



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการทดสอบประสิทธิภาพและเปรียบเทียบชุดน้ำยาตรวจพิสูจน์

ดีเอ็นเอในงานนิติวิทยาศาสตร์

โดย ผศ.ดร.ภูวดล ธนะเกียรติไกร และคณะ

มีนาคม พ.ศ. 2559

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการทดสอบประสิทธิภาพและเปรียบเทียบชุดนํ้ายาตรวจพิสูจน์

ดีเอ็นเอในงานนิติวิทยาศาสตร์

คณะผู้วิจัย

สังกัด

- | | |
|-------------------------------|---|
| 1. ผศ.ดร.ภูวดล ธนะเกียรติไกร | คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ |
| 2. ผศ.ดร.ฐิติกา กิจพิพิธ | คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ |
| 3. พ.ต.อ.วาที อัสวตมางกูร | สถาบันนิติเวชวิทยา โรงพยาบาลตำรวจ สำนักงานตำรวจ
แห่งชาติ |
| 4. ร.ต.ท.หญิงสุกัญญา เพชรเพ็ง | ศูนย์พิสูจน์หลักฐาน 10 สำนักงานตำรวจแห่งชาติ |
| 5. นางสาวดัลลัด มัธยัสส์ | คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ |

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทสรุปผู้บริหาร

รายงานนี้เป็นการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus กับ QIAGEN® Investigator IDplex Plus ซึ่งทั้งสองชุดน้ำยาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งที่สำคัญในงานนิติวิทยาศาสตร์ 16 ตำแหน่ง ชุดน้ำยาทางการค้า AmpFLSTR® Identifiler® Plus เป็นชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอหลักที่สำนักงานพิสูจน์หลักฐาน ตำรวจ สำนักงานตำรวจแห่งชาติ และสถาบันนิติวิทยาศาสตร์ กระทรวงยุติธรรม เลือกใช้ในการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ ชุดน้ำยาดังกล่าวได้ถูกนำมาตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอจากวัตถุพยานทางชีวภาพมากกว่า 42,000 รายการต่อปี คิดเป็นจำนวนเงินกว่า 50.4 ล้านบาทต่อปีงบประมาณ หลังจากชุดน้ำยา Identifiler® Plus ออกสู่ตลาดไม่นานมา ชุดน้ำยา Qiagen® Investigator IDplex Plus ก็ถูกนำมาขาย ผู้ผลิตรายงานผลการทดสอบชุดน้ำยาดังกล่าวสามารถตรวจพิสูจน์วัตถุพยานทางนิติวิทยาศาสตร์หลากหลายประเภทได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีความคงทนสูงต่อตัวยับยั้งกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ มีความไวในการวิเคราะห์สูง รวมทั้งใช้เวลาในการตรวจพิสูจน์น้อยกว่าชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus นอกจากนี้ค่าใช้จ่ายในการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยาดังกล่าว ยังน้อยกว่าชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus ถึง 350 บาท ต่อหนึ่งตัวอย่าง ซึ่งอาจทำให้ประหยัดงบประมาณได้มากกว่า 18 ล้านบาทต่อปีและลดเวลาในการตรวจวิเคราะห์ได้มาก อย่างไรก็ตาม การตัดสินใจเปลี่ยนชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นเรื่องที่ต้องศึกษาให้ถี่ถ้วน ทั้งในด้านประสิทธิภาพของชุดน้ำยา ความไวในการวิเคราะห์ การศึกษาความคงทนต่อตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ ความสอดคล้องของผลดีเอ็นเอ ความซับซ้อนของกระบวนการดำเนินงาน เป็นต้น ทั้งนี้เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจส่งผลกระทบต่อขั้นตอนการปฏิบัติงานมาตรฐาน (Standard operating protocols) ภายในองค์กร และมีผลกระทบต่อรูปคดีและการพิจารณาคดีความในกระบวนการยุติธรรมได้

งานวิจัยชิ้นนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus กับ QIAGEN® Investigator IDplex Plus โดยการพิจารณาจากประสิทธิภาพของชุดน้ำยาในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างควบคุม และตัวอย่างวัตถุพยานชีวภาพในคดีจริงหลากหลายประเภทที่พบบ่อยในงานนิติวิทยาศาสตร์ร่วมกับ

การวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ด้วยพารามิเตอร์ทางสถิติที่สำคัญต่องานนิติพันธุศาสตร์ เช่น Peak heights, Percent profile, Intra-locus balance, Inter-locus balance, Stutter ratio, Allelic drop-in Allelic drop-out และ STR Concordance เป็นต้น

ผลการศึกษาพบว่าชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus มีประสิทธิภาพที่ดีกว่า ชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus ในด้านความไววิเคราะห์เนื่องจากให้ความสูงของอัลลีลที่มากกว่าในปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นที่เท่ากัน ในช่วง 31-500 พิโคกรัม และสามารถคงทนต่อตัวยับยั้งกระบวนการพีซีอาร์ได้ดีกว่าเมื่อมีการเติมแคลเซียม ฮิวมิกแอซิด และเฮมาตินลงในสารละลายพีซีอาร์ รวมทั้งยังสามารถตรวจวัดอัลลีลเฉลี่ยได้อย่างมีประสิทธิภาพเหมือนกับชุดน้ำยาชุดเดิมจากการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างวัตถุพยานจริง ในขณะที่ความสมดุลของตำแหน่ง STR ต่างๆในลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากทั้งสองชุดน้ำยาและอัตราส่วนของพีคสตัดเตอร์นั้นแทบจะไม่ต่างกัน นอกจากนี้ ชุดน้ำยาทั้งสองให้ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความสอดคล้องกันสูง

จึงกล่าวได้ว่าชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus สามารถนำมาใช้แทนชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus ในห้องปฏิบัติการได้ นักนิติวิทยาศาสตร์สามารถใช้ชุดน้ำยาชุดใหม่ได้โดยไม่ต้องเปลี่ยนแปลงเครื่องมือและขั้นตอนการทำงานมาตรฐานเดิมและสามารถนำผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากชุดน้ำยาใหม่ไปใช้ร่วมกับฐานข้อมูลเดิมได้ ซึ่งในหน่วยงานทางนิติวิทยาศาสตร์อย่างสำนักงานพิสูจน์หลักฐานตำรวจ สำนักงานตำรวจแห่งชาติ มีการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอมากกว่า 40,000 ตัวอย่างในแต่ละปี จะทำให้หน่วยงานประหยัดงบประมาณได้มากถึง 18 ล้านบาทต่อปี อีกทั้งยังช่วยลดเวลาในการตรวจพิสูจน์ ชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus จึงเป็นอีกตัวเลือกที่ดีสำหรับการตรวจพิสูจน์ในหน่วยงานทางนิติวิทยาศาสตร์ทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอในงานนิติวิทยาศาสตร์ทั่วโลก นิยมใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อเป็นมาตรฐานเดียวกันในการสร้างฐานข้อมูลดีเอ็นเอและแลกเปลี่ยนข้อมูลดีเอ็นเอระหว่างพื้นที่ทั้งภายในและระหว่างประเทศ ชุดน้ำยาหลักที่หน่วยงานทางนิติวิทยาศาสตร์ในประเทศไทยเลือกใช้เป็นมาตรฐานในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลในประเทศไทย คือชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus ซึ่งตรวจ STR มาตรฐานจำนวน 15 ตำแหน่ง ต่อมาชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus ซึ่งผู้ผลิตรายงานว่าสามารถตรวจพิสูจน์วัตถุพยานทางนิติวิทยาศาสตร์หลากหลายประเภทได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีความไวในการวิเคราะห์และความคงทนต่อตัวยับยั้งกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสูง ใช้เวลาในการตรวจพิสูจน์น้อย และที่สำคัญมีราคาถูกกว่าชุดน้ำยาเดิม ซึ่งจะทำให้ประหยัดงบประมาณได้ปีละมากกว่า 18 ล้านบาท อย่างไรก็ตามการตัดสินใจเปลี่ยนชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณ STR เป็นเรื่องที่ต้องศึกษาให้ถี่ถ้วนในทุกด้านเพื่อไม่ให้ส่งผลกระทบต่อขั้นตอนการปฏิบัติงานมาตรฐานและการพิจารณาตีความในกระบวนการยุติธรรม และเนื่องจากยังไม่มีรายงานทางวิชาการที่ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างชุดน้ำยาทั้งสองเพื่อประกอบการตัดสินใจในครั้งนี้ งานวิจัยชิ้นนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus กับ QIAGEN® Investigator IDplex Plus โดยการพิจารณาจากพารามิเตอร์ที่สำคัญทั้งหมดภายใต้สภาวะควบคุมและทดสอบกับตัวอย่างวัตถุพยานชีวภาพในคดีจริงหลากหลายประเภทที่พบบ่อยในงานนิติวิทยาศาสตร์และการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ทางสถิติ ผลการศึกษาพบว่าชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus มีประสิทธิภาพที่ดีกว่า ชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus ในด้านความไววิเคราะห์เนื่องจากให้ความสูงของอัลลีลที่มากกว่าในปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นที่เท่ากัน ในช่วง 31-500 พิโคกรัม และสามารถคงทนต่อตัวยับยั้งกระบวนการพีซีอาร์ได้ดีกว่าเมื่อมีการเติมแคลเซียม ฮิวมิกแอซิด และเฮมาตินลงในสารละลายพีซีอาร์ รวมทั้งยังสามารถตรวจวัดอัลลีลเฉลี่ยได้อย่างมีประสิทธิภาพเหมือนกับชุดน้ำยาชุดเดิมจากการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างวัตถุพยานจริง จากการศึกษาจะเป็นประโยชน์ต่อองค์กรทางนิติพันธุศาสตร์ในประเทศไทยและห้องปฏิบัติการนิติพันธุศาสตร์นานาชาติที่ต้องการตัดสินใจเลือกใช้ชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณ STR และต้องการปรับปรุงกระบวนการดำเนินงานได้

Abstract

Many forensic STR kits are currently available in the market. The AmpFLSTR® Identifiler® Plus kit, which targets 15 STRs, is commonly used worldwide. The Thai forensic DNA community is built around it in terms of instrument, databases, and interpretation. QIAGEN's IDplex Plus kit targets the same loci, but the cost per sample is lower and the PCR cycling time is shorter by about 90 minutes. A direct comparison between the two kits has never been carried out. In this study, we performed a direct comparison between the two kits using serial dilutions of two control DNA samples and 60 randomly selected casework samples, including samples taken from improvised explosive devices and terrorist raids. We compared the performance of the two kits in terms of peak height, number of allele detected (allelic drop-out), intra-locus balance, inter-locus balance, inhibitor tolerance, stutter ratio, concordance, and allelic drop-in. The results demonstrate that both kits are very similar in performance. IDplex Plus gave higher peak heights in sensitivity test and tolerated inhibitors better, but had slightly worse inter-locus balances and stutter ratios. However, these differences were not practically significant, as seen by the resulting profiles of the casework samples ($p = 0.601$). In conclusion, laboratories looking to replace the aging Identifiler® Plus might consider the IDplex Plus as a cheaper and faster alternative that fits right into their existing structure without any further investment in instrument and DNA database. Switching to the IDplex Plus could save our laboratory over USD 600,000 annually and this same situation could be applied to routine laboratories in other developing countries.

