

การตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ โดยใช้ดีเอ็นเอจากฟันน้ำนมที่เป็นโรคฟันผุ Forensic Identification by Polymerase Chain Reaction of DNA Extracted from Primary Teeth with Dental Caries

รุจี ดันเหลือง¹, ธาณินทร์ ภูพัฒน์², ภาพิมล ชมภูอินทร์³, อะนันท์ เอี่ยมอรุณ⁴
¹นักศึกษาระดับปริญญาโท สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
²ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
³ภาควิชาทันตกรรมจัดฟันและทันตกรรมสำหรับเด็ก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
⁴ภาควิชาชีววิทยาช่องปากและวิทยาการวินิจฉัยโรคช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Rujee Tonleuang¹, Tanin Bhoopat², Papimon Chompu-Inwai³, Anak Iamaroon⁴
¹Master's Student in Forensic Science, Graduate School, Chiang Mai University
²Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Chiang Mai University
³Department of Orthodontics and Pediatric Dentistry, Faculty of Dentistry, Chiang Mai University
⁴Department of Oral Biology and Diagnostic Sciences, Faculty of Dentistry, Chiang Mai University

ชม. ทันตสาร 2564; 42(1): 139-149
CM Dent J 2021; 42(1): 139-149

Received: 12 November, 2019
Revised: 31 March, 2020
Accepted: 21 April, 2020

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาผลของระยะเวลาในฟันน้ำนมที่เป็นโรคฟันผุ

วัสดุและวิธีการ: นำดีเอ็นเอจากตัวอย่างฟันกรามน้ำนมที่เป็นโรคฟันผุในเด็กเชื้อชาติไทยอายุไม่เกิน 12 ปี จำนวน 26 ตัวอย่าง และนำดีเอ็นเอจากฟันมาตรวจเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอจากเลือดของบุคคลคนเดียวกัน โดยการทดลองแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 13 ตัวอย่าง โดยใช้ฟันกรามน้ำนมที่เป็นโรคฟันผุตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน และ 1 เดือนตามลำดับ แล้วนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วย

Abstract

Objective: The aim of this study was to determine the effect of time of on personal identification using human deciduous teeth with dental caries.

Methods: Human genomic DNA isolated from deciduous molar teeth in Thai children (n=26) aged under twelve years was compared with DNA from the blood of the same individuals. All samples were equally divided into two

Corresponding Author:

อะนันท์ เอี่ยมอรุณ

ศาสตราจารย์ (เชี่ยวชาญพิเศษ) ดร., ภาควิชาชีววิทยาช่องปากและวิทยาการวินิจฉัยโรคช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 50200

Anak Iamaroon

Professor, Dr., Department of Oral Biology and Diagnostic Sciences, Faculty of Dentistry, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand
E-mail: iamaroon@yahoo.com

ชุดน้ำยาสำเร็จรูป QIAamp® DNA Investigator จากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์บริเวณไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ ในตำแหน่ง D3S1358, D5S818 และ D16S539 ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ผลการทดลอง: สามารถตรวจพบดีเอ็นเอจากฟันทั้ง 2 กลุ่ม โดยมีลักษณะไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอในตำแหน่ง D3S1358, D5S818 และ D16S539 ให้ผลตรงกันกับตัวอย่างเลือด

สรุปผลการทดลอง: ฟันน้ำนมที่เก็บไว้ให้อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 เดือน สามารถนำดีเอ็นเอจากฟันมาใช้ในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลได้

คำสำคัญ: ฟันน้ำนม ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ

groups. Each group comprised thirteen teeth, which were kept at room temperature for a period of one day and one month, respectively. Tooth DNAs were extracted using QIAamp® DNA Investigator and the microsatellite DNAs on D3S1358, D5S818 and D16S539 loci were amplified using polymerase chain reaction.

Results: DNA could be detected from two groups. The microsatellite DNA on D3S1358, D5S818 and D16S539 loci showed the same results as the blood samples.

Conclusion: DNA extracted from deciduous teeth stored at room temperature for one month could be used for personal identification.

Keywords: deciduous teeth, polymerase chain reaction, microsatellite DNA

บทนำ

กรณีก่อเหตุฆาตกรรมหรือการเกิดเหตุร้ายพิบัติทางธรรมชาติซึ่งอาจทำให้ไม่สามารถระบุตัวบุคคลของผู้ก่อเหตุหรือเหยื่อผู้เคราะห์ร้ายได้ จึงจำเป็นต้องใช้กระบวนการทางนิติวิทยาศาสตร์เข้ามาช่วยในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของบุคคล นิติวิทยาศาสตร์เป็นการประยุกต์วิทยาศาสตร์หลายสาขามาใช้เพื่อประโยชน์ทางนิติบัญญัติในเรื่องของการออกกฎหมาย การคลี่คลายปัญหาและพิสูจน์ข้อเท็จจริงในคดีความเพื่อผลในการบังคับใช้กฎหมายและการลงโทษผู้กระทำความผิด ประกอบด้วย สาขาวิชานิติเวชศาสตร์ (forensic medicine) นิติวิศวกรรมศาสตร์ (forensic engineering) นิติทันตวิทยา (forensic odontology) นิติเภสัชวิทยา (forensic pharmacy) นิติมานุษยวิทยา (forensic anthropology) และนิติกีฏวิทยา (forensic entomology)⁽¹⁾

ในกรณีที่เกิดเหตุการณ์ภัยพิบัติคลื่นยักษ์สึนามิในปี พ.ศ. 2547 ในประเทศไทย ได้มีการนำนิติวิทยาศาสตร์มาใช้ในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล และจากสถิติข้อมูลผู้เสียชีวิตในวันที่ 26 เดือนธันวาคม พ.ศ. 2547 ถึงวันที่ 16 พฤษภาคม

พ.ศ. 2550 มีจำนวนผู้เสียชีวิตที่สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลได้จำนวนทั้งหมด 3,308 ราย โดยตรวจพบจากหลักฐานทางดีเอ็นเอร้อยละ 24 ลายพิมพ์นิ้วมือร้อยละ 35 ข้อมูลทางทันตกรรมร้อยละ 40 และรูปพรรณสัณฐานร้อยละ 1⁽²⁾

