การจำแนก 16S rDNA ของแพงก์ตอน โดยใช้วิธีการใหม่ที่มีพื้นฐานจากวิธี PCR-DGGE เพื่อวินิจฉัยการตายจากการจมน้ำ

A novel PCR-DGGE-based method for identifying plankton 16S rDNA for the diagnosis of drowning

510 720 สัมมนาสำหรับนิติวิทยาศาสตร์ 1 ภาคต้น ปีการศึกษา 2553

ผู้ให้สัมมนา นายอำนาจ ยอดใจ รหัส 52312348

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.ธงชัย เตโชวิศาล

วัน เวลา สถานที่ 31 กรกฎาคม 2553

บทคัดย่อ

การวินิจฉัยการตายจากการจมน้ำนั้น เป็นหนึ่งในหลายปัญหาที่ยากต่อการวินิจฉัยในทางนิติวิทยาศาสตร์ เราจึงได้พัฒนาวิธีการ PCR-DGGE ที่ไวต่อการทดสอบ และจำเพาะกว่า เพื่อจำแนก 16S rDNA ของแพลงก์ตอน ซึ่งเป็นส่วนที่คงอยู่ในน้ำทุกชนิด ในลำดับการประเมินผลเพื่อประโยชน์ของวิธีการที่ใช้วินิจฉัยการตายจากการจมน้ำนั้น เราได้ใช้วิธีการตรวจหา 16S rDNA ของแพงก์ตอน ในกระต่ายที่ถูกทำให้จมน้ำตาย และกระต่ายที่ไม่ได้ถูกทำให้จมน้ำตาย แต่ถูกนำไปแช่ในน้ำหลังจากที่ตายแล้ว ตลอดจนการศึกษากรณีการตายของศพจมน้ำ 2 ศพ DNA ของแพงก์ตอน ถูกจำแนกจาก ปอด, ตับ, ไต, เลือด และสมอง ของกระต่ายที่ถูกทำให้จมน้ำตาย และรูปแบบของ DEEG นั้นจะช่วยในการชี้บอกแหล่งหรือสถานที่เกิดเหตุ DNA ของแพงก์ตอน จะถูกจำแนกจากปอดทั้งสองข้างของกระต่ายที่ไม่ได้จมน้ำตายด้วยเช่นกัน ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าวิธีการใหม่ที่มีพื้นฐานจากวิธี PCR-DGGE มีประสิทธิภาพและเป็นประโยชน์ในการวินิจฉัยการตายจากการจมน้ำ

<u>เอกสารอ้างอิง</u>

1. F. He, D. Huang, L. Liu, X. Shu, H. Yin, X. Li, A novel PCR-DGGE-based method for identifying plankton 16S rDNA for the diagnosis of drowning, Forensic Science International 176 (2008) 152-156.
2. A. Auer, Qualitative diatom Analysis as a tool to diagnose of drowning, Am. J. Forensic Med. Pathol. 12 (1991) 213-218
3. F. He, L. Liu, D. Huang, Q. Yang, X. Zhai, H. Yin, The value of plankton 16S rDNA detection on identification of drowing rat, Chin. J. Forensic Med. 21 (2006) 331-333

Abstract

The diagnosis of drowning is one of the most difficult issues in forensic practice. We have developed a sensitive and specific PCR and DGGE method for identifying the 16S rDNA of plankton, which exists ubiquitously in all types of water. In order to evaluate the usefulness of this method for diagnosis of drowning, we used this method for detection of plankton 16S rDNA in drowned rabbits and non-drowned rabbits submerged after death, as well as two human drowning cases. Plankton DNAwas identified from lung, liver, kidney, blood and brain of the drowned victims, and the DGGE patterns were helpful in indicating the site of drowning. Plankton DNA was also identified from two lung samples obtained from nondrowned rabbits. The results show that the new PCR–DGGE-based method is a potentially useful tool for diagnosing drowning.

