การตรวจดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์เพื่อการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลจากรากฟันของฟัน 1 ซี่

Microsatellite DNA Typing for Personal Identification from the Roots of a Single Tooth

สุทธิชัย กฤษณะประกรกิจ[1], ทองนารถ คำใจ[2], Heinrich F. Steger[3], ธานินทร์ ภู่พัฒน์[3], อะนัม เอี่ยมอรุณ[1]
[1]ภาควิชาทันตวิทยา-พยาธิวิทยาช่องปาก, [2]ภาควิชาศัลยศาสตร์ช่องปาก, คณะทันตแพทยศาสตร์,
[3]ภาควิชานิติเวชศาสตร์, คณะแพทยศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Suttichai Krisanaprakornkit[1], Thongnard Kumchai[2], Heinrich F. Steger[3], Tanin Bhoopat[3], Anak Iamaroon[1]
[1]Department of Odontology & Oral Pathology, [2]Department of Oral Surgery, Faculty of Dentistry
[3]Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Chiang Mai University

ชม.ทันตสาร 2549; 27(1) : 101-110
CM Dent J 2006; 27(1) : 101-110

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความเป็นไปได้ในการใช้ดีเอ็นเอซึ่งถูกสกัดจากรากฟันของฟันเพียง 1 ซี่ในการตรวจลักษณะดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ 3 ตำแหน่ง ได้แก่ HUMVWA, HUMD 19S253 และ HUMPENTA E และบ่งบอกเพศโดยศึกษายีนอะมิโลเจนิน (amelogenin) และเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือด ใช้ตัวอย่างฟันกรามแท้ซี่ที่สามและเลือดที่เก็บจากอาสาสมัครจำนวนทั้งสิ้น 15 ราย จากนั้นตัวอย่างฟันจะถูกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม โดยเก็บไว้ในสภาพแวดล้อมต่างกัน คือ กลุ่มที่ 1 ทิ้งฟันไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 40 วัน จำนวน 5 ซี่ กลุ่มที่ 2 ฝังฟันไว้ในดินเป็นเวลา 40 วัน จำนวน 5 ซี่ และกลุ่มที่ 3 แช่ฟันในน้ำทะเลเป็นเวลา 40 วัน จำนวน 5 ซี่ หลังจากนั้นทำการตัดฟันให้เหลือแต่รากฟัน และนำไปสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส ผลการทดลองพบว่าสามารถใช้รากฟันจากทั้งสามกลุ่มบ่งบอกเพศของอาสาสมัครได้อย่างแม่นยำ และไม่พบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอระหว่างตัวอย่าง นอกจากนั้นดีเอ็นเอที่สกัดได้จากรากฟันในกลุ่มที่ 2 และ 3 ยังแสดงลักษณะดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์

Abstract

The objective of this study was to test the possibility of using DNA isolated from the roots of a single tooth for the analyses of 3 DNA microsatellite loci, including HUMVWA, HUMD19S253, and HUMPENTA E, and gender determination from amelogenin locus in comparison with the results typed from blood DNA. Third molars and blood were collected from 15 volunteers, and the tooth samples were divided into 3 groups according to different conditions. Group 1, the teeth were left air-dried for 40 days (n = 5), Group 2, the teeth were buried under the ground for 40 days (n = 5), and Group 3, the teeth were immersed in the sea water for 40 days (n = 5). Subsequently, the teeth were cut to separate the crowns from the roots. Only the roots were subject to further DNA extraction and DNA amplification was done by polymerase chain reaction. The results showed that the roots from all three groups could be used in gender

ตำแหน่ง HUMVWA และ HUMD19S253 ตรงกับผลที่ตรวจได้จากเลือดของอาสาสมัครคนเดียวกัน โดยสรุปแล้วดีเอ็นเอที่สกัดจากรากฟันของฟัน 1 ซี่มีคุณภาพดีและสามารถตรวจหาลักษณะดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ได้เช่นเดียวกับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเลือดหรือเนื้อเยื่อส่วนอื่นของร่างกาย ซึ่งทำให้มีความเป็นไปได้ในการนำองค์ความรู้นี้ไปประยุกต์ใช้สำหรับงานนิติวิทยาศาสตร์และนิติทันตวิทยาต่อไป

คำไขรหัส: ดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ อะมิโลเจนิน รากฟัน ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส

verification without any DNA contamination between samples. Moreover, DNA isolated from the roots in Groups 2 and 3 showed the identical DNA patterns of HUMVWA and HUMD19S253 loci to those extracted from blood. In conclusion, the roots of a single human tooth can be used as a source of DNA for microsatellite analyses as well as DNA isolated from blood or other tissues. Therefore, it is possible to apply this knowledge for future works in the areas of forensic science and forensic odontology.

