

บทที่ 1

บทนำ วัตถุประสงค์ และบททวนเอกสาร

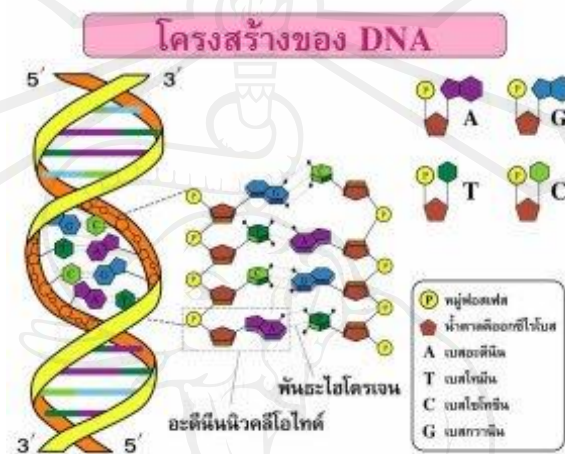
บทนำ หลักการ ทฤษฎี เหตุผล และสมมติฐาน

ปัจจุบันการตรวจพิสูจน์บุคคลมีมากมายหลายวิธีทั้งจากรูปพรรณสัณฐาน เครื่องแต่งกาย บาดแผล รอยแผลเป็น ตำหนิ และอื่นๆ แต่วิธีที่ได้รับการยอมรับอย่างเป็นสากล ได้แก่ การตรวจพิสูจน์ยืนยันด้วยเอกลักษณ์ลายพิมพ์นิ้วมือ การตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ฟัน และการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ดีเอ็นเอ ความรู้ทางด้านการพิสูจน์บุคคลมีประโยชน์อย่างมากในกระบวนการสืบสวน สอบสวนเพื่อระบุตัวบุคคลหรือเพื่อหาตัวผู้กระทำผิด

การพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลด้วยดีเอ็นเอได้เข้ามามีบทบาท และได้รับความสนใจอย่างมาก ในปัจจุบัน เพราะธรรมชาติของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในแต่ละบุคคล จึงทำให้สามารถใช้ดีเอ็นเอในการระบุตัวบุคคล ตรวจสอบผู้กระทำผิด ผู้ต้องสงสัย ผู้เสียชีวิตที่ไม่ทราบชื่อ เป็นต้น โดยนำเซลล์ ส่วนใดส่วนหนึ่งของร่างกายมาพิสูจน์ก็ได้ เพราะในแต่ละบุคคลจะมีดีเอ็นเอรูปแบบเดียวกันทั้งร่างกาย เช่น ตัวอสุจิ เซลล์รากเส้นผม เซลล์เม็ดเลือด ชันเนื้อ ฟัน เป็นต้น อย่างไรก็ตามการพิสูจน์ ชนิดของสารคัดหลั่งจากร่างกายนั้นอาจมีความเกี่ยวข้องที่แสดงถึงเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นในคดี อาชญากรรมนั้นๆได้

ดีเอ็นเอ (Deoxyribonucleic acid) เป็นชื่อของสารพันธุกรรม เป็นกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) ที่บรรจุข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต ดีเอ็นเอประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เรียกว่า นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ประกอบด้วยน้ำตาล (deoxyribose sugar) ฟอสเฟต (phosphate) และไนโตร-จีนัสเบส (nitrogenous base) เบสในนิวคลีโอไทด์ มีอยู่ 4 ชนิด ได้แก่ อะดีนีน (Adenine, A) ไทมิน (thymine, T) ไซโทซีน (cytosine, C) และกวานีน (guanine, G) ซึ่งการเรียงตัวของลำดับเบสทั้ง 4 ชนิดนี้ จะส่งผลต่อการเกิดความหลากหลายและความแตกต่างกันบนลำดับเบสของดีเอ็นเอที่จำเพาะในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด โครงสร้างของดีเอ็นเอประกอบไปด้วย สายพอลินิวคลีโอไทด์ที่เกิดจากการเชื่อมต่อกันของนิวคลีโอไทด์หลายๆหน่วยด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ โดยเกิดจากสายพอลินิวคลีโอไทด์ จำนวนสองสายเรียงตัวขนานกันในทิศทางตรงข้ามเข้าสู่และพันกันเป็นเกลียวเวียนขวาลายบันไดเวียนที่เรียกว่าดับเบิลเฮลิคซ์ (double helix) การเข้าสู่หรือเข้าจับกัน

ของสายพอลินิวคลีโอไทด์ทั้งสองสาย เกิดจากการเข้าคู่กันระหว่างเบสพิวรีนและเบสไพริมิดีน ด้วยพันธะไฮโดรเจน โดย A จำนวน 2 พันธะ เข้าจับกับ T ($A=T$) และ G ทำการสร้างพันธะจำนวน 3 พันธะ เข้าจับกับ C ($G=C$) โดยมีน้ำตาลและหมู่ฟอสเฟตทำหน้าที่เป็นแกนอยู่ด้านนอกของโมเลกุล (กาญจนา มะลิกรณ์, 2010)



ภาพ 1: แสดงลักษณะ โครงสร้างของดีเอ็นเอ (DNA structure)

(ที่มา: <http://www.thaigoodview.com/library/contest2552/type2/science04/27/contents/genetics-8e01.html>)

สารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอทั้งหมดที่มีอยู่ภายในเซลล์หนึ่งๆของสิ่งมีชีวิตถูกเรียกว่า จีโนม (Genome) ข้อมูลในจีโนมจึงเป็นข้อมูลทางพันธุกรรมทั้งหมดที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิตซึ่งแตกต่างกันและมีความจำเพาะในแต่ละสิ่งมีชีวิตในจีโนมหรือดีเอ็นเอทั้งหมดของมนุษย์ ประกอบด้วยจำนวนเบส (Base sequence) ประมาณ 3 พันล้านเบส ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 3 ส่วน ดังนี้

1. ดีเอ็นเอส่วนที่เป็นยีน (gene) มีประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ ของดีเอ็นเอทั้งหมดในมนุษย์ สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ส่วน คือ

1.1. ส่วนที่เป็นรหัสพันธุกรรม (coding sequence) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่มีรหัสพันธุกรรม (exon) ที่สามารถถอดรหัสเป็นสายโพลีเปปไทด์ได้ โดยส่วนที่เป็นรหัสพันธุกรรมจะน้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ ของส่วนที่เป็นยีน

1.2. ส่วนที่ไม่เป็นรหัส (non-coding sequence) ซึ่งเป็นส่วนของอินตรอนมีจำนวนมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ของส่วนที่เป็นยีน

2. ดีเอ็นเอส่วนที่ไม่ใช่ยีน (non gene) พบว่ามีประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ ของดีเอ็นเอ ทั้งหมดในมนุษย์ แบ่งออกเป็น