สารบัญ

บทสรุปผู้บริหาร.....	1
บทคัดย่อ.....	3
Abstract	4
บทที่ 1	7
ที่มาและความสำคัญ.....	7
ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับดีเอ็นเอ	9
ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับ STR	10
ตำแหน่ง STR มาตรฐานปัจจุบันและ CODIS	11
กระบวนการตรวจพิสูจน์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ.....	12
ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับกระบวนการพีซีอาร์.....	13
ชุดน้ำยา STR สำเร็จรูปกับงานนิติวิทยาศาสตร์.....	14
หน่วยงานทางนิติวิทยาศาสตร์ในประเทศไทย	15
SWGDM และหน่วยงานที่กำหนดมาตรฐานชุดน้ำยา STR.....	16
พารามิเตอร์ที่สำคัญในลายพิมพ์ดีเอ็นเอ.....	17
วัตถุประสงค์	20
บทที่ 2	21
การเตรียมตัวอย่าง.....	21
การวัดปริมาณดีเอ็นเอ.....	22
เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	22
ตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ.....	23
ทดสอบความไววิเคราะห์.....	23
ศึกษาด้วยยับยั้งกระบวนการพีซีอาร์.....	24

ศึกษาประสิทธิภาพการนำไปใช้กับวัตถุพยานจริง.....	26
การวิเคราะห์ทางสถิติ	27
บทที่ 3	29
ผลการศึกษาความไววิเคราะห์ (Sensitivity study).....	29
ความสมดุลของความสูงของอัลลีลในแต่ละตำแหน่ง STR (Intra-locus balance)	31
ความสมดุลของความสูงของอัลลีลระหว่างตำแหน่ง STR (Inter-locus balance).....	32
ความคงทนต่อตัวยับยั้งกระบวนการพีซีอาร์ (Inhibitor tolerance study).....	33
ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการใช้ชุดน้ำยากับตัวอย่างวัตถุพยานจริง (Real case performance)	36
ความไม่สอดคล้องของลายพิมพ์ STR (Non-concordance study)	38
การศึกษาพิศตัตเตอร์ (Stutter study).....	39
บทที่ 4	42
วิจารณ์ผลการทดลอง	42
บทที่ 5	47
สรุปผลการทดลอง.....	47
เอกสารอ้างอิง	48
ภาคผนวก ก. บทความวิจัยสำหรับเผยแพร่	53
ภาคผนวก ข. บทความวิจัยเกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์.....	75
ภาคผนวก ค. ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ และกิจกรรมที่ ดำเนินการมาและผลที่ได้รับตลอดโครงการ	76
วัตถุประสงค์	76
ผลที่ได้รับ	76
ความสอดคล้องของวัตถุประสงค์กับผลที่ได้รับ	77

บทที่ 1

ที่มาและความสำคัญ

การตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลเป็นเครื่องมือสำคัญในการสืบสวนสอบสวนทางนิติวิทยาศาสตร์ เพื่อนำไปใช้เป็นหลักฐานจับกุมผู้กระทำความผิดในกระบวนการยุติธรรม การตรวจพิสูจน์สารพันธุกรรมดีเอ็นเอเป็นหนึ่งในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลที่มีความถูกต้องสูงและน่าเชื่อถือ มีการกำหนดมาตรฐานเพื่อนำไปใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์ทั่วโลก [1] โดยนิยมใช้เครื่องหมายพันธุกรรมบริเวณ Short Tandem Repeat (STR) หรือเรียกอีกอย่างว่า ไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellite) ซึ่งเป็นส่วนของสารพันธุกรรมที่ประกอบไปด้วยลำดับเบสซ้ำแบบต่อเนื่อง โดยมีลำดับเบสแกนกลางจำนวนตั้งแต่สองถึงสิบคู่เบส ในแต่ละบุคคลจะมีจำนวนซ้ำของชุดเบสดังกล่าวแตกต่างกัน ทำให้เกิดเป็นลักษณะที่จำเพาะในแต่ละบุคคลที่สามารถนำมาใช้เชื่อมโยงสู่ตัวผู้กระทำความผิดได้ [2] ในปัจจุบันสำนักงานสอบสวนกลางแห่งสหรัฐอเมริกา (Federal Bureau of Investigation, FBI) กำหนดระบบ Combined DNA Index System (CODIS) ที่ประกอบด้วยตำแหน่งดีเอ็นเอเป้าหมายทั้งสิ้น 20 ตำแหน่ง เพื่อใช้เป็นมาตรฐานในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลในประเทศสหรัฐอเมริกา [3, 4] ซึ่งต่อมาหลายประเทศทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทยก็ยึดถือระบบดังกล่าวเป็นมาตรฐานในการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลภายในประเทศด้วยเช่นกัน [1, 3]

กระบวนการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอเพื่อระบุบุคคลนั้นประกอบไปด้วย การเก็บวัตถุดิบชีวภาพจากสถานที่เกิดเหตุ การสกัดดีเอ็นเอ การหาปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีการเรียลไทม์ (Real-time PCR) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอหรือตำแหน่ง STR เป้าหมาย และการตรวจสอบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณขึ้นด้วยเทคนิคแคพิลลารีอิเล็กโตรโฟรีซิส (Capillary electrophoresis) ในปัจจุบันมีการพัฒนาชุดน้ำยาสำเร็จรูปทางการค้าจำนวนมากเพื่อใช้ในแต่ละขั้นตอนของการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ รวมถึงขั้นตอนการเพิ่มปริมาณตำแหน่งดีเอ็นเอเป้าหมาย ทั้งนี้ก็เพื่อการควบคุมมาตรฐาน เป็นประโยชน์ในการสร้างฐานข้อมูลดีเอ็นเอและแลกเปลี่ยนข้อมูลดีเอ็นเอระหว่างพื้นที่ทั้งภายในและระหว่างประเทศ สำหรับชุดน้ำยาทางการค้าเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เป้าหมายนั้นได้มีการพัฒนาคุณภาพอย่างต่อเนื่องเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพต่อการนำไปใช้ตรวจพิสูจน์วัตถุดิบชีวภาพที่มีปริมาณน้อยมาก เสื่อมสภาพ หรือมีอายุมาก ซึ่งมักพบบ่อยในงานนิติวิทยาศาสตร์ [2] โดยมีการเติมสารเคมี

บางชนิดในพีซีอาร์บัฟเฟอร์ (PCR buffer) หรือพัฒนาดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (DNA polymerase) ให้ทนทานต่อตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์มากขึ้น ทำให้เพิ่มโอกาสในการได้ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์จากวัตถุพยานเสื่อมสภาพมากขึ้นด้วย นอกจากนี้ชุดน้ำยาส่งสำเร็จรูปชุดใหม่ๆ จะมีการเพิ่มตำแหน่ง STR เป้าหมายเพื่อเพิ่มขีดความสามารถหรือความน่าเชื่อถือในการจำแนกบุคคล (Discrimination power) ตัวอย่างชุดน้ำยาส่งสำเร็จรูปในปัจจุบัน ได้แก่ ชุดน้ำยา Identifiler® Plus, NGM® และ GlobalFiler® จากบริษัท Applied Biosystems (Foster City, CA); PowerPlex® ESX/ESI 17 และ PowerPlex® Fusion จาก Promega Corporation (Madison, WI); ESSplex และ IDplex Plus จาก Qiagen (Hilden, Germany) [5, 6]

ชุดน้ำยาทางการค้า AmpFLSTR® Identifiler® Plus เป็นชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอหลักที่สำนักงานพิสูจน์หลักฐานตำรวจ สำนักงานตำรวจแห่งชาติ และสถาบันนิติวิทยาศาสตร์กระทรวงยุติธรรม เลือกใช้ในการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ โดยใช้เพิ่มปริมาณ STR เป้าหมายจำนวน 15 ตำแหน่ง ได้แก่ D8S1179 D21S11 D7S820 CSF1PO D3S1358 TH01 D13S317 D16S539 D2S1338 D19S433 vWA TPOX D18S51 D5S818 FGA และตำแหน่งระบุเพศบนยีน Amelogenin [6, 7] ชุดน้ำยาดังกล่าวได้ถูกนำมาตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอจากวัตถุพยานทางชีวภาพมากกว่า 42,000 รายการต่อปี (ข้อมูลจากการสื่อสารส่วนตัวกับทางเจ้าหน้าที่ของสำนักงานตำรวจแห่งชาติ และ (Central Institute for Forensic Science, 2014)) คิดเป็นจำนวนเงินกว่า 50.4 ล้านบาทต่อปีงบประมาณ (Central Institute for Forensic Science, 2014) ไม่นานมานี้บริษัท Qiagen ได้ผลิตชุดน้ำยาส่งสำเร็จรูปชื่อว่า Qiagen® Investigator IDplex Plus ซึ่งใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเป้าหมายเหมือนกับชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus ทุกตำแหน่ง [6, 8]) ผู้ผลิตรายงานผลการทดสอบชุดน้ำยาดังกล่าวที่สามารถตรวจพิสูจน์วัตถุพยานทางนิติวิทยาศาสตร์หลากหลายประเภทได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีความคงทนสูงต่อตัวยับยั้งกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ มีความไวในการวิเคราะห์สูง รวมทั้งใช้เวลาในการตรวจพิสูจน์น้อยกว่าชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus [9] นอกจากนี้ค่าใช้จ่ายในการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยาดังกล่าว ยังน้อยกว่าชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus ถึง 350 บาท ต่อหนึ่งตัวอย่าง ซึ่งอาจทำให้ประหยัดงบประมาณได้มากกว่า 18 ล้านบาทต่อปีและลดเวลาในการตรวจวิเคราะห์ได้มาก การตัดสินใจเปลี่ยนชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นเรื่องที่ต้องศึกษาให้ถี่ถ้วน ทั้งในด้านประสิทธิภาพของชุดน้ำยา

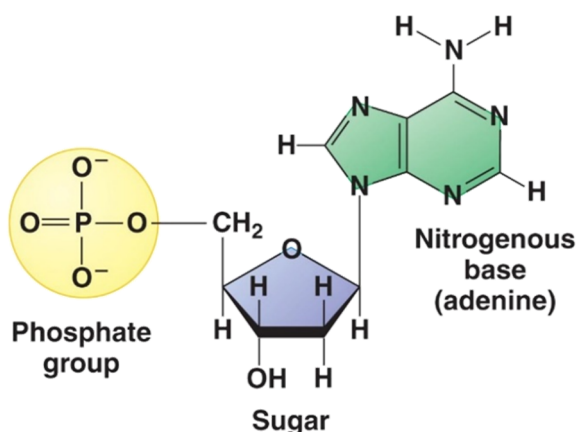
ความไวในการวิเคราะห์ การศึกษาความคงทนต่อตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ ความสอดคล้องของผลดีเอ็นเอ (STR Concordance) ความซับซ้อนของกระบวนการดำเนินงาน เป็นต้น [5, 10, 11] ทั้งนี้ เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจส่งผลกระทบต่อขั้นตอนการปฏิบัติงานมาตรฐาน (Standard operating protocols) ภายในองค์กร และมีผลกระทบต่อรูปคดีและการพิจารณาคดีความในกระบวนการยุติธรรมได้

อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifier® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus ซึ่งเป็นที่สนใจของหน่วยงานภาครัฐในประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาในวัตถุพยานชีวภาพจากคดีจริง ดังนั้น งานวิจัยชิ้นนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดน้ำยาทั้งสองในทุกด้านที่กล่าวมาข้างต้น โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอมาตรฐานและตัวอย่างวัตถุพยานจริงหลากหลายประเภทที่พบบ่อยในงานนิติวิทยาศาสตร์ โดยศึกษาพารามิเตอร์ที่สำคัญในการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ ได้แก่ Peak heights, Percent profile, Intra-locus balance, Inter-locus balance, Stutter ratio, Allelic drop-in, Allelic drop-out และ STR Concordance เป็นต้น

ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอ (Deoxyribonucleic acid, DNA) เป็นแหล่งข้อมูลทางพันธุกรรมและควบคุมลักษณะการแสดงออกของสิ่งมีชีวิต หน่วยย่อยที่เล็กที่สุดของสารพันธุกรรมดีเอ็นเอเรียกว่า นิวคลีโอไทด์ (Nucleotide) ซึ่งประกอบด้วยสามองค์ประกอบหลักคือ น้ำตาลดีออกซีไรโบส หมู่ฟอสเฟต และไนโตรจีนัสเบส (รูปที่ 1) ที่มีสี่ชนิด ได้แก่ อะดีนีน (Adenine) กัวนีน (Guanine) ไซโทซีน (Cytosine) และไทมีน (Thymine) นิวคลีโอไทด์ในแต่ละหน่วยย่อยเรียงต่อกันเป็นสายโพลิเมอร์สายยาวที่เรียกว่าโพลีนิวคลีโอไทด์ จากการเชื่อมกันด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ (Phosphodiester bond) โครงสร้างของดีเอ็นเอประกอบด้วยสายโพลีนิวคลีโอไทด์สองสายที่เรียงตัวขนานกันในทิศทางตรงกันข้าม (Antiparallel) เกิดการจับกันตรงตำแหน่งไนโตรจีนัสเบสด้วยพันธะไฮโดรเจน มีการขดตัวเป็นเกลียวคู่ (Double helix) [12] ดีเอ็นเอทั้งหมดของมนุษย์หรือทั้งจีโนมมีความยาวประมาณสามพันสองร้อยล้านคู่เบส โดยส่วนใหญ่ประมาณร้อยละ 90 ของความยาวดังกล่าวเป็นดีเอ็นเอที่ไม่ถูกถอดรหัสเป็นโปรตีน ซึ่งในบางบริเวณจะพบการจัดเรียงของนิวคลีโอไทด์ที่มีลำดับเบสเรียงตัวซ้ำกัน

เป็นชุดๆ ที่มีความหลากหลายของรูปแบบการซ้ำและจำนวนซ้ำหรือเรียกว่า Short tandem repeat (STR) ในแต่ละบุคคลจะมีจำนวนการซ้ำของชุดเบสแตกต่างกัน ซึ่งทำให้เกิดเป็นลักษณะที่จำเพาะในแต่ละบุคคล ลักษณะดังกล่าวนี้จึงนำมาใช้ในงานทางนิติวิทยาศาสตร์เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลได้ [12]

