) ทำให้มีโอกาสที่ bead จะไม่จับกับดีเอ็นเอต้นแบบเนื่องจากและทำให้เราสูญเสียดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มจำนวนได้ในระหว่างขั้นตอนนี้

นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังพบการเกิด artifact ในรูปแบบ A>G หรือ T>C ในอัตราที่ใกล้เคียงกับการเกิด C>T หรือ G>A ซึ่งหลายงานวิจัยที่พบการเกิด artifact ในรูปแบบนี้ได้ระบุว่าคุณภาพเสียหายในรูปแบบนี้อาจเกิดจากเบส Adenine เกิดการ deamination แล้วเปลี่ยนเป็น

hypoxanthine (HX) ซึ่งคล้ายกับ Guanine ทำให้เมื่อมีการเพิ่มจำนวนบริเวณดังกล่าวจึงเป็นการเพิ่ม artifact ในรูปแบบ A>G หรือ T>C ในตัวอย่าง (55-57)

และจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถวิเคราะห์ได้จะสังเกตเห็นว่ามีบางตำแหน่งที่พบการเกิดการเปลี่ยนแปลงเบสได้บ่อย ซึ่งหากอ้างอิงจากงานวิจัยของ Gilbert และคณะ (58) ที่ทำการศึกษาเกี่ยวกับรูปแบบการเกิด postmortem damage ภายในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของมนุษย์ โดยผู้วิจัยได้ตั้งสมมุติฐานว่าตำแหน่งที่เกิด postmortem damage ภายในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอจะเกิดแบบสุ่มทั่วบริเวณ HVI และ COIII โดยรูปแบบความเสียหายที่ Gilbert และคณะตรวจหาก็คือการเกิด cytosine deamination และจากผลการวิจัยพบว่าการเกิด postmortem damage ไม่ได้เกิดขึ้นแบบกระจายอย่างสุ่มทั่วบริเวณ HVI หรือ COIII และจากงานวิจัยในครั้งนี้นับตำแหน่งที่เกิด postmortem damage เหมือนกับงานวิจัยของ Gilbert อยู่ 4 ตำแหน่ง คือ 16189, 16223, 16290 และ 16298 แต่มีเพียงตำแหน่งเดียวที่พบการเกิด cytosine deamination เหมือนกันคือตำแหน่ง 16189 นอกจากนี้ยังพบตำแหน่งที่เกิด cytosine deamination แตกต่างจากงานวิจัยของ Gilbert อยู่ 1 ตำแหน่ง ก็คือ 16260 ดังนั้นในอนาคตหากทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอจากตัวอย่าง FFPE ควรพิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งดังกล่าวด้วยความระมัดระวังเนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์มีโอกาสที่จะเกิดการเปลี่ยนแปลงไปจากตัวอย่างอ้างอิงได้บ่อยอันเป็นผลมาจาก Cytosine deamination

สรุปผลการทดลอง

จากผลการวิจัยในครั้งนี้นำแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างชิ้นเนื้อแต่ละชนิดมีความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับองค์ประกอบต่างๆภายในอวัยวะ รวมทั้งอัตราการเน่าสลายหลังจากเสียชีวิตภายในตัวอย่างมีส่วนทำให้ปริมาณดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันอีกด้วย นอกจากนี้ยังเห็นได้ว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่แช่ใน 10% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เกิดความเสียหายเพียงเล็กน้อยถึงปานกลางเท่านั้น และยังไม่พบการเกิด cytosine deamination ที่เกิดจากการแช่ฟอร์มาลินในสภาวะดังกล่าว ดังนั้นตัวอย่างชิ้นเนื้อที่แช่ใน 10% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงเป็นตัวอย่างที่เหมาะสมในการนำมาประยุกต์ใช้กับงานทางนิติพันธุศาสตร์นอกเหนือจากการศึกษาทางพยาธิวิทยา เนื่องจากดีเอ็นเอเกิดการแตกหักเพียงเล็กน้อยและไม่พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในดีเอ็นเอที่สามารถส่งผลกระทบต่อการวิเคราะห์ในกระบวนการ downstream ในทางกลับกันเมื่อศึกษาในตัวอย่างที่แช่ใน 20% Neutral Buffered Formalin เป็นเวลา 1 เดือน จะเห็นได้ว่าดีเอ็นเอเกิดความเสียหายมากขึ้น ดีเอ็นเอสายยาวเกิดการแตกหักเป็นสายสั้นทำให้โอกาสในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในบริเวณที่ต้องการศึกษาลดลง และมี