2.1. ดีเอ็นเอที่มีชุดเบสซ้ำ (repetitive DNA) มีประมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์ของดีเอ็นเอ ส่วนที่ไม่ใช่ยีน ซึ่ง Repetitive DNA แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ

2.1.1. ชุดเบสซ้ำต่อเนื่อง (Tendern repeat) คือชุดเบสซ้ำที่มีลำดับการเรียงตัวของ ชุดเบสซ้ำต่อกันเป็นช่วงยาว ได้แก่ satellite, minisatellite และ microsatellite ซึ่งแบ่งตาม จำนวนซ้ำ และความยาวของหน่วยซ้ำดังนี้

2.1.1.1) satellite (Highly repetitive DNA) คือชุดเบสซ้ำขนาด 2-7 เบส หรือชุด เบสซ้ำ ยาวขนาดหลายร้อยเบส โดยมีจำนวนซ้ำแต่ละตำแหน่งตั้งแต่ 10^3 - 10^7 ครั้ง

2.1.1.2) minisatellite (moderately repetitive DNA หรือ variable number of tendern repeat; VNTR) คือชุดเบสขนาด 9-100 เบส ที่มีจำนวนซ้ำแต่ละตำแหน่งตั้งแต่ 10-1000 ครั้ง

2.1.1.3) microsatellite (simple sequence repeats: SSR หรือ short tendern repeat; STR) คือชุดเบสซ้ำขนาด 2-7 โดยที่มีจำนวนซ้ำในแต่ละตำแหน่งไม่เกิน 100 ครั้ง

2.1.2. ชุดเบสซ้ำกระจาย (interspersed repeats) คือ กลุ่มของชุดเบสซ้ำที่พบ กระจายอยู่ที่บริเวณต่างๆในจีโนม ในลักษณะที่ต่างจากกลุ่มชุดเบสซ้ำ แบบต่อเนื่อง คือ จะ ไม่พบซ้ำ กันเป็นช่วงต่อเนื่องแต่จะอยู่ในลักษณะเดี่ยว (Individual unit) กระจายทั่วไป หลายๆ แห่งในจีโนมซึ่งแบ่งได้ เป็น 2 กลุ่มย่อย ตามความต้องการของชุดเบสซ้ำ

2.1.2.1) Short interspersed elements (SINES) คือ ชุดเบส กระจาย มีขนาด ประมาณ 130-300 เบส

2.1.2.2) Long interspersed elements (LINES) คือ ชุดเบสกระจาย มีขนาดตั้งแต่ 500 เบสขึ้นไป พบประมาณ 1-2 เปอร์เซ็นต์ของจีโนม

2.2 ลำดับเบสจำเพาะ มีประมาณ 70-80 เปอร์เซ็นต์ ของดีเอ็นเอส่วนที่ไม่ใช่ยีน

โครงสร้างพื้นฐานของโครโมโซม ประกอบด้วยสายดีเอ็นเอ และฮิสโตน โปรตีน โดยสาย ดีเอ็นเอจะอยู่ในลักษณะที่พันรอบฮิสโตนโปรตีนนอกจากดีเอ็นเอและฮิสโตนโปรตีนแล้ว โครโมโซมยังประกอบด้วยโปรตีนอื่นๆอีกหลายชนิดที่เข้าไปมีส่วนในกระบวนการต่างๆของ โครโมโซม เช่น การจำลองดีเอ็นเอ, การแปลรหัส, การถอดรหัส, การซ่อมแซมดีเอ็นเอ, การตัดต่อดี เอ็นเอ หากกล่าวถึงความเหมือนหรือความต่างกันของเอ็มบริโอ นิกเซลล์กับนิวเคลียสของโซมาติก เซลล์ นิวเคลียสของเอ็มบริโอ นิกเซลล์ และโซมาติกเซลล์ มีโครงสร้างพื้นฐานของโครโมโซม

เหมือนกันแต่ต่างกันในส่วนของการเกิดการดัดแปลงซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในพันธะโควาเลนต์ ของดีเอ็นเอ และฮิสโตนโปรตีน เกิดภาวะเอพิเจเนติก (โซติกา, 2011)

เอพิเจเนติก (Epigenetic) เป็นเรื่องที่พูดถึงกันมากในศตวรรษที่ 20 อธิบายถึงการเปลี่ยนแปลงที่เป็นลักษณะทางพันธุกรรมด้าน cellular phenotype หรือ การแสดงออกของยีน การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวขึ้นกับกลไกควบคุม (regulatory mechanism) ไม่ได้เกิดขึ้นกับลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยตรง เอพิเจเนติก (epigenetic) คือการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนแปลงไปโดยที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของดีเอ็นเอ กระบวนการเอพิเจเนติก มีหลายประการ โดยมีกระบวนการควบคุมหลักคือ ดีเอ็นเอ เมทิลเลชัน การดัดแปรฮิสโตน เช่น histone methylation, histone acetylation รวมทั้งการปรับเปลี่ยนโครงสร้างโครมาติน

Conrad Waddington นักชีววิทยาชาวอังกฤษ ได้ให้คำนิยามคำว่า เอพิเจเนติกส์ (epigenetics) ไว้ว่า “ ศาสตร์ทางด้านชีววิทยา ว่าด้วยเรื่องการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีนและผลผลิตของยีน ซึ่งทำให้ลักษณะต่างๆของสิ่งมีชีวิตปรากฏขึ้น” (Waddington, 1942) ส่วนคำว่า อีพิเจเนติก หมายความว่า การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่ลำดับเบสของดีเอ็นเอ ซึ่งการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนแปลงไปนี้สามารถผันกลับได้ และสามารถถ่ายทอดสู่รุ่นลูกหลานได้ (Bird, 2007) การควบคุมการแสดงออกของยีนโดยเอพิเจเนติกนั้น มีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของการดัดแปรทางเคมีชนิดต่างๆที่โครมาติน ซึ่งอาจเรียกรวมกันได้ว่า “ การดัดแปรทางเอพิเจเนติก ” (epigenetic modification) เช่น การเติมหมู่เมทิล ให้แก่เบสบนสายดีเอ็นเอ หรือการดัดแปรโปรตีนฮิสโตน ผลของการดัดแปรนี้เมื่อเกิดขึ้นร่วมกับการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่ม chromatin remodeling complex จะช่วยรักษาสมดุลให้แก่ยีน เพื่อให้ยีนมีการแสดงออกอย่างถูกต้องในระดับและระยะเวลาที่เหมาะสม (Grewal and Jia, 2007)