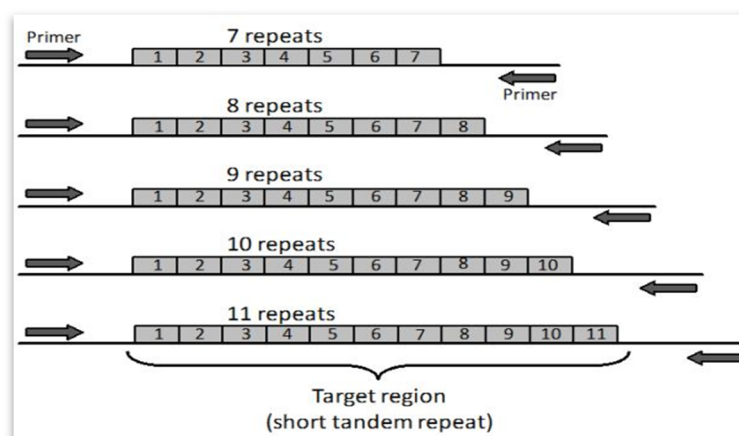


รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างทางเคมีของนิวคลีโอไทด์ [13]

ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับ STR

Short tandem repeat (STR) หรือ simple sequence repeat (SSR) หรือ ไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellite) คือส่วนของสารพันธุกรรมที่ประกอบไปด้วยลำดับเบสซ้ำแบบต่อเนื่อง โดยที่มีลำดับเบสแกนกลางจำนวนสองถึงสิบคู่เบส ทั้งนี้ลักษณะของ STR ที่มีความแตกต่างในแต่ละบุคคลคือจำนวนซ้ำของหน่วยซ้ำ (รูปที่ 2) ในปัจจุบันมีการศึกษาและรายงานตำแหน่ง STR จำนวนมากกว่า 20,000 ตำแหน่ง จากจำนวนทั้งหมดประมาณหนึ่งล้านตำแหน่งที่คาดว่าจะมีอยู่ในจีโนม อย่างไรก็ตามมีดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์เพียงประมาณ 20 ตำแหน่งเท่านั้นที่ถูกใช้อย่างแพร่หลายเพื่อการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลในงานนิติพันธุศาสตร์ ซึ่งตำแหน่งเหล่านี้มีขนาดของลำดับเบสแกนกลางจำนวนสี่หรือห้าเบส และมีขนาดความยาวน้อยกว่า 350 คู่เบส เครื่องหมายพันธุกรรม STR เหมาะที่จะนำมาใช้ในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลเนื่องจากเหตุผลหลายประการ คือ ขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ได้จากการวิเคราะห์ตำแหน่ง STR นั้นมีขนาดเล็กเมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ที่นิยมใช้ในการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอในสมัยแรกๆ จึงทำให้โอกาสในการได้รับผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากวัตถุพยานทางชีวภาพที่เสื่อมสภาพหรือมี

ปริมาณน้อยๆนั้นเพิ่มมากขึ้นทวีคูณ นอกจากนี้ STR ยังสามารถนำมาใช้ในชุดทดสอบหลายตำแหน่ง ซึ่งให้ผลการตรวจพิสูจน์ที่มีอำนาจการจำแนกระหว่างบุคคลสูงในการตรวจวัดแค่ครั้งเดียว

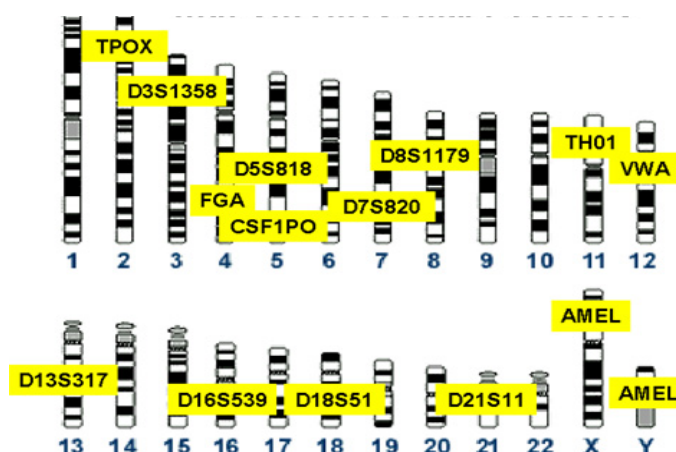


รูปที่ 2 แสดงรูปแบบการซ้ำกันของ STR [14]

ตำแหน่ง STR มาตรฐานปัจจุบันและ CODIS

สถาบัน องค์กร หรือเครือข่ายทางนิติพันธุศาสตร์ที่เกี่ยวข้อง มีการเลือกใช้กลุ่มและจำนวนของตำแหน่ง STR มาตรฐานที่แตกต่างกันเพื่อการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล ซึ่งใน STR บางตำแหน่งอาจถูกนำไปใช้มากกว่าหนึ่งหน่วยงาน โดยสำนักงานสอบสวนกลางแห่งสหรัฐอเมริกา (FBI) กำหนดตำแหน่ง STR มาตรฐานทั้งสิ้น 20 ตำแหน่ง ได้แก่ D18S51, FGA, D21S11, D8S1179, vWA, D13S317, D16S539, D7S820, TH01, D3S1358, D5S818, CSF1PO, D2S1338, D19S433, D1S1656, D12S391, D2S441, D10S1248, DYS391 และ Amelogenin เพื่อใช้เป็นมาตรฐานในการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล (รูปที่ 3) ทั้งนี้ข้อมูลลายพิมพ์ STR จากของผู้กระทำความผิดในประเทศสหรัฐอเมริกา จะถูกเก็บรวบรวมไว้ในฐานข้อมูลที่เรียกว่า Combined DNA Index System (CODIS) ซึ่งถูกจัดตั้งขึ้นในปีค.ศ. 1998 และมีการเชื่อมโยงกับข้อมูลในทุกรัฐของสหรัฐอเมริกา ทั้งนี้ระบบฐานข้อมูลดีเอ็นเอดังกล่าวได้รับการพิสูจน์แล้วว่ามีความมีประสิทธิภาพเป็นอย่างมากในการเชื่อมโยงคดี โดยเฉพาะในกรณีที่มีการกระทำความผิดอย่างต่อเนื่อง ฐานข้อมูลดังกล่าวยังนับได้ว่าเป็นฐานข้อมูลดีเอ็นเอที่ใหญ่ที่สุดในโลก โดยในปัจจุบันบรรจุลายพิมพ์ดีเอ็นเอมากกว่า 9 ล้านลายพิมพ์ [15] ส่วนในยุโรป เครือข่ายนิติพันธุศาสตร์แห่งสหภาพยุโรป (European Network of Forensic Science Institutes, ENFSI) ก็ได้กำหนดตำแหน่ง STR มาตรฐานทั้งสิ้น 12 ตำแหน่งเพื่อใช้ในการพิสูจน์

เอกลักษณ์บุคคล ซึ่งประกอบไปด้วย D3S1358, vWA, D8S1179, D21S11, D18S51, TH01, FGA, D10S1248, D22S1045, D2S441, D1S1656 และ D12S391 ไว้เช่นเดียวกัน [16]



รูปที่ 3 แสดงชุดตำแหน่ง STR มาตรฐานทั้งหมด 13 ตำแหน่ง ที่กำหนดโดย FBI ก่อนที่จะมีการเพิ่มขึ้นเป็น 20 ตำแหน่งในภายหลัง [17]

กระบวนการตรวจพิสูจน์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

กระบวนการตรวจพิสูจน์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เริ่มจากการเก็บวัตถุพยานชีวภาพในสถานที่เกิดเหตุ ตามด้วยการสกัดดีเอ็นเอแล้วหาปริมาณดีเอ็นเอที่อยู่บนวัตถุพยานนั้นๆ จากนั้นเพิ่มปริมาณตำแหน่งดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ โดยออกแบบไพรเมอร์ให้จับกับบริเวณดีเอ็นเอเป้าหมาย และทำการตรวจวัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เพิ่มปริมาณขึ้นด้วยเทคนิคแคปิลลารีอิเล็กโตรโฟรีซิส เนื่องจากขนาดของดีเอ็นเอบางตำแหน่งมีความใกล้เคียงกันมาก จึงอาศัยเทคนิคการติดฉลากเรืองแสงต่างสีกันตรงปลาย 5' ของไพรเมอร์ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีความยาวใกล้เคียงกัน ทำให้สามารถแยกผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีขนาดใกล้เคียงกันเหล่านี้ได้ด้วยการเรืองแสงสีที่ต่างกัน ปัจจุบันได้มีการพัฒนาชุดน้ำยาทางการค้ามากมายเพื่อใช้เพิ่มปริมาณตำแหน่งดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งจะวิเคราะห์ตำแหน่ง STR มาตรฐานต่างๆ ที่สนใจเพื่อระบุบุคคล ร่วมกับการตรวจวิเคราะห์ยีนอะมีโลจินิน (Amelogenin gene) ที่อยู่บนโครโมโซม X และ Y เพื่อการระบุเพศโดยอาศัยความแตกต่างของขนาดยีนชนิดนี้บนโครโมโซมเพศทั้งสอง กล่าวคือ ตำแหน่งดังกล่าวบนยีนอะมีโลจินินบนโครโมโซม X มีขนาดสั้นกว่าบนโครโมโซม Y อยู่หกลู่เบส [12]

ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับกระบวนการพีซีอาร์

จากวัตถุดิบทางชีวภาพที่เก็บจากสถานที่เกิดเหตุ ดีเอ็นเอส่วนใหญ่จะมีปริมาณน้อยหรือเสื่อมสภาพไปเนื่องจากสภาพแวดล้อมในสถานที่เกิดเหตุ ดังนั้นขั้นตอนการเพิ่มปริมาณจึงมีความสำคัญมากขึ้นขั้นตอนหนึ่งซึ่งเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ที่เรียกกันว่ากระบวนการ PCR (พีซีอาร์) ย่อมาจาก Polymerase Chain Reaction นั้นเป็นวิธีที่ใช้ในกระบวนการทางนิติวิทยาศาสตร์ปัจจุบัน เป็นกระบวนการสังเคราะห์ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในหลอดทดลอง ซึ่งจะต้องทำการเตรียมสารละลายพีซีอาร์ให้อยู่ในหลอดทดลองเดียวกันก่อนนำไปทำปฏิกิริยา ประกอบด้วย บัฟเฟอร์สำหรับทำปฏิกิริยา dNTP (ประกอบด้วย dATP dCTP dGTP และ dTTP) ไพรเมอร์ (โอลิโกนิวคลีโอไทด์ขนาด 20-24 นิวคลีโอไทด์ที่มีเบสคู่สมกับปลายทั้งสองด้านของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ) ดีเอ็นเอเป้าหมาย แมกนีเซียมคลอไรด์ ซึ่งอาจรวมอยู่ในบัฟเฟอร์เนื่องจากแมกนีเซียมไอออนเป็นส่วนสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส และเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส เนื่องจากขั้นตอนในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ ต้องมีการทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพด้วยความร้อน เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสที่ใช้ ต้องทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส เอนไซม์ชนิดที่มีการใช้กันมาก รู้จักกันในชื่อ *Taq polymerase* ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 70-80 องศา โดยวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เลียนแบบมาจากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิต โดยใช้เครื่อง Thermal cycler ขั้นตอนในกระบวนการพีซีอาร์แบ่งเป็นสามขั้นตอนหลัก เริ่มต้นด้วย Denature คือ เป็นขั้นตอนการแยกดีเอ็นเอที่เป็นสายคู่ด้วยการเพิ่มอุณหภูมิอย่างช้าๆจนดีเอ็นเอแยกสายเดี่ยว (Denatured DNA) อุณหภูมิที่ใช้อยู่ในช่วง 90-95 องศาเซลเซียส ขั้นตอนต่อไปคือ Annealing เป็นขั้นตอนการลดอุณหภูมิลงเพื่อให้เกิดการเข้าคู่กันของเบส (Complementary base pair) ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอดั้งเดิมโดยอุณหภูมิที่ใช้อยู่ในช่วง 37-60 องศาเซลเซียส และขั้นตอนท้ายสุดคือ Extension เป็นขั้นตอนการการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายโดยอุณหภูมิที่ใช้อยู่ในช่วง 72-75 องศาเซลเซียส [12] เมื่อกระบวนการเสร็จสิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างทวีคูณเพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนการวิเคราะห์ต่อไป

ชุดน้ำยา STR สำเร็จรูปกับงานนิติวิทยาศาสตร์

การใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปทางการค้าในแต่ละขั้นตอนของการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ รวมถึงขั้นตอนการเพิ่มปริมาณตำแหน่งดีเอ็นเอเป้าหมาย ทั้งนี้ก็เพื่อการควบคุมมาตรฐาน เป็นประโยชน์ในการสร้างฐานข้อมูลดีเอ็นเอและแลกเปลี่ยนข้อมูลดีเอ็นเอระหว่างพื้นที่ทั้งภายในและระหว่างประเทศ สำหรับชุดน้ำยาทางการค้าเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายนั้นได้มีการพัฒนาคุณภาพอย่างต่อเนื่องเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพต่อการนำไปใช้ตรวจพิสูจน์วัตถุพยานชีวภาพที่มีปริมาณน้อยมาก เสื่อมสภาพ หรือมีอายุมาก ซึ่งมักพบบ่อยในงานนิติวิทยาศาสตร์ [2] โดยมีการเติมสารเคมีบางชนิดในพีซีอาร์บัฟเฟอร์ (PCR buffer) หรือพัฒนาดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส (DNA polymerase) ให้ทนทานต่อตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์มากขึ้น ทำให้เพิ่มโอกาสในการได้ผลดีเอ็นเอที่สมบูรณ์จากวัตถุพยานเสื่อมสภาพมากขึ้นด้วย ในปี ค.ศ. 1990 บริษัท Applied Biosystems ได้ริเริ่มพัฒนาชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ชื่อ Second Generation Multiplex Plus (SGM Plus) ที่วิเคราะห์ STR จำนวน 10 ตำแหน่ง ได้แก่ D3S1358, vWA, D16S539, D2S1338, D8S1179, D21S11, D18S51, D19S433, TH01, FGA และยีน Amelogenin [15] ซึ่งในปัจจุบันชุดน้ำยาชุดนี้ก็ยังเป็นชุดน้ำยามาตรฐานของสหราชอาณาจักร นอกจากนี้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปชุดใหม่ๆ จะมีการเพิ่มตำแหน่ง STR เป้าหมายนอกเหนือจากตำแหน่งมาตรฐานที่กำหนดไว้ในระบบ CODIS หรือ ESS Panel เพื่อเพิ่มขีดความสามารถหรือความน่าเชื่อถือในการจำแนกบุคคล (Discrimination power) ในปัจจุบันห้องปฏิบัติการทางนิติพันธุศาสตร์ส่วนใหญ่นิยมใช้ดีเอ็นเออย่างน้อย 16 ตำแหน่งเป็นมาตรฐาน โดยมีชุดน้ำยาหลายชุดจากหลายบริษัท ได้แก่ ชุดน้ำยา Identifiler® Plus และ NGM® จากบริษัท Applied Biosystems (Foster City, CA); PowerPlex® 16, PowerPlex® ESX 17, PowerPlex® ESI 17 และ PowerPlex® 18D จากบริษัท Promega (Madison, WI) and ESSplex® และ IDplex® Plus จากบริษัท Qiagen (Hilden, Germany) เป็นต้น [6, 8, 11, 18, 19] ล่าสุดมีการพัฒนาชุดน้ำยาสำเร็จรูป GlobalFiler™ Express และ PowerPlex® Fusion ในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอจำนวนมากถึง 23 และ 24 ตำแหน่งตามลำดับ ซึ่งรวมทุก STR มาตรฐานจากฐานข้อมูล Combined DNA Index System (CODIS) ของประเทศสหรัฐอเมริกาและเครือข่ายนิติพันธุศาสตร์แห่งสหภาพยุโรป [20, 21]

หน่วยงานทางนิติวิทยาศาสตร์ในประเทศไทย

หน่วยงานหลักภาครัฐของประเทศไทยที่รับผิดชอบการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอจากวัตถุพยานทางชีวภาพคือ สำนักงานพิสูจน์หลักฐานตำรวจ สำนักงานตำรวจแห่งชาติ ซึ่งประกอบด้วย กองพิสูจน์หลักฐานกลางและศูนย์พิสูจน์หลักฐาน 1-10 ที่ตั้งอยู่ในภูมิภาคต่างๆทั่วประเทศ และสถาบันนิติวิทยาศาสตร์ กระทรวงยุติธรรม จำนวนวัตถุพยานชีวภาพที่ส่งมาตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ ณ หน่วยงานเหล่านี้ เฉลี่ยแล้วไม่ต่ำกว่า 42,000 รายการต่อปี ซึ่งดำเนินการโดยสำนักงานพิสูจน์หลักฐานตำรวจประมาณ 27,000 รายการ และสถาบันนิติวิทยาศาสตร์ กระทรวงยุติธรรมประมาณ 15,000 รายการต่อปี (Central Institute for Forensic Science, 2014) โดยชุดน้ำยาหลักที่ถูกใช้ในการตรวจพิสูจน์คือชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus ที่มีค่าใช้จ่ายประมาณ 1,350 บาท ต่อตัวอย่าง ในการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอจากวัตถุพยานทั้งหมด โดยใช้เพิ่มปริมาณ STR เป้าหมาย จำนวน 15 ตำแหน่ง ได้แก่ D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D5S818, FGA และ ตำแหน่งระบุเพศบนยีน Amelogenin [6, 7] นอกจากนี้ในบางกรณีอาจจะมีการใช้ชุดน้ำยา IDplex Plus ที่มีค่าใช้จ่ายประมาณ 900 บาทต่อตัวอย่างและวิเคราะห์ STR ตำแหน่งเดียวกับ AmpFLSTR® Identifiler® Plus ทุกประการ และชุดน้ำยา GlobalFiler™ ที่มีค่าใช้จ่ายประมาณ 1,600 บาท และใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 23 ตำแหน่งร่วมด้วย

เนื่องจากชุดน้ำยา IDplex Plus ตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอตำแหน่งเดียวกันกับชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus ชุดเดิม แต่มีราคาถูกกว่าส่งผลให้สามารถประหยัดงบประมาณได้มากกว่าสิบล้านบาทต่อปีหากมีการเปลี่ยนจากชุดน้ำยาหลักจาก Identifiler® Plus มาเป็น IDplex Plus และการที่ทั้งสองชุดน้ำยาตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอตำแหน่งเดียวกัน จึงไม่น่าส่งผลกระทบต่อ การดำเนินงานในแง่จัดทำฐานข้อมูลดีเอ็นเอและในขั้นตอนการวิเคราะห์และแปลผล [9] นอกจากนี้ชุดน้ำยา IDplex Plus ใช้เวลาในการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอน้อยกว่า ดังนั้นการทดสอบเปรียบเทียบทั้งสองชุดน้ำยาจึงเป็นที่สนใจของหน่วยงานนิติวิทยาศาสตร์ทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ

SWGDM และหน่วยงานที่กำหนดมาตรฐานชุดน้ำยา STR

เนื่องจากอุปกรณ์และชุดน้ำยาต่าง ๆ นั้นมีผลต่อคุณภาพลายพิมพ์ STR ซึ่งสำคัญต่อการนำไปใช้ในทางกฎหมาย ดังนั้นประสิทธิภาพของชุดน้ำยา STR สำเร็จรูปจึงมีความสำคัญ การจะใช้ชุดน้ำยาสำเร็จทางการค้ารูปใดๆ ในการตรวจพิสูจน์บุคคลในงานทางนิติวิทยาศาสตร์ ชุดน้ำยานั้นๆ จะต้องมีการศึกษาทดสอบประสิทธิภาพของชุดน้ำยาตามข้อกำหนดของหน่วยงานทางนิติวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้อง เช่น Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM) และ European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI) เป็นต้น โดยมีข้อกำหนดเกี่ยวกับการทดสอบประสิทธิภาพของชุดน้ำยา STR ทางการค้าสำเร็จรูปต่างๆ ที่จะต้องศึกษาทดสอบในด้านต่างๆ ตัวอย่างเช่น Sensitivity, Percent profile, Intra-locus balance Inter-locus balance และ Concordance เป็นต้น ทั้งนี้การจะนำชุดน้ำยามาใช้กับวัตถุพยานทางชีวภาพในงานนิติวิทยาศาสตร์นอกจากบริษัทผู้ผลิตต้องทำการทดสอบแล้วยังต้องมีการทดสอบภายในห้องปฏิบัติการที่จะนำมาชุดน้ำยามาใช้จริง เพื่อให้ได้ผลการตรวจพิสูจน์ที่น่าเชื่อถือและสามารถใช้ได้กับวัตถุพยานที่มีปริมาณดีเอ็นเอน้อยหรือเสื่อมสภาพที่จะพบในวัตถุพยานจริงได้ [35, 36]

การทดสอบเปรียบเทียบมาตรฐานของชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอนั้นเป็นสิ่งสำคัญที่ผู้ผลิตต้องดำเนินการก่อนนำมาจำหน่ายและใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์ โดยปกติผู้ผลิตจะเป็นผู้ที่ดำเนินการทดสอบคุณภาพของชุดน้ำยาในด้านประสิทธิภาพของการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างดีเอ็นเอปริมาณน้อยหรือเสื่อมสภาพ ซึ่งพบบ่อยในงานนิติวิทยาศาสตร์ ทดสอบความไววิเคราะห์ ศึกษาความคงทนต่อตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ ศึกษาความสอดคล้องของผลดีเอ็นเอ เป็นต้น และทำการเผยแพร่ข้อมูลเกี่ยวกับการพัฒนาและผลการตรวจสอบชุดน้ำยาสำเร็จรูปนั้นๆ [22, 23] หลังจากนั้นนักวิจัยหรือหน่วยงานซึ่งอาจจะไม่เกี่ยวข้องกับผู้ผลิต จะทำการศึกษาทดสอบภายในห้องปฏิบัติการ (Internal validation) และตรวจสอบประสิทธิภาพของชุดน้ำยากับตัวอย่างประเภทต่างๆ รวมทั้งเผยแพร่ผลงานลงในวารสารวิทยาศาสตร์อีกครั้ง [24, 25] ขั้นตอนถัดมา นักวิจัยจะเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างชุดน้ำยา [5, 10, 11] ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็นสองประเภท คือการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างชุดน้ำยาจากผู้ผลิตที่วางขายในยุคเดียวกัน ที่ได้พัฒนาจากพื้นฐานเทคโนโลยีและความรู้ที่มีอยู่ในช่วงเวลาเดียวกัน ตัวอย่างงานวิจัยดังกล่าวได้แก่ การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพ

ระหว่างชุดน้ำยา Identifiler® Direct กับ PowerPlex® 16 HS [18] และชุดน้ำยา NGMSelect® กับ PowerPlex® ESI 17 [11] เป็นต้น ผลการศึกษาจากงานวิจัยเหล่านี้พบความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญระหว่างชุดน้ำยา [18, 26] ในขณะที่งานวิจัยอีกประเภทหนึ่งคือการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างชุดน้ำยาที่วางขายต่างยุค ซึ่งพัฒนาจากพื้นฐานเทคโนโลยีและความรู้ที่ต่างกัน ได้แก่ การศึกษาเปรียบเทียบระหว่างชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® กับ AmpFLSTR® Identifiler® Plus พบว่าชุดน้ำยาที่ใหม่กว่า (AmpFLSTR® Identifiler® Plus) มีความไวในการวิเคราะห์และมีความคงทนต่อตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ดีกว่า ตามที่ระบุไว้ในรายงานจากผู้ผลิต [27][20]

พารามิเตอร์ที่สำคัญในลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ในงานวิจัยนี้จะพิจารณาเปรียบเทียบชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จากพารามิเตอร์ที่สำคัญ ได้แก่ Peak heights, Percent profiles, Intra-locus balance, Inter-locus balance, Stutter ratio, Allelic drop-in, Allelic drop-out และ Concordance Peak heights คือความสูงของพีคหรืออัลลีล บอกถึงปริมาณของการเรืองแสงซึ่งเป็นสัดส่วนกับปริมาณผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ กล่าวคือหากมีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ มาก Peak heights ก็สูง และหากมีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์น้อย Peak heights ก็ต่ำ [1] ในกรณีที่ความสูงของพีคต่ำนั้นมักพบในลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ไม่สมบูรณ์ อาจเป็นผลมาจากปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์น้อย อันเนื่องมาจากวัตถุดิบชีวภาพที่ได้รับมีลักษณะเสื่อมสภาพ หรือมีตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ปะปนอยู่ [1, 12] Percent profiles บอกถึงจำนวนร้อยละของอัลลีลที่ตรวจวัดได้จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอลายหนึ่ง [28] ดังนั้นหากทำการวิเคราะห์ดีเอ็นเอเป้าหมายจำนวน 16 ตำแหน่ง จะต้องตรวจพบอัลลีลทั้งหมด 32 อัลลีลในลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ (อัลลีลในตำแหน่งที่เป็น homozygous จะนับเป็น 2 อัลลีล หากพีคมีความสูงที่มากพอ) Intra-locus balance เป็นอัตราส่วนระหว่างสองอัลลีลในตำแหน่งที่เป็น Heterozygous [29] ทั้งนี้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มาจากคนๆ เดียวมักจะมี Intra-locus balance อยู่ในช่วง 0.6 - 1.6 บางข้อมูลอาจมีการเบี่ยงเบนไปจากช่วงที่กำหนดได้ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับมาจากบุคคลมากกว่าหนึ่งคนหรือที่เรียกว่า Mixed DNA profile หรือเกิดจากความผิดปกติของโครโมโซม เช่น ดาวน์ซินโดรม เป็นต้น Inter-locus balance คืออัตราส่วนของความสูงของพีคตำแหน่งหนึ่ง

เปรียบเทียบกับตำแหน่งอื่นๆในลายพิมพ์ดีเอ็นเอเดียวกันซึ่งควรมีค่าที่ใกล้เคียงกัน ค่า Inter-locus balance ที่ดีจะต้องมีค่าเข้าใกล้ศูนย์หรือเท่ากับศูนย์นั้นหมายถึง ค่าความสูงของอัลลีลในตำแหน่ง STR นั้นๆ มีค่าเท่ากับค่าเฉลี่ยของความสูงของพีคในลายพิมพ์ ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพที่ดีของชุดน้ำยาในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยกระบวนการพีซีอาร์และหากค่า Inter-locus balance มีค่าที่ห่างจากศูนย์มาก ณ ตำแหน่ง STR ใดๆ ในลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากบุคคลคนเดียว ก็บ่งบอกถึง STR ตำแหน่งนั้นมีความสูงของอัลลีลแตกต่างจากตำแหน่งอื่นๆมากในลายพิมพ์เดียวกัน [11] การศึกษาอัลลีลหรือพีคแปลกปลอม (Artifacts) เช่น Stutters และ Allelic drop-in นั้นนับว่าเป็นสิ่งสำคัญเช่นเดียวกัน

ฟิคสตัดเตอร์ (Stutter) เป็นพีคเล็กๆที่ปรากฏอยู่ข้างหน้าหรือข้างหลังพีคจริงในตำแหน่งที่ห่างออกไปหนึ่งหน่วยซ้ำ (4 เบส สำหรับตำแหน่ง STR ที่นิยมใช้) ซึ่งเกิดจากการเลื่อนพับของสายไพรเมอร์หรือสายดีเอ็นเอแม่แบบในระหว่างการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ทำให้เกิดเป็นสายนิวคลีโอไทด์สายใหม่ที่สั้นหรือยาวกว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ต้องการ Stutter ratios บอกละเอียดอัตราส่วนระหว่างความสูงของพีค Stutter (n-4) กับพีคจริง อัตราส่วนของ Stutter สำหรับลายพิมพ์ STR ที่ดีจะต้องมีความสูงของฟิคสตัดเตอร์ไม่เกินร้อยละ 15 ของความสูงของอัลลีลจริง และมีความแตกต่างกันในแต่ละตำแหน่งเป้าหมาย ขึ้นอยู่กับความยาวของอัลลีล โดยอัลลีลที่มีขนาดใหญ่มักจะเกิด Stutter มากกว่าอัลลีลขนาดเล็ก [26, 30, 31] Allelic drop-ins คือ อัลลีลแปลกปลอมที่ไม่ใช่อัลลีลแท้จริงในลายพิมพ์ดีเอ็นเอนั้นๆ อาจเกิดจากการปนเปื้อนดีเอ็นเอในวัตถุดิบชีวภาพที่ได้รับหรือการปนเปื้อนระดับต่ำในห้องปฏิบัติการ ในขณะที่ Allelic drop-outs คือ อัลลีลแท้จริงที่หายไปจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ อาจเกิดจากปริมาณดีเอ็นเอที่ใส่ในปฏิกิริยาพีซีอาร์น้อยเกินไป ซึ่งส่งผลให้เกิด Intra-locus balance และ Percent profile ที่ต่ำได้ [32, 33] Concordance คือการศึกษาความสอดคล้องของผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากชุดน้ำยาต่างชุด การศึกษา Concordance ที่ดีจะดำเนินการโดยห้องปฏิบัติการขนาดใหญ่เพราะต้องใช้ชุดน้ำยาหลายชุดและจำนวนตัวอย่างที่เยอะ จึงอาจใช้เวลานานในการเผยแพร่ [5, 34-37]

อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างชุดน้ำยา AmpFISTR® Identifier® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus ซึ่งเป็นที่สนใจของหน่วยงานภาครัฐในประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาในวัตถุดิบชีวภาพจากคดีจริง และ

เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงการใช้ชุดน้ำยาดังกล่าวอาจส่งผลกระทบต่อขั้นตอนการปฏิบัติงานมาตรฐาน (Standard operating protocols) ภายในองค์กร และมีผลกระทบต่อรูปคดีและการพิจารณาคดีความในกระบวนการยุติธรรมได้ ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดน้ำยาทั้งสองในทุกด้านที่กล่าวมาข้างต้น โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอมาตรฐานเป็นตัวควบคุมและตัวอย่างวัตถุพยานจริงหลากหลายประเภทที่พบบ่อยในงานนิติวิทยาศาสตร์ โดยศึกษาพารามิเตอร์ที่สำคัญในการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ ได้แก่ Peak heights, Percent profile, Intra-locus balance, Inter-locus balance, Stutter ratio, Allelic drop-in Allelic drop-out และ STR Concordance เป็นต้น

วัตถุประสงค์

งานวิจัยชิ้นนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus กับ QIAGEN® Investigator IDplex Plus ภายใต้สภาวะควบคุมและทดสอบกับตัวอย่างวัตถุพยานชีวภาพในคดีจริงโดยทำการทดสอบความไวในการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอที่ปริมาณต่างๆ และ ศึกษาความคงทนต่อตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ จำนวน 3 ชนิดได้แก่ ฮิวมิก แอซิด (Humic acid) เฮมาติน (Hematin) และแคลเซียมโดยพิจารณาจากพารามิเตอร์ทางนิติวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องทั้งหมดจำนวน 7 ประเภท ได้แก่ Peak heights Percent profiles Intra-locus balance Inter-locus balance Stutter ratio Allelic drop-in และ Allelic drop-out

บทที่ 2

การเตรียมตัวอย่าง

ทำการเพิ่มปริมาณ DNA กับตัวอย่างทั้งหมด 166 ตัวอย่าง ประกอบด้วยตัวอย่าง control DNA 9947A control DNA 9948 และตัวอย่างจากวัตถุดิบจริง โดยเจือจางตัวอย่าง control DNA ทั้งสอง ให้ได้ความเข้มข้น 500, 250, 125, 62.5 และ 31.3 พิโคกรัม และ ตัวอย่างวัตถุดิบจริงอีก 57 ตัวอย่าง (แบ่งตัวอย่างได้ 8 ชนิด ได้แก่ เลือด ผม เล็บ เยื่อบุกระพุ้งแก้ม เทป กาวเหนียว กันกรองบุหรี เสื้อผ้า และแปรงสีฟัน) ซึ่งสุ่มเลือกตัวอย่างมาจาก ศูนย์พิสูจน์หลักฐาน 10 สำนักงานพิสูจน์หลักฐานตำรวจ โดยตัวอย่างวัตถุดิบทั้งหมดนั้นสกัดโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ DNA IQ™ system (Promega, WI, USA) เตรียมตัวอย่างในการศึกษาโดยตัดไม้สาลีพันปลายให้เป็นขนาด เล็กประมาณ 5×5 มิลลิเมตร หรือตัวอย่างที่เป็นเทปกาวยาวขนาด 3×3 มิลลิเมตร ใส่ หลอด 1.5 ไมโครลิตร จากนั้นเติม Lysis buffer ที่มีส่วนผสมของ DTT (เข้มข้นเป็นอัตราส่วน 1 โมลต่อลิตร) 200 ไมโครลิตร ลงบนตัวอย่างที่เตรียมไว้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำตัวอย่างใส่ในหลอด 1.5 ไมโครลิตรที่มีตัวกรองวางอยู่ด้านบน (Spin basket) ที่วางบน หลอด 1.5 ไมโครลิตร จากนั้น หมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้องด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที และนำตะแกรงด้านบนออก เติมเรซิน (Resin) 7 ไมโครลิตร ลงในสารละลายที่เหลือจากการ หมุนเหวี่ยง เขย่าให้เข้ากัน ประมาณ 15 วินาที ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที เพื่อให้เรซินจับกับดีเอ็นเอในตัวอย่างได้ดี จากนั้นนำหลอดตัวอย่างวางลงบน Magnetic stand ดูดสารละลายทิ้งและเติม Lysis buffer 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ประมาณ 15 วินาที ดูด Lysis buffer ทิ้ง ทำการล้าง ตัวอย่างด้วย 1X Wash buffer 3 ครั้งโดยใช้ปริมาณครั้งละ 100 ไมโครลิตร เมื่อล้างครบสามครั้งให้ เปิดฝาทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที และ เติม Elution buffer 20 ไมโครลิตรลงในหลอดตัวอย่าง เขย่าให้ เข้ากันประมาณ 15 วินาที และนำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำตัวอย่าง มาเขย่าให้เข้ากันประมาณ 15 วินาที และวางลงบน Magnetic stand ดูดสารละลายใส่ที่เหลือใน กันหลอดใส่หลอด 1.5 ไมโครลิตรหลอดใหม่ และเก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การวัดปริมาณดีเอ็นเอ

ทำการวัดปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างวัตถุพยานจริงที่ผ่านการสกัดแล้วด้วยวิธี Real-time PCR ใช้ชุดน้ำยาหาปริมาณ Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit โดยนำดีเอ็นเอที่ผ่านการสกัดจำนวน 1 ไมโครลิตรใส่ในสารละลาย Quantifiler PCR Reaction Master Mix ปริมาณ 11.5 ไมโครลิตรต่อหนึ่งตัวอย่าง (Quantifiler Human Primer Mix 6.25 ไมโครลิตร และ Quantifiler PCR Reaction Mix 5.25 ไมโครลิตร) จากนั้นใช้เครื่องมือ ABIPRISM® 7000 Sequence Detection System เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยมี TaqMan® probe ตรวจวัดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในแต่ละรอบของปฏิกิริยาและเทียบปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากตัวอย่างจากดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA Standard) 8 ความเข้มข้น โดยมีความเข้มข้นเริ่มต้นสูงสุด 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรและเจือจางความเข้มข้นต่ำสุดที่ 0.023 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร วิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากตัวอย่างด้วยโปรแกรม SDS Software v1.0 ในหน่วย นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

สำหรับชุดน้ำยาสำเร็จรูป AmpFLSTR® Identifiler® Plus ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในสารละลายปริมาณทั้งหมด 12.5 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบไปด้วย สารละลาย PCR Master Mix 5.0 ไมโครลิตร สารละลาย Primer Mix 2.5 ไมโครลิตร และเติม สารสกัด DNA 5.0 ไมโครลิตร ทำการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเครื่อง ABI 9700 ซึ่งมีสภาวะดังนี้: 95 องศาเซลเซียส นาน 11 นาที ตามด้วย 28 cycles ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที และ 59 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ขั้นตอนสุดท้ายที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และเก็บรักษาผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 1)

สำหรับชุดน้ำยาสำเร็จรูป QIAGEN® Investigator IDplex® Plus ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในสารละลายปริมาณสุทธิทั้งหมด 12.5 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบไปด้วย Fast Reaction Mix 3.75 ไมโครลิตร Primer Mix 1.25 ไมโครลิตร และ Nuclease-free water 2.5 ไมโครลิตร เติมสารสกัด DNA 5.0 ไมโครลิตร ทำการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเครื่อง ABI 9700 ซึ่งมีสภาวะดังนี้: 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตามด้วย 30 cycles ที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10

วินาที และ 61 °C เป็นเวลา 2 นาที และเก็บรักษาผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงสถานะสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction ตามคู่มือการใช้งานของแต่ละชุดน้ำยา

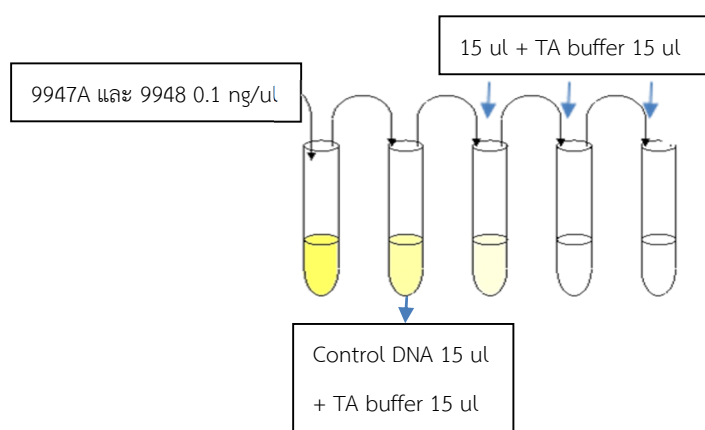
AmpFLSTR® Identifiler® Plus			QIAGEN® Investigator IDplex Plus		
อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
95 °C	11 นาที		95 °C	5 นาที	
94 °C	1 นาที	28 รอบ	96 °C	10 วินาที 2 นาที	30 รอบ
59 °C	1 นาที		61 °C		
72 °C	1 นาที				
60 °C	60 นาที		-	-	
4 °C	∞		4 °C	∞	

ตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

ทำการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเครื่อง ABI 3130xl Genetic Analyzer พอลิเมอร์ที่ใช้คือ POP-4 และคาพิลลารีความยาว 36 เซนติเมตร เติม PCR products 1 ไมโครลิตร ลงใน Formamide 10.7 ไมโครลิตร และ Genescan LIZ-500 0.3 ไมโครลิตร สำหรับชุดน้ำยา Identifiler® Plus kit และสำหรับชุดน้ำยา IDplex Plus เติม Formamide 12 ไมโครลิตร และเติม DNA Size Standard 550 (BTO) 0.5 ไมโครลิตร สารละลายพีซีอาร์ทั้งหมดจะนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ใช้สภาวะการฉีดสาร 15 kV/5 วินาที และ 3 kV/10 วินาที สำหรับชุดน้ำยา Identifiler® Plus และ IDplex Plus kit ตามลำดับ ข้อมูลที่ได้ถูกนำเข้าสู่โปรแกรม GeneMapper® ID v. 3.2 เพื่อตรวจวิเคราะห์ในขั้นต่อไป โดยกำหนดขั้นต่ำของความสูงพีคไว้ที่ 50 RFU

ทดสอบความไววิเคราะห์

เตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอควบคุม 9947A และ 9948 ด้วยเทคนิค Serial dilution ให้ได้ความเข้มข้น 50, 25, 12.5, 6.25 และ 31.3 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร โดยใช้ TA buffer 15 ไมโครลิตร (รูปที่ 4) จากนั้นเก็บดีเอ็นเอที่เจือจางแล้วไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปเพิ่มปริมาณ DNA สำหรับการวิเคราะห์ความไววิเคราะห์ที่ปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้น 500, 250, 125, 62.5, and 31.3 พิโคกรัม



รูปที่ 4 แสดงการเจือจางตัวอย่างดีเอ็นเอควบคุมด้วยเทคนิค Serial dilution

ศึกษาตัวยับยั้งกระบวนการพีซีอาร์

ตัวยับยั้งกระบวนการพีซีอาร์ 3 ชนิดที่ใช้ได้แก่ ฮิวมิกแอซิด เฮมาติน และ แคลเซียม จาก Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) เตรียมสารละลายฮิวมิกแอซิดความเข้มข้น 5000 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร โดยชั่งฮิวมิกแอซิด ให้ได้ 0.0025 กรัม ละลายในน้ำ 500 ไมโครลิตร จากนั้น ทำการเจือจางให้ได้ ความเข้มข้นสุดท้าย 375 750 และ 1125 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร โดยเติมน้ำและสารละลายฮิวมิกแอซิดที่เตรียมไว้ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณสารละลายฮิวมิกแอซิดและน้ำเพื่อเตรียมสารละลายฮิวมิกแอซิดที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น ฮิวมิกแอซิด	ปริมาณสารละลายฮิวมิกแอซิด	ปริมาณน้ำ
375 ng/ μ l	3.75 μ l	46.25 μ l

750 ng/μl	7.50 μl	42.50 μl
1125 ng/μl	11.25 μl	38.75 μl

เตรียมสารละลายเฮมาตินความเข้มข้น 10,000 ไมโครโมลาร์ โดยชั่งเฮมาตินให้ได้ 0.0032 กรัม ละลายใน 0.1 นอัมลของโซเดียมไฮดรอกไซด์ 500 ไมโครลิตร และเจือจางให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1,500 ไมโครโมลาร์ 3,000 ไมโครโมลาร์ และ 4,500 ไมโครโมลาร์ โดยเติมสารละลายต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณสารละลายเฮมาตินและน้ำเพื่อเตรียมสารละลายเฮมาตินที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น เฮมาติน	ปริมาณสารละลายเฮมาติน	ปริมาณน้ำ
1,500 μM	7.50 μl	42.50 μl
3,000 μM	15.00 μl	35.00 μl
4,500 μM	22.50 μl	27.50 μl

ในส่วนของแคลเซียม เตรียมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ โดยชั่ง แคลเซียมคลอไรด์ให้ได้ 0.0027 กรัม ละลายในละลายในน้ำกลั่น 500 ไมโครลิตร นำไปเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.005 มิลลิโมลาร์ 0.010 มิลลิโมลาร์ และ 0.015 มิลลิโมลาร์ เติมน้ำและสารละลายแคลเซียม ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงปริมาณสารละลายแคลเซียมและน้ำเพื่อเตรียมสารละลายแคลเซียมที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นแคลเซียม	ปริมาณสารละลายแคลเซียม	ปริมาณน้ำ
0.005 mM	5.00 μl	45.00 μl
0.010 mM	10.00 μl	40.00 μl
0.015 mM	15.00 μl	35.00 μl

ในการศึกษาเปรียบเทียบความคงทนต่อตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ระหว่างชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus กับ QIAGEN® Investigator IDplex Plus ตัวยับยั้งแต่ละความเข้มข้นถูกนำไปเติมในสารละลายพีซีอาร์ที่มี control DNA 9947A หรือ 9948 จำนวน 500 พิโคกรัม

ศึกษา ในแต่ละหลอดทดลองนั้นได้เติมตัวยับยั้งกระบวนการพีซีอาร์ในปริมาณที่ต่างกัน ดังนี้ ฮิวมิกแอซิด 75, 150 และ 225 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เสมาดิน 300, 600, 900 ไมโครโมลาร์ และแคลเซียมคลอไรด์ 1, 2 และ 3 มิลลิโมลาร์ หลังจากนั้นนำตัวอย่างเข้าสู่ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณและตรวจวัดดีเอ็นเอด้วยทั้งสองชุดน้ำยา และเปรียบเทียบข้อมูลจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ที่ได้ระหว่างชุดน้ำยาทั้งสองชนิด ในด้านความสูงของอัลลิลและความสมบูรณ์ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ศึกษาประสิทธิภาพการนำไปใช้กับวัตถุพยานจริง

จากตัวอย่างวัตถุพยานจริงจำนวน 57 ตัวอย่างที่สุ่มเก็บมาจากกลุ่มงานชีววิทยาและดีเอ็นเอ ศูนย์พิสูจน์หลักฐาน 10 ซึ่งแบ่งได้เป็น 8 ชนิด ได้แก่ คราบเลือด เยื่อกระดูก ฟัน แก้ว เล็บ ก้นกรองบุหรี่ เสื้อผ้า ดีเอ็นเอจากการสัมผัสที่เก็บโดยเทปกาวยึดเหนี่ยวและ เก็บโดยใช้ไม้พันสำลี นำมาสกัดและวัดปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems) โดยดำเนินการตามขั้นตอนที่ระบุไว้ในคู่มือจากผู้ผลิต และนำตัวอย่างที่มีปริมาณดีเอ็นเอตั้งแต่ 0.01 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรขึ้นไปเข้าสู่การเพิ่มปริมาณ STR และจัดทำลายพิมพ์ STR ตามขั้นตอน ด้วยชุดน้ำยา AmpFISTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus จากนั้นนำข้อมูลลายพิมพ์ STR มาวิเคราะห์โดยคัดตัวอย่างที่เป็นโปรไฟล์ผสมออกและเปรียบเทียบจำนวนอัลลิลที่ตรวจวัดได้ระหว่างชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณ STR ทั้งสองชุดในตัวอย่างแต่ละชนิด

ตารางที่ 5 แสดงชนิดและเลขวัตถุพยานที่สุ่มเก็บ

ชนิดวัตถุพยาน	หมายเลขตัวอย่าง	ชนิดวัตถุพยาน	หมายเลขตัวอย่าง
เลือด (13)	2186	ก้นกรองบุหรี่	4551
	2475		4552
	3094		4631
	3103		4632
	3162	เสื้อผ้า (4)	1128
	3173		2703

	3587
	4079
	4649
	4667
	4671
	4711
	4721
เยื่อกระดาษ (13)	1187
	2055
	2092
	2117
	2728
	2833
	3474
	3987
	4011
	4090
	4098
	4100
	4797
ก้นกรองบุหรี่ (7)	1985
	3871
	4181

	3054
	4431
ผม (1)	4713
เล็บ (1)	4511
เทพกาวเหนียว (4)	3552
	4464
	4615
	4741
ก้านพันสำลี (8)	3697
	3887
	3903
	4687
	4706
	4726
	4735
	4736
เทปลิฟต์ (4)	3287
	3376
	3383
	3470
	4452
แปรงสีฟัน (1)	4381
รวม	57

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองต่างๆถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยพารามิเตอร์ทางสถิติที่สำคัญ
ในงานนิติพันธุศาสตร์ดังต่อไปนี้

Percent profile: จำนวนอัลลีลที่ตรวจวัดได้นำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์โพรไฟล์โดยหารด้วย 32 (จำนวนอัลลีลสูงสุดที่สามารถตรวจวัดได้) ตำแหน่งที่เป็น Homozygous ที่มีความสูงของอัลลีล 150 RFU ขึ้นไป จะนับเป็น 2 อัลลีล หากน้อยกว่านั้นจะนับเป็นอัลลีลเดียว ดังสมการ

$$\text{Percent profile} = \frac{\text{จำนวนอัลลีลสูงสุดที่สามารถตรวจวัดได้}}{32} \times 100$$

Peak height: คำนวณค่าเฉลี่ยความสูงของพีคของสองอัลลีลที่อยู่ในตำแหน่งเป็น Heterozygous ความสูงของพีคของอัลลีลเดียวในตำแหน่งที่เป็น Homozygous จะถูกหารสอง

$$\text{Peak height} = \frac{\text{ความสูงของพีคที่สูงกว่า} + \text{ความสูงของพีคที่ต่ำกว่า}}{2}$$

Intra-locus balance: คำนวณได้โดยนำค่าความสูงของพีคทั้งสองมาหารกันสำหรับตำแหน่งที่เป็น Heterozygous ถ้ามีค่าใกล้ 1 หมายถึงพีคทั้งสองมีความสมดุลกัน

$$\text{Intra locus balance} = \frac{\text{ความสูงของพีคที่ต่ำกว่า}}{\text{ความสูงของพีคที่สูงกว่า}}$$

Inter-locus balance: นำข้อมูลความสูงของอัลลีลมาคำนวณทางสถิติและเปรียบเทียบข้อมูล ตามวิธีการซึ่งศึกษาและรายงานโดย Tvedebrink และคณะ [11] ดังสมการ

$$\text{Inter locus balance} = \frac{\text{ความสูงรวมของพีคในตำแหน่งนั้น} \times \text{ความสูงเฉลี่ยของพีคจากทุกตำแหน่ง}}{\sqrt{\text{ความสูงเฉลี่ยของพีคจากทุกตำแหน่ง}}}$$

Stutter ratio: คำนวณโดยการนำความสูงของพีคตรงตำแหน่ง n-4 bp มาหารด้วยความสูงของอัลลีลจริงที่ตำแหน่ง n

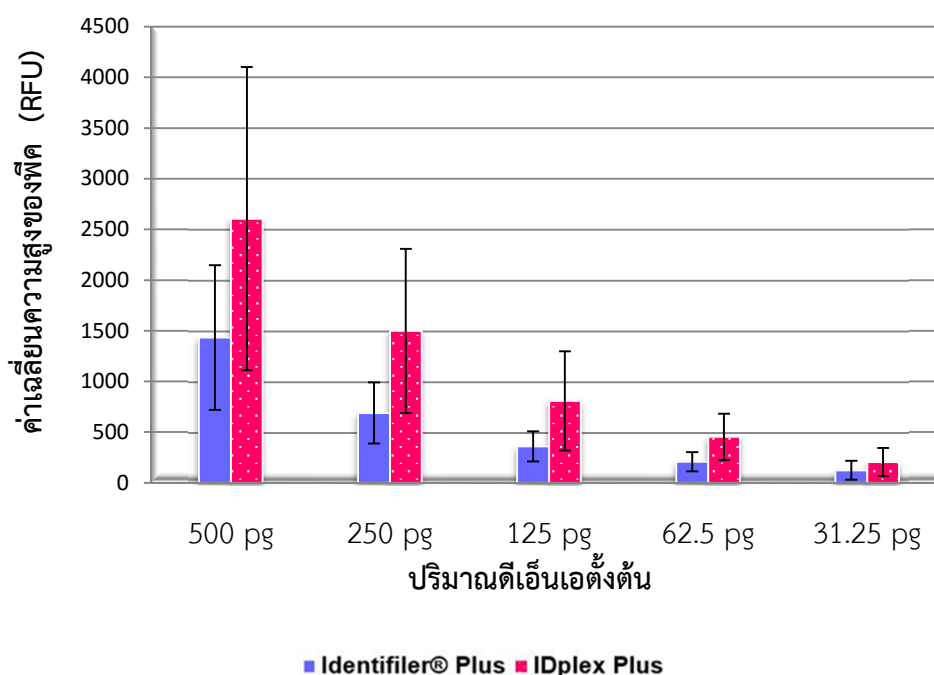
$$\text{Stutter ratio} = \frac{\text{ความสูงของพีคสตัตเตอร์}}{\text{ความสูงของพีคจริง}}$$

Allelic drop-in: คือพีคที่ไม่ปรากฏในลายพิมพ์อ้างอิง ไม่ใช่ stutter และไม่ใช่พีคที่มาจาก pull-up

บทที่ 3

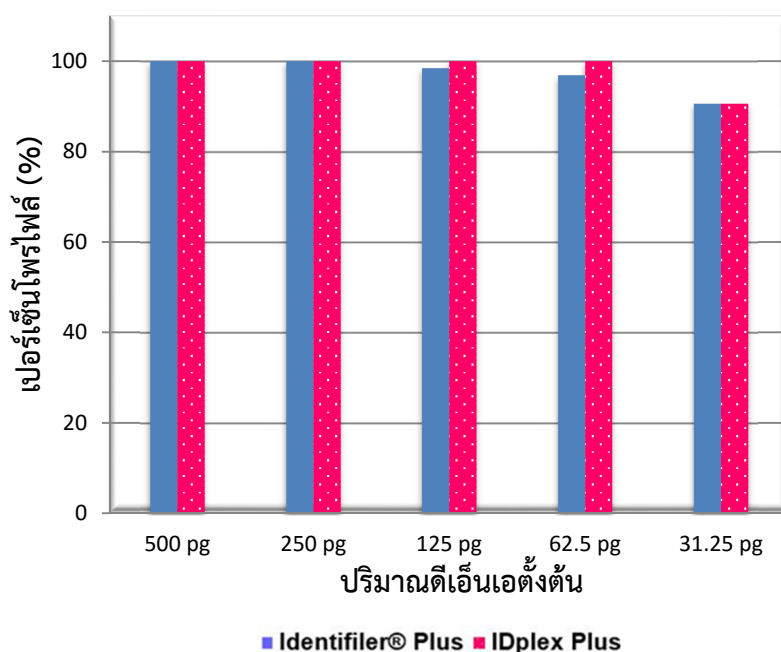
ผลการศึกษาความไววิเคราะห์ (Sensitivity study)

ในการพิจารณาประสิทธิภาพของชุดน้ำยาสำเร็จรูปสำหรับการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอนั้น ความไววิเคราะห์เป็นคุณสมบัติที่สำคัญ ความไววิเคราะห์แสดงปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นที่น้อยที่สุดที่ชุดน้ำยาแต่ละชุดสามารถเพิ่มปริมาณได้และให้ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ได้ ผลการทดลองศึกษาเปรียบเทียบความไววิเคราะห์ระหว่างชุดน้ำยาทั้งสองให้ผลการศึกษาถูกแสดงในรูปที่ 5 ค่าเฉลี่ยความสูงของพีคในแต่ละปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นระหว่างชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus แสดงผลตามลำดับ ดังนี้ ที่ปริมาณดีเอ็นเอ 500 พิโคกรัม ความสูงเฉลี่ยของพีคเท่ากับ 1,432 และ 2,606 RFU ที่ปริมาณดีเอ็นเอ 250 พิโคกรัมค่าเฉลี่ยความสูงของพีคเท่ากับ 689 และ 1498 RFU ปริมาณดีเอ็นเอ 125 พิโคกรัม ค่าเฉลี่ยความสูงของพีคเท่ากับ 360 และ 807 RFU ปริมาณดีเอ็นเอ 62.5 พิโคกรัมค่าเฉลี่ยความสูงของพีคเท่ากับ 208 และ 452 RFU และ ปริมาณดีเอ็นเอ 31.25 พิโคกรัมค่าเฉลี่ยความสูงของพีคเท่ากับ 123 และ 203 RFU จากการศึกษา ชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus มีค่าความสูงของพีคสูงกว่าเป็นเท่าตัวเมื่อเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยความสูงของพีคจากชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus ในทุกๆ ปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



รูปที่ 5 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความสูงของอัลลีล ระหว่างชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus ในแต่ละปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้น (n=20)

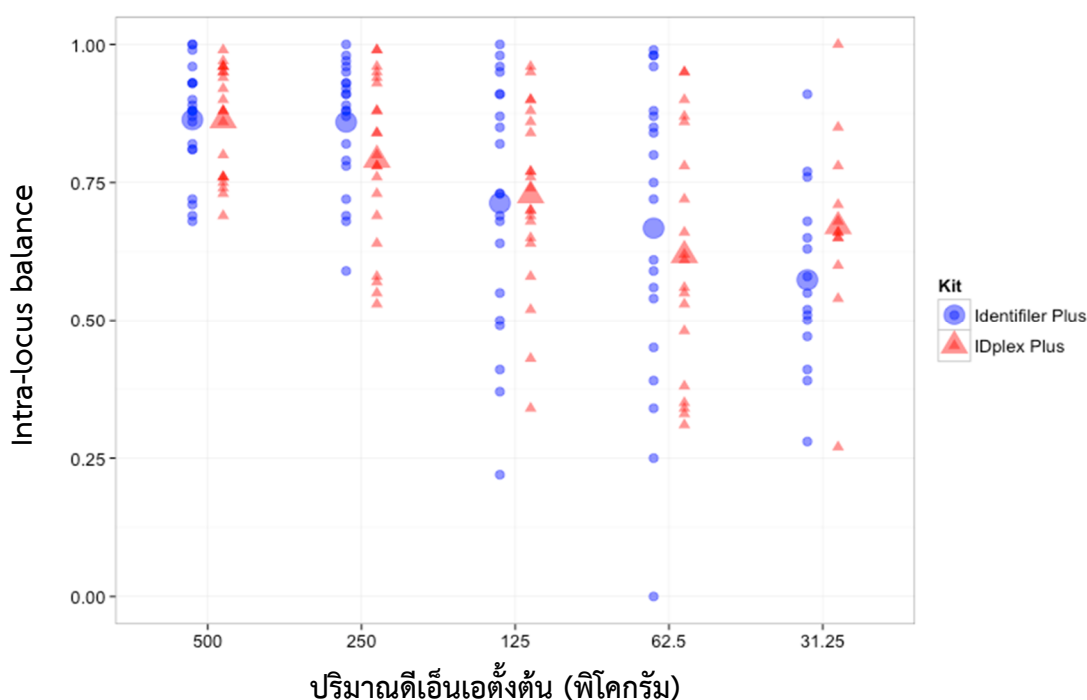
นอกจากค่าความสูงของพีค การศึกษาคุณภาพของลายพิมพ์ดีเอ็นเอก็มีความสำคัญเช่นกัน เนื่องด้วยชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus เป็นชุดน้ำยาที่ตรวจพิสูจน์ STR 16 ตำแหน่ง เหมือนกัน นั้นหมายถึง ในแต่ละลายพิมพ์ดีเอ็นเอสามารถตรวจพบอัลลีลได้สูงสุด 32 อัลลีลหรือเปอร์เซ็นต์โพรไฟล์ 100 เปอร์เซ็นต์ (Full profile) หากตรวจวัด STR ได้ไม่ครบทุกตำแหน่งหรือมีอัลลีลในบางตำแหน่งหายไป ผลเปอร์เซ็นต์โพรไฟล์ก็จะต่ำกว่า 100 เปอร์เซ็นต์ (Partial profile) จากผลการทดลองเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์โพรไฟล์ในแต่ละปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นของชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus ผลตามลำดับ ดังนี้ ที่ปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้น 250-500 พิโคกรัม อัลลีลที่ตรวจวัดได้ของทั้งสองชุดน้ำยาเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์เท่ากัน ที่ปริมาณดีเอ็นเอ 62.5-125 พิโคกรัม เปอร์เซ็นต์โพรไฟล์ของ AmpFLSTR® Identifiler® Plus เท่ากับ 97 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus สามารถตรวจวัดอัลลีลได้ครบทั้ง 100 เปอร์เซ็นต์ และ ที่ปริมาณดีเอ็นเอ 31.25 พิโคกรัม ทั้งสองชุดน้ำยาให้ผลเป็นโพรไฟล์ที่ไม่สมบูรณ์ ตรวจวัดได้ 29 อัลลีล คิดเป็น 91 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 แสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์โพไฟล์ระหว่างชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus ช่วงปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้น 5 ความเข้มข้น (n=20)

ความสมดุลของความสูงของอัลลีลในแต่ละตำแหน่ง STR (Intra-locus balance)

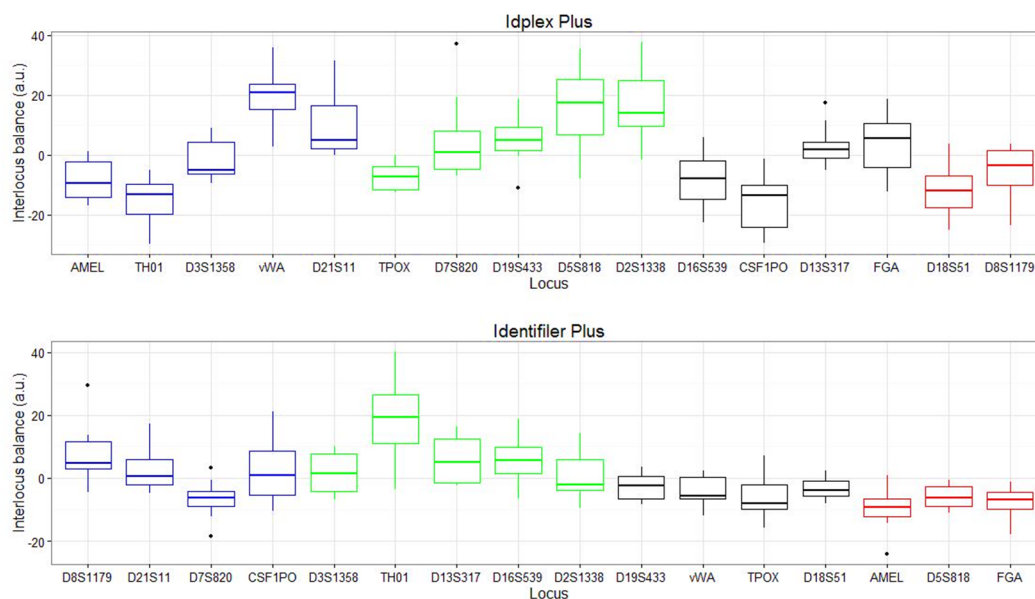
รูปที่ 7 แสดงผลการศึกษา Intra-locus balance เมื่อเปรียบเทียบอัตราส่วนความสูงของสองอัลลีลในแต่ละตำแหน่งที่พบสองอัลลีล (Heterozygous) ระหว่างชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus พบว่าเมื่อปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นน้อยลง Intra-locus balance ทั้งสองชุดน้ำยามีแนวโน้มลดลง และมีค่าใกล้เคียงกันมากระหว่างข้อมูลของชุดน้ำยาทั้งสองชุด แต่สังเกตพบความแตกต่างของค่าอัตราส่วน Intra-locus balance ระหว่างทั้งสองชุดน้ำยาเล็กน้อยในตัวอย่างที่มีปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นน้อย (31.25 พิโคกรัม) โดยค่า Inter-locus balance ของชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus มีค่ามากกว่า ชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus



รูปที่ 7 แสดงอัตราส่วน Intra-locus balance ที่ปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้น 500 – 31.25 พิโคกรัม โดยเปรียบเทียบระหว่าง ชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus วงกลมใหญ่และสามเหลี่ยมใหญ่แสดงถึงค่าเฉลี่ย

ความสมดุลของความสูงของอัลลีลระหว่างตำแหน่ง STR (Inter-locus balance)

ผลการศึกษาเปรียบเทียบในงานวิจัยนี้พบว่า ชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus มีความสมดุลของค่าความสูงของอัลลีลในลายพิมพ์ STR ที่ดีกว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus ดังแสดงในรูปที่ 8 ซึ่งแสดงผลการศึกษาเรียงตามฉลากสี ได้แก่ สีน้ำเงิน สีเขียว สีดำ และ สีแดง จะเห็นว่าในแต่ละฉลากสีของชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus ค่า Inter-locus balance ของแต่ละตำแหน่ง STR มีค่าใกล้เคียงกัน ต่างกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus ซึ่ง STR ตำแหน่งที่มีขนาดใหญ่กว่าในฉลากสีชนิดเดียวกันจะมีความสูงของอัลลีลที่สูงกว่า STR ตำแหน่งที่มีขนาดเล็กกว่า และเมื่อเปรียบเทียบความต่างของ Inter-locus balance ระหว่างแต่ละฉลากสีของลายพิมพ์ดีเอ็นเอของทั้งสองชุดน้ำยาพบว่าผล Inter-locus balance ที่ได้ใกล้เคียงกันระหว่างแต่ละฉลากสี