Key words: DNA microsatellite, amelogenin, tooth root, polymerase chain reaction

บทนำ

จากเหตุการณ์ธรณีพิบัติและคลื่นยักษ์สึนามิใน 6 จังหวัดภาคใต้ของประเทศไทย เมื่อวันที่ 26 ธันวาคม พ.ศ. 2547 ทำให้เกิดความเสียหายต่อทั้งชีวิตและทรัพย์สินอย่างมหาศาล นอกจากนี้ยังทำให้เกิดปัญหาในการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลที่เสียชีวิตเป็นจำนวนมากๆ พร้อมกัน จึงทำให้ศพเป็นจำนวนมากเน่าสลายอย่างรวดเร็วจนไม่สามารถพิสูจน์ได้ด้วยหลักฐานจากเนื้อเยื่ออ่อนของร่างกาย เช่น ลายพิมพ์นิ้วมือ (fingerprints) หรือการสกัดดีเอ็นเอ (DNA) จากเนื้อเยื่ออ่อน เช่น กล้ามเนื้อ เส้นผม เป็นต้น ดังนั้นการตรวจลักษณะของฟันและประวัติทางทันตกรรมจากศพจึงเป็นทางเลือกที่สำคัญในการช่วยพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลได้โดยเฉพาะศพชาวต่างชาติซึ่งมีประวัติทางทันตกรรมก่อนเสียชีวิตมายืนยันอย่างครบสมบูรณ์ (จากข้อมูล ณ เดือนเมษายน พ.ศ. 2548 พบว่าสามารถส่งศพซึ่งส่วนใหญ่เป็นชาวต่างประเทศกลับโดยอาศัยประวัติทางทันตกรรมเพียงอย่างเดียวเป็นจำนวนร้อยละ 85 ของจำนวนศพที่ถูกพิสูจน์และส่งกลับ[1]) ข้อได้เปรียบของการใช้การตรวจลักษณะฟันในทางนิติวิทยาศาสตร์ คือ ฟันเป็นอวัยวะที่ไม่ค่อยมีการเปลี่ยนแปลงหรือเน่าสลายหลังจากที่เสียชีวิตแล้วเช่นเดียวกับกระดูก และลักษณะฟันของแต่ละบุคคลมีความเฉพาะเจาะจงสูง เช่น มีรอยผุ ฟันที่หายไป หรือวัสดุที่ใช้ในการบูรณะฟันที่แตกต่างกันในแต่ละบุคคล[2,3] นอกจากข้อมูลจากการตรวจฟันแล้วภาพถ่ายรังสีในช่องปากยังสามารถนำมาใช้เปรียบเทียบลักษณะสำคัญที่ไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยตาเปล่า เช่น การอุดคลองรากฟัน พยาธิสภาพในกระดูก เป็นต้น ซึ่งเป็นเครื่องมือสำคัญที่ใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล สำหรับภาพถ่ายรังสีในระบบดิจิตอล (digital) ยังมีประโยชน์ต่องานพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลโดยสามารถนำภาพถ่ายรังสีก่อนและหลังเสียชีวิตมาซ้อนทับกัน (superimposition) ซึ่งได้ถูกนำมาใช้ในงานพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลเช่นเดียวกัน[4] แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากศพชาวเอเชียบางประเทศ โดยเฉพาะศพคนไทยซึ่งไม่สามารถหาประวัติทางทันตกรรมของผู้เสียชีวิตก่อนตายได้หรือได้ไม่ครบสมบูรณ์ จึงทำให้เกิดปัญหาในการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลขึ้น ดังนั้นทางเลือกสุดท้ายคือการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอที่สกัดมาจากเนื้อเยื่อแข็ง เช่น กระดูกและฟัน ซึ่งนอกจากฟันจะเป็นอวัยวะที่มีสภาพคงทนต่อการเน่าสลายแล้วฟันยังเป็นอวัยวะที่ได้รับการปกป้องจากการปนเปื้อน (contamination) จากสิ่งแวดล้อมภายนอกเพราะฝังอยู่ในกระดูกเบ้าฟัน (alveolar bone)

เนื่องจากเป็นที่ทราบดีว่าลักษณะกายวิภาคของฟัน

ไม่พบเซลล์โดยเฉพาะนิวเคลียส (nucleus) ในส่วนที่เป็นเคลือบฟัน (enamel) และเนื้อฟัน (dentin) แต่พบได้ในเซลล์เคลือบรากฟัน (cementocyte) ซึ่งฝังอยู่ในเมทริกซ์ (matrix) ของเคลือบรากฟันชนิดที่ประกอบด้วยเซลล์ (cellular cementum) ซึ่งมีลักษณะและองค์ประกอบของสารอินทรีย์ (organic) และสารอนินทรีย์ (inorganic) คล้ายกับกระดูก[5] นอกจากนี้ยังเป็นการยากที่จะบดเคลือบฟันซึ่งเป็นอวัยวะที่แข็งที่สุดในร่างกายให้ละเอียดเป็นผง จึงทำให้คณะผู้วิจัยสนใจที่จะสกัดดีเอ็นเอจากรากฟันเท่านั้น

การตรวจดีเอ็นเอนั้นจำเป็นต้องมีวิธีที่สามารถใช้ได้กับรากฟันของฟันเพียงซี่เดี่ยวซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมาก เนื่องจากไม่ต้องกังวลเรื่องตัวอย่างที่ถูกส่งมาตรวจซึ่งอาจจะมาจากหลายคนปนกันอยู่ เมื่อความก้าวหน้าทางอณูชีววิทยา (molecular biology) เจริญมากขึ้น จึงมีความเป็นไปได้ในการตรวจดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) จากรากฟันของฟันเพียง 1 ซี่เพื่อใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล ไมโครแซทเทลไลท์เป็นส่วนของดีเอ็นเอขนาดสั้นๆ ประมาณ 100 เบสบนจีโนม (genome) มนุษย์ ซึ่งมีลำดับเบสเรียงซ้ำๆ กันจำนวนหลายชุด เช่น ซ้ำกัน 4 หรือ 5 เบส (AATG หรือ AAAGA) เป็นต้น ซึ่งลักษณะนี้ทำให้ง่ายต่อการเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส (polymerase chain reaction) และยังเหมาะสำหรับดีเอ็นเอที่มีการเสื่อมสลาย (degrade) ไปบางส่วน เช่น ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากชิ้นส่วนหรือเนื้อเยื่อของศพ เป็นต้น[6,7] นอกจากนี้จำนวนชุดของไมโครแซทเทลไลท์ที่แตกต่างกันยังเป็นลักษณะเฉพาะของแต่ละบุคคลจึงเหมาะสมสำหรับการนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล

ในการศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบว่าสามารถนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากรากฟันของฟันเพียง 1 ซี่มาใช้ในการตรวจพิสูจน์บุคคลได้หรือไม่ โดยจำลองเหตุการณ์ต่างๆ ให้คล้ายคลึงกับเหตุการณ์สึนามิ ทำการศึกษาลักษณะดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ทั้งหมด 3 โลคัส (locus) ซึ่งอยู่บนโครโมโซมต่างๆ และศึกษาเพศของบุคคลโดยศึกษาตรงตำแหน่งยีน (gene) อะมิโลเจนิน (amelogenin) ซึ่งพบบนโครโมโซมเพศทั้ง X และ Y ผลจากการศึกษาพบว่าสามารถสกัดดีเอ็นเอจากรากฟันของฟันเพียง 1 ซี่และสามารถนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาบ่งบอกเพศและลักษณะดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ของอาสาสมัครแต่ละคนได้อย่างถูกต้องเมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเลือดของอาสาสมัครคนเดียวกัน