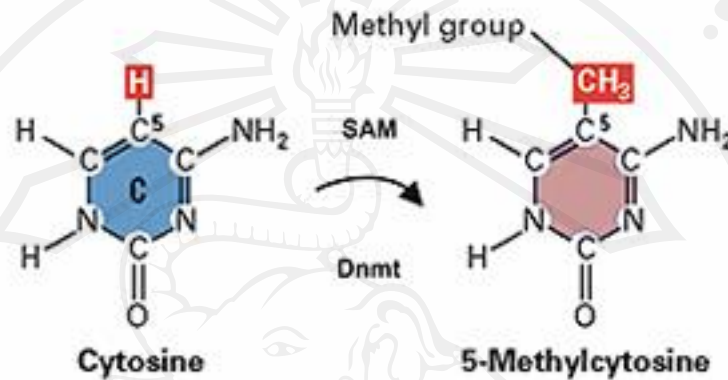
ดีเอ็นเอ เมทิลเลชัน (DNA methylation) ถือว่าเป็นกระบวนการควบคุมเหนือพันธุกรรม ที่มีการศึกษากันมากที่สุดในปัจจุบัน โดยดีเอ็นเอ เมทิลเลชันเป็นการเติมหมู่เมทิล (CH_3) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของเบสไซโตซีน (Cytosine, C) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอเมทิลทรานสเฟอเรส (DNA methyltransferase, DNMT) ซึ่งจะเคลื่อนย้ายหมู่เมทิลจาก S-adenosylmethionine (SAM) ได้เป็น 5-methyl cytosine และ S-adenosyl homocysteine (SAH) ในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมโดยส่วนใหญ่แล้ว ดีเอ็นเอเมทิลเลชันอาจเกิดกับไซโทซีนที่ไม่ใช่ CpG dinucleotide ได้เช่นเดียวกัน ดังที่พบในลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่เป็น CpHpG และ CpHpH ซึ่งส่วนใหญ่จะพบได้ในเซลล์ต้นกำเนิดของตัวอ่อนในมนุษย์มีเอนไซม์ DNMT ที่สำคัญแบ่งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ DNMT1, DNMT3a, DNMT3b ในขณะที่มีการถ่ายแบบของสายดีเอ็นเอ (DNA replication) DNMT1 จะทำหน้าที่รักษารูปแบบของดีเอ็นเอเมทิลเลชันให้เหมือนกับสายดีเอ็นเอ

แม่แบบ ดังนั้น DNMT1 จึงเป็น maintenance methyltransferase ในขณะที่ DNMT3a และ DNMT3b จะทำหน้าที่เติมหมู่เมทิลให้กับสายดีเอ็นเอ ที่สูญเสียหมู่เมทิล ไปในระหว่างกระบวนการถ่ายแบบ ของสายดีเอ็นเอ ดังนั้น DNMT13a และ DNMT3b จะทำหน้าที่เติมหมู่เมทิล ให้กับสายดีเอ็นเอ ที่สูญเสียหมู่เมทิลไปในระหว่างกระบวนการถ่ายแบบของสายดีเอ็นเอ ดังนั้น DNMT3a และ DNMT3b จึงจัดเป็น *de novo* methyltransferase ในจีโนมของมนุษย์ พบว่ามีจำนวนของ CpG dinucleotides ค่อนข้างน้อย ทั้งนี้เนื่องจาก ไซโทซีน ที่ถูกเติมหมู่เมทิล ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 มักถูกกำจัดหมู่เอมีน (deamination) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ทำให้ได้เบสไทมีนแทน แต่มักพบ CpG dinucleotide ค่อนข้างหนาแน่นในบริเวณที่เรียกว่า CpG-island ซึ่งมักเกี่ยวข้องกับโปรโมเตอร์ของยีน ในมนุษย์พบว่ามี CpG - island ประมาณร้อยละ 60 ในบริเวณ โปรโมเตอร์ของยีนทั้งหมด ในเซลล์ปกติ CpG -island ของยีนไม่เกิดเมทิลเลชัน แต่ CpG dinucleotide ในบริเวณอื่นในจีโนมจะถูกเมทิลเลชัน

การเกิดดีเอ็นเอ เมทิลเลชัน เป็นกระบวนการที่มีความอนุรักษ์สูง พบได้ในสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมนั้นการเกิดดีเอ็นเอ เมทิลเลชันส่วนมากมักจะพบการเติมหมู่เมทิลที่เบสไซโทซีนในลำดับเบสที่เป็น CpG การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันนั้นแบ่งออกเป็นสองชนิด คือ การเติมหมู่เมทิลเพื่ออนุรักษ์รูปแบบของดีเอ็นเอเมทิลเลชันไว้ หรือเรียกว่า maintenance methylation และการเติมหมู่เมทิลแบบใหม่หรือ *de novo* methylation โดยมีเอนไซม์ดีเอ็นเอเมทิลทรานสเฟอเรส (DNA methyl transferase; DNA MTase) ที่จำเพาะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาแต่ละชนิด การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันแบบ maintenance จะเกิดขึ้นบนสายดีเอ็นเอ หลังจากที่ดีเอ็นเอเกิดการจำลองตัวเองหรือการซ่อมแซมดีเอ็นเอ โดยมีดีเอ็นเอคู่สมสายหนึ่งที่มีการเติมหมู่เมทิลอยู่แล้วเป็นต้นแบบในการเติมหมู่เมทิลให้กับดีเอ็นเออีกสายหนึ่ง ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่ถูกจำลองตัวขึ้นมาใหม่จากกระบวนการนี้จึงทำให้สิ่งมีชีวิตสามารถรักษารูปแบบของการเติมหมู่เมทิลในดีเอ็นเอสายใหม่ได้ และทำให้รูปแบบของการเติมหมู่เมทิลนี้คงไว้เช่นเดิม หลังจากการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสและไมโอซิส ในขณะที่การเติมหมู่เมทิลแบบ *de novo* นั้นจะเป็นการเติมหมู่เมทิลให้กับดีเอ็นเอที่เบสไซโทซีนในตำแหน่งใหม่ โดยไม่ต้องอาศัยดีเอ็นเอซึ่งถูกเติมหมู่เมทิลอยู่แล้วเป็นต้นแบบ การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันแบบนี้จะทำให้เกิดรูปแบบของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันไปจากเดิม (Vanyushin and Ashapkin, 2011)

ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน สามารถเกิดการผันกลับได้ โดยการสูญเสียหมู่เมทิลที่ดีเอ็นเอ เกิดได้ 2 แบบด้วยกันคือ การสูญเสียหมู่เมทิลแบบ passive demethylation และแบบ active demethylation ในการเกิดดีเอ็นเอ เมทิลเลชันแบบ maintenance นั้นเกิดได้ไม่สมบูรณ์ระหว่างการจำลองตัวของดีเอ็นเอ

ในขณะที่ดีเอ็นเอ เมธิเลชันแบบ active จะเป็นการสูญเสียหมู่เมทิลที่ดีเอ็นเอ โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอไกลโค-ไซเลส (Zhang et al., 2010)