บทนำ

ในการวินิจฉัยการจมน้ำของศพที่ได้หลังจากการกู้ศพขึ้นมาจากน้ำ โดยพื้นฐานหลักแล้วมักจะมีสัญญาณของการจมน้ำบ่งบอกไว้ เช่น การเกิดฟองที่รูจมูก หรือปาก, ถุงลมโป่งพอง และมีรอยกดของกระดูซี่โครงบนปอด เป็นต้น สำหรับศพจมน้ำที่ถูกพบมีการเน่า หรือถูกย่อยสลายมักจะทำให้การวินิจฉัยการจมน้ำเป็นไปได้ค่อนข้างยาก เนื่องมาจากสาเหตุที่ว่าสัญญาณของการจมน้ำนั้นได้ถูกทำลายไป แม้ว่า การวินิจฉัยมักจะนิยมใช้การทดสอบไดอะตอม ซึ่งยังมีข้อโต้แย้งแต่ผู้ชำนาญการในกระบวนการยุติธรรม ยังคงเล็งเห็นความน่าเชื่อได้ของไดอะตอมเมื่อเปรียบเทียบกับอย่างอื่น และเป็นเครื่องมือการวินิจฉัยที่เป็นประโยชน์ในกระบวนการยุติธรรม

วิธีการทดสอบโดยใช้ไดอะตอมมีกระบวนการหลักที่ใช้กันโดยทั่วไปอยู่ 3 วิธี คือ disorganization ด้วยกรดแก่, การใช้เอนไซม์ย่อยด้วย proteinase K, และ การทำละลายด้วย soluene-350 กระบวนการย่อยด้วยกรดแก่นั้นถูกใช้อย่างกว้างขวางในประเทศจีน อย่างไรก็ตาม อาจจะไม่พบไดอะตอมจากผู้ที่จมน้ำ อันมีสาเหตุมาจาก (1) อาจจะไม่พบในตัวกลางการจมน้ำ (ในตัวกลางเอง, การเปลี่ยนแปลงของสภาพอากาศ, มลพิษ, ฯลฯ) (2) ไดอะตอมไม่สามารถทะลุผ่านเข้าไปในถุงลมได้ หรือ (3) ไดอะตอมบางส่วน หรือทั้งหมด ถูกทำลายไประหว่างกระบวนการเตรียมตัวอย่าง ดังนั้น สาเหตุเหล่านี้จึงเป็นสาเหตุสำคัญในการพัฒนาวิธีการที่น่าเชื่อถือ ในการจำแนกไดอะตอมและสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กชนิดอื่นที่อาศัยอยู่ในน้ำ ซึ่งอาจจะสามาถผ่านเข้าไปในอวัยวะของผู้ที่จมน้ำได้ ยังมีวิธีการอื่นๆที่ได้พยายามในการจำแนกแพลงก์ตอนต่างๆ มากกว่าการใช้ไดอะตอม ในผู้ที่จมน้ำ

ด้วยการพัฒนาทางด้านอณูชีววิทยา มีการใช้กระบวนการทาง DNA มาประยุกต์ใช้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการตรวจหาการถอดรหัสของ 16s rDNA เป็นการจัดเตรียมจุดมุ่งหมายที่มีความหวังในการตรวจหาแพลงก์ตอนในเนื้อเยื่อ และการวินิจฉัยการจมน้ำ Kane *et al.* ได้ออกแบบ primer จำเพาะขึ้นมา 2 คู่ ที่เหมาะกับsequence information ของ picoplankton ที่มีอยู่ในทะเลสาบ Biwa ประเทศญี่ปุ่น และประสบผลสำเร็จเป็นอย่างยิ่งในการใช้ primer ในการขยายท่อนสาย 16s rDNA ของ picoplankton จากเนื้อเยื่อของผู้ที่จมน้ำ ด้วยกระบวนการที่มีความไว และความจำเพาะนี้ การจำแนกแพลงก์ตอนก็ไม่ต้องขึ้นอยู่กับการใช้ลักษณะเฉพาะทางสัณฐานอีกต่อไป Nübel *et al.* ได้ออกแบบชุด primer ที่จำเพาะกับ phylum เพื่อคัดเลือกการขยายท่อนสาย 16s rDNA ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน และ ไดอะตอม จากแหล่งธรรมชาติต่างๆ และทำให้ประสบผลสำเร็จในการจำแนกสายพันธุ์ต่างๆ ด้วยวิธีการdenaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

ในงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึง ผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีการ PCR ที่มีความไว และจำเพาะ และกระบวนการ DGGE เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ 16s rDNA ของแพลงก์ตอน และกระบวนการนี้ได้นำไปเป็นต้นแบบใช้ในการทดลอง และ กรณีศึกษาคนจมน้ำอีก 2 กรณี

อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง

กระต่ายสีขาว ไม่แยกเพศ จำนวน 30 ตัว แต่ละตัวมีน้ำหนักประมาณ 2.4-3.4 กิโลกรัม ได้รับมาจาก ศูนย์สัตว์ทดลอง, วิทยาลัยการแพทย์ Tongji, มหาวิทยาลัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี Huazhong, กระต่ายจะถูกสุ่มแยกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มจมน้ำ (n=12), กลุ่มที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงหลังจากการตาย (n=12), และกลุ่มควบคุม (n=6), การดูแลสัตว์ทดลองจะเป็นไปตามระเบียบวิธีการ และแนวทางของวิทยาลัยการแพทย์ Tongji, มหาวิทยาลัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี Huazhong, ประเทศจีน

กระบวนการจมน้ำ และการเตรียมเนื้อเยื่อ

การทดลองนี้ได้เลือกสถานที่สำหรับทดลองการจมน้ำไว้ 2 ที่ คือ ทะเลสาบ Moshi และทะเลสาบ Donghu เพื่อที่จะทดลองการจมน้ำของกระต่ายกลุ่มจมน้ำตาย กระต่าย 12 ตัว (6 ตัว ทดลองกับทะเลสาบ Moshi และอีก 6 ตัว ทดลองกับทะเลสาบ Donghu) จะถูกขังไว้ในกรง และจุ่มกรงที่ขังกระต่ายไว้ลงในทะเลสาบ ที่ความลึก 30 เซนติเมตร เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้น ยกกรงกระต่ายขึ้นมาจากน้ำพักไว้เป็นเวลา 30 วินาที จึงนำลงไปจุ่มน้ำที่ความลึกเท่าเดิม จนกระทั่งแน่ใจว่ากระต่ายที่ถูกขังอยู่ในกรงนั้นตายทั้งหมด ส่วนกระต่ายกลุ่มที่จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงหลังการตายนั้น กระต่ายทั้งหมด 12 ตัว (6 ตัว ทดลองกับทะเลสาบ Moshi และอีก 6 ตัว ทดลองกับทะเลสาบ Donghu) จะถูกฆ่าตายก่อนด้วยการใช้ค้อนหุ้มด้วยผ้าสำลีทุบบริเวณใกล้สมอง จนตายแล้วจึงนำกระต่ายที่ถูกฆ่าแล้วลงจุ่มในทะเลสาบ ที่ความลึกเดียวกันกับกระต่ายกลุ่มที่จมน้ำตายเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และกระต่ายกลุ่มควบคุมนั้นจะถูกฆ่าให้ตายด้วยวิธีเดียวกันกับกลุ่มที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงหลังการตายแต่ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงหลังการตายด้วยการจุ่มน้ำ