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

1) ตัวอย่างดีเอ็นเอจากเลือดและรากฟัน

เก็บตัวอย่างฟันกรามแท้ซี่ที่สามซึ่งถูกถอนออกด้วยวิธีปกติจากอาสาสมัครชายและหญิงรวม 15 ราย เป็นเพศชาย 9 รายและหญิง 6 ราย อายุระหว่าง 18-25 ปี พร้อมกับเก็บเลือดปริมาตร 100 ไมโครลิตรจากบริเวณแผลถอนฟันเพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอด้วย ก่อนเก็บตัวอย่างได้รับอนุญาตจากอาสาสมัครทุกรายและไม่มีการจดบันทึกชื่อ เลขที่บัตรผู้ป่วย และประวัติผู้ป่วยเพื่อปกปิดข้อมูลดีเอ็นเอของอาสาสมัคร แยกฟันออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกจำนวน 5 ซี่นำไปเก็บไว้ในที่แห้ง ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 40 วัน กลุ่มสองจำนวน 5 ซี่นำไปฝังดินเป็นเวลา 40 วัน กลุ่มสามจำนวน 5 ซี่นำไปแช่ในน้ำทะเลเป็นเวลา 40 วัน หลังจากนั้นนำฟันทั้งสามกลุ่มมาทำความสะอาดเพื่อขจัดคราบเลือดหรือเนื้อเยื่อที่ติดค้างบนตัวฟัน ตัดตัวฟันออกจากรากฟันตรงคอฟันในแนวขวางโดยใช้แผ่นคาร์โบรันดัม (carborundum disc) รากฟันถูกนำไปชั่งน้ำหนักซึ่งพบว่ามีน้ำหนัก 400-600 มิลลิกรัมขึ้นกับขนาดของฟัน นำรากฟันทั้งหมดของฟัน 1 ซี่มาบดโดยใช้ครกหินและสากให้เป็นผงละเอียดที่สุด นำผงรากฟันที่บดแล้วซึ่งมีน้ำหนักเหลือประมาณร้อยละ 75 มาใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็กที่เป็นฝาเกลียวเพื่อสกัดดีเอ็นเอตามวิธีที่พัฒนาขึ้นโดย Steger และ ธานินทร์ ภู่พัฒน์ (ยังไม่ได้ตีพิมพ์) เติม 1 มิลลิลิตร ของ 0.5 โมล่าร์ (molar) ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) และ 0.25 โมล่าร์ของฟอสเฟท (phosphate) ซึ่งมีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8.0 แล้วทำการผสมให้เข้ากันด้วยการหมุนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อดึงแร่ธาตุ (demineralization) ในส่วนของรากฟันและเคลือบรากฟันออกไปและทำให้ดีเอ็นเอที่ติดอยู่ในเคลือบรากฟันหลุดออกมา ปั่นแยกสารละลายออกจากผงรากฟันที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

ทำการดูดน้ำส่วนใสประมาณ 500 ไมโครลิตรใส่ในหลอดทดลองใหม่แล้วเติม 4 โมล่าร์ของแอมโมเนียม อะซิเตท (ammonium acetate) 500 ไมโครลิตรและเติมไอโซโพรพานอล (isopropanol) 1 มิลลิลิตรทำการเขย่า ปั่นแยกที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะสังเกตเห็นตะกอนดีเอ็นเอ (DNA pellet) ตกอยู่ที่ก้นหลอด ดูดน้ำส่วนใสทิ้งให้ได้มากที่สุด ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยการเติม 200 ไมโครลิตรของเอธานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 ปั่นล้างอีกครั้งที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดน้ำทิ้ง แล้วเปิดฝาหลอดทดลองเพื่อทิ้งให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งเป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย TE (Tris pH 8.0 และ 0.5 มิลลิโมล่าร์ EDTA) 30 ไมโครลิตรต่อตัวอย่าง แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้เก็บไว้ในตู้เย็น เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรสต่อไป ส่วนการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดของอาสาสมัครใช้วิธีมาตรฐาน[8]

2) เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากรากฟันและเลือด ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตรมาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์บนโลคัส HUMVWA, HUMD19S253, HUMPENTA E และยีนอะมิโลเจนิน ในสารละลายปริมาตรสุดท้าย 15 ไมโครลิตรในหลอดทดลองที่มีผนังด้านข้างหลอดบาง (thin-walled tube) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ (primer) จำเพาะต่อ 1 โลคัสความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมล่าร์ (ลำดับนิวคลิโอไทด์ถูกแสดงในตารางที่ 1) ในสารละลายนี้ยังประกอบด้วยสารเคมีอื่นๆ ดังนี้ 10X *Taq* buffer (Invitrogen) 1.5 ไมโครลิตร 1 mM dNTPs mix (Invitrogen) 1.5 ไมโครลิตร เอ็นไซม์ *Taq* DNA polymerase (Invitrogen) ความเข้มข้น 0.25 ยูนิต (unit) ต่อไมโครลิตร 1.5 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น หลังจากนั้นนำหลอดทดลองใส่เข้าเครื่อง thermal cycler (Master-cycler Gradient, Eppendorf™) โดยใช้อุณหภูมิต่างๆ กัน 3 อุณหภูมิ ได้แก่ อุณหภูมิที่ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิที่ 58 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที และอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที ใช้จำนวนรอบในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ 32 รอบ หลังจากนั้นแช่สารละลายที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 นาที สำหรับโลคัส HUMPENTA E เริ่มใส่เอ็นไซม์ *Taq* DNA polymerase เมื่อสารละลายมีอุณหภูมิถึง 94 องศาเซลเซียส

3) ตรวจลักษณะดีเอ็นเอด้วยการเคลื่อนสู่ขั้วไฟฟ้า (electrophoresis)

นำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาข้างต้นประมาณ 10 ไมโครลิตรมาตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอในวุ้นพอลีอะคริลาไมด์ (polyacrylamide gel) ในแนวตั้ง (vertical) ความเข้มข้นร้อยละ 8.5 โดยเป็น cross linker ร้อยละ 4.8 ของอะคริลาไมด์ (acrylamide) ทั้งหมด ตามวิธีของ Sajantila และคณะ (1994)[9] โดยใช้ชุดการเคลื่อนสู่ขั้วไฟฟ้าชนิด BioRad ProteanIIxi Cell® และใช้สารละลาย Tris boric acid EDTA (TBE) เป็นตัวนำกระแสไฟฟ้า จ่ายกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 85 โวลท์ (volt) นาน 16.5 ชั่วโมงจนสีย้อม (dye) วิ่งหลุดออกไปจากวุ้น หลังจากนั้นจึงทำการย้อมให้เห็นแถบดีเอ็นเอด้วยเกลือเงิน (silver staining) ตามวิธีของ Budowle และคณะ (1991)[10] จนปรากฏแถบดีเอ็นเอสีดำให้เห็นขึ้นบนวุ้น