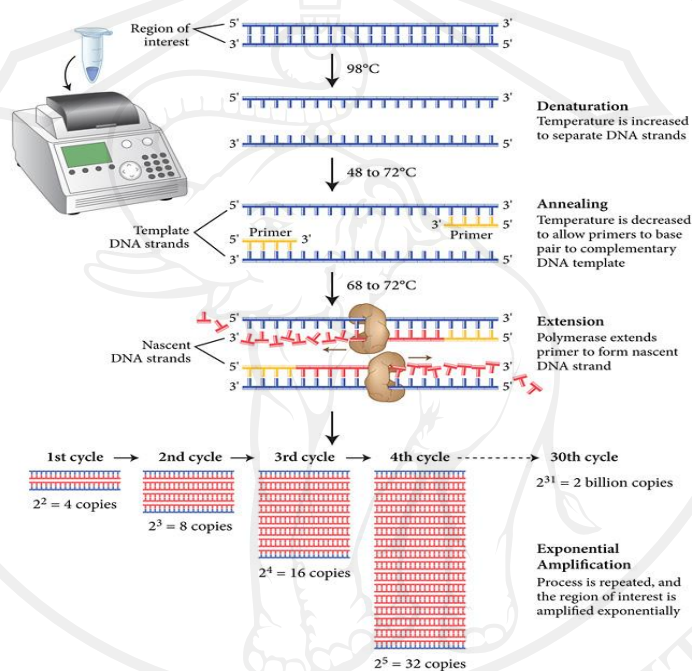
ภาพ 2: แสดงรูปแบบของดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation pattern)

(ที่มา: http://www.hgu.mrc.ac.uk/people/r.meehan_research/b.html)

ดีเอ็นเอมีคุณสมบัติในการเสียสภาพ (denaturation) และการคืนสภาพ (renaturation) ได้ เนื่องจากพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบสเป็นพันธะอ่อน ดีเอ็นเอจึงสามารถแยกออกเป็นเส้นเดี่ยวได้เมื่ออยู่ในสภาพที่มีอุณหภูมิหรือความเป็นกรดเป็นด่างสูงมากๆ และสามารถคืนสู่สภาพเดิมเมื่อมีการปรับอุณหภูมิ หรือความเป็นกรดเป็นด่างให้ลดลง การเข้าคู่ของดีเอ็นเอจะเป็นในรูปแบบเดิมคือ A จับกับ T และ G จับกับ C คุณสมบัติพฤติกรรมของดีเอ็นเอจึงสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพต่างๆ ได้โดยการนำดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction โดยอาศัยหลักการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ (DNA replication) จากดีเอ็นเอต้นแบบในหลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้น และได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่า

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (polymerase chain reaction) หรือ ปฏิกิริยา PCR เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายซึ่งอยู่ในสารละลายรวมกับดีเอ็นเออื่นโดยไม่จำเป็นต้องทำให้ชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวบริสุทธิ์ก่อน สามารถแยกส่วนของดีเอ็นเอที่สนใจได้โดยไม่ต้องนำไปขยายเพิ่มปริมาณในเซลล์หรือนำไปโคลน การทำ PCR คือการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ ดีเอ็นเอจะเกิดขึ้นได้จำเป็นต้องมีไพรเมอร์ 2 เส้น ที่มีเบสคู่สมกับปลายทั้งสองด้านของช่วงดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ โดยไพรเมอร์จะเข้าเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายและมีปลาย 3' ในทิศทางเข้าหากัน ดังนั้น

ข้อกำหนดในการทำ PCR คือต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอและบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ ซึ่งอาจทราบลำดับเบสทั้งหมดหรือทราบเฉพาะส่วนปลายก็ได้ เพื่อการออกแบบสังเคราะห์ไพรเมอร์มาใช้ในปฏิกิริยาต่อไป บริเวณหรือชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณขึ้นจะมีความยาวเท่ากับชิ้นดีเอ็นเอจากปลาย 5' ของไพรเมอร์หนึ่งถึงปลาย 5' ของไพรเมอร์อีกชนิดหนึ่งนั่นเอง



ภาพ 3: แสดงปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (polymerase chain reaction)

(ที่มา: <https://www.neb.com/applications/dna-amplification-and-pcr>)

ไพรเมอร์ ที่ใช้เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ ความยาวประมาณ 20-35 เบส วิธีทำ PCR คือสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ นำมาใส่รวมกับไพรเมอร์ บัฟเฟอร์ ไดออกซีไรโบนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟต (dNTP) ทั้ง 4 ชนิดทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบแยกเป็นสายเดี่ยว (denaturation) โดยใช้ความร้อนแล้วลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วเพื่อให้ไพรเมอร์ที่มีเบสคู่สมกับส่วนปลายของดีเอ็นเอเป้าหมายและมีปริมาณมากกว่าชิ้นดีเอ็นเออื่นๆ มากมายเข้ามาจับคู่กับส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ (annealing) ขั้นสุดท้าย จึงเปลี่ยนอุณหภูมิให้พอเหมาะกับการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส พร้อมทั้งใส่เอนไซม์ลงไปในปฏิกิริยา เอนไซม์จะทำหน้าที่สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ (primer)

extension) โดยมีดีเอ็นเอเป้าหมายเดิมเป็นต้นแบบ เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปครบทั้ง 3 ขั้นตอนโมเลกุลของดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า เช่นจากเดิมมี 1 โมเลกุลจะเพิ่มเป็น 2 โมเลกุล ดังนั้นถ้าดำเนินปฏิกิริยาซ้ำกัน (Denaturation-annealing-extension) หลายๆรอบ ปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มขึ้นจาก 1 เป็น 2,4,8... ไปเรื่อยๆจนถึง 2^n เท่าเมื่อปฏิกิริยาผ่านไป n รอบ