หลังจากที่ได้ศพกระต่ายทดลองมาทั้งหมดแล้ว ทำการล้างด้วยน้ำประปา และย้ายศพกระต่ายไปยังโต๊ะทดลองที่ปราศจากเชื้อเพื่อทำการผ่าศพกระต่าย หลังจากการผ่าบริเวณช่องอกและช่องท้องของศพกระต่าย จะทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากหัวใจกระต่ายห้องล่างซ้ายโดยใช้กระบอกฉีด แล้วเก็บไว้ในหลอดทดลองโดยไม่มีการเติมสารเคมีใดๆ จากนั้นเก็บตัวอย่าง ปอด, ตับ, และไต โดยมีการล้างอวัยวะเหล่านี้ด้วยน้ำกลั่น นำน้ำที่ล้างอวัยวะต่างๆมาส่องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยไม่มีการย้อมสี ในการเติมสาร, เนื้อเยื่อสมองจะถูกนำออกจากกะโหลกศีรษะ นำเนื้อเยื่อแต่ละชนิด ชนิดละ 2 กรัม มาบดให้ละเอียด และจากนั้นเติมน้ำกลั่นแล้วนำไปเข้าเครื่อง homogenizer

แหล่งน้ำที่ทำการกดกระต่ายลงไปจะถูกเก็บตัวอย่างน้ำแต่ละแหล่งปริมาณ 2 มิลลิลิตร

การแยกแพงก์ตอนจากเนื้อเยื่อด้วยการใช้ Percoll

Percoll เป็นสารอ้างอิงในการปั่นเหวี่ยงส่วนผสมที่มีความถ่วงจำเพาะของเซลล์ จะถูกนำมาใช้ในการจำแนกแพลก์ตอนสายพันธุ์ต่างๆ จากเนื่อเยื่อของกระต่าย หรือเนื้อเยื่อของมนุษย์ หรือเลือด โดยวิธีการต่างๆอธิบายโดย Terazawa และ Takatori ซึ่งโดยสรุป ใช้ Percoll (Amersham Biosciences, Sweden) 8 ml และ เนื้อเยื่อที่ทำการ homogenized แล้ว 2 ml หรือเลือดจากหัวใจ ผสมให้เข้ากันดีด้วยเครื่อง vortex หลังจากนั้นเทลงในหลอดปั่นเหวี่ยง (ปริมาตร 10 ml, NALGENE, American) หลังจากทำการปั่นเหวี่ยง ที่ 17000 rpm เป็นเวลา 65 นาที ที่ 12°C แล้วใช้ปิเปตดูดของผสมที่อยู่ชั้นบนสุดที่ประกอบไปด้วยเซลล์ออก สารที่เหลือเป็นสารที่มีความถ่วงจำเพาะสูงกว่า จะถูกล้างเพื่อนำสาร Percoll ออก โดยเติมน้ำกลั่น แล้วคนให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม จึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ได้สารที่แยกชั้นกันดูดของเหลวชั้นบนออก แล้วทำการล้างสาร Percoll ด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง ปั่นเหวี่ยงที่ 12000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ได้สารที่แยกชั้นกัน ดูดของเหลวชั้นบนออกอีกครั้ง ตะกอนที่ได้จะถูกนำไปสกัด DNA

น้ำตัวอย่าง 2 ml จากแหล่งน้ำที่กระต่ายถูกจุ่มลงไป จะถูกนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 12000 rpm เปนเวลา 15 นาที และล้างตะกอนที่ได้ด้วยน้ำกลั่น สองครั้ง ตะกอนที่ได้สุดท้ายหลังจากการล้างจะถูกนำไปสกัด DNA

การสกัด DNA ของแพลงก์ตอน

ตะกอนของตัวอย่างจากเนื้อเยื่อ, เลือด, และตัวอย่างแหล่งน้ำ จะถูกเติมด้วย 5% Chelex-100 ปริมาณ 150 µl ในหลอดปริมาตร 0.5 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -80 °C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเขย่าด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 5 วินาที ให้สารนั้นละลาย ก็จะได้ DNA ที่ได้จากการสกัดจากสาร Chelex-100