ผลการศึกษา

การใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากรากฟันของฟัน 1 ซี่ ซึ่งถูกเก็บที่อุณหภูมิห้อง ในการบ่งบอกเพศ

เพื่อตรวจสอบดูว่าสามารถใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากรากฟันของฟันเพียง 1 ซี่ในการบ่งบอกเพศได้หรือไม่ โดยในระยะแรกทำการศึกษาในฟันที่ถูกเก็บไว้ให้เน่าสลายในที่แห้ง ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 40 วัน จากผลการทดลองพบว่าสามารถระบุเพศจากรากฟันได้อย่างถูกต้องทั้ง 5 ราก (root #1-#5 ในรูปที่ 1) โดยใช้ยีนอะมิโลเจนินเป็นตัวบ่งบอก กล่าวคือถ้ามีผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น 1 แถบจะเป็นเพศหญิง (XX) ซึ่งมาจากยีนอะมิโลเจนินที่อยู่บนโครโมโซม X (อาสาสมัครคนที่ 1, 3 และ 5 ในรูปที่ 1) แต่ถ้ามีผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น 2 แถบ จะเป็นเพศชาย (XY) ซึ่งมาจากยีนอะมิโลเจนินที่อยู่บนทั้งโครโมโซม X และ Y ซึ่งมีขนาดแตกต่างกัน 6 เบส (base) โดยดีเอ็นเอส่วนนี้บนโครโมโซม Y จะยาวกว่า (อาสาสมัครคนที่ 2 และ 4 ในรูปที่ 1) ซึ่งผลการทดลองที่ได้จากยีนอะมิโลเจนินนี้ตรงกับเพศของอาสาสมัครทั้ง 5 คนที่ได้ทำการบันทึกก่อนล่วงหน้า จากผลการทดลองดังกล่าวได้ชี้ให้เห็นถึง

ความเป็นไปได้ในการใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากรากฟันของฟันเพียง 1 ซี่ในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล นอกจากนี้ยังใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากรากฟันนี้ในการตรวจลักษณะดีเอ็นเอไมโครแซลเทลไลท์บนโลคัส HUM PENTA E (PENTA E) จากผลการทดลองในรูปที่ 1 พบว่าลักษณะดีเอ็นเอดังกล่าวนี้ของรากฟันทั้ง 5 ซี่ซึ่งมาจากอาสาสมัครทั้ง 5 คนแตกต่างกันอย่างสิ้นเชิง (สังเกตว่าแถบดีเอ็นเอจากอาสาสมัครทั้ง 5 คนไม่มีลักษณะที่เหมือนกัน) จึงสรุปได้ว่าไม่เกิดการปนเปื้อนขึ้นระหว่างตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากรากฟันของอาสาสมัครทั้ง 5 คนในทุกขั้นตอนของขบวนการตรวจสอบ ทำให้คณะผู้วิจัยเกิดความเชื่อมั่นในผลการตรวจสอบมากยิ่งขึ้น ซึ่งจะนำไปสู่การเปรียบเทียบกับผลตรวจลักษณะดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ที่ได้จากตัวอย่างเลือดหัวข้อต่อไป

การตรวจสอบเพศโดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากรากฟันซึ่งถูกนำไปฝังดินหรือแช่ในน้ำทะเล

คณะผู้วิจัยได้ทำการทดลองในขั้นต่อไปโดยใช้ฟัน 10 ซี่ (#6-#15) แยกออกเป็นนำไปฝังดินเป็นเวลา 40 วัน จำนวน 5 ซี่ (#6-#10) หรือนำไปแช่น้ำทะเลเป็นระยะเวลา 40 วันจำนวน 5 ซี่ (#11-#15) หลังจากนั้นได้ดำเนินการขั้นตอนสกัดดีเอ็นเอจากรากฟัน และปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรสดังที่กล่าวข้างต้น จากการทดลองพบว่าสามารถใช้ตำแหน่งยีนอะมิโลเจนินในการบ่งบอกเพศจากดีเอ็นเอที่สกัดจากรากฟันของฟันเพียง 1 ซี่ได้อย่างถูกต้อง กล่าวคือพบว่าอาสาสมัครคนที่ 8, 10 และ 15 เป็นเพศหญิงเนื่องจากมีแถบที่เกิดขึ้นเพียง 1 แถบ (รูปที่ 2) ในขณะที่อาสาสมัครคนที่ 6, 7, 9, 11, 12, 13 และ 14 เป็นเพศชายเนื่องจากมีแถบที่เกิดขึ้น 2 แถบ (รูปที่ 2) ซึ่งข้อมูลทั้งหมดนี้ตรงกับเพศของอาสาสมัครที่ได้ถูกจดบันทึกไว้ก่อนล่วงหน้า แสดงให้เห็นว่ายังสามารถสกัดดีเอ็นเอที่ยังมีคุณภาพดีและนำมาใช้ในการตรวจเพศของบุคคลได้อย่างแม่นยำ ถึงแม้ว่าฟันนั้นจะถูกฝังในสิ่งแวดล้อมที่สกปรก หรือถูกแช่ในน้ำทะเลซึ่งความเค็มของน้ำทะเลสามารถชะล้างคราบเลือดและเนื้อเยื่อที่ติดอยู่ในโพรงฟันหรือบนรากฟันจนหมด ทางคณะผู้วิจัยได้สังเกตว่าไม่พบเนื้อเยื่อหรือคราบเลือดหลงเหลืออยู่เลยในโพรงฟันหรือบนตัวรากฟันที่ถูกแช่ในน้ำทะเล และยังพิสูจน์ให้เห็นว่าดีเอ็นเอที่สกัดจากรากฟันนั้นมาจากดีเอ็นเอของเซลล์เคลือบรากฟันที่ฝังตัว (trapped) อยู่ในเมทริกซ์ของเคลือบรากฟันซึ่งไม่ถูกชะล้างออกมาในน้ำทะเล

การเปรียบเทียบลักษณะดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์จากดีเอ็นเอที่สกัดจากรากฟันและเลือด

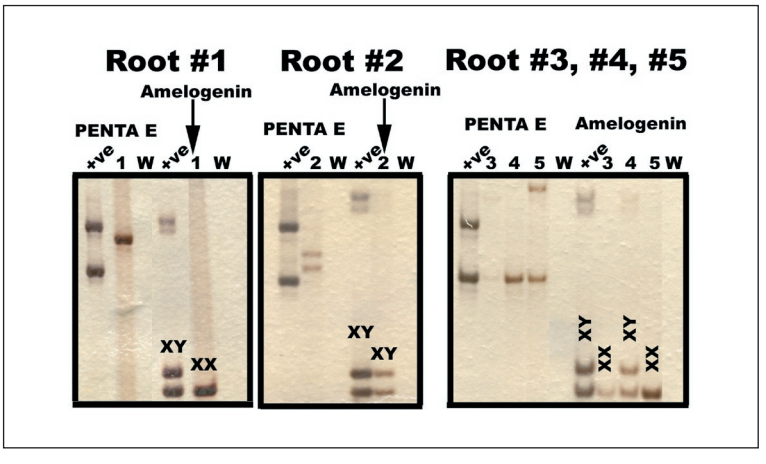
หลังจากนั้นทางคณะผู้วิจัยได้ดำเนินการวิเคราะห์เปรียบเทียบลักษณะดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 2 โลคัส ได้แก่ HUMVWA และ HUMD19S253 ซึ่งถือว่าเป็นโลคัสที่ง่ายและยากที่สุดตามลำดับในการวิเคราะห์ลักษณะดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ซึ่งมีจำนวนทั้งสิ้น 18 โลคัสที่ใช้ในภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จากการทดลองพบว่า ลักษณะดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์บนโลคัส HUMVWA ที่ได้จากดีเอ็นเอที่สกัดจากรากฟัน (แทนด้วยตัวอักษร R สีดำ) และเลือด (แทนด้วยตัวอักษร B สีแดง) จากทั้ง 2 กลุ่ม (คือกลุ่มที่ 2 [#6-#10] และกลุ่มที่ 3 [#11-#15]) มีลักษณะดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ที่เหมือนกันในตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากรากฟันและเลือดของอาสาสมัครคนๆ เดียวกัน (รูปที่ 3) สังเกตว่าในตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากรากฟันของอาสาสมัครคนที่ 10 (R10) ไม่พบแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นบนวุ้น แต่เมื่อคณะผู้วิจัยได้ทำการทดลองใหม่โดยเพิ่มจำนวนรอบของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรสเป็น 35 รอบ ก็สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอบนวุ้นซึ่งตรงกับแถบดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเลือดของอาสาสมัครคนที่ 10 เช่นเดียวกัน (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง)

หลังจากนั้นคณะผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์ลักษณะดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์บนโลคัส HUMD19S253 โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากรากฟัน (แทนด้วยตัวอักษร R สีดำ) และเลือด (แทนด้วยตัวอักษร B สีแดง) จากทั้ง 2 กลุ่ม (คือกลุ่มที่ 2 [#6-#10] และกลุ่มที่ 3 [#11-#15]) จากผลการทดลองพบว่ามีลักษณะดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์บนโลคัสดังกล่าวเหมือนกันจากตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากรากฟันและเลือดของอาสาสมัครคนๆ เดียวกัน (รูปที่ 4) จากผลการทดลองในรูปที่ 3 และ 4 เป็นเครื่องยืนยันว่าสามารถใช้รากฟันของฟันเพียง 1 ซี่ในการตรวจวิเคราะห์หาลักษณะดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์เพื่อนำไปใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลได้อย่างถูกต้อง

สังเกตได้ว่าแถบของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรสบนโลคัส HUMPENTA E, HUMVWA และ HUMD19S253 (ในรูปที่ 1, 3 และ 4) มีได้ 2 ลักษณะ คือ ตัวอย่างที่มีแถบดีเอ็นเอขึ้น 1 แถบ (เช่น จากตัวอย่างที่ 7 และ 8 ในรูปที่ 3) หมายถึง 2 อัลลีลที่ได้จากพ่อและแม่อย่างละอัลลีลนั้นมีจำนวนชุดไมโครแซทเทลไลท์ที่เท่ากันจึงทำให้ปรากฏเป็นแถบเพียง 1 แถบ ในขณะที่ตัวอย่างที่มีแถบดีเอ็นเอขึ้น 2 แถบ (เช่น จากตัวอย่างที่ 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14 และ 15 ในรูปที่ 3) หมายถึง 2 อัลลีลที่ได้จากพ่อและแม่มีจำนวนชุดไมโครแซทเทลไลท์ที่แตกต่างกัน

บทวิจารณ์

ผลการศึกษาจากโครงการวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของฟันโดยเฉพาะรากฟันซึ่งสามารถนำมาใช้สกัดดีเอ็นเอเพื่อนำไปตรวจลักษณะดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์และการบ่งบอกเพศได้ ซึ่งเป็นการย้ำให้เห็นถึงความสำคัญของบทบาททันตแพทย์และการวิจัยทางสาขาทันตแพทยศาสตร์ซึ่งมีต่อวงการวิทยาศาสตร์สุขภาพได้เป็นอย่างดี ดังนั้นบทบาทของทันตแพทย์ไทยต่อเหตุการณ์อุบัติภัยหมู่ในอนาคต จึงมีมากไปกว่าการให้ข้อมูลทางด้านทันตกรรมก่อนการเสียชีวิตของผู้สูญหาย (antemortem data) และการตรวจเก็บข้อมูลทางทันตกรรมของผู้เสียชีวิต (postmortem data) แต่ยัง