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในรอบแรก จะพบว่าผลผลิตที่ได้ ไม่ได้มีเฉพาะส่วนของดีเอ็นเอบริเวณที่เป็นเป้าหมายเท่านั้น แต่ได้โมเลกุลดีเอ็นเอที่มีสายหนึ่งยาวมากเพราะเป็นต้นแบบเดิมอีกสายหนึ่งที่เป็นคู่สมมีปลาย 5' เริ่มต้นจากปลาย 5' ของไพรเมอร์ที่ใช้ ส่วนปลาย 3' ยาวออกไปนอกบริเวณที่ต้องการ ในรอบที่ 2 ยังคงได้ผลผลิตที่มีสายยาวมากหรือมีปลาย 3' ที่ยาวเกินส่วนที่ต้องการ จนถึงรอบที่ 3 จึงเริ่มมีโมเลกุล ดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากับเป้าหมายที่ต้องการ ซึ่งจะเพิ่มปริมาณขึ้นอย่างรวดเร็ว ส่วนโมเลกุลที่มีปลาย 3' ยาวจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นรอบละ 2 โมเลกุลเท่านั้น โดยโมเลกุลที่มีปลาย 3' ดังกล่าวนี้อาจจะหามาจากดีเอ็นเอต้นแบบเริ่มต้นที่เป็นสายยาว เมื่อเปรียบเทียบกับพบว่าการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยรวมเพิ่มขึ้นแบบทวีคูณรอบละ 2 เท่า แต่โมเลกุลที่มีปลาย 3' ยาว เพิ่มขึ้นแบบสม่ำเสมอ 2 โมเลกุล ถ้าประสิทธิภาพของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสมบูรณ์จะสามารถคำนวณปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นได้เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอครบ 30 รอบปริมาณดีเอ็นเอที่มีขนาดตามเป้าหมาย จะเพิ่มขึ้นประมาณ 1 พันล้านเท่าขณะที่ดีเอ็นเอที่มีสายยาวมีเพียง 60 เท่าเมื่อนำผลผลิตที่ได้ไปตรวจสอบจึงพบเฉพาะดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากับเป้าหมายเท่านั้น

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ อาศัยการทำงานของเอนไซม์ ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส ถ้าใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสจากแบคทีเรีย *E.coli* หรือจากเซลล์อื่น เมื่อทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพโดยใช้อุณหภูมิสูงประมาณ 95 องศาเซลเซียส เอนไซม์ก็จะเสียสภาพด้วย ต้องเติมเอนไซม์ใหม่ลงไปในปฏิกิริยาทุกรอบของการสังเคราะห์ต่อมาที่มีการค้นพบ Tag DNA polymerase จากแบคทีเรียในน้ำพุร้อน *Thermus aquaticus* เอนไซม์นี้สามารถทนความร้อนได้สูง ทำให้การดำเนินปฏิกิริยา PCR สะดวกขึ้นไม่ต้องมีการเติมเอนไซม์และสามารถประยุกต์ใช้กับเครื่องอัตโนมัติได้ โดยควบคุมอุณหภูมิในแต่ละขั้นตอน ทำซ้ำ 30-40 รอบก็สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้เป็นล้านๆเท่าโดยใช้เวลาเพียง 3-4 ชั่วโมงเท่านั้น สำหรับอุณหภูมิที่ใช้ในแต่ละขั้นตอน คือ

ขั้นที่ 1 คือทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ มักใช้ที่ 94-95 องศาเซลเซียส ส่วนขั้นที่ 2 ทำให้ไพรเมอร์จับตัวกับดีเอ็นเอต้นแบบ จะอยู่ในช่วง 35-65 องศาเซลเซียส ขึ้นกับขนาดและองค์ประกอบของเบสและไพรเมอร์ที่ใช้ ทั้งนี้เพราะขนาดและองค์ประกอบของเบสมีผลต่ออุณหภูมิที่ใช้ในการแยกเกลียวคู่ให้เป็นสายเดี่ยว อุณหภูมิที่ใช้เพื่อทำให้ดีเอ็นเอเกลียวคู่แยกเป็นสายเดี่ยว 50 เปอร์เซ็นต์ เรียกว่า Melting temperature หรือ T_m ในกรณีของ โอลิโกนิวคลีโอไทด์สามารถคำนวณค่า T_m โดยประมาณได้จาก $T_m = [4 \times (C+G)] + [2 \times (A+T)]$ โดย G, C, A และ T คือจำนวนเบสแต่ละ

ชนิดที่มีในสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์นั้นค่าที่ได้มีหน่วยเป็นองศาเซลเซียส อุณหภูมิสำหรับ annealing จะใช้ประมาณ $T_m - 5$ องศาเซลเซียส ขั้นสุดท้าย คือ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อไพรเมอร์ จะใช้อุณหภูมิที่เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุด สำหรับ Tag polymerase คือ 72 องศาเซลเซียส เมื่อทราบลำดับเบสของยีนใด ๆ แล้ว สามารถสังเคราะห์ไพรเมอร์ 2 ชนิดสำหรับส่วนหัวและส่วนท้ายของยีนนั้น นำมาใช้เพิ่มปริมาณส่วนของยีนดังกล่าว เพื่อแยกยีนนั้นจากจีโนมหรือจากดีเอ็นเอโดยรวมได้โดยอาจใช้เทคนิค PCR ในการแยกส่วนของยีนใด ๆ ที่ทราบลำดับเบสเพื่อมาใช้โคลนยีนใช้เป็นโพรบเพื่อตรวจหายีนที่มีความสัมพันธ์กัน ใช้ตรวจความหลากหลายในสิ่งมีชีวิตใช้ในการตรวจสอบจีโนไทป์ ตรวจหาเชื้อโรคที่เกิดกับคน สัตว์ หรือพืช เป็นต้น

เนื่องจากเทคนิค PCR เป็นเทคนิคที่มีความไว (sensitivity) สูง สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นล้านๆ เท่าได้อย่างรวดเร็วใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้นเพียงเล็กน้อยก็สามารถตรวจสอบได้ ดังนั้นจึงต้องระมัดระวังการปนเปื้อนของดีเอ็นเอจากภายนอก เช่น จากอากาศ ผิวหนัง เส้นผม เป็นต้น

ในการทำ PCR ต้องใช้สารเคมีต่างๆดังนี้

บัฟเฟอร์ สำหรับทำปฏิกิริยาซึ่งมักจะมาพร้อมกับเอนไซม์ Tag polymerase โดยมีความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของที่ใช้จริง (10x buffer) ซึ่งจะใส่ในปริมาณ 1 ใน 10 ของปริมาตรรวมของปฏิกิริยา dNTP ประกอบด้วย dATP, dCTP, dGTP, dTTP ความเข้มข้นอย่างละ 2 มิลลิโมลาร์ โดยอาจซื้อสำเร็จรูปหรือซื้อมาแต่ละชนิดแล้วจึงนำมารวมกันให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ ในปฏิกิริยาจะใส่ในปริมาณ 1 ใน 10 ของปริมาตรรวม เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็นชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์