ตารางที่ 1

the primer sequences for amplification of the 16S rDNA of plankon

primer	sequence
CYA-F	5'-GGGGAATY6TTCCGCAATGGG-3'
CYA-R (a)	5'-GACTACTGGGGTATCTAATCCCATT-3'
CYA-R (b)	5'-GACTACAGGGGTATCTAATCCCTTT-3'

Note: Y denotes a C/T nucleotide degeneracy. The reverse primer CYA-R was an equimolar mixture of CYA-R (a) and CYA (b)

การเพิ่มปริมาณด้วยวิธีการ PCR และการตรวจหาผลผลิต

สาย DNA ที่ใช้เป็นสายเริ่มต้นในการเพิ่มปริมาณ 16S rDNA ของแพงก์ตอน ซึ่งได้นำเสนอโดย Nübel และคณะ ได้ถูกนำมาสังเคราะห์โดย บริษัท Sagon Biotech จำกัด (ประเทศจีน) (ดังแสดง ตาราง 1) สาย nucleotide ที่มีปริมาณเบส G-C มาก จะถูกนำมาติดลงบนปลายสาย 5' ของ Forwad primer

วิธีการ PCR จะถูกแสดงออกมาในรูปแบบปฏิกิริยารวม ปริมาตร 20 µl ซึ่งประกอบไปด้วย DNA จีโนมของแพลงก์ตอน 30 ng, primer แต่ละชนิด 0.5 mM, บัพเฟอร์ Tris-HCl 10 mM (pH 8.3), KCl 50 mM, $MgCl_2$ 1.5 mM, dNTP แต่ละชนิด 200 mM, และ Taq DNA polymerase 1 U (Biostar, Canada). เงื่อนไขในการ PCR แต่ละรอบ : 95°C เป็นเวลา 2 นาที, 94°C เป็นเวลา 45 วินาที, 60°C เป็นเวลา 50 วินาที, 72°C เป็นเวลา 1 นาที, ทั้งหมด 38 รอบ และเวลาในการเพิ่มจำนวนสายนิวคลีโอไทด์สุดท้าย 10 นาที ที่ 72°C

ในการเพิ่มจำนวนสายนิวคลิโอไทด์ จะถูกแยกด้วย agarose gel และ ทำให้มองเห็นด้วยการใช้สาร ethidium bromide หรือแยกด้วยวิธีการ DGGE และทำให้มองเห็นด้วย silver straining สำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธีการ DGGE จะใช้แผ่นเจล polyacrylamide หนา 1 mm (T = 6%, Acr:Bis = 37.5:1) จะใช้สาร denaturant gradient 20% ไปจนถึง 60% ไล่ความเข้มข้นจากมากไปหาน้อย จากส่วนบนของแผ่นเจลลงไปถึงส่วนล่างของแผ่นเจล และใช้กระแสไฟฟ้าช่วยกระตุ้นในการเคลื่อนที่ของท่อนสาย DNA ไปตามแผ่นเจลโดยใช้ 1x TAE buffer เป็นตัวกลาง ใช้เวลา 6 ชั่วโมง ที่กระแสไฟฟ้า 150 V

กรณีศึกษาจากการจมน้ำของมนุษย์

กรณี 1: ผู้ตายเป็น เพศหญิง อายุ 47 ปี ได้หายตัวไปหลังจากมีการทะเลาะกันอย่างรุนแรงกับสามี ศพของผู้ตายถูกพบในแม่น้ำในวันถัดไป และมีการผ่าชันสูตรศพ หลังจากที่พบศพ 1 วัน สามารถตรวจพบเปลือกหุ้มไดอะตอม หลังจากที่ย่อยด้วยกรดแก่ ในเนื้อเยื่อปอด ตับ และไต จำนวน 20 กรัม จากการผ่าชันสูตรศพ และการตรวจหาไดอะตอม คาดว่าสาเหตุการตาย เกิดจากการจมน้ำ