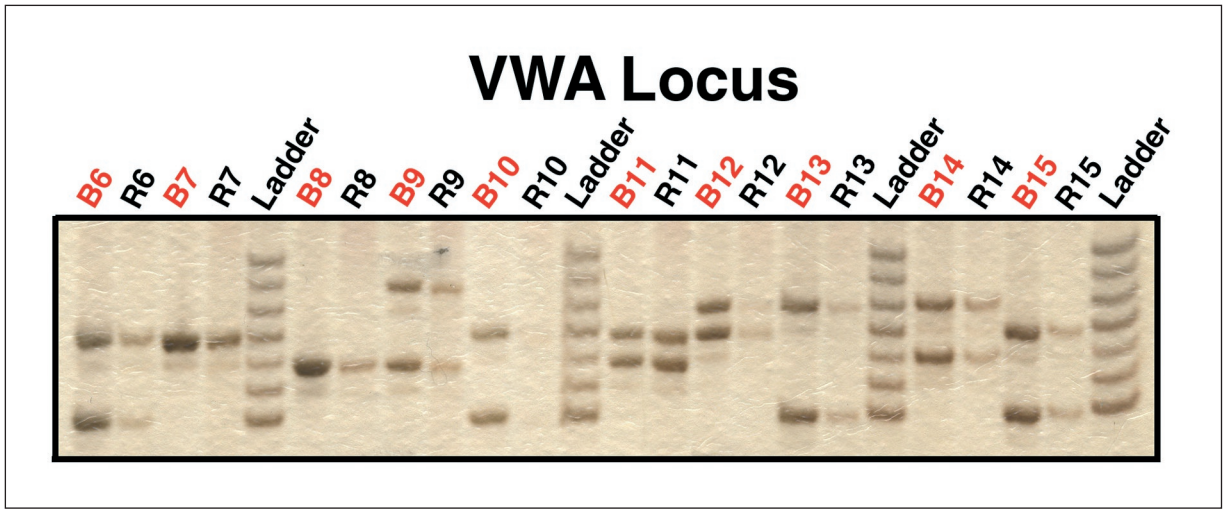


รูปที่ 1 *การตรวจลักษณะดีเอ็นเอไมโคแซทเทลไลท์บนโลคัส HUMPENTA E (PENTA E) และบ่งบอกเพศจากรากฟันกลุ่มที่ 1 สามารถบ่งบอกเพศของอาสาสมัครจากรากฟันของฟันทั้ง 5 ซี่โดยใช้ยีนอะมิโลเจนิน พบว่าอาสาสมัครคนที่ 2 และ 4 เป็นผู้ชาย (XY) ในขณะที่อาสาสมัครคนที่ 1, 3 และ 5 เป็นผู้หญิง (XX) พบว่าลักษณะดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์โลคัส PENTA E แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่าง แสดงว่าไม่เกิดการปนเปื้อนของดีเอ็นเอระหว่างตัวอย่าง +ve หมายถึง ดีเอ็นเอควบคุมที่ให้ผลบวกตรงโลคัส PENTA E จากตัวอย่างเลือดของอาสาสมัครเพศชายซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัยนี้ W หมายถึงใส่น้ำแทนดีเอ็นเอในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรสเพื่อเป็นตัวควบคุมที่ให้ผลลบ*

Figure 1 *Microsatellite DNA typing on the HUMPENTA E locus and gender verification from human tooth roots in Group 1. Using the amelogenin gene, the gender of 5 volunteers could be identified from the roots of five teeth, i.e. the volunteers #2 and #4 were male (XY), while the volunteers #1, #3, and #5 were female (XX). There was no DNA contamination between samples from different volunteers as different patterns were detected. +ve means a positive DNA control for a PENTA E locus isolated from the blood sample of a male volunteer, not involved with this project. W means addition of water instead of DNA in the polymerase chain reaction as a negative control.*

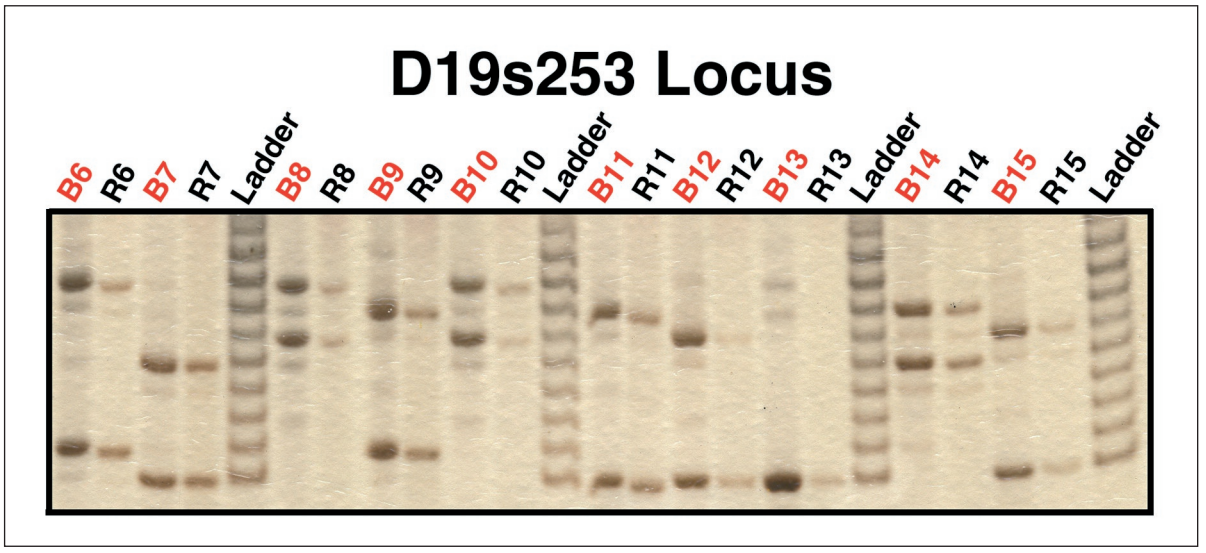
รูปที่ 2 *การบ่งบอกเพศของอาสาสมัครโดยใช้ยีนอะมิโลเจนินจากรากฟันในกลุ่มที่ 2 และ 3 พบว่าอาสาสมัครคนที่ 8, 10 และ 15 เป็นผู้หญิง ในขณะที่อาสาสมัครคนที่ 6, 7, 9, 11, 12, 13 และ 14 เป็นผู้ชาย control XX และ control XY หมายถึงดีเอ็นเอที่ใช้เป็นตัวควบคุมซึ่งสกัดมาจากเลือดของอาสาสมัครเพศหญิงและชาย ตามลำดับ*