โอกาสพบการเกิด cytosine deamination บนสายดีเอ็นเอ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นและระยะเวลาที่ใช้ในการแช่ฟอร์มาลินมีผลต่อความเสียหายที่เกิดขึ้นภายในดีเอ็นเอ ดังนั้นหากจำเป็นจะต้องทำการวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างในสภาวะดังกล่าว ทางห้องปฏิบัติการจะต้องมีการจัดการรับมือกับความเสียหายของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น โดยผู้วิจัยหวังว่าผลจากงานวิจัยในครั้งนี้จะสามารถเป็นแนวทางในการประเมินคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอเบื้องต้นเพื่อเป็นประโยชน์สำหรับหลายๆห้องปฏิบัติการที่ยังคงใช้สภาวะดังกล่าวในการแช่ชิ้นเนื้อ รวมไปถึงหน่วยนิติเวชโรวิทยา ภาควิชานิติเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เช่นเดียวกัน และจากงานวิจัยครั้งนี้พบว่าตัวอย่างสมอง หัวใจ และไต เป็นกลุ่มตัวอย่างที่น่าสนใจหากจะนำไปศึกษาต่อในอนาคต เนื่องจากสมองและหัวใจเป็นอวัยวะที่มาจากบริเวณกะโหลกศีรษะและช่องอกจึงมีคุณภาพของดีเอ็นเอค่อนข้างสมบูรณ์ รวมไปถึงตัวอย่างไตที่แม้ว่าจะเป็นอวัยวะที่มาจากส่วนช่องท้องก็ตามแต่ก็ได้มีงานวิจัยก่อนหน้านี้แนะนำให้นำมาใช้ในการศึกษาเช่นเดียวกัน (59) และผลจากการซ่อมแซมดีเอ็นเอพบว่าชุดซ่อมแซมดีเอ็นเอสามารถช่วยลดการเกิด cytosine deamination ได้แต่ยังไม่สามารถเปลี่ยนเบสที่เสียหายให้กลับมาเป็นเบสเดิมอย่างสมบูรณ์ได้ ดังนั้นงานวิจัยในอนาคตจะต้องมีการปรับปรุงขั้นตอนการซ่อมแซมดีเอ็นเอดังกล่าวเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการซ่อมแซมดีเอ็นเอที่เกิดความเสียหายมากขึ้น และสามารถนำเอาดีเอ็นเอที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในงานทางนิติพันธุศาสตร์ได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. งานวิจัยนี้ได้ตั้งข้อสังเกตและข้อควรระวังเกี่ยวกับวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างชิ้นเนื้อด้วยการใช้ silica-bases column ซึ่งก่อให้เกิดปัญหา filter column เกิดการอุดตันทั้งนี้คาดว่าเกิดจากชิ้นเนื้อที่เกิดการ lysis ไม่สมบูรณ์ด้วยการใช้ Proteinase K ซึ่งในงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Miething และคณะ (59) ได้กล่าวถึงปัญหานี้เช่นเดียวกัน ซึ่งการเกิดกระบวนการ lysis ที่ไม่สมบูรณ์นี้ส่งผลให้ชิ้นเนื้อส่วนเกินขัดขวางบริเวณ filter column ทำให้สูญเสียดีเอ็นเอบางส่วนที่ไม่สามารถผ่าน column ไปได้ ดังนั้นขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอควรปรับหรือเปลี่ยนวิธีการสกัดให้เหมาะสมมากขึ้น เช่น การใช้ paramagnetic bead แทนการใช้ filter column เพื่อเป็นการลดการเกิดปัญหาดังกล่าว
2. เนื่องจากดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่าง FFPE ที่แช่ใน 20%NBF เป็นเวลา 1 เดือน เกิดการแตกหักของสายดีเอ็นเอค่อนข้างรุนแรง ดังนั้นหากทำการศึกษาในตัวอย่างจากสภาวะดังกล่าวควรใช้ไพรเมอร์ที่มีขนาดเล็กลงเพื่อเพิ่มโอกาสในการจับกันระหว่างคู่ไพรเมอร์และดีเอ็นเอต้นแบบมากขึ้น