ไพรเมอร์ ที่นิยมใช้คือโอลิโกนิวคลีโอไทด์ขนาด 20-24 นิวคลีโอไทด์ มีองค์ประกอบของเบส G และ C อยู่ระหว่าง 40-60 เปอร์เซ็นต์ โดยไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิดที่ใช้คู่กันควรมีส่วนประกอบของ G+C เท่ากัน เพื่อให้ค่า T_m เท่ากันหรือใกล้เคียงกัน และไม่ควรใช้ไพรเมอร์ที่มีลักษณะปลายทั้ง 2 ข้างเป็นคู่สมกัน (palindrome sequence) ทั้งภายในไพรเมอร์เดียวกันและระหว่างไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิดที่ใช้คู่กันแต่ในบางกรณีก็พบว่าอาจจะใช้ไพรเมอร์ที่มีลักษณะไม่เหมาะสมดังกล่าวได้บ้าง การออกแบบไพรเมอร์อาจทำได้โดยดูจากลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณโดยตรงหรือใช้โปรแกรมสำเร็จรูปก็ได้ เมื่อสังเคราะห์ไพรเมอร์เรียบร้อยแล้วจึงนำมาละลายในน้ำหรือ TE buffer ให้มีความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ปริมาณที่ใช้ในปฏิกิริยา คือ ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1-2.0 ไมโครโมลาร์

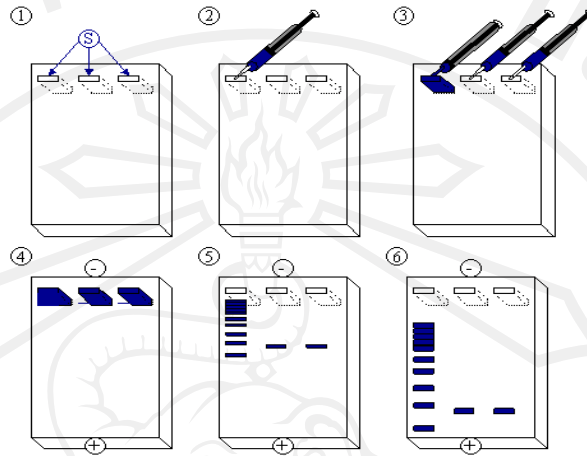
ดีเอ็นเอเป้าหมาย ใช้ได้ทั้งดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีและดีเอ็นเอที่มีคุณภาพไม่ดีนัก เช่น ดีเอ็นเอจากเซลล์เม็ดเลือด เนื้อเยื่อที่เก็บในพาราฟิน เป็นต้น แต่ถ้าใช้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีก็จะได้

ผลผลิตมากกว่า ปริมาณดีเอ็นเอใช้ได้ตั้งแต่ 5-500 นาโนกรัม โดยทั่วไปนิยมใช้ในช่วง 10-50 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา

แมกนีเซียมคลอไรด์ ซึ่งอาจรวมอยู่ในบัฟเฟอร์ก็ได้ แต่ส่วนใหญ่แยกต่างหากเพื่อให้ปรับใช้ได้ปริมาณที่เหมาะสมกับดีเอ็นเอแต่ละชนิด เนื่องจากแมกนีเซียมไอออนเป็นส่วนสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส และมีรายงานว่าความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออนมีผลต่อปฏิกิริยามาก ดังนั้นในการทดลองกับตัวอย่างชนิดใหม่ที่ยังไม่มีรายงานมาก่อน จึงควรทดลองปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ก่อนเพื่อเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด ความเข้มข้นของแมกนีเซียมที่ใช้ในปฏิกิริยาคือ 1.5-10 มิลลิโมลาร์

เอนไซม์ เนื่องจากขั้นตอนในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยเทคนิค PCR ต้องมีการทำให้ดีเอ็นเอเสถียรด้วยความร้อน เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสที่ใช้จึงเลือกใช้เอนไซม์ทนความร้อน (thermostable DNA polymerase) เอนไซม์ชนิดแรกแยกได้จากแบคทีเรีย *Thermus aquaticus* VT1 ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมที่สูงสุดได้ที่ pH 7.3-8.3 ชนิดที่ 2 แยกได้จากแบคทีเรียเดียวกัน เป็นชนิดที่มีการใช้กันมาก รู้จักกันในชื่อ Tag polymerase ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส สำหรับเอนไซม์ Tag polymerase มักอยู่ในสารละลายที่มีความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตรและใช้ในปฏิกิริยา 2.5-5 ยูนิต ต่อปฏิกิริยา 100 ไมโครลิตร ต่อมาสามารถแยกเอนไซม์ได้อีกหลายชนิดจากแบคทีเรียต่างๆ โดยทุกชนิดที่แยกได้ประกอบด้วยพอลิเปปไทด์เดียว (Monomer) ขนาดอยู่ระหว่าง 61-100 กิโลดาลตัน ความแตกต่างของเอนไซม์แต่ละชนิดคือการมีคุณสมบัติตัดดีเอ็นเอจากปลาย (exonuclease activity) เพราะเอนไซม์ที่สามารถตัดดีเอ็นเอจากปลาย 3' (3' to 5' exonuclease) จะสามารถกำจัดนิวคลีโอไทด์ที่สังเคราะห์ผิดพลาดหรือตรวจสอบความถูกต้องได้ (proofreading) หลังจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์แล้ว จะต้องนำผลผลิตที่ได้มาทำการวิเคราะห์โดยใช้กระแสไฟฟ้าในการแยก โดยใช้เทคนิค เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

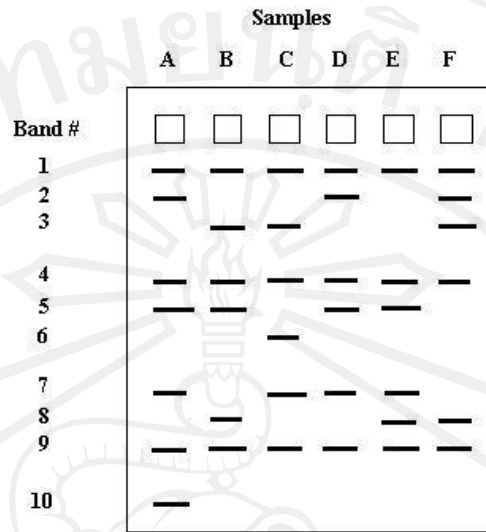
อิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโมเลกุลของสารที่มีประจุออกจากกัน โดยใช้กระแสไฟฟ้า โดยให้สารที่มีประจุนั้นเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางชนิดหนึ่งในสารละลาย สารที่ประจุต่างกันจะเคลื่อนที่ไปในทิศทางตรงกันข้าม นอกจากประจุแล้วอัตราการเคลื่อนที่ก็ยังขึ้นอยู่กับรูปร่าง ขนาด แรงเคลื่อนไฟฟ้า และชนิดของตัวกลางที่ใช้ สารละลายของดีเอ็นเอประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟตจำนวนมาก จึงมีประจุเป็นลบในสารละลายที่มี pH เป็นกลาง เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้า โมเลกุลของดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก เนื่องจากหมู่ฟอสเฟตอยู่น้อยกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ ดังนั้นจะพบว่าประจุต่อมวลโมเลกุลของดีเอ็นเอทุกขนาดมีค่าเท่ากัน ความเร็วในการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอจึงขึ้นอยู่กับขนาดเป็นส่วนใหญ่ อย่างไรก็ตามมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอด้วย