จากข้อมูลสถิติข้างต้นพบว่า การตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล จากข้อมูลทางทันตกรรมสามารถยืนยันตัวบุคคลได้สูงที่สุด การเก็บลายพิมพ์นิ้วมือบางรายอาจจะไม่มีการบันทึกข้อมูลลายนิ้วมือในฐานข้อมูล และการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอนั้นใช้ระยะเวลาและยากต่อการตรวจวิเคราะห์เนื่องจากปัจจัยทางสภาพแวดล้อม ศพมีการเน่าเปื่อยและทำให้สภาพชีววัตถุมีการเปลี่ยนแปลง รวมทั้งค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอราคาสูงและใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์นาน ซึ่งในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์จากฟัน แม้ศพอยู่ในสภาพเน่าเปื่อย จะยังสามารถตรวจเปรียบเทียบกับฟันในผู้เสียชีวิตกับฐานข้อมูลทางทันตกรรมของผู้เสียชีวิตได้ เนื่องจากฟันมีความคงทนต่อสภาวะแวดล้อมได้ดี ดังนั้นจึงใช้ข้อมูลทางทันตกรรมในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลมากที่สุด

หลังจากเหตุการณ์สึนามิดังกล่าวทำให้นิติทันตวิทยา ได้

รับความสนใจมากขึ้นในประเทศไทย นิติทันตวิทยาเป็นการนำความรู้ทางศาสตร์และศิลป์ของวิชาทางทันตแพทยศาสตร์มาใช้ร่วมกับศาสตร์อื่นๆ ในทางนิติวิทยาศาสตร์ในกระบวนการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล

ปัจจุบันเด็กจำนวนมากยังไม่สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลได้เนื่องจากประวัติทางทันตกรรมในผู้ป่วยวัยเด็กได้รับการบันทึกประวัติน้อยหรือเด็กบางคนอาจจะยังไม่เคยได้รับการรักษาทางทันตกรรมมาก่อน เมื่อเปรียบเทียบกับวัยผู้ใหญ่ที่อาจมีการบันทึกประวัติการรักษาทางทันตกรรม อาทิ การถอนฟัน อุดฟัน รักษาฟัน และพิมพ์ฟันหรือถ่ายภาพทางรังสี เป็นต้น การตรวจฟันสามารถบ่งบอกถึงเอกลักษณ์บุคคลได้ เนื่องจากฟันมีลักษณะพิเศษเฉพาะในแต่ละบุคคล อาทิ การอุดฟัน การถอนฟัน ความกว้างของฟัน และการเรียงตัวของฟันแต่ละซี่โดยสามารถเช็คได้จากประวัติการรักษาฟัน บอกอายุได้โดยดูจากฟันน้ำนม ฟันแท้ และฟันกราม การสึกของฟัน และการร่นของเหงือก⁽³⁾

ในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลสามารถตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอจากฟันแทนการตรวจดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของร่างกายในกรณีที่เนื้อเยื่อส่วนอื่นของร่างกายเสื่อมสลายไป เนื่องจากฟันมีความคงทนต่อการย่อยสลายและความร้อนมากกว่าเนื้อเยื่ออื่นๆ ของร่างกาย และฟันอยู่ในขากรรไกรซึ่งเป็นส่วนที่สามารถป้องกันฟันไม่ให้ฟันถูกทำลายได้เมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมต่างๆ นอกจากนั้นฟันสามารถทนความร้อนได้ถึง 1,600 องศาเซลเซียส จึงมีการเปลี่ยนแปลงภายหลังการตายน้อยมาก^(4,5) และมีโอกาสเกิดการปนเปื้อนของดีเอ็นเอน้อยกว่าการสกัดดีเอ็นเอจากกระดูก⁽⁶⁾

ในปี ค.ศ. 2007 Prinz และคณะ ได้ศึกษาปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากฟันประเภทต่าง ๆ จากผลการศึกษาพบว่า ฟันที่มีโพรงเนื้อเยื่อใน (pulp chamber) ขนาดใหญ่จะเป็นแหล่งดีเอ็นเอได้ดีเนื่องจากพบปริมาณของเซลล์เนื้อเยื่อโพรงประสาทจำนวนมาก และฟันที่มีจำนวนรากฟันมากจะพบเซลล์ที่อยู่บริเวณเคลือบรากฟัน (cementum) มากกว่าทำให้มีปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้มากกว่าฟันที่มีเพียงรากเดียว ดังนั้นฟันที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล ควรเป็นฟันกรามหรือในกรณีที่ไม่มีฟันกราม อาจจะใช้ฟันกรามน้อยแทน⁽⁷⁾ ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Krisanaprakornkit และคณะ ในปี ค.ศ. 2006 โดยมีการศึกษาไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ (microsatellite DNA)

จากรากฟันของฟันเพียง 1 ซี่ โดยศึกษาไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอบนออโตโซม (autosome) จำนวน 3 ตำแหน่ง ได้แก่ vWA, D 19S253 และ Penta E และโครโมโซมเพศชายจากยีนอะเมลโลจีนิ (amelogenin gene) และเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือด จากรากฟัน 1 ซี่ ใช้ตัวอย่างฟันกรามแท้ซี่ที่สามและเลือด พบว่าสามารถใช้รากฟันในการระบุเพศและไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอของอาสาสมัครได้อย่างแม่นยำและไม่พบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอระหว่างตัวอย่างโดยสรุปแล้ว ดีเอ็นเอที่สกัดจากรากฟันของฟัน 1 ซี่มีคุณภาพดีและสามารถตรวจหาลักษณะไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอได้เช่นเดียวกันกับ ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเลือดหรือเนื้อเยื่อส่วนอื่นของร่างกาย⁽⁸⁾

นอกจากนั้น Piedad และ Juan ได้ศึกษาการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของฟันเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสกัดดีเอ็นเอ โดยการเปรียบเทียบส่วนของเนื้อฟัน (dentin) เคลือบรากฟัน และเนื้อเยื่อใน (pulp) ผลการศึกษาพบว่าสามารถตรวจพบดีเอ็นเอดำแหน่ง D17Z1 ได้ดีที่สุดคือเนื้อเยื่อจากโพรงประสาทฟัน ส่วนของเนื้อฟันและรากฟันจะให้ผลที่ใกล้เคียงกัน ผลการศึกษาไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA) พบว่าเนื้อฟันและรากฟันให้ผลดีที่สุดเหมาะแก่การนำมาตรวจหาดีเอ็นเอ เนื่องจากเป็นส่วนที่คงทนต่อการเสื่อมสลายและเกิดการปนเปื้อนต่อสิ่งภายนอกได้น้อย⁽⁹⁾