3. จากการซ่อมแซมดีเอ็นเอพบว่าชุดซ่อมแซมดีเอ็นเอยังไม่สามารถซ่อมแซมความเสียหายที่เกิดจาก cytosine deamination ได้อย่างสมบูรณ์ ดังนั้นขั้นตอนดังกล่าวควรมีการปรับเปลี่ยนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของชุดซ่อมแซมดีเอ็นเอให้ดีขึ้น



บรรณานุกรม

1. Skage M, Schander C. DNA from formalin-fixed tissue: extraction or repair? That is the question. *Marine Biology Research*. 2007;3(5):289-95.
2. Bagnall RD, Ingles J, Yeates L, Berkovic SF, Semsarian C. Exome sequencing-based molecular autopsy of formalin-fixed paraffin-embedded tissue after sudden death. *Genet Med*. 2017;19(10):1127-33.
3. Eriksson A. Forensic pathology. In: Freeman M, Zeegers M, editors. *Forensic epidemiology*. Massachusetts: Academic press; 2016. p. 151-77.
4. Ambers A, Turnbough M, Benjamin R, King J, Budowle B. Assessment of the role of DNA repair in damaged forensic samples. *Int J Legal Med*. 2014;128(6):913-21.
5. Gorden EM, Sturk-Andreaggi K, Marshall C. Repair of DNA damage caused by cytosine deamination in mitochondrial DNA of forensic case samples. *Forensic Sci Int Genet*. 2018;34:257-64.
6. Alqaydi M, Roy R. Quantitative and qualitative study of STR DNA from ethanol and formalin fixed tissues. *Forensic Sci Int*. 2016;262:18-29.
7. Eltoun I, Fredenburgh J, Myers RB, Grizzle WE. Introduction to the Theory and Practice of Fixation of Tissues. *Journal of Histotechnology*. 2013;24(3):173-90.
8. Thavarajah R, Mudimbaimannar VK, Elizabeth J, Rao UK, Ranganathan K. Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2012;16(3):400-5.
9. Cecil H, Frank B, John W, P P. Formaldehyde Fixation. *The journal of histochemistry and cytochemistry*. 1985;33(8):845-53.
10. Amemiya K, Hirotsu Y, Oyama T, Omata M. Relationship between formalin reagent and success rate of targeted sequencing analysis using formalin fixed paraffin embedded tissues. *Clin Chim Acta*. 2019;488:129-34.
11. Wheeler A, Czado N, Gangitano D, Turnbough M, Hughes-Stamm S. Comparison of DNA yield and STR success rates from different tissues in embalmed bodies. *International Journal of Legal Medicine*. 2016;131(1):61-6.
12. Funabashi KS, Barcelos D, Visona I, e Silva MS, e Sousa ML, de Franco MF, et al.

DNA extraction and molecular analysis of non-tumoral liver, spleen, and brain from autopsy samples: the effect of formalin fixation and paraffin embedding. *Pathol Res Pract.* 2012;208(10):584-91.