กรณี 2: ผู้ตายเป็น เพศหญิง อายุ 39 ปี ศพถูกพบบริเวณชานเมือง หลังจากที่ได้หายตัวไป 2 วัน และหลังจากที่พบศพ 1 วัน ได้มีการผ่าชันสูตรศพ แม้ว่าการคาดการณ์ถึงสาเหตุการตายของกรณีนี้จะเป็นการจมน้ำ เนื่องจากผลของการผ่าชันสูตรศพ และข้อมูลจากการสืบสวน แต่ไม่มีการพบเปลือกของไดอะตอมจากเนื้อเยื่อ ปอด ตับ และไต จำนวน 20 กรัม และในการตรวจน้ำตัวอย่างจากแหล่งน้ำที่พบศพ 15 ml ก็ตรวจไม่พบไดอะตอมเช่นกัน

เนื้อเยื่อจากปอด ตับ และไต จากทั้งสองกรณี จำนวน 2 กรัม จะถูกนำมาตรวจสอบหา 16s rDNA ด้วยวิธีการเดียวกันกับที่ใช้ในสัตว์ทดลอง

ผลการวิจัย

การวิเคราะห์เชิงคุณภาพของ 16s rDNA ของแพลงก์ตอน

ความยาวของผลผลิตจากการขยายสาย DNA ด้วย CYA primer ได้สาย DNA ยาว 487 bp (รวม G-C clamp) ในกลุ่มกระต่ายทดลองที่จมน้ำ หลังจากการ PCR สามารถตรวจพบสาย DNA ซึ่งสามารถแยกได้ในเนื้อเยื่อส่วนใหญ่ของกระต่ายทดลอง (ตาราง 2, รูป 1) ผลการ PCR ของกลุ่มกระต่ายที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงหลังการตายด้วยการจุ่มลงในน้ำนั้น สามารถตรวจพบได้เพียงในเนื้อเยื่อปอดของกระต่ายเพียง 2 ตัวเท่านั้น และไม่มีการตรวจพบในเนื้อเยื่อชนิดอื่นของกลุ่มที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงหลังการตาย นอกจากนี้ในกลุ่มควบคุมนั้นไม่มีการตรวจพบผลผลิตจากการ PCR ในเนื้อเยื่อทุกชนิดของกระต่าย (ตาราง 2, รูป 2)

ตารางที่ 2

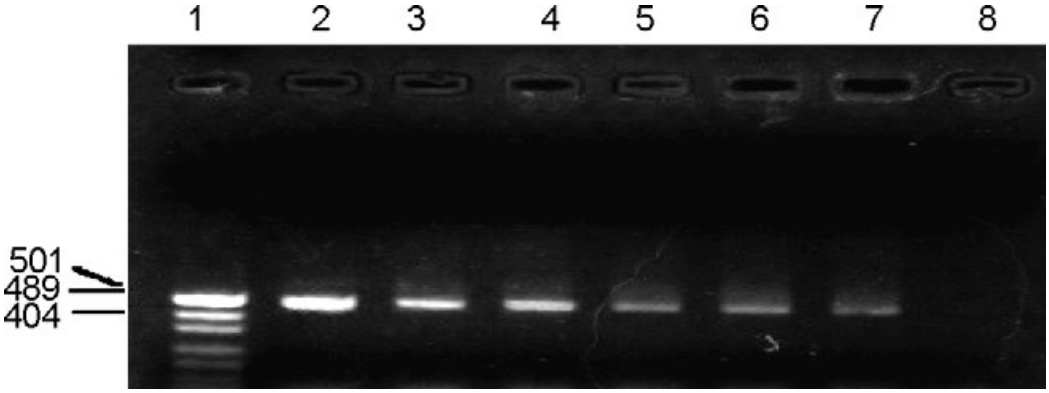
จำนวน และ เปอเซนต์การตรวจพบของผลผลิต PCR ในแต่ละกลุ่ม

group	Positive number and percentage				
	Lung	Liver	Kidney	Blood	Brain
Drowning group (n=12)	12 (100%)	10 (83%)	9 (75%)	10 (83%)	5 (42%)
Postmortem submersion group (n=12)	2 (16.7%	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)
Control group (n=12)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)

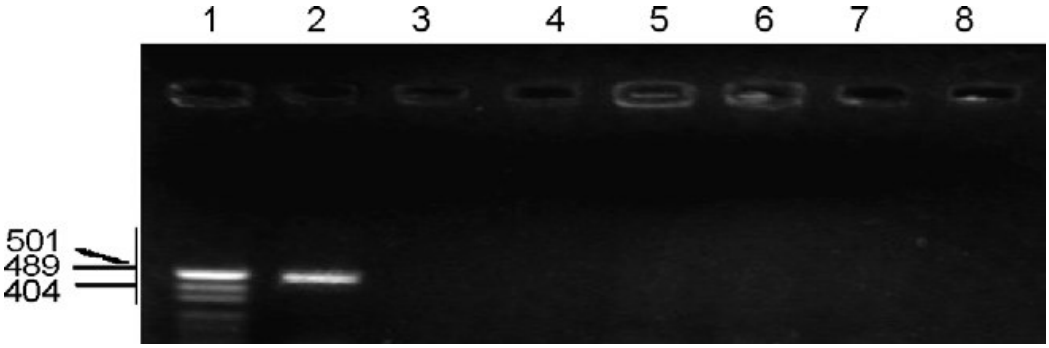
ผลการวิเคราะห์ DGGE

Anabaena flos-aquae (FACHB-245), Microcystis aeruginosa (FACHB-942), Cyclotella meneghiniana sp. (FACHB-986) and Gloeocapsa alpicola (FACHB-905) ได้รับมาจาก สถาบันชีววิทยาทางน้ำ สมาคมส่งเสริมความรู้ทางด้านวิทยาศาสตร์ ประเทศจีน จะถูกนำมาใช้เป็น marker ของวิธีการDGGE ในการตรวจหาความแตกต่างของผลผลิตจากกระบวนการ PCR จากแหล่งน้ำที่ต่างกัน ซึ่งโดยทั่วไปจะพบสาหร่ายเหล่านี้ในแหล่งน้ำ

ในการตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างแพลงก์ตอนในกระต่ายจมน้ำ และแพลงก์ตอนของแหล่งน้ำที่จม วิธีการวิเคราะห์ DGGE จะใช้ผลผลิตจากการ PCR จากตัวอย่าง ปอด ของกระต่ายจมน้ำ และน้ำตัวอย่างจากทะเลสาบ Moshui และทะเลสาบ Donghu ยิ่งกว่านั้น ตัวอย่างน้ำจากทะเลสาบ Yuehu จะนำมาใช้เป็นตัวอย่างควบคุม โดยจำนำวิธีการ DGGE มาใช้ในการแยกความแตกต่างของผลผลิตจาก PCR (รูป 3) ซึ่งมีความยาวของท่อนสายนิวคลิโอไทด์เท่ากัน และไม่สามารถใช้วิธีการแยกด้วยวิธีการ agarose gel electrophoresis (รูป 1) ซึ่งดังแสดงใน รูป 3 แถบสายนิวคลิโอไทด์ 1 ใน 4 ของแต่ละตัวอย่างจะถูกนำมาใช้วิเคราะห์ด้วยวิธีการ DGGE และรูปแบบของ DGGE ซึ่งมาจากเนื้อเยื่อปอดของกระต่ายที่จมนำมีความคล้ายคลึงกับรูปแบบที่มาจากตัวอย่างของแหล่งน้ำที่กระต่ายจมอยู่ อย่างไรก็ตามตัวอย่างน้ำที่เก็บจากแหล่งน้ำอื่นมีความแตกต่างอย่างชัดเจน