นอกเหนือจากการตรวจดีเอ็นเอจากฟันแท้แล้วยังมีรายงานวิจัยการตรวจดีเอ็นเอระบุเพศจากฟันน้ำนมได้ ในงานวิจัยของ Kumar และ Hegde ได้นำตัวอย่างฟันน้ำนมมาตรวจดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลทางนิติวิทยาศาสตร์ โดยสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟัน ด้วยวิธีฟีนอล-คลอโรฟอร์ม (phenol-chloroform extraction method) พบว่าในการตรวจดีเอ็นเอจากฟันเพศชายและเพศหญิง สามารถยืนยันด้วยตำแหน่งยีนอะเมลโลจีนิได้ร้อยละ 100 เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 เดือน⁽¹⁰⁾ นอกจากนั้น Prashant และ Shodan ได้ศึกษาปัจจัยทางสภาพแวดล้อมที่ส่งผลต่อการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลโดยระบุเพศจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟัน โดยใช้ตัวอย่างในการทดลอง 120 ตัวอย่าง แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 30 ตัวอย่าง กลุ่มที่หนึ่งเก็บไว้ในถังที่บรรจุน้ำ กลุ่มที่สอง สาม และสี่ นำไปฝังในทรายที่เก็บมาจากทะเล ดินและดินทราย

ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 2 เดือน จากนั้นนำเนื้อเยื่อจากโพรงประสาทฟันมาสกัดดีเอ็นเอและวิเคราะห์ตำแหน่งยีนอะเมโล-จินิน เพื่อระบุเพศของตัวอย่างดังกล่าว จากรายงานวิจัย พบว่าสามารถตรวจดีเอ็นเอจากฟันที่เก็บรักษาในสภาพแวดล้อมที่มีความแห้งได้ดีกว่าฟันที่อยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีความชื้น⁽¹¹⁾

Williams และคณะ ได้ทำการวิจัยการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอเพื่อระบุเพศจากฟันน้ำนมที่ถูกเผาด้วยความร้อนในช่วงอุณหภูมิ 100-500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พบว่าอุณหภูมิที่ยังสามารถตรวจพบยีนอะเมโลจินินได้จะอยู่ในช่วงอุณหภูมิต่ำกว่า 200 องศาเซลเซียส⁽¹²⁾

ในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลจากตัวอย่างฟันที่เป็นโรคฟันผุนั้น Esther และคณะได้มีการศึกษาวิจัยผลของการสะสมแบคทีเรียต่อการตรวจดีเอ็นเอในการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล โดยการนำตัวอย่างฟันทั้งหมด 120 ตัวอย่างมาทำการทดสอบโดยแบ่งออกเป็นสองกลุ่ม กลุ่มที่หนึ่งเป็นฟันที่มีสุขภาพดีไม่มีรอยโรค 60 ตัวอย่าง และกลุ่มที่สองเป็นฟันที่มีรอยโรคการผุ 60 ตัวอย่าง ผลการทดลองพบว่าสามารถตรวจดีเอ็นเอได้จำนวน 81 ตัวอย่าง จาก 120 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 67.5 จากงานวิจัยจึงสรุปได้ว่าแบคทีเรียไม่มีผลต่อการตรวจหาดีเอ็นเอในการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล⁽¹³⁾

จากรายงานวิจัยข้างต้นพบว่าดีเอ็นเอมีบทบาทอย่างมากในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล เนื่องจากดีเอ็นเอเป็นแหล่งเก็บข้อมูลทางพันธุกรรม ซึ่งสารพันธุกรรมเหล่านี้ถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรมไปยังลูกหลานได้ ดังนั้นการตรวจหาดีเอ็นเอจากฟันที่มีโรคฟันผุจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลในวัยเด็กที่ยังคงมีฟันน้ำนมเหลืออยู่ เพื่อให้ผลการศึกษาที่ได้เป็นแนวทางเลือกหนึ่งในการใช้ดีเอ็นเอจากฟันน้ำนมที่เป็นโรคฟันผุในการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล และสามารถประยุกต์ใช้งานด้านนิติวิทยาศาสตร์ต่อไปในอนาคต

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษานี้ผ่านการรับรองโครงการวิจัยตามแนวทางหลักจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ จากคณะกรรมการพิทักษ์สวัสดิภาพและป้องกันภัยอันตรายของผู้ถูกวิจัย คณะทันต-แพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เอกสารเลขที่ 18/2560 เกณฑ์ในการคัดเลือกตัวอย่างในการทดลองใช้ฟันน้ำนมในตำแหน่งฟันกรามที่เป็นผุเล็กน้อยและมีภาระละลายของรากฟัน นำไปสู่การถอนฟัน ใช้ฟันจากเด็กที่มีช่วงอายุไม่เกิน 12 ปี การ

ทดลองจะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 13 ซี่ กลุ่มที่ 1 ฟันน้ำนมที่เป็นโรคฟันผุตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน กลุ่มที่ 2 ฟันน้ำนมที่เป็นโรคฟันผุตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 เดือน โดยจะนำดีเอ็นเอจากฟันน้ำนมมาตรวจเปรียบเทียบดีเอ็นเอจากเลือดที่ติดอยู่บนผ้าก๊อชและนำมาตรวจดีเอ็นเอในตำแหน่ง D3S1358 D5S818 และ D16S539 โดยใช้ดีเอ็นเอจากห้องปฏิบัติการตรวจดีเอ็นเอ ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) แสดงในตารางที่ 1 สาเหตุในการเลือกดีเอ็นเอใน 3 ตำแหน่งนี้ เนื่องจากในแต่ละตำแหน่ง มีค่า polymorphism information content (PIC) คือค่าที่แสดงความหลากหลายของข้อมูลในตำแหน่งที่ศึกษา ถ้าหากมีค่ามากก็จะมีหลากหลายมาก มีความเหมาะสมในการใช้ในการตรวจพิสูจน์บุคคล⁽¹⁴⁾