13. Liu Y, Li L, Li C, Zhao Z. Allelic alterations of STRs in archival paraffin embedded tissue as DNA source for paternity testing. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series.* 2009;2(1):12-3.
14. Cao W, Hashibe M, Rao JY, Morgenstern H, Zhang ZF. Comparison of methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissues and buccal cells. *Cancer detection and prevention.* 2003;27(5):397-404.
15. Reid KM, Maistry S, Ramesar R, Heathfield LJ. A review of the optimisation of the use of formalin fixed paraffin embedded tissue for molecular analysis in a forensic post-mortem setting. *Forensic Sci Int.* 2017;280:181-7.
16. Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol.* 2002;161(6):1961-71.
17. Ludyga N, Grünwald B, Azimzadeh O, Englert S, Höfler H, Tapio S, et al. Nucleic acids from long-term preserved FFPE tissues are suitable for downstream analyses. *Virchows Archiv : an international journal of pathology.* 2012;460(2):131-40.
18. Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *The American journal of surgical pathology.* 2000;24(7):1016-9.
19. Lin Y, Gryazeva T, Wang D, Zhou B, Um SY, Eng LS, et al. Using postmortem formalin fixed paraffin-embedded tissues for molecular testing of sudden cardiac death: A cautionary tale of utility and limitations. *Forensic Sci Int.* 2020;308:110177.
20. Paireder S, Werner B, Bailer J, Werther W, Schmid E, Patzak B, et al. Comparison of protocols for DNA extraction from long-term preserved formalin fixed tissues. *Analytical biochemistry.* 2013;439(2):152-60.
21. Do H, Dobrovic A. Sequence artifacts in DNA from formalin-fixed tissues: causes and strategies for minimization. *Clin Chem.* 2015;61(1):64-71.
22. Yun BH, Guo J, Turesky RJ. Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues-An Untapped Biospecimen for Biomonitoring DNA Adducts by Mass Spectrometry. *Toxics.* 2018;6(2).

23. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. Sixth ed: Garland Science; 2015.
24. Hongdo D, Alexander D. Dramatic reduction of sequence artefacts from DNA isolated from formalin-fixed cancer biopsies by treatment with uracil-DNA glycosylase. *Oncotarget*. 2012;3(5):546-58.
25. Mathieson W, Thomas GA. Why Formalin-fixed, Paraffin-embedded Biospecimens Must Be Used in Genomic Medicine: An Evidence-based Review and Conclusion. *J Histochem Cytochem*. 2020;68(8):543-52.
26. Chen G, Mosier S, Gocke CD, Lin MT, Eshleman JR. Cytosine deamination is a major cause of baseline noise in next-generation sequencing. *Mol Diagn Ther*. 2014;18(5):587-93.
27. Sah S, Chen L, Houghton J, Kempainen J, Marko AC, Zeigler R, et al. Functional DNA quantification guides accurate next-generation sequencing mutation detection in formalin-fixed, paraffin-embedded tumor biopsies. *Genome medicine*. 2013;5(8):77.
28. Sedlackova T, Repiska G, Celec P, Szemes T, Minarik G. Fragmentation of DNA affects the accuracy of the DNA quantitation by the commonly used methods. *Biol Proced Online*. 2013;15(1):5.
29. Alaeddini R, Walsh SJ, Abbas A. Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA--a review. *Forensic Sci Int Genet*. 2010;4(3):148-57.
30. Holmes AS, Houston R, Elwick K, Gangitano D, Hughes-Stamm S. Evaluation of four commercial quantitative real-time PCR kits with inhibited and degraded samples. *Int J Legal Med*. 2018;132(3):691-701.
31. Quantifiler™ HP and Trio DNA Quantification Kits User Guide. 2018.
32. Battista J. Tools for Improving the Quality of Aged, Degraded, Damaged, or Otherwise Compromised DNA Evidence. 2012.
33. Liu Y, He H, Yi S, Hu Q, Zhang W, Huang D. Comparison of different methods for repairing damaged DNA from buffered and unbuffered formalin-fixed tissues. *Int J Legal Med*. 2018;132(3):675-81.
34. Carsten MP, Ian G, Michael S. Repair of degraded duplex DNA from prehistoric samples using *Escherichia coli* DNA polymerase I and T4 DNA ligase. *Nucleic Acids Res*. 1998;26(3):857-9.

