

การระบุเนื้อเยื่อสมองโดยใช้ตำแหน่งจำเพาะของ CpG methylation

Brain tissue identification by site-specific CpG methylation

จริญญา สามสุวรรณ (Jarunya Samsuwan)* ดร. ปฐมวดี ญาณทัสนียจิต (Dr. Pattamawadee Yanatatsaneejit)**

ดร.อภิวัฒน์ มุทิรากร (Dr. Apiwat Mutirangura)***

ดร.นกรินทร์ กิตกำธร (Dr. Nakarin Kitkumthorn) **** ทัชพล เมืองทรัพย์ (Tachapol Muangsub)*****

บทคัดย่อ

ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน(DNA methylation) เป็นกลไกทางชีวเคมีของภาวะเหนือพันธุกรรมซึ่งเกี่ยวข้องกับพัฒนาการของอวัยวะและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพื่อไปทำหน้าที่ต่างๆ มักเกิดขึ้นในตำแหน่งที่เป็น CpG dinucleotide พบกระจายอยู่ทั่วทั้งจีโนมโดยรูปแบบ CpG methylation จะมีความจำเพาะต่อเนื้อเยื่อในแต่ละอวัยวะ ในงานวิจัยครั้งนี้ต้องการศึกษาหาตำแหน่ง CpG methylation ที่จำเพาะต่ออวัยวะที่สำคัญต่อการมีชีวิต เพื่อใช้ในการพิสูจน์ชนิดของชีววัตถุที่เก็บได้จากสถานที่เกิดเหตุ โดยใช้ข้อมูลจากฐานข้อมูลทางชีวสารสนเทศ เป็นแหล่งอ้างอิงในการคัดเลือกตำแหน่ง CpG methylation ที่จำเพาะของเนื้อเยื่อในอวัยวะต่างๆ โดยรวบรวมข้อมูลจาก 39 งานทดลองที่ใช้การตรวจวัดโดย methylation microarray มีตำแหน่งของ CpG จำนวน 27,578 ตำแหน่งจากการคัดเลือก พบตำแหน่ง cg03096975 ของยีน *EML2* จากเนื้อเยื่อสมองมีรูปแบบ CpG methylation ที่จำเพาะ จากนั้นทำการเปรียบเทียบความจำเพาะของรูปแบบ CpG methylation ในสมองกับเนื้อเยื่อจากอวัยวะอื่นๆ 13 อวัยวะ ด้วยเทคนิค COBRA เพื่อตรวจยืนยันความถูกต้องของข้อมูล จากผลการทดลองพบว่ามีเพียงเนื้อเยื่อจากสมองเท่านั้นที่แสดงความจำเพาะกับตำแหน่ง cg03096975 ของยีน *EML2*

ABSTRACT

DNA methylation is a major epigenetic modification which commonly occurs at the CpG nucleotide repeats along the whole genome and is responsible for organ development and cellular differentiation. Generally, each CpG site possesses a different methylation status in different tissues. The purpose of this study is to use the CpG methylation profile strategy for vital tissue identification at the crime scene. In this current study, we focused on identifying brain tissue within the sample that indicated the death of the owner. By scanning 39 experiment methylation array databases (27,578 CpG positions). We found that the cg03096975 position of *EML2* was strikingly methylated in the brain tissue. After that, we validated this data by COBRA technique in the tissues from individual autopsy cases compared between brain tissue and other 13 organs. We observed that this CpG site was methylated in the brain tissue while non-methylated in the other 13 tissues. The results clearly demonstrated that, this marker can distinguish brain tissue from other organs.

คำสำคัญ: ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน ตำแหน่งจำเพาะ ซีพีจี เมทิลเลชัน เทคนิค COBRA

Key Words: DNA methylation, site specific CpG methylation, COBRA technique

*นิสิต หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

***ศาสตราจารย์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

****ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาพยาธิวิทยาช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

*****นิสิต หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

ในปัจจุบันการตรวจสอบวัตถุพยานประเภทชีววัตถุ ซึ่งได้แก่ ชิ้นส่วนอวัยวะ เนื้อเยื่อ หรือสารน้ำจากร่างกาย จากสถานที่เกิดเหตุหลักฐานทางนิติวิทยาศาสตร์ที่ถูกนำมาใช้เพื่อตรวจสอบวัตถุพยานเหล่านั้น คือ หลักฐานทางด้านดีเอ็นเอ เพราะผลที่ได้จากการตรวจสอบดีเอ็นเอมีความน่าเชื่อถือ และสามารถตรวจสอบได้แม้ในวัตถุพยานที่เสื่อมสภาพโดยการตรวจดีเอ็นเอในทางนิติวิทยาศาสตร์ ได้ให้ความสำคัญกับส่วนที่เป็น Short Tandem Repeats (STR) หรือ Microsatellite ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีลักษณะดีเอ็นเอเป็นชุดเบสซ้ำๆ กันและจะไม่เหมือนกันในแต่ละบุคคล ยกเว้นแฝดร่วมไข่ (สราลักษณ์ และคณะ, 2555) โดยผลการตรวจจะบอกได้ว่าบุคคลใดมีส่วนเกี่ยวข้องกับวัตถุพยาน หรือชิ้นส่วนอวัยวะนั้นเป็นของใคร

นอกจากนั้นยังมีการตรวจสอบเพื่อระบุชนิดของชีววัตถุ โดยเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นก่อนการตรวจเพื่อระบุตัวบุคคล เพราะเป็นขั้นตอนที่ให้ข้อมูลพื้นฐาน และสามารถกำหนดทิศทางในการดำเนินงานต่อ ด้วยการใช้เทคนิคทางห้องปฏิบัติการ เช่น ตรวจระบุชนิดเนื้อเยื่อด้วยการดูชนิดของเซลล์จากกล้องจุลทรรศน์ หรือตรวจสอบโปรตีนโดยใช้สารเคมี เพราะการระบุชนิดของชีววัตถุจะมีส่วนช่วยในการเชื่อมโยงพฤติกรรมทางคดี (Frumkin et al., 2010) ยกตัวอย่างเช่น หากเจอคราบอสุจิในเกิดเหตุก็สามารถอนุมานในเบื้องต้นว่าคดีนั้นน่าจะเกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ทางเพศ หรือหากเจอชิ้นส่วนอวัยวะในที่เกิดเหตุ แต่ไม่เจอศพ หากตรวจได้ว่าอวัยวะนั้นเป็นอวัยวะที่สำคัญต่อการมีชีวิต เช่น สมอง หัวใจ ไต ตับ ก็สามารถอนุมานในเบื้องต้นได้เช่นกันว่าเจ้าของอวัยวะนั้นน่าจะเสียชีวิตแล้วซึ่งมีผลต่อแนวทางการดำเนินคดีต่อไป แต่วัตถุพยานที่เสื่อมสภาพทั้งจากการเก็บที่ไม่ได้คุณภาพหรืออายุของชีววัตถุจะเป็นอุปสรรคต่อเทคนิคต่างๆ ที่กล่าวมา ทั้งขาดความแม่นยำในการตรวจแยกชนิดของชีววัตถุหรือไม่สามารถตรวจหาชนิดของชีววัตถุได้ แต่

หากสามารถใช้ดีเอ็นเอเพื่อระบุชนิดของชีววัตถุได้ ก็จะเป็นการแก้ปัญหาสำหรับวัตถุพยานที่เสื่อมสภาพ

ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน เป็นกลไกหนึ่งของภาวะเหนือพันธุกรรมเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน ด้วยกระบวนการทางชีวเคมีที่มีความสำคัญต่อการพัฒนาในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง (Bibikova et al., 2009) โดยการเติมหมู่เมทิลที่เบส cytosine ที่อยู่ติดกับเบส guanine ซึ่งในกระบวนการเติมหมู่เมทิลให้กับเบสไซโตซีนนั้น จะมี S-adenosyl-L-methionine (SAM) เป็นโมเลกุลที่ให้หมู่เมทิล และเอนไซม์ DNA methyltransferase (DNMTs) (Cottrell et al., 2010) เป็นเอนไซม์ที่คอยเติมหมู่เมทิลให้กับดีเอ็นเอ เรียกตำแหน่ง CpG dinucleotide นี้ว่า CpG methylation (Bird, 2002) ได้มีการศึกษารูปแบบ CpG methylation ในเลือด น้ำลาย และน้ำอสุจิโดยในการศึกษาได้ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดไปยังตำแหน่ง CpG methylation ในตัวอย่างแต่ละชนิด พบว่ารูปแบบที่ได้มีความแตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างจึงเป็นที่มาของข้อสรุปว่า เซลล์ที่มาจากอวัยวะที่แตกต่างกันจะมีรูปแบบ CpG methylation ที่แตกต่างกัน ดังนั้น จึงสามารถใช้รูปแบบ CpG methylation เพื่อระบุชนิดของเซลล์หรือเนื้อเยื่อได้ (Zilberman et al., 2007)

การคัดเลือกตำแหน่ง CpG methylation ที่จำเพาะทำโดยรวบรวมข้อมูลจากฐานข้อมูล NCBI แล้วจัดการข้อมูลดิบที่ได้ด้วยโปรแกรม CU-DREAM ซึ่งเป็นโปรแกรมทางชีวสารสนเทศที่สามารถคำนวณและประเมินความสัมพันธ์ของแต่ละยีนระหว่าง ข้อมูลการทดลองสองการทดลอง (Aporntewan and Mutirangura, 2011) เพื่อสร้างเป็นฐานข้อมูล โดยฐานข้อมูลที่ได้จะมีประโยชน์ในการใช้หาระดับของค่า DNA methylation เพื่อใช้ตรวจแยกชนิดของเนื้อเยื่อ ชนิดต่างๆ

โดยในงานวิจัยนี้ได้เลือกตรวจสอบตำแหน่ง CpG methylation ที่มีความจำเพาะในสมอง เพราะชิ้นส่วนสมองเป็นชิ้นส่วนอวัยวะที่สามารถพบในสถานที่เกิดเหตุได้เป็นประจำและด้วยลักษณะของเนื้อเยื่อที่บอบบาง เสื่อมสภาพได้ง่าย การใช้ดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบจึงเป็นแนวทางเพื่อใช้แก้ปัญหาการขาดความ

แม่นยำในการตรวจหรือไม่สามารถตรวจหาชนิดของชีววัตถุที่เชื่อมสภาพได้ และตำแหน่ง cg 03096975 ซึ่งอยู่ในยีน *EML2* ของสมอง จากฐานข้อมูลที่สร้างขึ้นแสดงค่าเป็น Hypermethylation ที่โดดเด่นเมื่อเทียบกับอวัยวะอื่นๆ โดยยีน *EML2* ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 19 มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการรับรู้ทางประสาทสัมผัสของเสียง (*EML2* Gene protein-coding, 2013: online ; *EML2* Gene Detail, 2013: online)

การศึกษานี้ได้ผ่านการพิจารณาจริยธรรมในมนุษย์ได้รับเอกสารรับรองโครงการวิจัยโดยคณะกรรมการจริยธรรมและวิจัย ของโรงพยาบาลตำรวจ เลขที่หนังสือรับรอง จว 74/2556

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. คัดเลือกตำแหน่ง CpG methylation ที่มีความจำเพาะต่อสมองจากตำแหน่ง CpG methylation ทั่วทั้งจีโนมจากฐานข้อมูล DNA methylation ในเนื้อเยื่อต่างๆที่สร้างขึ้น
2. หาเทคนิคเพื่อใช้ในการตรวจแยกเนื้อเยื่อสมองด้วยตำแหน่ง CpG methylation ที่จำเพาะต่อสมอง

วิธีการวิจัย

1. ค้นหาข้อมูลจากฐานข้อมูล NCBI ในส่วนของ GEO dataset ของเนื้อเยื่อมนุษย์ชนิดต่างๆ โดยเลือกข้อมูลงานทดลองที่ใช้ชุดตรวจ Infinium Human Methylation 27 BeadChip Kit ของบริษัท Illumina® ด้วยเหตุผลคือ ชุดตรวจนี้สามารถตรวจสอบตำแหน่ง CpG methylation ได้ถึง 27,528 ตำแหน่ง ทั่วทั้งจีโนมครอบคลุมตำแหน่งของยีนมากกว่า 14,000 ยีน (Bibikova et al., 2009) และมีข้อมูลงานทดลองจำนวนมากที่ใช้ชุดตรวจชนิดนี้ โดยใช้สำคัญในการค้นหาคือ GPL8490-65 เลือกข้อมูลในช่วงวันที่ 18 สิงหาคม 2552 ถึง วันที่ 31 ธันวาคม 2555 ได้งานทดลองมาทั้งหมด 172 ชุด

2. จากฐานข้อมูลที่ได้จากข้อ (1.) คัดเลือกเฉพาะงานทดลองที่ทำในเนื้อเยื่อปกติของมนุษย์จาก

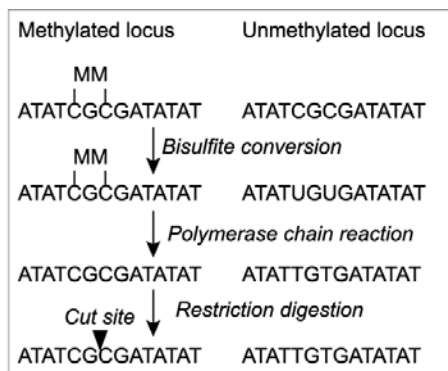
172 ชุด ได้งานทดลองที่มีเงื่อนไขตามต้องการ 39 ชุด เป็นงานทดลองที่ทำในเนื้อเยื่อปกติของมนุษย์ 18 ชนิด ได้แก่ กระดูก ไขกระดูก เลือด สมอง ปอด เต้านม หัวใจ ตับ กระเพาะอาหาร ลำไส้ ไต ตับอ่อน ต่อมหมวกไต ต่อมลูกหมาก ปากมดลูก ผิวหนัง กล้ามเนื้อ เซลล์เยื่อ และไฟโบรบลาสต์ นอกจากนี้ข้อมูลงานทดลองอีกส่วนหนึ่งเป็นข้อมูลที่ได้รับจากงานวิจัยของบริษัท Illumina ดังนั้น ฐานข้อมูลที่ได้จึงครอบคลุมเฉพาะการใช้เพื่อ ค้นหาตำแหน่ง CpG methylation ที่มีความจำเพาะต่อเนื้อเยื่อปกติเท่านั้นไม่สามารถนำมาใช้กับเนื้อเยื่อที่มีความผิดปกติได้

3. นำข้อมูลงานทดลองที่คัดเลือกได้ ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CU-DREAM เพื่อคำนวณค่าเมทิลเลชันเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มตัวอย่างเนื้อเยื่อทั้ง 18 ชนิดจาก 39 งานทดลอง จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ มารวบรวมและจัดเรียงลงในโปรแกรม Microsoft Excel เพื่อสร้างเป็นฐานข้อมูลของอวัยวะต่างๆ แล้วสร้างกราฟแสดงค่าดีเอ็นเอเมทิลเลชัน ของแต่ละ CpG ด้วยโปรแกรมอาร์ ซึ่ง เป็นโปรแกรมที่จะใช้เพื่อการสร้างกราฟทั้ง 27,578 ตำแหน่ง ด้วยการเขียนคำสั่งเพียงครั้งเดียว โดยกราฟที่ได้จะกำหนดให้แกน X แสดง เนื้อเยื่อจากอวัยวะจากงานทดลองต่างๆ 18 ชนิด ซึ่งมีการจัดข้อมูลเนื้อเยื่อชนิดเดียวกันอยู่ติดกัน เพื่อความสะดวกในการพิจารณาค่าการเกิดเมทิลเลชันในแต่ละตำแหน่ง CpG และแกน Y แสดง เปอร์เซ็นต์การเกิดเมทิลเลชัน

4. คัดเลือกกราฟ CpG ที่แสดงความจำเพาะต่อเนื้อเยื่อแต่ละชนิดโดยการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเกิดเมทิลเลชันจากทั้งหมด 27,578 กราฟ เมื่อเสร็จขั้นตอนนี้จะได้กราฟที่แสดงค่าเมทิลเลชันจำเพาะต่ออวัยวะต่างๆ ทั้งหมด 222 กราฟ หรือก็คือมี CpG 222 ตำแหน่งแสดงความจำเพาะ ใน 15 อวัยวะ แบ่งเป็น กลุ่ม hypermethylation จำนวน 82 ตำแหน่ง และกลุ่ม hypomethylation จำนวน 140 ตำแหน่ง โดยมี 43 ตำแหน่งเป็นตำแหน่ง CpG ที่มีความจำเพาะต่อสมอง จากนั้นคัดเลือกอีกครั้งจากการพิจารณาอันดับของกราฟ ที่แสดงความต่างของค่าเมทิลเลชัน ระหว่างสมองกับ

เนื้อเยื่ออื่นมากเป็นอันดับต้นๆซึ่งในงานวิจัยนี้เลือกใช้ตำแหน่ง cg03096975 ในยีน *EML2* ที่แสดงค่าเป็น hypermethylation ในสมองสูงถึงเกือบ 80% เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่ออื่นๆเพื่อการระบุเนื้อเยื่อสมอง

5. เทคนิคที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือ Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) เป็นวิธีการที่ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ Bisulfite treatment PCR และ restriction enzyme (Xiong et al., 1997) โดยไพรเมอร์ที่ใช้เป็นการออกแบบครอบคลุมตำแหน่ง cg03096975 ในยีน *EML2* primer forward sequence คือ 5'CGTTATTYGTGTTATGAGTAGTTT 3' และ primer reverse คือ 5'CCRATCTAAATCCCCAAAAT TAAATA 3' เอนไซม์ที่ใช้คือ *BstUI* เพราะมีความจำเพาะกับตำแหน่ง CpG ที่ต้องการศึกษา

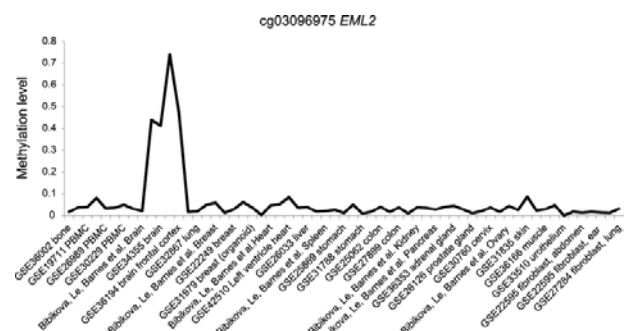


รูปที่ 1 แผนภาพแสดงขั้นตอนการทำงานในเทคนิค Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) ในตำแหน่งที่เป็น methylated และ unmethylated

ทำการทดลองในตัวอย่าง เนื้อเยื่อของอวัยวะต่างๆ ที่ได้จากการตรวจศพ 14 อวัยวะ ได้แก่ สมอง ใต้ ตับ ปอด หัวใจ ม้าม ตับอ่อน กระเพาะอาหาร ผิวหนัง ถุงน้ำดี ลิ้น ลำไส้เล็ก ต่อมทอมซิล ไข่ตั้ง จำนวนทั้งหมด 99 ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่างที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก กลุ่มงานนิติพยาธิ สถาบันนิติเวชวิทยา โรงพยาบาลตำรวจ จากนั้นทำการตรวจสอบความไวและความจำเพาะของเทคนิค COBRA พร้อมทั้งวิเคราะห์ความเหมาะสมของเทคนิคต่อไป

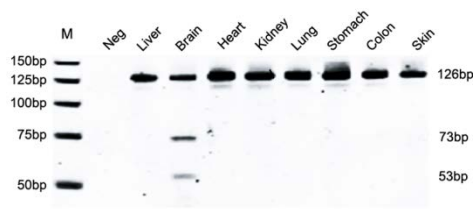
ผลการวิจัย

จากการค้นหาคำแหน่ง CpG methylation ที่มีความจำเพาะต่อเนื้อเยื่อสมองจากฐานข้อมูลชีวสารสนเทศได้เลือกตำแหน่ง cg03096975 ในยีน *EML2* เพื่อใช้ระบุเนื้อเยื่อสมอง เพราะเป็นตำแหน่ง CpG ที่แสดงค่าเป็น hypermethylation ในเนื้อเยื่อสมองสูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับเนื้อเยื่อจากอวัยวะอื่นๆ แสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 กราฟค่าเมทิลเลชันในอวัยวะต่างๆของตำแหน่ง cg03096975 ในยีน *EML2* จากฐานข้อมูล โดยแกน X คือ เนื้อเยื่อจากอวัยวะต่างๆ ที่ได้จากงานทดลองทั้ง 39 งานทดลอง แกน Y คือ ระดับการเกิดเมทิลเลชัน ตำแหน่งที่กราฟแสดงค่าเป็น hypermethylation เกือบ 80 เปอร์เซ็นต์ นั่นคือค่าที่ตรวจวัดจากเนื้อเยื่อสมอง

ผลการตรวจสอบ ที่ตำแหน่ง cg03096975 ของยีน *EML2* ในเนื้อเยื่อสมอง เปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อจากอวัยวะอื่นๆด้วยวิธีการ COBRA แสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 PCR product ของตำแหน่ง cg03096975 ของยีน *EML2* จาก ตับ สมอง หัวใจ ไต ปอด กระเพาะอาหาร ลำไส้ และผิวหนัง คัดด้วยเอนไซม์ *Bst*UI จากรูป M คือ DNA marker ขนาด 25 bp ขึ้นตีเอ็นเอขนาด 126bp คือ ขึ้นตีเอ็นเอที่เป็น Unmethylated ขึ้นตีเอ็นเอขนาด 73bp และ 53 bp คือขึ้น

ตีเอ็นเอที่เป็น methylated โดยมี

Negatives control คือ น้ำกลั่น

Positive control methylation คือ DNA จากสมองที่ผ่านการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequenc แล้วว่าเป็น (methylation

Positive control unmethylation คือ DNA จากปอด ที่ผ่านการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วว่าเป็น unmethylation

ทำการทดลองในตัวอย่างทั้งหมด 99 ตัวอย่าง แบ่งเป็นสมอง 19 ตัวอย่าง และอวัยวะอื่นๆ 80 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค COBRA ที่ตำแหน่ง cg03096975 ยีน *EML2* จากผลการทดลองพบว่าสมองทั้ง 19 ตัวอย่างถูกระบุได้ด้วยวิธีการนี้ ในขณะที่อวัยวะอื่นๆก็ถูกระบุเช่นกันว่าไม่ใช่สมอง

จากผลการทดลองนำมาคำนวณหาค่าความไว (sensitivity) และ ความจำเพาะ (specificity) การตรวจสอบวินิจฉัย(Diagnostic Test) ได้ดังนี้

ความไว = ผลบวกจริง/ ผลบวกทั้งหมด X 100

$$= 19/19 \times 100$$

$$= 100 \%$$

ความจำเพาะ = ผลลบจริง/ผลลบทั้งหมด X 100

$$= 80/80 \times 100$$

$$= 100 \%$$

หมายเหตุ: ผลบวกจริง หมายถึง การตรวจสอบเนื้อเยื่อสมองแล้วสามารถบอกได้ว่าเป็นเนื้อเยื่อสมอง

ผลลบจริง หมายถึง การตรวจสอบเนื้อเยื่อจากอวัยวะอื่นแล้วสามารถบอกได้ว่าไม่ใช่สมอง

ซึ่งการทดสอบที่มีความไวสูง จะมีโอกาสพลาดน้อยมากสำหรับการระบุเนื้อเยื่อสมองและจะมีประโยชน์มากที่สุดเมื่อผลการทดสอบเป็นลบ คือการแยกเนื้อเยื่อที่ไม่ใช่สมองออกไป และคำนวณค่าความจำเพาะได้เปอร์เซ็นต์ ซึ่งหมายถึง ในการระบุเนื้อเยื่อสมอง 100 ด้วยเทคนิคCOBRA ที่ตำแหน่ง cgจะมี 03096975 โอกาสพลาดน้อยมากในการระบุเนื้อเยื่อชนิดอื่นเป็นเนื้อเยื่อสมอง แสดงให้เห็นว่า ณ ตำแหน่งcg 03096975 ของยีนEMLสามารถใช้เพื่อระบุเนื้อเยื่อสมองได้ 2 อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งความจำเพาะนี้สามารถนำมาประยุกต์ในงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ แทนเทคนิคการตรวจแบบเดิมที่จะมีข้อจำกัดในตัวอย่างเสื่อมสภาพ

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากผลการวิจัยที่ได้จากการตรวจสอบ DNA methylation ในตำแหน่ง cg03096975 ของยีน *EML2* ให้ข้อสรุปแล้วว่า มีความจำเพาะต่อเนื้อเยื่อสมอง และจากผลการวิจัยนี้จึงสอดคล้องกับข้อมูลที่ได้จากฐานข้อมูล DNA methylation ที่สร้างขึ้น นั้นยอมแสดงว่าที่ตำแหน่ง cg03096975 ของยีน *EML2* สามารถใช้ระบุเนื้อเยื่อสมองได้จริง ซึ่งก่อนหน้านี้ในหัวข้อวิจัยที่ทำการทดลองเพื่อหาตำแหน่ง CpG methylation เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ ในการตรวจสอบสารน้ำจากร่างกาย ได้แก่ เลือด น้ำลาย น้ำอสุจิ น้ำจากช่องคลอด ด้วยวิธีการ Bisulfite treatment, PCR, clones, sequencing และ MSRE-PCR (Frumkin et al, 2010) รวมถึงอีกหนึ่งงานวิจัยที่ทำในสารคัดหลั่งเช่นกันนอกจากนั้นยังมีการรวมผลการตรวจระหว่าง DNA methylation ที่จะสามารถบอกได้ว่าตัวอย่างที่ทำการตรวจคือตัวอย่างชนิดใด กับผลการตรวจ STR เพื่อบอกว่าเป็นตัวอย่างของใคร ด้วยซ้ำด้วยกัน ด้วยวิธีการ Bisulfite treatment

แล้วทำ pyrosequencing และวิธีการที่ใช้ restriction enzyme ร่วมกับ capillary electrophoresis (An et al., 2013) ผลที่ได้จากงานวิจัยทั้งสองหัวข้อแสดงให้เห็นว่า DNA methylation มีความจำเพาะต่อเนื้อเยื่อแต่ละชนิด แต่จะเห็นว่างานวิจัยที่ผ่านมาจะเป็นการศึกษา DNA methylation เพื่อระบุชนิดของเนื้อเยื่อ จะเป็นงานวิจัยที่ทำในสารคัดหลั่งหรือสารน้ำจากร่างกาย แต่การทำในอวัยวะต่างๆ มักเป็นการมุ่งเน้นเพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคหรือสาเหตุการเกิดโรค เช่น มะเร็ง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นงานวิจัยที่ริเริ่มการนำ DNA methylation มาใช้เพื่อระบุชนิดของเนื้อเยื่อ เพื่อมุ่งหวังการใช้งานด้านนิติวิทยาศาสตร์ และหากในอนาคตสามารถพัฒนาวิธีการตรวจที่จะรวมการตรวจ DNA methylation เข้ากับการตรวจ DNA STR ก็จะทำให้ได้ผลการตรวจที่รวดเร็วและชัดเจนมากขึ้น คือสามารถระบุชนิดของตัวอย่าง และตัวบุคคลได้ในคราวเดียว

และจากข้อมูลตำแหน่ง CpG ที่แสดงค่าเมทิลเลชันที่จำเพาะต่อสมองในตำแหน่งอื่นอีก 42 ตำแหน่ง ก็สามารถนำมาตรวจระบุเนื้อเยื่อสมองได้และหากเพิ่มตำแหน่ง CpG ก็จะเป็นการเพิ่มความแม่นยำของผลการตรวจและป้องกันความคลาดเคลื่อนที่อาจเกิดจากการเสื่อมสภาพของดีเอ็นเอในบริเวณ CpG ที่จำเพาะตลอดจนสภาวะต่างๆ ที่อาจส่งผลต่อ CpG ตำแหน่งนั้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยชิ้นนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยสมบูรณ์ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากหลายฝ่ายผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.ปฐมวดี ญาณทัศน์ยิจิต อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ศ.ดร. นพ. อภิวัฒน์ มุทิรางกูร และ ผศ. ดร. ทพ. นครินทร์ กิตกำธร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ช่วยเหลือและความอนุเคราะห์ในทุกขั้นตอนของการทำงานวิจัยรวมทั้งให้คำแนะนำ ให้คำสั่งสอน ตั้งแต่การรวบรวมข้อมูล การทดลอง วิธีการทดลอง ตลอดจนให้ข้อเสนอแนะที่มี

ประโยชน์กราบขอบพระคุณ พล.ต.ต. นพ.พรชัย สุทธิรัฐ คุณ ผู้บังคับการสถาบันนิติเวชวิทยา โรงพยาบาลตำรวจ ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างเพื่อใช้ในการวิจัย ขอบคุณเจ้าหน้าที่ตำรวจกลุ่มงานนิติพยาธิผู้ช่วยเหลือในขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง ขอขอบคุณนาย ทักษพล เมืองทรัพย์ ที่ให้ความช่วยเหลือในเรื่องฐานข้อมูลทางชีวสารสนเทศและการคัดแยกกราฟ CpG ทั้ง 27,578 ตำแหน่ง ตลอดจนความช่วยเหลืออื่นๆ ในระหว่างการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

- ศราลักษณ์ ศักดิ์เกียรติชัย, ฐานันท์ ภูพัฒน์, เลิศลักษณ์ ภูพัฒน์. การศึกษาไมโครแซทเทลไลต์ DNA ตำแหน่ง DYS 393 จากตัวอย่างสาลิ ป้ายช่องคลอดเพื่อเป็นตัวบ่งชี้ของการมีเพศสัมพันธ์. นิติเวชศาสตร์ ปีที่ 4 ฉบับที่ 2 (2555): 83-91.
- An, J.H., Choi, A., Shin, K., Yang, W.I, and Lee, H.Y. 2012. DNA methylation-specific multiplex assays for body fluid identification. *International Journal of Legal Medicine* 127: 35-43.
- Anonymous. 2013. EML2 Gene protein-coding. Retrieved 1 September 2013, from: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=EML2>.
- Anonymous. 2013. Eml2 Gene Detail. Retrieved 1 September 2013, from: <http://www.informatics.jax.org/marker/MGI:1919455>
- Aporntewan, C., and Mutirangura, A. 2011. Connection up-and down-regulation expression analysis of microarrays (CUDREAM). *Asian Biomedicine* 5: 257-262.

- Bibikova, M., and others. 2009. Genome-wide DNA methylation profiling using Infinium assay. *Epigenomics* 1(1): 177-200.
- Bird, A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes and Development* pp.6-21. UK: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Cottrell, S., and others. 2010. DNA methylation analysis: Providing new insight into human disease. *Essentials of Genomic and Personalized Medicine* pp.60-68. London: Elsevier Inc.
- Frumkin, D., Wasserstrom, A., Budowle, B., and Davidson, A. 2011. DNA methylation-based forensic tissue identification. *Forensic Science International : Genetic* 5: 517-524.
- Xiong, Z., and W. Laird, P. 1997. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acid Research* 25: 2532-2534.
- Zilberman, D. and Henikoff, S. 2007. Genome- wide analysis of DNA methylation patterns. *Development* 134: 3959-3965.