การแบ่งระดับฟันผุ

ฟันผุระดับมาก หมายถึง ฟันผุถึงระดับโพรงประสาทฟันและรากฟัน

ฟันผุระดับปานกลาง หมายถึง ฟันผุถึงระดับเนื้อฟัน

ฟันผุระดับน้อย หมายถึง ไม่สามารถสังเกตเห็นรอยโรคฟันผุได้ด้วยตาเปล่า

วิธีการวิจัย

1. ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างฟันก่อนนำมาสกัดดีเอ็นเอ

ล้างทำความสะอาดฟันด้วยน้ำกลั่น และแช่ในเอทานอล (ethanol) เป็นเวลา 15 นาที เพื่อฆ่าเชื้อโรคที่ติดอยู่บนผิวฟัน จากนั้นนำฟันไปบดโดยใช้ครกบดจนเป็นผงละเอียดเก็บไว้ในหลอดปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเตรียมไว้สำหรับการสกัดดีเอ็นเอ

ตารางที่ 1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่ใช้ในงานทดลอง

Table 1 The nucleotide sequences of primers used in this study

Primer	The nucleotide sequences (5'→3' direction)
D3S1385	Forward: 5'-ACT GCA GTC CAA TCT GGG T-3'
	Reward: 5'-ATG AAA TCA ACA GAG GCT TG-3'
D5S818	Forward: 5'-GGGTGATTTTCCTCTTTGGT-3'
	Reward: 5'-TGATTCCAATCATAGCCACA-3'
D16S539	Forward: 5'-GATCCCCAAGCTCTTCCTCTT-3'
	Reward: 5'-ACGTTTGTGTGTGCATCTGT-3'

2. ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากฟัน

ในการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างฟันจะใช้ชุดสกัดน้ำยาสำเร็จรูป QIAamp® DNA Investigator (Qiagen, Germany) โดยมีขั้นตอนดังนี้ นำตัวอย่างฟัน 100 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดไมโครเซ็นติฟิวก์ (micro centrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิตร แล้วเติมสารละลายบัฟเฟอร์ ATL (buffer ATL) ปริมาตร 360 μ l และเอ็นไซม์ย่อยสลายโปรตีน (proteinase K) ปริมาตร 20 μ l นำไปบ่มข้ามคืนบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (thermomixer) ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เติมสารละลายบัฟเฟอร์ AL (buffer AL) ปริมาตร 300 μ l วางหลอดในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 900 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที แล้วนำสารละลายส่วนใสใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นติฟิวก์ ขนาด 1.5 มิลลิตร เติมเอทานอลปริมาตร 150 μ l นำส่วนใสไปเปิดใส่ลงในแท่งกรอง (filter column) ที่วางซ้อนอยู่ในหลอดทดลอง (collection tube) 2 มิลลิตร ปิดฝานำไปปั่นเหวี่ยง 8,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาทีและวางแท่งกรองในหลอดทดลองหลอดใหม่ เติมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับล้างขั้นตอนที่ 1 (buffer AW1) ปริมาตร 600 μ l ปิดฝานำไปปั่นเหวี่ยง 8,000 รอบต่อนาที เติมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับล้างขั้นตอนที่ 2 (buffer AW2) ปริมาตร 700 μ l ปิดฝานำไปปั่นเหวี่ยง 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที วางแท่งกรองในหลอดทดลองหลอดใหม่ เติมเอทานอลปริมาตร 700 μ l ปิดฝานำไปปั่นเหวี่ยง 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาทีและวางแท่งกรองในหลอดทดลองหลอดใหม่ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้แผ่นเยื่อ (membrane) แห้ง วางแท่งกรองในหลอดไมโครเซ็นติฟิวก์ ขนาด 1.5 มิลลิตร เปิดฝาแท่งกรองและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 นาที เติมสารละลายบัฟเฟอร์ ATL ปริมาตร 20 μ l ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที นำดีเอ็นเอจากฟันเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากเลือด

ในการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด ใช้ชุดสกัดน้ำยาสำเร็จรูป QIAamp® DNA Investigator Kit (Qiagen, Germany) ในการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดมีขั้นตอนดังนี้ คือ ตัดเศษผ้าก๊อชเปื้อนเลือดขนาด 0.5 ตารางเซนติเมตร ให้

เป็นชิ้นเล็กๆ นำไปใส่ในหลอดไมโครเซ็นติฟิวก์ ขนาด 2.0 มิลลิตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์ ATL ปริมาตร 300 μ l และเอ็นไซม์ย่อยสลายโปรตีน ปริมาตร 20 μ l นำไปบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ แล้วเติมสารละลายบัฟเฟอร์ AL ปริมาตร 300 μ l แล้วนำหลอดใส่ในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 900 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที นำสารละลายส่วนใสไปเปิดใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นติฟิวก์ ขนาด 1.5 มิลลิตร เติมเอทานอลปริมาตร 150 μ l นำส่วนใสใส่ลงในแท่งกรองที่วางซ้อนอยู่ในหลอดทดลอง ปริมาตร 2.0 มิลลิตร ปิดฝานำไปปั่นเหวี่ยง 8,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที และวางแท่งกรองในหลอดทดลองหลอดใหม่ ปริมาตร 2.0 มิลลิตรหลอดใหม่ นำหลอดทดลองหลอดเดิมทิ้ง เติมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับล้างขั้นตอนที่ 1 ปริมาตร 500 μ l ในแท่งกรอง ปิดฝานำไปปั่นเหวี่ยง 8,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เติมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับล้างขั้นตอนที่ 2 ปริมาตร 700 μ l ปิดฝานำไปปั่นเหวี่ยง 8,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที และวางแท่งกรองในหลอดทดลองหลอดใหม่ เติมเอทานอลปริมาตร 700 μ l ปิดฝานำไปปั่นเหวี่ยง 8,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาทีและวางแท่งกรองในหลอดทดลองหลอดใหม่ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้แผ่นเยื่อแห้ง วางแท่งกรองในหลอดไมโครเซ็นติฟิวก์ ขนาด 1.5 มิลลิตร นำหลอดเก่าทิ้งค่อยๆ เปิดฝาแท่งกรอง และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที เติมสารละลายบัฟเฟอร์ ATL ปริมาตร 20 μ l ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที นำดีเอ็นเอจากเลือด เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ D3S1358, D5S818 และ D16S539 โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ไลเซชัน

นำดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างฟันและตัวอย่างเลือด ปริมาตร 4 μ l ใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบของการเพิ่มปริมาณ ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอบนตำแหน่ง D3S1358, D5S818 และ D16S539 ในสารละลายปริมาตรสุดท้าย 10 μ l โดยประกอบไปด้วย 2XJumpStart™ REDTaq® Ready-Mix™ Reaction Mix (SIGMA®, Germany) ปริมาตร

5.0 μ l, ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) 4.0 μ l, 4 μ M Primer mix (ตำแหน่ง D3S1358, D5S818, D16S539) (SIGMA[®], Germany) 1.0 μ l นำหลอดทดลองเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (thermal cycler) โดยใช้โปรแกรมปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ ดังนี้ แยกสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ออกจากกัน (denaturation) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที อบเหนียว (annealing) ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที สังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ (extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวนรอบในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอทั้งหมด 32 รอบ และพักทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที

5. การแยกแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณ D3S1358, D5S818 และ D16S539 ด้วยพอลิครีลาไมด์อิเล็กโตร-ฟอเรซิส

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณ D3S1358, D5S818 และ D16S539 ที่เพิ่มปริมาณแล้ว ปริมาตร 10 μ l มาวิเคราะห์ขนาดและรูปแบบพอลิครีลาไมด์อิเล็กโตรฟอเรซิส ในแนวตั้ง ความเข้มข้นร้อยละ 8.5 โดยใช้ชุดการเคลื่อนสู่ขั้วไฟฟ้าชนิด Bio-Rad Protean Li Xi Cell ในสารละลายสารละลายบัฟเฟอร์ TBE (tris boric acid EDTA; TBE) เป็นตัวนำกระแสไฟฟ้า จ่ายกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 90 โวลต์ นาน 16.5 ชั่วโมง ย้อมสีเจลด้วยวิธีย้อมเงิน (silver staining) เพื่อตรวจสอบขนาดและชนิดอัลลีล (allele) ของตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ของตัวอย่างฟันและเลือด

ผลการศึกษา

ผลการตรวจดีเอ็นเอของฟันน้ำนมที่เป็นโรคฟันผุตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วันและ 1 เดือน พบว่าฟันที่มีการผุในระดับมาก ปานกลางและน้อย สามารถตรวจพบดีเอ็นเอได้ในฟันทุกซี่ดังที่แสดงในตารางที่ 2 และ ตารางที่ 3 ตามลำดับ ซึ่งผลการตรวจแถบดีเอ็นเอในฟันน้ำนมที่เป็นโรคฟันผุตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วันและ 1 เดือน พบว่าเมื่อเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอระหว่างตัวอย่างฟันกับเลือดแล้ว แถบดีเอ็นเอปรากฏในตำแหน่งเดียวกัน ในทั้ง ตำแหน่ง D3S1358, D5S818 และ D16S539 ดังที่แสดงในรูปที่ 1 และ 2

ตารางที่ 1 แสดงผลการตรวจดีเอ็นเอ ของกลุ่มที่ 1

Table 1 DNA results of Group 1

ลำดับฟัน	ระดับการผุของฟัน	ผลปรากฏของแถบดีเอ็นเอ		
		D3S1358	D5S818	D16S539
1	ปานกลาง	+	+	+
2	น้อย	+	+	+
3	ปานกลาง	+	+	+
4	ปานกลาง	+	+	+
5	มาก	+	+	+
6	มาก	+	+	+
7	ปานกลาง	+	+	+
8	มาก	+	+	+
9	มาก	+	+	+
10	มาก	+	+	+
11	ปานกลาง	+	+	+
12	ปานกลาง	+	+	+
13	มาก	+	+	+

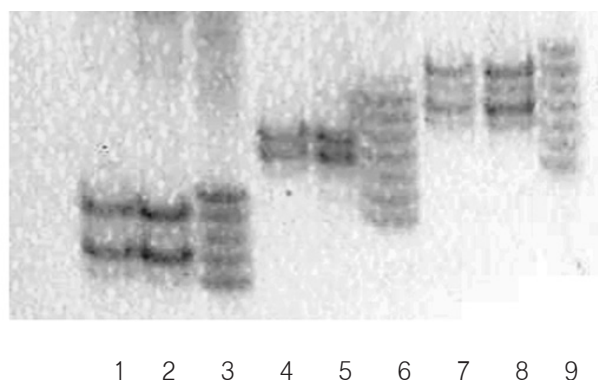
ตารางที่ 2 แสดงผลการตรวจดีเอ็นเอ ของกลุ่มที่ 2

Table 2 DNA results of Group 2

ลำดับฟัน	ระดับการผุของฟัน	ผลปรากฏของแถบดีเอ็นเอ		
		D3S1358	D5S818	D16S539
1	ปานกลาง	+	+	+
2	ปานกลาง	+	+	+
3	น้อย	+	+	+
4	น้อย	+	+	+
5	มาก	+	+	+
6	มาก	+	+	+
7	มาก	+	+	+
8	ปานกลาง	+	+	+
9	มาก	+	+	+
10	ปานกลาง	+	+	+
11	มาก	+	+	+
12	มาก	+	+	+
13	มาก	+	+	+

บทวิจารณ์

จากผลการทดลองพบว่า เมื่อนำฟันที่เป็นโรคฟันผุเก็บรักษาในระยะเวลา 1 เดือนสามารถตรวจพบดีเอ็นเอได้ ผลการทดลองดังกล่าวมีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Esther และคณะ⁽¹³⁾ ศึกษาการตรวจดีเอ็นเอจากฟันแท้ที่เป็นโรคฟันผุ โดยนำส่วนของเนื้อเยื่อโพรงประสาทในฟันที่

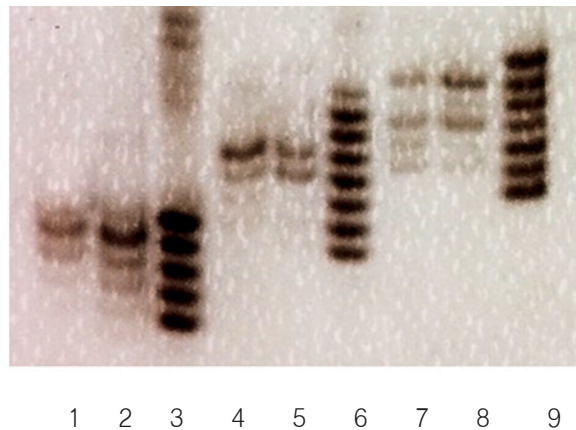


รูปที่ 1 แสดงลักษณะดีเอ็นเอจากฟันที่เป็นโรคฟันผุที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด

Figure 1 DNA from teeth was kept at room temperature for a period of one day as compared with DNA, from the blood samples.

- เลนที่ 1-3 แสดงผลการตรวจดีเอ็นเอในตำแหน่ง D3S1358 โดยแสดงตามลำดับดังนี้
 - ดีเอ็นเอจากฟันที่เป็นโรคฟันผุที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน
 - ดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด
 - ดีเอ็นเอมาตรฐานในตำแหน่ง D3S1358
- เลนที่ 4-6 แสดงผลการตรวจดีเอ็นเอในตำแหน่ง D5S818 โดยแสดงตามลำดับดังนี้
 - ดีเอ็นเอจากฟันที่เป็นโรคฟันผุที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน
 - ดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด
 - ดีเอ็นเอมาตรฐานในตำแหน่ง D5S818
- เลนที่ 7-9 แสดงผลการตรวจดีเอ็นเอในตำแหน่ง D16S539 โดยแสดงตามลำดับดังนี้
 - ดีเอ็นเอจากฟันที่เป็นโรคฟันผุที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน
 - ดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด
 - ดีเอ็นเอมาตรฐานในตำแหน่ง D16S539

จะเห็นได้ว่าสามารถตรวจพบตำแหน่งดีเอ็นเอที่สกัดจากฟันกรามน้ำนมที่เป็นโรคฟันผุที่เก็บรักษาไว้ 1 วัน ได้ทั้งหมดทุกซี่ และมีการปรากฏแถบดีเอ็นเอทั้ง 3 ตำแหน่ง ตรงกับตัวอย่างเลือดของผู้ทดสอบ



รูปที่ 2 แสดงลักษณะดีเอ็นเอจากฟันที่เป็นโรคฟันผุที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 เดือน เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด

Figure 2 DNA from teeth was kept at room temperature for a period of one month as compared with DNAs from the blood samples.

- เลขที่ 1-3 แสดงผลการตรวจดีเอ็นเอในตำแหน่ง D3S1358 โดยแสดงตามลำดับดังนี้
 - ดีเอ็นเอจากฟันที่เป็นโรคฟันผุที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 เดือน
 - ดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด
 - ดีเอ็นเอมาตรฐานในตำแหน่ง D3S1358
- เลขที่ 4-6 แสดงผลการตรวจดีเอ็นเอในตำแหน่ง D5S818 โดยแสดงตามลำดับดังนี้
 - ดีเอ็นเอจากฟันที่เป็นโรคฟันผุที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 เดือน
 - ดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด
 - ดีเอ็นเอมาตรฐานในตำแหน่ง D5S818
- เลขที่ 7-9 แสดงผลการตรวจดีเอ็นเอในตำแหน่ง D16S539 โดยแสดงตามลำดับดังนี้
 - ดีเอ็นเอจากฟันที่เป็นโรคฟันผุที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 เดือน
 - ดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด
 - ดีเอ็นเอมาตรฐานในตำแหน่ง D16S539

จะเห็นได้ว่าสามารถตรวจพบตำแหน่งดีเอ็นเอที่สกัดจากฟันกรามน้ำนมที่เป็นโรคฟันผุที่เก็บรักษาไว้ 1 เดือนได้ทั้งหมดทุกซี่ และมีการปรากฏแถบดีเอ็นเอทั้ง 3 ตำแหน่ง ตรงกับตัวอย่างเลือดของผู้ทดสอบ

เป็นโรคฟันผุมารตรวจเปรียบเทียบกับฟันที่มีสุขภาพดีพบว่าสามารถตรวจพบติเอ็นเอได้ทั้ง 2 กลุ่มให้ผลการทดลองที่ไม่แตกต่างกัน เป็นข้อมูลยืนยันได้ว่าฟันที่เป็นโรคฟันผุสามารถตรวจพบติเอ็นเอ ได้เช่นเดียวกันกับฟันที่มีสุขภาพดี ในการศึกษาข้างต้นได้มีการนำส่วนของเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันมาตรวจเท่านั้น แต่การศึกษานี้ใช้ฟันน้ำนมทั้งซี่ในการตรวจหาติเอ็นเอ ซึ่งสามารถตรวจพบติเอ็นเอได้ทุกซี่

เนื่องจากติเอ็นเอสามารถตรวจพบได้ในบริเวณต่าง ๆ ของฟัน Gaytmenn และ Sweet ทำการศึกษาติเอ็นเอจากฟันในบริเวณต่าง ๆ ในส่วนของรากฟัน ที่ประกอบด้วยเคลือบรากฟัน เนื้อฟัน และโพรงประสาทฟัน พบปริมาณติเอ็นเอมากกว่า บริเวณตัวฟัน ถึง 10 เท่า เนื่องจากบริเวณตัวฟันประกอบด้วย เคลือบฟันและเนื้อฟันเป็นส่วนใหญ่ เคลือบฟันจะเป็นตัวป้องกันไม่ให้เนื้อฟันถูกทำลายจากสภาวะแวดล้อมภายนอกและเป็นส่วนที่ไม่พบเซลล์ที่มีชีวิต จึงทำให้ไม่สามารถตรวจ ติเอ็นเอได้จากเคลือบฟัน⁽¹⁵⁾ เซลล์สร้างเนื้อฟัน (odontoblast) เป็นส่วนของเซลล์ที่มีชีวิต เซลล์อยู่ระหว่างเนื้อฟันและโพรงประสาทฟัน สามารถพัฒนาเป็นเนื้อฟันได้สามารถตรวจพบติเอ็นเอได้⁽¹⁶⁾ เช่นเดียวกับโพรงประสาทฟัน ภายในประกอบด้วย เนื้อเยื่อโพรงประสาทฟัน เซลล์ชนิดต่าง ๆ เส้นประสาทจำนวนมาก เป็นส่วนที่ตรวจพบปริมาณติเอ็นเอมากที่สุด⁽¹⁷⁾ บริเวณปลายรากฟันจะประกอบด้วย เซลล์ของเคลือบรากฟัน (cementocyte) เป็นเซลล์ที่มีชีวิตสามารถตรวจพบติเอ็นเอได้⁽¹⁸⁾ มีการศึกษาของ Krisanaprakornkit และคณะ ศึกษาติเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์จากรากฟันของฟันเพียง 1 ซี่ เปรียบเทียบกับติเอ็นเอที่สกัดจากเลือด โดยเก็บไว้ในสภาพแวดล้อมต่างกัน ทั้งฟันไว้ในอุณหภูมิห้อง ฝังไว้ในดินและ แช่ฟันในน้ำทะเลเป็นเวลา 40 วัน ซึ่งผลการทดลองพบว่าสามารถใช้รากฟันจากทั้งสามกลุ่ม บ่งบอกเพศและไมโครแซทเทลไลต์ติเอ็นเอของอาสาสมัครได้อย่างแม่นยำและไม่พบการปนเปื้อนของติเอ็นเอระหว่างตัวอย่าง⁽⁸⁾