ภาพ 4: ขั้นตอนเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

(ที่มา: <http://ku-scmicro36bkk.tripod.com/PCR.html>)

อะกาโรส เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) อะกาโรสเป็นสายพอลิเมอร์ของ D-galactose และ 3, 6-anhydro-L-galactose เมื่อเตรียมแผ่นเจล โดยต้มสารละลายอะกาโรสในบัฟเฟอร์และเทลงในถาดเตรียมเพื่อให้แข็งตัว เมื่อเย็นจะได้เจลที่มีรูพรุนใหญ่จึงใช้แยกสารที่มีขนาดใหญ่ เช่น กรดนิวคลีอิก ซึ่งขนาดรูพรุนขึ้นกับความเข้มข้นของอะกาโรส (เมื่อความเข้มข้นสูงรูพรุนจะเล็กลง) ในตัวกลางที่ pH เป็นกลาง โมเลกุลของกรดนิวคลีอิกจะมีประจุลบและเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวกด้วยความเร็วที่ขึ้นกับขนาดโมเลกุล และโครงรูป กรดนิวคลีอิกขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าขนาดใหญ่ และถ้าขนาดเท่ากันแต่มีรูปร่างต่างกันจะมีอัตราเร็วต่างกัน บัฟเฟอร์ที่ใช้คือ Tris acetate (TAE), Tris borate (TBE) และ Tris phosphate (TPE) ที่มีความเข้มข้น 50 mM pH 7.0-8.5 และมี EDTA เพื่อยับยั้งการทำงานของ ดีเอ็นเอส ส่วนสีย้อมที่ใช้เป็นสารประกอบฟลูออเรสเซนต์ที่จับกับดีเอ็นเอสายคู่ โดยเข้าไปแทรกตัวระหว่างคู่เบสที่ซ้อนกัน เช่น เอธิเดียมโบรไมด์ เมื่อฉายแสงอัลตราไวโอเลตจะทำให้มองเห็นเป็นแถบของดีเอ็นเอเรืองแสง



ภาพ 5: แสดงผลของเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

(ที่มา: http://biology.arizona.edu/sciconn/lessons2/alongi/Lesson5_3.htm)

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อระบุชนิดและแหล่งที่มาของดีเอ็นเอจากอสุจิหรือเลือด โดยตรวจสอบความแตกต่างของดีเอ็นเอเมทิลเลชันใน โมเลกุลของดีเอ็นเอ

ประโยชน์ที่จะได้รับจากการศึกษาเชิงทฤษฎีและ/หรือเชิงประยุกต์

1. ได้วิธีการใหม่ในการตรวจแยก ดีเอ็นเอ ที่มาจากอสุจิหรือเซลล์เม็ดเลือด
2. สามารถระบุแหล่งที่มาที่แน่นอนของดีเอ็นเอได้
3. นำมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในการพิสูจน์วัตถุพยานทางคดีได้

ทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การระบุสารคัดหลั่งหรือสารของเหลวในร่างกาย ที่พบในสถานที่เกิดเหตุ โดยการใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมมาเป็นตัวกำหนด ได้กลายเป็นสิ่งที่น่าสนใจในงานทางด้านนิติพันธุศาสตร์ มีการศึกษาในต่างประเทศหลายงานวิจัย ที่ศึกษาเกี่ยวกับดีเอ็นเอ เมทิลเลชัน ที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการระบุสารของเหลวในร่างกายในการพิสูจน์ให้เห็นว่า ดีเอ็นเอ เมทิลเลชัน เป็นเทคนิคที่มีความเสถียร มีความไวและความจำเพาะ ค่อนข้างสูง สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างทางชีวภาพในการระบุถึงแหล่งที่มา ของเนื้อเยื่อหรือเซลล์เหล่านั้น

จากการรายงานของ Frumkin และคณะ (2011) ในการศึกษาเรื่องดีเอ็นเอ เมทิลเลชัน กับการระบุเนื้อเยื่อในทางนิติวิทยาศาสตร์ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบว่ารูปแบบเมทิลเลชันที่ต่างกันสามารถใช้แยกชนิดของเนื้อเยื่อที่แตกต่างกันได้ โดยอยู่บนพื้นฐานของการตรวจหารูปแบบที่จำเพาะของการเติมหมู่เมทิล ซึ่งใช้เทคนิค MSRE-PCR (methylation-sensitive restriction endonuclease polymerase chain reaction) ในการตรวจเลือด น้ำลาย อสุจิ เซลล์ผิวหนังกำพริบทั้งหมดจำนวน 50 ตัวอย่าง โดยทำการวิเคราะห์ทั้งสิ้น 15 ตำแหน่ง ผลที่ได้สามารถระบุถึงชนิดและแหล่งที่มาของทุกตัวอย่างได้อย่างถูกต้อง โดยการวิเคราะห์แบ่งเป็นการทดสอบแบบ Stand-alone assay และ combined assay ซึ่งกล่าวสรุปไว้ว่า รูปแบบดีเอ็นเอ เมทิลเลชัน เป็นเครื่องมือที่มีแนวโน้มที่จะแยกความแตกต่างระหว่างชนิดของเซลล์ที่ปนอยู่ในของเหลวจากส่วนประกอบต่างๆของร่างกายได้ เพราะเป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะสูง และสามารถเข้ากันได้กับการทำ STR profile ซึ่งเหมาะที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในงานทางนิติวิทยาศาสตร์ในการอธิบายคุณลักษณะของตัวอย่างทางชีวภาพ

Gomes และคณะ (2011) ทำการศึกษาเรื่องเครื่องหมายทางพันธุกรรมในการระบุเนื้อเยื่อและของเหลวในร่างกายในทางนิติวิทยาศาสตร์ โดยทำการเปรียบเทียบวิธีการในการระบุเนื้อเยื่อสองวิธี คือวิธี ดีเอ็นเอ เมทิลเลชันกับวิธีเอ็มอาร์เอ็นเอ โดยเก็บตัวอย่างจากจากเซลล์ผิวหนังที่ฝ่ามือจำนวน 10 ตัวอย่าง และตัวอย่างน้ำลาย จำนวน 8 ตัวอย่าง สำหรับวิธีการตรวจด้วยวิธีเอ็มอาร์เอ็นเอ เลือกใช้ตำแหน่งในการวิเคราะห์คือ LOR, KRT9, CDSN ส่วนวิธีดีเอ็นเอ เมทิลเลชัน เลือกใช้ตำแหน่ง L91762, L68346, L76138 และ L26688 (Frumkin และคณะ, 2011) ได้ผลสรุปสำหรับวิธีเอ็มอาร์เอ็นเอว่า ตำแหน่ง LOR และ CDSN มีความไวสูงในการตรวจเซลล์ผิวหนังชนิดอิพิทีเลียมและ KRT9 มีความไวค่อนข้างน้อยในการตรวจเซลล์ผิวหนังสำหรับวิธีการเอ็มอาร์เอ็นเอนี้ LOR มีความเสถียร มีความไว เหมาะที่จะนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์เซลล์ผิวหนัง สำหรับ CDSN ไม่ควรที่จะนำมาใช้เดี่ยวๆต้องใช้ร่วมกับ LOR

สำหรับวิธีดีเอ็นเอเมทิลชัน ของตัวอย่างเซลล์ผิวหนังจะมีอัตราส่วน เมทิลชันในระดับสูง ของ L91762/L68346 และ L76138/L26688 ในตัวอย่างน้ำลาย ก็ให้ผลในอัตราส่วนเมทิลชันในระดับสูงเช่นกัน ซึ่งไม่เป็นไปตามที่คาดหวังว่า ใน L76318/L26688 จะได้อัตราส่วนที่ต่ำ ดังนั้น อาจจะเป็นไปไม่ได้ที่จะใช้เพียงสี่ตำแหน่งในการแยกความแตกต่างของเนื้อเยื่อ และได้กล่าวไว้ด้วยว่าการตรวจ mRNA ได้รับการพิสูจน์แล้วว่าเป็นวิธีการที่น่าเชื่อถือสำหรับการระบุที่ให้ผลเชิงบวก จากวัสดุชีวภาพมากที่สุดที่พบในที่เกิดเหตุ และรูปแบบดีเอ็นเอ เมทิลชัน จะจำเพาะสำหรับชนิดของเนื้อเยื่อที่แยกให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่างชนิดของเซลล์ และมีแนวโน้มที่จะเป็นอีกหนึ่งเครื่องมือที่มีคุณภาพในงานทางนิติวิทยาศาสตร์

Lee และคณะ (2012) ได้ทำการศึกษาเรื่อง การประยุกต์ใช้ ดีเอ็นเอ เมทิลชันในการระบุของเหลวในร่างกาย โดยวิเคราะห์จาก tDMRs (tissue-specific differentially methylation region) จำนวน 5 ตำแหน่งคือ DACT1, USP49, HOXA4, PFN3 และ PRMT2 โดยวิธี bisulfite sequencing analysis ซึ่งใช้ดีเอ็นเอ จากตัวอย่าง เลือด น้ำลาย อสุจิ เลือดประจำเดือน สารคัดหลั่งจากช่องคลอด ได้ผลการวิเคราะห์ว่า tDMRs ของ DACT1 และ USP49 แสดง hypomethylation ที่จำเพาะต่อ อสุจิ และ tDMRs ของ HOXA4, PFN3 และ PRMT2 แสดงผลระดับเมทิลชันที่แตกต่างกันตามชนิดของเนื้อเยื่อ ดังนั้น ความจำเพาะของ ของเหลวในร่างกายที่มี ดีเอ็นเอ เมทิลชันที่ต่างกันอาจจะเป็นตัวบ่งชี้สำหรับการระบุของเหลวในร่างกายได้อย่างดี เพราะรูปแบบดีเอ็นเอ เมทิลชันที่ได้ จะใช้แหล่งที่มาของดีเอ็นเอจากร่างกายเดียวกันกับการระบุบุคคล (STR profile) ทำให้สามารถระบุตัวบุคคลพร้อมทั้งบอกถึงแหล่งที่มาของเนื้อเยื่อเหล่านั้นได้พร้อมๆกัน

Byun และคณะ (2009) ทำการศึกษาเรื่องรูปแบบเอพิเจเนติก ในการระบุเนื้อเยื่อที่ได้จากการชันสูตรพลิกศพและรูปแบบดีเอ็นเอ เมทิลชันที่จำเพาะในแต่ละบุคคล ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์รูปแบบดีเอ็นเอ เมทิลชันจากเนื้อเยื่อหลายชนิดจากบุคคลหลายคนโดยเทคนิค Illumina GoldenGate BeadArray โดยใช้รูปแบบดีเอ็นเอ เมทิลชันที่แตกต่างกัน ของเนื้อเยื่อ จำนวน 11 ชนิด ซึ่ง ได้กล่าวไว้ว่า ชนิดของเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ต่างกันจะมีรูปแบบดีเอ็นเอ เมทิลชันที่ต่างกัน แต่พบว่าการใช้ เทคนิค Illumine GoldenGate BeadArray นั้นถ้าใช้ probes จำนวนมาก อาจรบกวนการวิเคราะห์ จีโนมทั้งหมดได้

Baron และคณะ (2006) ที่ทำการศึกษาเรื่อง การวิเคราะห์ ดีเอ็นเอเมทิลชัน ที่เป็นเครื่องมือสำหรับแยกชนิดของเซลล์ โดยทำการทดสอบว่ารูปแบบของดีเอ็นเอ เมทิลชันจะเป็นเครื่องหมายที่โดดเด่นถึงชนิดของเซลล์ ซึ่งระบุ cell type specific differentially methylated gene regions (CDMs) ซึ่งวิธีนี้จะให้รูปแบบที่ชัดเจนถึงชนิดของเซลล์ สามารถบอกชนิดของเซลล์ได้จึงสรุปได้ว่า ชนิดของเซลล์และเนื้อเยื่อที่ต่างกันจะมีรูปแบบดีเอ็นเอ เมทิลชันที่ต่างกันด้วย

Hyun และคณะ (2013) ทำการศึกษาเรื่องความจำเพาะของดีเอ็นเอ เมทิลเลชัน โดยวิธี มัลติเพล็กซ์ สำหรับการระบุชนิดของเหลวในร่างกาย โดยทำการพิสูจน์ถึงการเปลี่ยนแปลงของเมทิลเลชันที่เกี่ยวข้องกับอายุใน eDMRs ที่จำเพาะกับอสุจิ โดยใช้จากชายหนุ่มและชายสูงวัย ใช้วิธี methylation-sensitive-restriction enzyme PCR และ Methylation SNashot วิเคราะห์จาก ตำแหน่ง USP49, DACT1, PRMT2 และ PFN3 ทั้งสองวิธีให้ผลเป็นที่น่าพอใจ สามารถระบุอสุจิได้พร้อม บอกถึงการมีหรือไม่มี spermatozoa และสามารถบอกถึงความแตกต่างของเลือดประจำเดือนกับสาร คัดหลั่งในช่องคลอด จากเลือด และน้ำลาย ซึ่งการศึกษานี้จะสนับสนุนการระบุของเหลวในร่างกาย โดยวิธีดีเอ็นเอ เมทิลเลชัน และอาจเป็นเครื่องมือที่มีคุณค่าในงานทางนิติวิทยาศาสตร์