รูปที่ 1. รูปแบบของแผ่น agarose gel ในการเพิ่มจำนวนผลผลิตจากเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ ของกลุ่มจมน้ำ ช่องที่1: pUC19 DNA/Msplmarker; ช่องที่ 2: ผลผลิตจากน้ำตัวอย่าง; ช่องที่ 3-7: ผลผลิตจาก ปอด, ตับ, ไต, เลือดจากหัวใจ และสมองของกระต่ายกลุ่มที่จมน้ำ; ช่องที่ 8: negative control



รูปที่ 2. รูปแบบของแผ่น agarose gel ในการเพิ่มจำนวนผลผลิตจากเนื้อเยื่อแต่ละชนิดของกลุ่มควบคุม ช่องที่ 1: pUC19DNA/Msplmarker; ช่องที่ 2: ผลผลิตจากน้ำตัวอย่าง; ช่องที่3-7: ผลผลิตจาก ปอด, ตับ, ไต, เลือดจากหัวใจ และสมองของกระต่ายกลุ่มที่จมน้ำ; ช่องที่ 8: negative control

อภิปรายผลการทดลอง

แพลงก์ตอนที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำโดยทั่วไปนั้นอาจจะมีการผ่านเข้าในระบบทางเดินหายใจของผู้เคราะห์ร้ายที่จมน้ำ และแพลงก์ตอนเหล่านั้นได้เข้าไปในอวัยวะต่างๆของร่างกายผ่านทางกระแสเลือด ดังนั้นการตรวจหาแพงก์ตอนจากอวัยวะต่างๆหรือเลือดของผู้เคราะห์ร้ายอาจจะนำมาใช้ในการวินิจฉัยสาเหตุการจมน้ำ มากไปกว่านั้น การจำแนกแพงก์ตอนชนิดต่างๆทั้งในด้านคุณภาพ และปริมาณ สามารถนำไปสู่การหาแหล่งน้ำที่เกิดการจมน้ำได้ แม้ว่า 16S rDNA ส่วนใหญ่จะถูกรักษาไว้อย่างสัมพันธ์กันแต่ก็ยังมีบางตำแหน่งที่มีการผันแปร การเปรียบเทียบตำแหน่งที่มีการผันแปรนั้นของท่อน 16s rDNA นั้นทำให้ทราบข้อมูลอย่างเพียงพอในการนำมาใช้หาระยะห่างของความสัมพันธ์ที่เกี่ยวข้องกับวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต ในงานวิจัยของ Kane และคณะ สาย DNA เริ่มต้นที่จำเพาะเจาะจงกับจีนัสของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ จะถูกนำมาใช้ในการตรวจหาตำแหน่งที่มีการผันแปรของ 16S rDNA ในสาหร่ายที่มีขนาดเล็ก (picoplankton) และขนาดของผลผลิตที่ได้จากการ PCR นั้นจะมีขนาดประมาณ 210 คู่เบส แม้ว่าวิธีการจะมีความไวสูง ความสมบูรณ์ของข้อมูลในการเพิ่มปริมาณ DNA นั้นยังน้อยกว่าในงานวิจัยของ Nübel และคณะ ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้ขนาด 487 คู่เบส ในการศึกษางานวิจัยเพิ่มเติมของ Abe และคณะ และของ Suto และคณะ ซึ่งได้ทำการพัฒนาวิธีการ PCR เพื่อใช้ในการจำแนกแพงก์ตอนในกรณีการจมน้ำ โดยการตรวจหาปริมาณของคลอโรฟิลล์ที่มีความสัมพันธ์กับยีนส์ ของ *Euglena gracilis* และ *Skeletonema costatum* ซึ่งทั้งหมดนี้มีความคล้ายคลึงกัน อย่างไรก็ตามการทดลองเหล่านี้ให้เพียงผลวิเคราะห์เชิงคุณภาพเพราะสามารถทำได้เพียงการสาธิตการพบแพลงก์ตอนในเนื้อเยื่อของเหยื่อ และไม่สามารถใช้ในการหาตำแหน่งที่เกิดการจมน้ำได้