นอกจากนั้นได้มีการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลจากศพของผู้เสียชีวิตจากเหตุการณ์รถจมอยู่ใต้น้ำเป็นเวลาประมาณ 2 ปี โดย Hussam และคณะ ได้นำส่วนของรากฟันและตัวฟันมาทำการสกัดติเอ็นเอเปรียบเทียบ พบว่าส่วนบริเวณรากฟันตรวจพบปริมาณติเอ็นเอได้มากกว่าบริเวณตัวฟัน และทำการผ่าฟันตามแนวขวางแล้วนำมาส่องกล้องพบ

ว่าบริเวณรากฟันมีเซลล์เคลือบรากฟันจำนวนมาก เมื่อนำมาตรวจติเอ็นเอพบว่าสามารถนำส่วนของปลายรากฟันตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลจากไมโครแซทเทลไลต์ติเอ็นเอ ได้ทั้ง 16 ตำแหน่ง สามารถยืนยันศพของผู้เสียชีวิตได้จากปลายรากฟันเพียง 1 ซี่⁽¹⁹⁾

ในการทดลองนี้ ฟันที่นำมาใช้ทดลอง เป็นฟันกรามที่เป็นโรคฟันผุ โดยใช้ฟันทั้งซี่ในการตรวจหาติเอ็นเอ ในส่วนของเคลือบฟันรวมถึงเนื้อฟันอาจถูกทำลายไปบางส่วน ในกรณีที่มีฟันผุอย่างรุนแรงบริเวณโพรงประสาทฟันจะถูกทำลายไป ทำให้เนื้อเยื่อเซลล์ประสาทฟันถูกทำลายไปบางส่วน แต่ยังคงสามารถตรวจติเอ็นเอได้จากบริเวณรากฟัน ซึ่งมักจะพบบริเวณปลายรากฟันของฟันกรามมากกว่าฟันหน้า⁽²⁰⁾ จึงทำให้ตรวจพบติเอ็นเอจากฟันที่เป็นโรคฟันผุได้

Prashant และ Shodan ศึกษาในด้านปัจจัยทางสภาพแวดล้อมที่ส่งผลต่อการตรวจติเอ็นเอระบุเพศจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันในฟันน้ำนม แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม โดยเก็บไว้ในถังที่บรรจุน้ำ นำไปฝังในทรายที่เก็บมาจากทะเล ดิน และดินทรายตามลำดับ เป็นระยะเวลา 2 เดือน จากนั้นนำเนื้อเยื่อจากโพรงประสาทฟันมาตรวจติเอ็นเอตำแหน่งยืนอะเมโล-จินิน พบว่าสามารถตรวจติเอ็นเอจากฟันที่เก็บรักษาในสภาพแวดล้อมที่มีความแห้งได้ดีกว่าฟันที่อยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีความชื้น⁽¹¹⁾ จะเห็นได้ว่าการที่เก็บรักษาฟันในอุณหภูมิห้องเป็นการรักษาสภาพของติเอ็นเอในฟันทำให้ในการเก็บรักษาฟันเป็นระยะเวลา 1 เดือน สามารถตรวจพบติเอ็นเอได้ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Kumar และ Hegde ได้นำตัวอย่างฟันน้ำนมมาตรวจติเอ็นเอเพื่อใช้ในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ทางนิติวิทยาศาสตร์ โดยสกัดติเอ็นเอจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟัน เพื่อนำมาตรวจตำแหน่งยืนอะเมโลจินิน พบว่าในการตรวจติเอ็นเอจากรากฟันเพศชายและเพศหญิง สามารถตรวจพบติเอ็นเอตำแหน่งยืนอะเมโลจินิน ได้ร้อยละ 100 เมื่อเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 เดือน⁽¹⁰⁾ นอกจากนี้มีการศึกษาของ Maria และคณะ ทำการศึกษาติเอ็นเอจากรากฟันน้ำนมของผู้เสียชีวิตจากเหตุภัยพิบัติ โดยสกัดติเอ็นเอจากรากฟันน้ำนมที่เก็บรักษาไว้ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ นำส่วนของเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันมาสกัดติเอ็นเอเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของผู้ประสบภัยจากจากเหตุภัยพิบัติ ผลการทดลองพบว่าติเอ็นเอให้ผลตรงกันทุกตำแหน่ง โดยฟันที่ยังคงสามารถตรวจพบติเอ็นเอได้มีการเก็บรักษาไว้นานถึง 18 ปี ในขณะที่

เดียวกันได้มีการนำดีเอ็นเอจากแปรงฟันหรือหวีของผู้เสียชีวิต มาตรวจสอบดีเอ็นเอ ผลการทดลองกลับไม่สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้⁽²¹⁾ แสดงให้เห็นว่าฟันเป็นอวัยวะที่สามารถเก็บรักษาดีเอ็นเอของผู้เสียชีวิตได้ดีกว่าเนื้อเยื่ออื่นๆ ในร่างกาย แม้ว่าระยะเวลาจะผ่านไปนาน ก็สามารถตรวจดีเอ็นเอได้จากฟัน

การตรวจดีเอ็นเอจากฟันนั้นมที่เป็นโรคฟันผุยังไม่เคยมีผู้วิจัยศึกษามาก่อน การทดลองอาจจะต้องมีการศึกษาด้านอื่นๆ เพิ่มเติม จากการศึกษาพบว่าระยะเวลาที่เก็บรักษาฟันสั้นเกินไปทำให้ผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกัน ดังนั้นควรพัฒนาการศึกษาโดยการเพิ่มระยะเวลาในการเก็บรักษาฟันให้มากขึ้นและเพิ่มการเก็บรักษาฟันในสภาวะแวดล้อมหลากหลายเพื่อให้ผลการศึกษามีความแตกต่างกันไปตามเงื่อนไขในการทดสอบมากยิ่งขึ้น ในการวิจัยได้มีการศึกษาในเชิงคุณภาพควรเพิ่มเติมการตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอเพื่อแสดงข้อมูลเชิงปริมาณ เพื่อให้ผลการทดลองมีความชัดเจนมากขึ้นและสามารถนำข้อมูลระดับความแตกต่างของดีเอ็นเอไปวิเคราะห์เพื่อทำการทดลองต่อยอดในงานวิจัยด้านนี้มากยิ่งขึ้น

บทสรุป

จากการศึกษาวิจัยพบว่าการสกัดดีเอ็นเอจากฟันที่เป็นโรคฟันผุ เปรียบเทียบกับไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ 3 ตำแหน่ง ได้แก่ D3S1358, D5S818 และ D16S539 กับดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด พบว่าฟันที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน สามารถตรวจพบตำแหน่งดีเอ็นเอที่สกัดจากฟันได้ทั้งหมดทุกซี่ และแถบดีเอ็นเอทั้ง 3 ตำแหน่ง ปรากฏตรงกับตัวอย่างเลือดของผู้ทดสอบ เช่นเดียวกันกับดีเอ็นเอของฟันที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 เดือน ซึ่งการทดลองครั้งนี้สามารถตรวจพบไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ ทั้ง 3 ตำแหน่ง ให้ผลร้อยละ 100 ดังนั้นจากผลการทดลองจึงแสดงให้เห็นว่าระยะเวลาให้การเก็บรักษาฟันที่เป็นโรคฟันผุระหว่าง 1 วันและ 1 เดือนไม่มีความแตกต่างกัน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมืออุปกรณ์ สถานที่ห้องปฏิบัติการวิจัย ขอขอบคุณ คุณสุทัศน์ ศรีดวงแก้ว และคุณพัชรินทร์ มหาวงค์ เจ้าหน้าที่ประจำห้อง

ปฏิบัติการนิติพันธุศาสตร์ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำในการทำวิจัย ขอขอบคุณ ผศ. ดร. พชณี แสงทอง ที่ให้คำแนะนำและปรับแก้ในงานวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Chamsuwanwong A. Forensic science 1 for crime investigation. 2th ed. Bangkok: TGC Printing; 2546: 2-4.
2. Kirsty W. An Evaluation of the Thai Tsunami victim identification DNA operation. *Forensic Sci Pol Manag* 2015; 6(3-4): 69-78.
3. Ritz S, Cattaneo C, Collins MJ, et al. Age estimation: The state of the art in relation to the specific demands of forensic practice. *Int J Legal Med* 2000; 113(3): 129-136.
4. Alvarez A, Munoz I, Pestoni C, et al. Rodriguez M.S, Carracedo A. Effect of environmental factors on PCR-DNA analysis from dental pulp. *Int J Legal Med* 1996; 109(3): 125-129.
5. Khammongkol P, Bhoopat T, Bhoopat B, Chatuppos V. Sex Determination of burnt teeth at amelogenin Y locus by Loop mediated isothermal amplification (LAMP). *Forensic Sci Med* 2013; 5(1): 5-15.
6. Gilbert M.T, Rudbeck L, Willerslev E, et al. Biochemical and physical correlates of DNA contamination in archeological human bones and teeth excavated at Matera, Italy. *J Archaeol Sci* 2005; 32: 785-793.
7. Prinz M, Carracedo A, Mayr WR, et al. DNA Commission of the international society for forensic genetics (ISFG): Recommendations regarding the role of forensic genetics for disaster victim identification (DVI), *Forensic Sci Int Genet* 2007; 1(1): 3-12.

8. Krisanaprakornkit S, Kumchai T, Steger H, Bhoopat T, Iamaroon A. Microsatellite DNA typing for personal identification from the roots of a single tooth. *CM Dent J* 2006; 27(1): 101-110.
9. Piedad CM, Juan JY .different Dental tissues as source of DNA for human identification in forensic cases. *Croat Med* 2003; 44(3): 306-309.
10. Kumar MG, Hegde AM. Sex identification from exfoliated primary teeth a PCR study. *J Clin Pediatr Dent* 2005; 30(1): 19-21.
11. Prashant M, Shodan M. Gender determination using primary teeth: A polymerase chain reaction (PCR) study. *J Dent Oral Hyg* 2013; 5(8): 77-82.
12. Williams D, Lewis M, Franzen T, et al. Sex determination by PCR analysis of DNA extracted from incinerated, deciduous teeth. *Sci Justice* 2004; 44(2): 89-94.
13. Esther A., David P, Ana S, et al. Forensic identification in teeth with caries. *Forensic Sci Int* 2015; 257: 236-241.
14. Egeland T, Mostad P. Statistical genetics and genetical statistics: a forensic perspective. *Scand J Stat* 2002; 29(2): 297-307.
15. Gaytmenn R, Sweet D. Quantification of forensic DNA from various regions of human teeth. *J Forensic Science* 2003; 48(3): 622-625.
16. Marko V, Tomaz T, Draga S, Joze B. Characteristics of the number of odontoblasts in human dental pulp post-mortem. *Forensic Sci Int* 2009; 193(1-3): 122-126.
17. Lucia P, Urs M. Application of DNA techniques for identification using human dental pulp as a source of DNA. *Int J Legal Med* 1992; 105(3): 139-143.
18. Bosshardt D. Are Cementoblasts a subpopulation of osteoblasts or a unique phenotype?. *J Dent Res* 2005; 84(5): 390-406.
19. Hussam M, Oliver K, Jan P, et al. Cementum as a source of DNA in challenging forensic cases. *Int J Legal Med* 2018; 54: 76-81.
20. Stamfelj I, Vidmar G, Cvetko E, Gaspersic D. Cementum thickness in multirrooted human molars: a histometric study by light microscopy. *Ann Anat* 2008; 190(2): 129-139.
21. Maria X, Ana B, Ana C, et al. Primary teeth as DNA reference sample in disaster victim identification (DVI). *Forensic Sci Int: Genetics Supplement Series* 2011; 3(1): 381-382.