35. Kovatsi L, Nikou D, Triantaphyllou S, Njau S, Voutsaki S, Kouidou S. DNA repair enables sex identification in genetic material from human teeth. *HIPPOKRATIA*. 2009;13(3):165-8.
36. NEBNext FFPE DNA Repair Instruction Manual. 2018.
37. Do H, Wong SQ, Li J, Dobrovic A. Reducing sequence artifacts in amplicon-based massively parallel sequencing of formalin-fixed paraffin-embedded DNA by enzymatic depletion of uracil-containing templates. *Clin Chem*. 2013;59(9):1376-83.
38. Butler J. *Forensic DNA Typing*. Second ed: Elsevier Academic Press; 2005.
39. Amorim A, Fernandes T, Taveira N. Mitochondrial DNA in human identification: a review. *PeerJ*. 2019;7:e7314.
40. ABI PRISM Mitochondrial DNA sequencing technical booklet. 1995.
41. Butler J. Mitochondrial DNA analysis. *Forensic DNA Typing*. 2nd ed: Academic Press/Elsevier; 2004. p. 241-98.
42. Parsons T, Muniec D, Sullivan K, Woodyatt N, Alliston-Greiner R, Wilson M, et al. A high observed substitution rate in the human mitochondrial DNA control region. *Nat Genet*. 1997;15(4):363-8.
43. Sanger F, Nicklen S, Coulson A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci*. 1977;74(12):5463-7.
44. QIAamp DNA FFPE Tissue Handbook. 2012.
45. Heyer E, Zietkiewicz E, Rochowski A, Yotova V, Puymirat J, Labuda D. Phylogenetic and familial estimates of mitochondrial substitution rates: study of control region mutations in deep-rooting pedigrees. *Am J Hum Genet*. 2001;69(5):1113-26.
46. QIAxcel User Manual. 2008.
47. ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup. 2017.
48. BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. 2018.
49. DyeEx™ Handbook. 2002.
50. Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(8):606-16.
51. Powers RH. The Decomposition of Human Remains. In: Jeremy R, Dorothy ED, Robert HP, editors. *Forensic Medicine of the Lower Extremity*. New Jersey: Humana Press; 2015. p. 3-15.

52. Niland EE, McGuire A, Cox MH, Sandusky GE. High quality DNA obtained with an automated DNA extraction method with 70+ year old formalin-fixed celloidin-embedded (FFCE) blocks from the indiana medical history museum. *American journal of translational research*. 2012;4(2):198-205.
53. Prentice LM, Miller RR, Knaggs J, Mazloomian A, Aguirre Hernandez R, Franchini P, et al. Formalin fixation increases deamination mutation signature but should not lead to false positive mutations in clinical practice. *PLoS One*. 2018;13(4):e0196434.
54. Agencourt AMPure XP PCR Purification. 2016.
55. Gilbert MT, Hansen AJ, Willerslev E, Rudbeck L, Barnes I, Lynnerup N, et al. Characterization of genetic miscoding lesions caused by postmortem damage. *Am J Hum Genet*. 2003;72(1):48-61.
56. Hansen AJ, Willerslev E, Wiuf C, Mourier T, Arctander P. Statistical Evidence for Miscoding Lesions in Ancient DNA Templates. *Molecular Biology and Evolution*. 2001;18(2):262-5.
57. Gao XH, Li J, Gong HF, Yu GY, Liu P, Hao LQ, et al. Comparison of Fresh Frozen Tissue With Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue for Mutation Analysis Using a Multi-Gene Panel in Patients With Colorectal Cancer. *Front Oncol*. 2020;10:310.
58. Gilbert MT, Willerslev E, Hansen AJ, Barnes I, Rudbeck L, Lynnerup N, et al. Distribution patterns of postmortem damage in human mitochondrial DNA. *Am J Hum Genet*. 2003;72(1):32-47.
59. Miething F, Hering S, Hanschke B, Dressler J. Effect of fixation to the degradation of nuclear and mitochondrial DNA in different tissues. *J Histochem Cytochem*. 2006;54(3):371-4.



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นรมน แซ่จิว
วัน เดือน ปี เกิด	9 สิงหาคม 2536
สถานที่เกิด	ร้อยเอ็ด
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2559 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาจุลชีวะวิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 19/1 หมู่ที่ 5 บ้านดงเต่า ตำบลขอนแก่น อำเภอเมืองร้อยเอ็ด จังหวัดร้อยเอ็ด 45000



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY