การระบุชนิดสัตว์ด้วยไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอบริเวณ D-loop สำหรับงานนิติวิทยาศาสตร์

Forensic Identification using Mitochondrial DNA D-loop locus

จิรพรรณ สุดศักดิ์กรี (Jirapan Sudsakkree)* ดร.รัชดาภรณ์ เบญจวัฒนานนท์ (Dr. Ratchadaporn Benjawatananon)**
ดร.ธาริณี ทิมาบุตร (Dr.Tarinee Timabud)*** ดร.ปวีณา พงษ์ดนตรี (Dr.Paweena Pongdontri)****
ดร.แสนสุข บุญสืบ (Dr.Sansook Boonseub)*****

บทคัดย่อ

บริเวณ D-loop ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของสัตว์แต่ละชนิดนั้นมีลำดับดีเอ็นเอที่แตกต่างกันมากพอที่จะนำมาใช้ในการระบุชนิดของสัตว์ที่เป็นชีววัตถุพยานในงานนิติวิทยาศาสตร์ได้ งานวิจัยนี้จึงได้ทำการออกแบบไพรเมอร์จากตำแหน่ง D-loop ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank ของสัตว์ 5 ชนิด ได้แก่ สุนัข (*Canis fanilliaris*) เสือโคร่ง (*Panthera tigris*) กระบือ (*Bubalus bulais*) ช้างเอเชีย (*Elephas maximus*) และแมวบ้าน (*Felis catus*) เมื่อสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากขนของสัตว์แต่ละชนิดมาทำการเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบริเวณดังกล่าวโดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์เปรียบเทียบกับบริเวณอนุรักษ์ในไมโตคอนดรียของสัตว์ คือ 12S และ 16S พบว่าสามารถเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอ็นเอได้เฉพาะ 12S และ 16S ณ ปัจจุบัน

ABSTRACT

D-loop loci of animal mitochondrial DNA are highly variable from species to species. This could be useful for forensic identification of biomaterial witness. This work employed GenBank genome databases from 5 animal species; i.e., dog (*Canis fanilliaris*), tiger (*Panthera tigris*), buffalo (*Bubalus bulais*), asian elephant (*Elephas maximus*) and domestic cat (*Felis catus*) for primer design. Genomic DNAs from hair of each animal were isolated and amplified, using primers harboring D-loop locus of mitochondrial DNA from each animal by PCR reaction, using 12S and 16S rRNA as controls. Only 12S and 16S rRNA fragments of each animal were able to be amplified currently.

คำสำคัญ: ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ, D-loop, นิติวิทยาศาสตร์

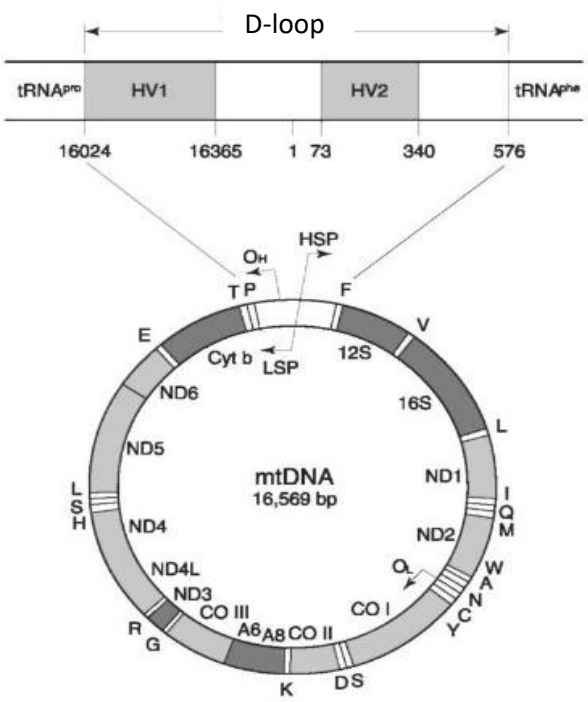
Keywords: Mitochondrial DNA, D-loop, Forensic

** นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
*** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
**** ผู้ช่วยวิจัย ห้องปฏิบัติการชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
***** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
****** พันตำรวจตรีหญิง สังกัดสถาบันฝึกอบรมและวิจัยการพิสูจน์หลักฐานตำรวจ สำนักงานพิสูจน์หลักฐานตำรวจ*

บทนำ

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แสดงความจำเพาะของสิ่งมีชีวิต ซึ่งสามารถใช้เป็นเทคนิคในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตได้หลายกลุ่ม เช่น สัตว์ป่า (Panday et al., 2014; ฐิติกา และภูวดล, 2556) สัตว์เลี้ยง (Lopez et al., 1996) และไม้ดอก (Kress et al., 2005) เป็นต้น ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจพิสูจน์ระบุชนิดของสัตว์และพืชสำหรับงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ได้หากชิ้นชีววัตถุพยานนั้นไม่ได้อยู่ในรูปปกติ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์นั้น นิยมเอามาจากไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ ซึ่งพบความหลากหลายของลำดับเบสดังกล่าวในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอนั้นมีข้อได้เปรียบสำหรับการนำมาใช้งานด้านนิติวิทยาศาสตร์ดีกว่าดีเอ็นเอจากนิวเคลียส (nuclear DNA) เนื่องจากมีจำนวนซ้ำมาก (high copy number) และทนต่อสภาพแวดล้อมภายนอกได้ดีกว่า ทำให้การตรวจพิสูจน์จากชีววัตถุพยานที่มีปริมาณน้อยนั้นมีความแม่นยำและรวดเร็วมากขึ้น

ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอโดยทั่วไปมีขนาดประมาณ 16 kb ประกอบไปด้วยยีน 37 ยีน เป็นยีนที่ถอดรหัสเป็น Tranfer RNA (tRNA) จำนวน 22 ยีน เป็น ribosomal RNA (rRNA) จำนวน 2 ยีนและยีนที่แสดงออกเป็นโปรตีนจำนวน 13 ยีน (ฐิติการ และภูวดล, 2556) โดยมีโครงสร้างดังภาพที่ 1 ทั้งนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์อาจมีการเปลี่ยนแปลงได้ขึ้นอยู่กับความห่างของสายวิวัฒนาการ แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าสัตว์มีกระดูกสันหลังหลายชนิด น่าจะมีลำดับเบสบางส่วนของ 12S และ 16S rRNA ที่คล้ายคลึงกัน (Kitano et al., 2007)



ภาพที่ 1 แผนผังของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่แสดง hypervariable region (HV1 และ HV2), 12S และ 16S rRNA (Holland and Parsons., 1999)

ยีน cytochrome b และ cytochrome c oxidase นั้นเป็นยีนที่อยู่ในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่นิยมนำมาใช้ในการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตในสัตว์ (Panday et al., 2014) และไม้ดอก (Kress et al., 2005) ในขณะที่ยีนตำแหน่ง D-loop ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอใช้สำหรับมนุษย์ ซึ่งเป็นตำแหน่งที่สำคัญต่อการเริ่มต้นการจำลองไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ และมีโปรโมเตอร์ของกระบวนการทรานสคริปชันประกอบกับมีความแปรปรวนของลำดับนิวคลีโอไทด์มากในมนุษย์ (Jazin , Soodyall, 1998) อย่างไรก็ตาม ยังไม่พบรายงานการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จาก D-loop มาใช้ในการระบุชนิดสัตว์

ในงานวิจัยนี้จึงได้นำการออกแบบไพรเมอร์บริเวณ D-loop ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของสัตว์ 5 ชนิด ได้แก่ สุนัข (*Canis fanilliaris*) เสือโคร่ง (*Panthera tigris*) กระบือ(*Bubalus bulais*) ช้างเอเชีย (*Elephas maximus*) และแมวบ้าน (*Felis catus*) โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นขนและเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของ D-loop เปรียบเทียบกับ 12S และ 16S rRNA (Kitano et al., 2007)

วัตถุประสงค์การวิจัย

ศึกษาความเป็นไปได้จากการใช้ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอบริเวณ D-loop ในการจำแนกชนิดสัตว์สำหรับงานด้านนิติวิทยาศาสตร์

วิธีการวิจัย

ตัวอย่างชีววัตถุ

ได้แก่ ขนเสือ ขนช้างเอเชีย และขนควาย ได้รับความอนุเคราะห์จากสวนเสือศรีราชา ขนแมวบ้าน และสุนัข ได้รับความอนุเคราะห์จากเจ้าของแมวและสุนัขที่ไม่ประสงค์ออกนาม

การออกแบบไพรเมอร์

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอจากฐานข้อมูล GenBank ของสุนัข เสือโคร่ง กระบือ ช้างเอเชีย และแมวบ้าน มาทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะด้วยโปรแกรม Perfect Primer Design software จาก Thermofisher Scientific และตรวจสอบความจำเพาะด้วย M6 alignment explorer software

การสกัดดีเอ็นเอจากขนสัตว์

ใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป QIAamp® DNA micro kit โดยใช้ขนสัตว์ประมาณ 20 เส้น ยกเว้นช้างใช้ 2-3 เส้น ในการสกัด โดยทำการย่อยชิ้นขนให้เล็กด้วยการตัดก่อนเติม ATL buffer ปริมาตร 180 µl ย่อยด้วยเอนไซม์ Proteiase K 600 mAU/ml (AU = Activity unit) ปริมาตร 20 µl และ 1 M DTT ปริมาตร 20 µl บ่มที่ 56 องศา เป็นเวลา 24 ชั่วโมงหรือจนสารละลายใส จากนั้นแยกดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วย QIAamp MinElute column ล้างด้วยสารละลาย AW1 และ AW2 ตามลำดับ จากนั้นชะดีเอ็นเอด้วย AE buffer ปริมาตร 30-50 µl และวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่อง NaNodrop (MAESTROGEN, Taiwan) และรายงานผลการสกัดในหน่วยนาโนกรัมต่อไมโครลิตร

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

นำจีโนมิกดีเอ็นเอของสัตว์ต่าง ๆ ที่สกัดปริมาณ 10 นาโนกรัม มาทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของ D-loop โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ในปริมาตร 10 ไมโครลิตร โดยใช้ไพรเมอร์ดังตารางที่ 1 มีอุณหภูมิและรอบในการทำปฏิกิริยา ดังนี้ Denaturation 94 ^{O}ซ เป็นเวลา 5 นาที Annealing 50 ^{O}ซ เป็นเวลา 30 วินาที และ Extension 72 ^{O}ซ เป็นเวลา 60 วินาที จำนวนรอบ 35 รอบ หลังการทำปฏิกิริยาแล้วให้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ ก่อนทำการตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้ด้วย 1% อะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส และย้อมด้วย GelRed® ก่อนทำการตรวจสอบด้วยแสงอัลตร้าไวโอเลต เปรียบเทียบกับชิ้นส่วนของ 12S และ 16S rRNA ไพรเมอร์สำหรับ 12S rRNA และ 16S จาก Kitano et al., 2007 ได้แก่ 5'-CCCAAACTGGGATTAGATACCC-3' และ 5'-GTTTGCTGAAGATGGCGGTA-3' สำหรับ 12S rRNA และ 5'- GCCTGTTTACCAAAAACATCAC-3' และ 5'- CTCCATAGGGTCTTCTCGTCTT-3' สำหรับ 16S rRNA

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาชีวเคมีและภาควิชานิติวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

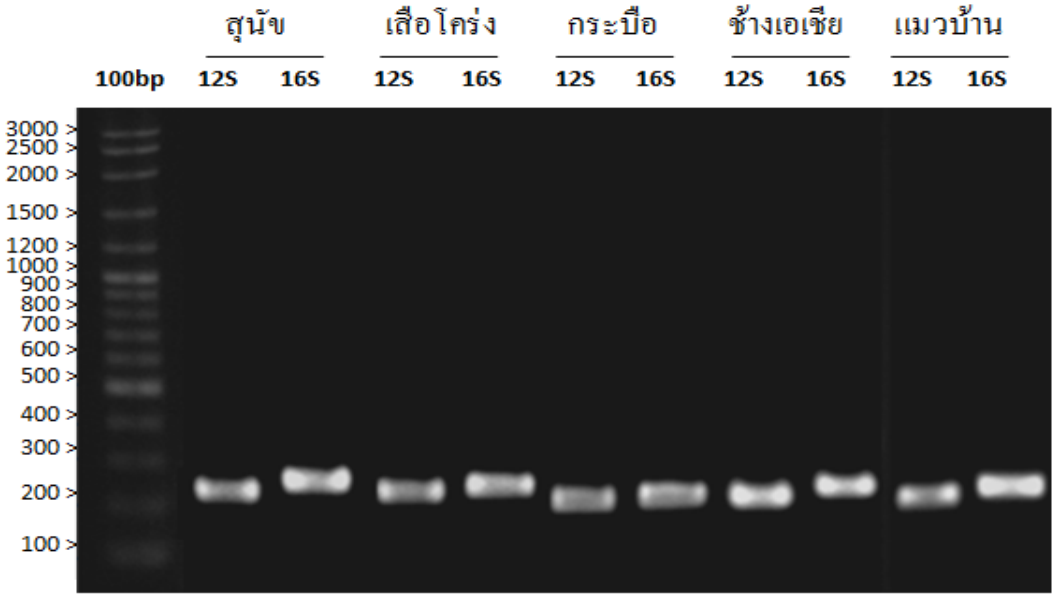
ผลการวิจัย

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลของสัตว์ต่าง ๆ ได้แก่ สุนัข เสือโคร่ง กระบือ ช้างเอเชีย และแมวบ้าน มาทำการวิเคราะห์เพื่อหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมและความเป็นไปได้ในการจับอย่างจำเพาะ พบว่าได้ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดสอบ 5 คู่ โดยมีขนาดของ D-loop ของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ตามที่ระบุไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ออกแบบจาก D – loop ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของสุนัข เสือ กระบือ ช้าง และแมว

สัตว์	ฐานข้อมูลของสัตว์	Forward primer	Reverse primer	**ขนาด** (bp)
สุนัข	*Canis fanilliaris*	GAGAACATATGCCCTCCCTAA	CTCATCTAGGCATTTTCAGTGC	1769
เสือโคร่ง	*Panthera tigris*	GAGAACATATGCCCTCCCTAA	CTCATCTAGGCATTTTCAGTGC	1470
กระบือ	*Bubalus bulais*	CAGAAAAGGAGAACAACCAACC	CTCATCTAGGCATTTTCAGTGC	1156
ช้างเอเชีย	*Elephas maximus*	CTAAGGGTATTCAGGGAAGAGG	GCTACATTAACGAGATGGGGTA	1636
แมวบ้าน	*Felis catus*	GAGAACATATGCCCTCCCTAA	TGTTTATGGAGTCTGGCGACT	1412

ไพรเมอร์ดังกล่าวได้นำมาทำการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากขนสัตว์เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (template) สำหรับขนสัตว์ที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ เบื้องต้นได้เลือกใช้ขนจากสัตว์ที่มักมีปัญหาทางด้านการระบุชนิดสัตว์เมื่อเกิดคดีความและสามารถหาได้จากแหล่งที่เพาะเลี้ยงตามสวนสัตว์ ได้แก่ เสือ และช้างเอเชีย และที่เลี้ยงตามบ้าน ได้แก่ สุนัข กระบือ และแมวบ้าน ซึ่งสามารถสกัดได้ในปริมาณ 68.5, 38.8, 87.3, 42.1 และ 104.78 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร แต่ยังไม่สามารถเพิ่มชิ้นส่วน D-loop จากสัตว์ต่าง ๆ ที่ต้องการได้โดยใช้ปฏิกิริยาดังกล่าวที่กล่าวมาข้างต้น ณ ปัจจุบัน แต่อย่างไรก็ตามสามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของ 12S และ 16S rRNA ของสัตว์ทุกชนิดได้ขนาดประมาณ 220 คู่เบส ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ผลการเพิ่มชิ้นส่วน 12S rRNA (12s) และ16S rRNA (16s) ของสัตว์ที่ใช้ในการทดลอง

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

เมื่อใช้ไพรเมอร์บริเวณ D-loop ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่ออกแบบไว้สำหรับการระบุชนิดของสัตว์ 5 ชนิด ได้แก่ สุนัข เสือโคร่ง กระบือ ช้างเอเชีย และแมวบ้าน โดยใช้ปฏิกิริยาดังที่กล่าวมาข้างต้น นั้นยังไม่สามารถประสบความสำเร็จได้ ซึ่งจำเป็นต้องศึกษาหาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา เพื่อให้สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ต้องการต่อไปได้ ทั้งนี้เนื่องจากบริเวณ D-loop ซึ่งมีความหลากหลายหลายบริเวณ เช่น hypervariable region 1, 2 และ 3 ซึ่งสัตว์แต่ละสายพันธุ์ถึงแม้จะเป็นสัตว์ประเภทเดียวกันก็ยังมีความแตกต่างกันได้ เช่น ความแตกต่างที่พบในสุนัขแต่ละสายพันธุ์ เป็นต้น และการออกแบบไพรเมอร์นั้นได้จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของสัตว์ชนิดต่าง ๆ ที่มาจากฐานข้อมูลใน GenBank น่าจะมีความแตกต่างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของสัตว์ป่าและสัตว์เลี้ยงที่นำใช้ในการทดสอบอยู่บ้าง อย่างไรก็ตามพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณ 12S และ 16S rRNA ที่มีตำแหน่งจับของไพรเมอร์ในสัตว์ที่หลากหลายได้ เมื่อใช้ไพรเมอร์ 12S และ 16S rRNA (Kitano et al., 2007) และพบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 12S และ 16S rRNA ที่ตรงกับฐานข้อมูลของสัตว์ต่าง ๆ ได้จริง (ยังไม่แสดงผล) และอย่างไรก็ตามงานวิจัยชิ้นนี้ถือเป็นความพยายามในการนำ D-loop ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอมาใช้ในงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ครั้งแรกของไทย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ คุณทิติกา กิจพิพิจ สาขาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลา สำหรับความเอื้อเฟื้อไพรเมอร์ 12S และ 16S ในงานวิจัยนี้ และสำนักงานพิสูจน์หลักฐานตำรวจสำหรับงบประมาณบางส่วนในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

ฐิติกา กิจพิพิธ, ภูวดล ธนะเกียรติไกร. การตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอเพื่อระบุชนิดของสัตว์ป่าในงานนิติ วิทยาศาสตร์. วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ 2013; 23: 727-740.

Jazin E, Soodyall H, Jalonen P, Lindholm E, Stoneking M, Gyllensten U. Mitochondrial mutation rate revisited: hot spots and polymorphism. Nature Genet 1998; 18: 109-110.

Kitano T, Umetsu K, Tian W, Osawa M. Two universal primer sets for species identification among vertebrates. International journal of legal medicine 2007; 121: 423-427.

Kress W. J, Wurdack K. J, Zimmer E. A, Weigt L. A , Janzen D. H. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. PNAS 2005; 102: 8369-8374.

Lopez J. V, Cevario S, O'Brien S. J. Complete nucleotide sequences of the domestic cat *(Felis catus)* mitochondrial genome and a transposed mtDNA tandem repeat *(Numt)* in the nuclear genome. Genomics 1996; 33: 229-246.

Panday R., Jha D. K, Thapa N, Pokharel B. R., Aryal N. K. Forensic wildlife parts and their production identification and individualization using DNA barcoding. The open forensic science journal 2014; 7: 6-13.

Pang X, Liu C, Shi L, Liu R., Liang D, Li H, et al. Utility of the *trnH-psbA* intergenic spacer region and its combinations as plant DNA barcodes; a meta-analysis. PLOS ONE 2012; 7: e48833.