Figure 2 *Gender verification using amelogenin gene of tooth roots in the Groups 2 and 3. It was found that the gender of volunteers #8, #10, and #15 was female, whereas that of volunteers #6, #7, #9, #11, #12, #13, and #14 was male. Control XX and control XY mean control DNA that was isolated from female and male volunteers' blood sample, respectively.*



รูปที่ 3 *การตรวจลักษณะดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์บนโลคัส HUMVWA จากดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือด (ตัวอักษร B สีแดง) และ รากฟัน (ตัวอักษร R สีดำ) ทั้งกลุ่มที่ 2 และ 3 (#6-#15) พบว่าในอาสาสมัครคนเดียวกัน ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดและรากฟันเหมือนกัน แสดงให้เห็นว่าสามารถนำรากฟันของฟัน 1 ซี่มาใช้พิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล Ladder หมายถึง อัลลีลมาตรฐาน (allelic ladder) ที่จัดทำขึ้นเองในห้องปฏิบัติการโดยนำอัลลีลที่ทราบชนิดแล้วหลายอันมาสกัดแล้วนำมารวมกันใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับการเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส*

Figure 3 *Microsatellite DNA typing on the HUMVWA locus from DNA isolated from blood (B, red color) and tooth roots (R, black color) in the Groups 2 and 3 (#6-#15). It was demonstrated that the fingerprints of DNA isolated from blood and tooth roots were identical in the same volunteer, indicating that DNA isolated from the roots of one tooth can be used in personal identification. A ladder means an allelic ladder that was prepared in our laboratory by combining different known alleles, which were used as a DNA template in the polymerase chain reaction.*



รูปที่ 4 *การตรวจลักษณะดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์บนโลคัส HUMD19S253 จากดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือด (ตัวอักษร B สีแดง) และ รากฟัน (ตัวอักษร R สีดำ) ทั้งกลุ่มที่ 2 และ 3 (#6-#15) พบว่าในอาสาสมัครคนเดียวกัน ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดและรากฟันเหมือนกัน*

Figure 4 *Microsatellite DNA typing on the HUMD19S253 locus from DNA isolated from blood (B, red color) and tooth roots (R, black color) in the Groups 2 and 3 (#6-#15). It was demonstrated that the fingerprints of DNA isolated from blood and tooth roots were identical in the same volunteer.*

รวมไปถึงความช่วยเหลือในด้านเทคนิคการสกัดดีเอ็นเอจากรากฟันซึ่งสามารถนำไปใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล นอกจากนี้องค์ความรู้ใหม่ที่ได้จากโครงการวิจัยนี้ยังสามารถนำไปต่อยอดเพื่อใช้ศึกษาดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรีย (mitochondria) ของฟันมนุษย์โบราณในการศึกษาเชิงมานุษยวิทยาได้ด้วย ในเซลล์ร่างกายมนุษย์สามารถพบดีเอ็นเอได้ 2 บริเวณ คือที่นิวเคลียสและไมโตคอนเดรีย ซึ่งมีจำนวนไมโตคอนเดรียเป็นจำนวนมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับนิวเคลียสซึ่งมีอยู่เพียง 1 นิวเคลียส ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการสกัดดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียจากซากโครงกระดูกและฟันของมนุษย์โบราณซึ่งมีอายุเก่าแก่นับพันปี ความรู้ที่ได้จากการตรวจดีเอ็นเอของซากโครงกระดูกและฟันจะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาถึงวิวัฒนาการของมนุษย์ แท้ที่จริงแล้วได้มีการศึกษาประเภทนี้ในต่างประเทศ[11] แต่ยังมีการศึกษาถึงชาติพันธุ์ของบรรพบุรุษหรือมนุษย์โบราณด้วยการศึกษาจากดีเอ็นเอที่สกัดจากกระดูกหรือฟันจำนวนไม่มากนักในประเทศไทย

วิธีการที่ใช้สกัดดีเอ็นเอจากรากฟันซึ่งพัฒนามาจากสมาชิกในคณะผู้วิจัยมีความแตกต่างจาก Sweet และ Hildebrand (1998)[12] ได้แก่ การใช้เฉพาะรากฟันแทนที่จะเป็นฟันทั้งซี่ การใช้ครกหินและสากในการบดรากฟันแทนที่จะเป็นเครื่องบดกระดูก (bone mill) เพราะว่าการบดรากฟันด้วยครกหินและสากทำได้ง่ายกว่าการบดฟันทั้งซี่ซึ่งประกอบด้วยเคลือบฟัน และนอกจากนี้ยังไม่จำเป็นต้องใช้ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) ซึ่งช่วยทำให้ฟันเปราะและง่ายต่อการบด ทำให้วิธีนี้สามารถสกัดดีเอ็นเอจากรากฟันได้ด้วยราคาที่ถูกกว่า เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ก็ไม่ยุ่งยากเท่าหรือเป็นพิษน้อยกว่าวิธีของ Sweet และ Hildebrand แต่ให้ผลดีเช่นเดียวกัน ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยขอเสนอวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากรากฟันที่ถูกพัฒนาขึ้นมานี้เป็นทางเลือกใหม่อีกทางหนึ่งสำหรับการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อแข็ง เช่น ฟัน

สำหรับการศึกษาต่อไปในอนาคต เนื่องจากโครงการวิจัยนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นเพื่อทดสอบความเป็นไปได้ในการสกัดดีเอ็นเอที่สกัดจากรากฟันและนำมาใช้

ตารางที่ 1 *แสดงลำดับนิวคลิโอไทด์ (nucleotide sequence) ของไพรเมอร์โลคัสต่างๆ (ออกแบบเอง)*

ชื่อโลคัส/ยีน	ลำดับนิวคลิโอไทด์
D19S253 (forward)	5′-AGA TCA TAG ACA GAC AGA CGG ACT-3′
D19S253 (reverse)	5′-TGT GGC TCC TCC TGG GAA AT-3′
VWA (forward)	5′-GGA CAG ATG ATA AAT ACA TAG GAT GGA TGG-3′
VWA (reverse)	5′-CCC TAG TGG ATG ATA AGA ATA ATC-3′
PENTA E (forward)	5′-GAG ATC ACG CCA TTG CAC TCC AGC C-3′
PENTA E (reverse)	5′-CTT ATT TGG GTT ATT AAT TGA GAA AAC TCC-3′
Amelogenin (forward)	5′-CCC TGG GCT CTG TAA AGA ATA GTG-3′
Amelogenin (reverse)	5′-CCA TCA GAG CTT AAA CTG GGA AGC-3′

เปรียบเทียบกับลักษณะดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์กับดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือด โดยคณะผู้วิจัยเลือกใช้ 3 โลคัส ได้แก่ HUMPENTA E, HUMVWA และ HUMD19S253 เป็นตัวแทนของโลคัสทั้งหมด 18 โลคัสที่ใช้ในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลในภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (ด้วยเหตุผลทางด้านเทคนิค) ซึ่งแท้ที่จริงแล้วในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลจากตัวอย่างต่างๆ จำเป็นต้องตรวจให้ถูกต้องอย่างน้อย 16 โลคัส ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงจะได้นำดีเอ็นเอที่เหลือไปตรวจลักษณะดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์บนโลคัสที่ยังไม่ได้ตรวจ นอกจากนี้ทางคณะผู้วิจัยมีโครงการที่จะศึกษาถึงสภาวะต่างๆ โดยจำลองมาจากเหตุการณ์อุบัติภัยที่อาจจะเกิดขึ้นได้ เช่น เครื่องบินตกและเกิดไฟไหม้ทำให้ผู้โดยสารเสียชีวิตเป็นจำนวนมาก และศพถูกเผาทำลายจนไม่สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลได้ด้วยวิธีอื่นๆ โดยจะนำฟันที่ถูกถอนออกจากอาสาสมัครไปเผาที่เตาเผาอุณหภูมิต่างๆ กัน และตรวจสอบดูว่ายังสามารถที่จะสกัดดีเอ็นเอจากรากฟันนั้นและนำไปตรวจลักษณะดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์หรือบ่งบอกเพศได้หรือไม่ และจะพัฒนาวิธีตรวจดีเอ็นเอที่สกัดจากรากฟันโดยตรวจโลคัสต่างๆ หลายๆ โลคัสพร้อมกันด้วยวิธี multiplex PCR โดยใช้โลคัสมาตรฐานและใช้คู่ไพรเมอร์ที่ติดฉลาก (labeled) ด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนท์ (fluorescent) และนำไปแปลผลด้วยเครื่อง automated sequencer[13] เพื่อทำให้การวิเคราะห์ผลและการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลเป็นที่น่าเชื่อถือตามมาตรฐานสากลต่อไป

โดยสรุปทางคณะผู้วิจัยได้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของรากฟันจากฟันเพียง 1 ซี่ในการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล ซึ่งในอนาคตมีความเป็นไปได้สูงที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์และนิติทันตวิทยา ในการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลผู้สูญหาย และยังอาจนำองค์ความรู้ที่ได้จากโครงการวิจัยนี้ไปช่วยพัฒนาความรู้ทางด้านมานุษยวิทยาให้เพิ่มมากขึ้นโดยใช้พื้นฐานความรู้ทางด้านวิทยาศาสตร์เข้ามาช่วย

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานหลักประกันสุขภาพแห่งชาติและทันตแพทยสภาที่สนับสนุนเงินทุนวิจัยทั้งหมดในโครงการนี้ นอกจากนั้นขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในคลินิกภาควิชาศัลยศาสตร์ช่องปากซึ่งช่วยเก็บรวบรวมตัวอย่าง และขอขอบคุณ คุณสุทัศน์ ศรีดวงแก้ว นักวิทยาศาสตร์ และคุณวิฑูรย์ ทะสุยะ นักเทคนิคการแพทย์ในห้องปฏิบัติการนิติพันธุกรรมศาสตร์ ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ซึ่งได้ช่วยเหลืองานทางห้องปฏิบัติการ และต้องขอขอบคุณอาสาสมัครในโครงการวิจัยนี้ทุกท่านที่ให้ความร่วมมือเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

1. de Valck E. Major incident response: Collecting ante-mortem data. *Forensic Sci Int* 2006; 159S: S15-S19.
2. Neville B, Douglas D, Allen CM, et al. Forensic dentistry. In: *Oral and Maxillofacial Pathology*. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co.; 2002: 763-783.
3. Spitz WU. Spitz and Fischer' s medicolegal investigation of death. In: *Guidelines for the*

Application of Pathology of Crime Investigation. Springfield, Ill: Charles C. Thomas; 1993.

4. Wood RE, Kirk NJ, Sweet DJ. Digital dental radiographic identification in the pediatric, mixed and permanent dentitions. *J Forensic Sci* 1999; 44: 910-916.
5. Ten Cate AR. Structure of the oral tissues. In: *Oral Histology: Development, Structure, and Function*. 5th ed. St. Louis: Mosby-Year Book, Inc.; 1998: 1-9.
6. Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 1989; 44: 388-396.
7. Litt M, Luty JA. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet* 1989; 44: 397-401.
8. ธานินทร์ ภู่พัฒน์, สุทัศน์ ศรีดวงแก้ว. การตรวจดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์เพื่อการพิสูจน์บุคคลจากรากผม. วารสารนิติวิทยาศาสตร์ 2547; 1: 27-33.
9. Sajantila A, Pacek P, Lukka M, et al. A microsatellite polymorphism in the von Willebrand factor gene: comparison of allele frequencies in different population samples and evaluation for forensic medicine. *Forensic Sci Int* 1994; 68: 91-102.
10. Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, et al. Analysis of the VNTR locus D1S80 by PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 137-144.
11. Adcock GJ, Dennis ES, Easteal S, et al. Mitochondrial DNA sequences in ancient Australians: Implications for modern human origins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 537-542.
12. Sweet D, Hildebrand D. Recovery of DNA from human teeth by cryogenic grinding. *J Forensic Sci* 1998; 43: 1199-1202.
13. Kimpton CP, Gill P, Walton A, et al. Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci. *PCR Methods Appl* 1993; 3: 13-22.

ขอสำเนาบทความที่:

รศ.ทพ.ดร. อะนัฆ เอี่ยมอรุณ ภาควิชาทันตวิทยา-พยาธิวิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50202

Reprint Request:

Assoc Prof. Dr. Anak Iamaroon, Department of Odontology & Oral Pathology, Faculty of Dentistry, Chiang Mai University, Muang District, Chiang Mai 50202

E-mail: iamaroon@yahoo.com