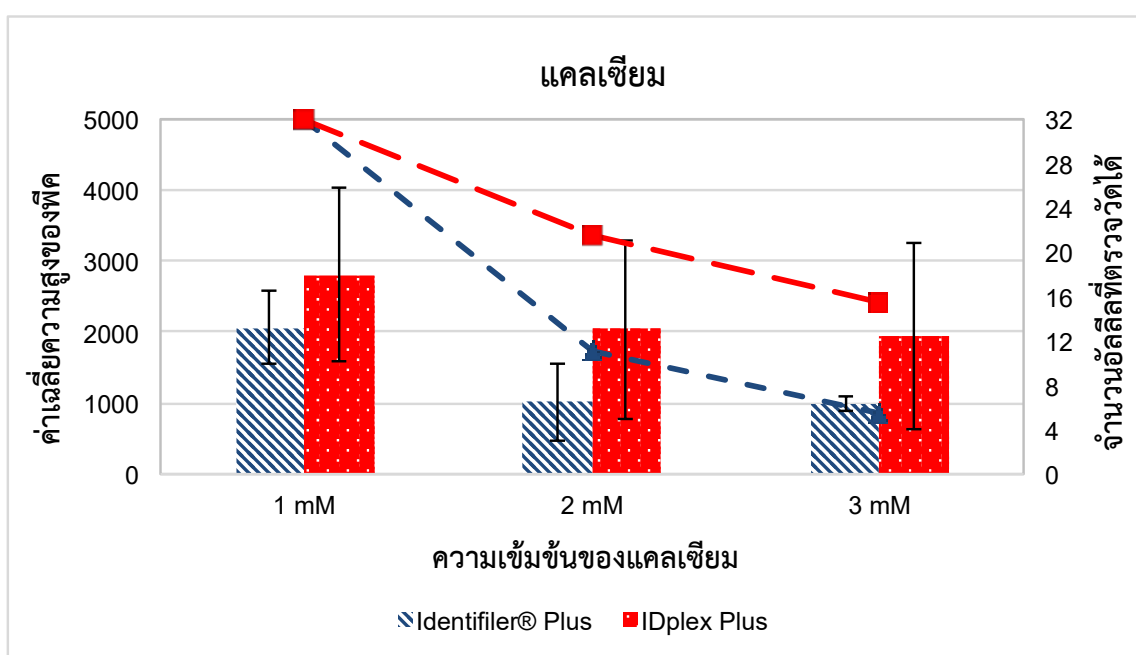


รูปที่ 8 แสดงค่า Inter-locus balance เรียงตามขนาดสีและขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของชุด
น้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus

ความทนต่อตัวยับยั้งกระบวนการพีซีอาร์ (Inhibitor tolerance study)

จากผลการทดลองของการเติมแคลเซียมคลอไรด์ลงไปในสารละลายพีซีอาร์ปริมาณ 1 มิลลิโมลาร์ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของลายพิมพ์ดีเอ็นเอระหว่างทั้งสองชุดน้ำยา โดยทั้งสองชุดน้ำยาสามารถตรวจดีเอ็นเอได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอสมบูรณ์ครบทุกตำแหน่งเหมือนกับตัวอย่างควบคุมบวกที่ไม่ได้เติมแคลเซียมคลอไรด์ลงไป (รูปที่ 9) และเมื่อปริมาณแคลเซียมในสารละลายพีซีอาร์ผสมเพิ่มขึ้นจำนวนอัลลีลที่ตรวจวัดได้ก็ลดลงในทั้งสองชุดน้ำยา เมื่อเปรียบเทียบจำนวนอัลลีลที่ตรวจวัดได้ที่ปริมาณแคลเซียมเท่ากันระหว่างชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus พบความแตกต่างกันคือ ชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus สามารถตรวจวัดอัลลีลได้จำนวนมากกว่า ดังนี้ ที่ปริมาณแคลเซียม 2 มิลลิโมลาร์ ชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus สามารถตรวจวัดอัลลีลได้ 11 อัลลีล ในขณะที่ QIAGEN® Investigator IDplex Plus ได้ 21.5 อัลลีล และที่ปริมาณแคลเซียม 3 มิลลิโมลาร์ ชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus ตรวจได้ 5.5 และ 15.5 อัลลีล ตามลำดับ อีกทั้งชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus มีค่าเฉลี่ยความสูงของ

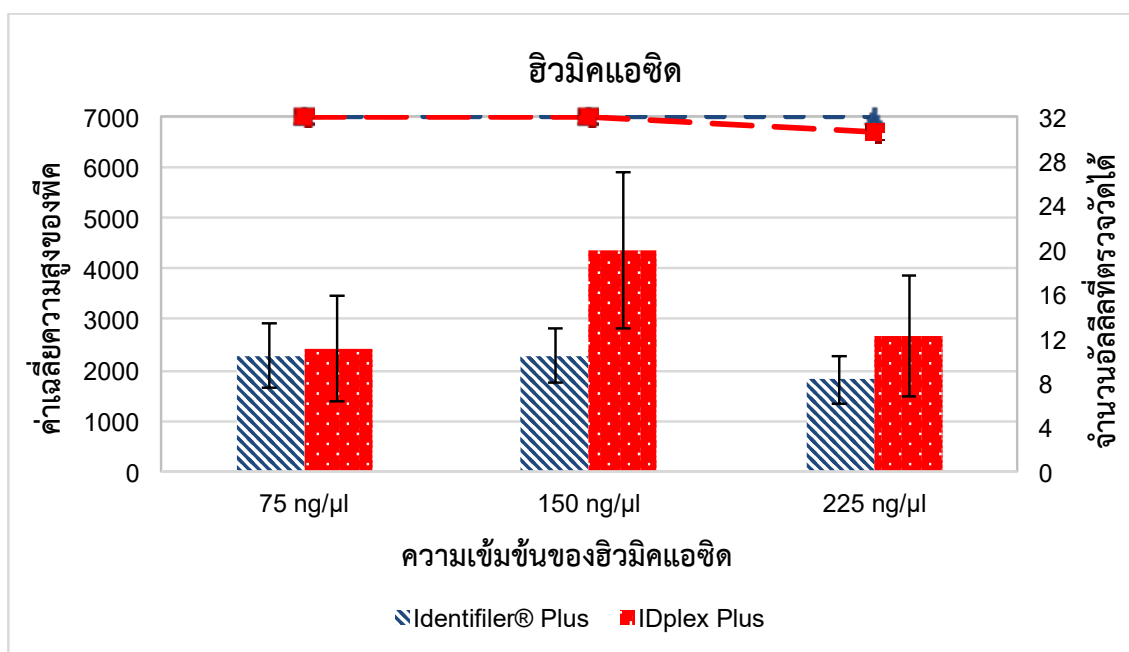
พีคที่สูงกว่า AmpFLSTR® Identifiler® Plus ซึ่งผลการทดลองก็สอดคล้องกับการผลการศึกษาด้านความไววิเคราะห์ นั้นแสดงให้เห็นถึงชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus มีความคงทนต่อแคลเซียมในกระบวนการพีซีอาร์ที่ดีกว่าชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus อย่างไรก็ตาม ค่าเฉลี่ยความสูงของพีคทั้งสองชุดน้ำยามีแนวโน้มลดลงเหมือนกันเมื่อปริมาณแคลเซียมในสารละลายพีซีอาร์ผสมเพิ่มขึ้น



รูปที่ 9 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความสูงของอัลลีลและจำนวนอัลลีล ระหว่างชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus จากการเติมแคลเซียมแต่ละความเข้มข้น

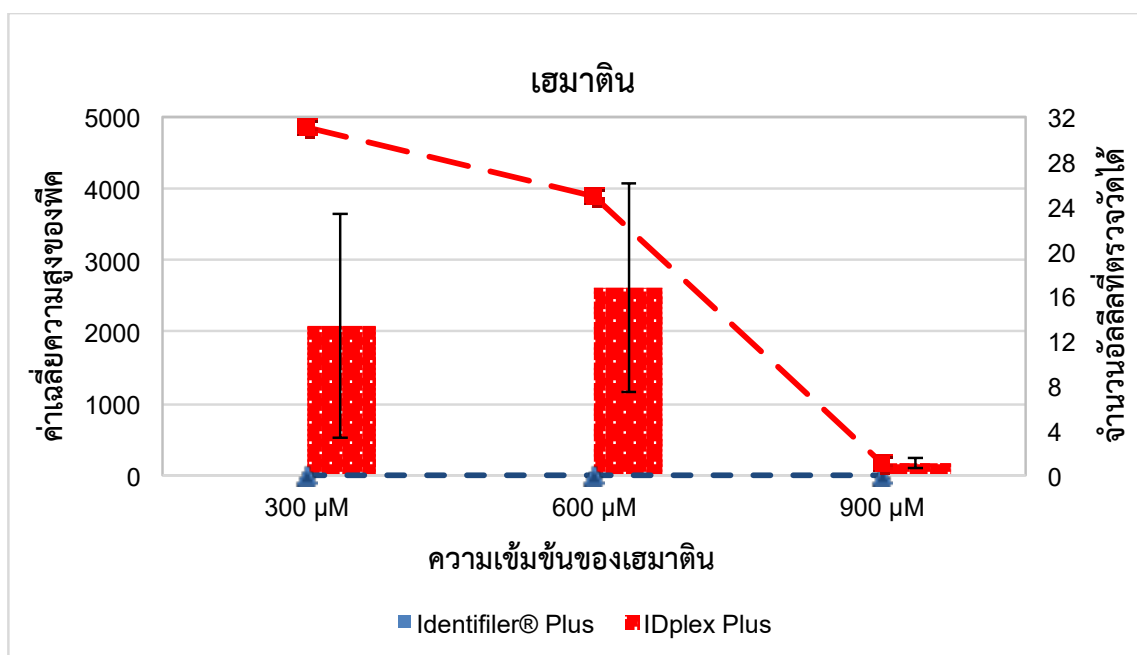
ผลการศึกษาความคงทนต่ออิทธิพลของอิทธิพลในกระบวนการพีซีอาร์ โดยเปรียบเทียบความสูงของอัลลีลและจำนวนอัลลีลที่ตรวจวัดได้ ระหว่างทั้งสองชุดน้ำยาในตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของอิทธิพลเหมือนกันในสารละลายพีซีอาร์ พบว่าสามารถตรวจวัดอัลลีลได้ครบสมบูรณ์ทุกตำแหน่งในอิทธิพลทุกความเข้มข้นเมื่อใช้ชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus (รูปที่ 10) แต่สำหรับชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus พบผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอสมบูรณ์ในตัวอย่างอิทธิพลความเข้มข้น 75 และ 150 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรเท่านั้น ส่วนในตัวอย่างที่มีอิทธิพลความเข้มข้น 225 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร พบว่าเกิด Allelic drop out จำนวน 2 อัลลีล เมื่อ

เปรียบเทียบความสูงเฉลี่ยของอัลลีล ผลปรากฏว่าชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus ให้ค่าเฉลี่ยความสูงของอัลลีลที่สูงกว่าชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus ในทุกความเข้มข้นของฮิวมิคแอซิด



รูปที่ 10 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความสูงของอัลลีลและจำนวนอัลลีล ระหว่างชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus จากการเติมฮิวมิคแอซิดแต่ละความเข้มข้น

ผลการทดลองเติมเฮมาตินซึ่งเป็นตัวยับยั้งกระบวนการพีซีอาร์ที่พบมากในตัวอย่างเลือดปรากฏว่า ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จากทุกตัวอย่างความเข้มข้นของเฮมาตินด้วยชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus ในขณะที่ ชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus สามารถตรวจวัดได้ 31 25 และ 1 อัลลีล จากตัวอย่างเฮมาตินความเข้มข้น 300 600 และ 900 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ (รูปที่ 11) แสดงให้เห็นถึงแนวโน้มจำนวนอัลลีลที่ตรวจวัดได้ลดลงเมื่อปริมาณเฮมาตินในสารละลายพีซีอาร์เพิ่มขึ้น ผลการทดลองในส่วนนี้เห็นความแตกต่างอย่างชัดเจนว่าชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus มีประสิทธิภาพความคงทนต่อเฮมาตินที่ดีกว่าชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus



รูปที่ 11 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความสูงของอัลลีลและจำนวนอัลลีล ระหว่างชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus จากการเติมเฮมาติน แต่ละความเข้มข้น

ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการใช้ชุดน้ำยากับตัวอย่างวัตถุพยานจริง (Real case performance)

ผู้วิจัยได้ทำการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอโดยใช้ชุดน้ำยาทั้งสองจากวัตถุพยานจริงทั้งหมด 57 ตัวอย่าง จากนั้นคัดเลือกตัวอย่างที่เป็นโปรไฟล์ผสมออกไป รวมทั้งได้คัดตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอต่ำกว่า 0.01 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรออกด้วย ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 6 จากข้อมูลชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus สามารถตรวจวัดได้จำนวนอัลลีลเฉลี่ยมากกว่าเพียงเล็กน้อย คือ 27.07 อัลลีล ในขณะที่ค่าเฉลี่ยอัลลีลที่ตรวจวัดได้ของชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus มีค่า 26.44 อัลลีล ข้อมูลทั้งสองชุดมีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) จากการคำนวณทางสถิติด้วย Wilcoxon Signed - Rank Test

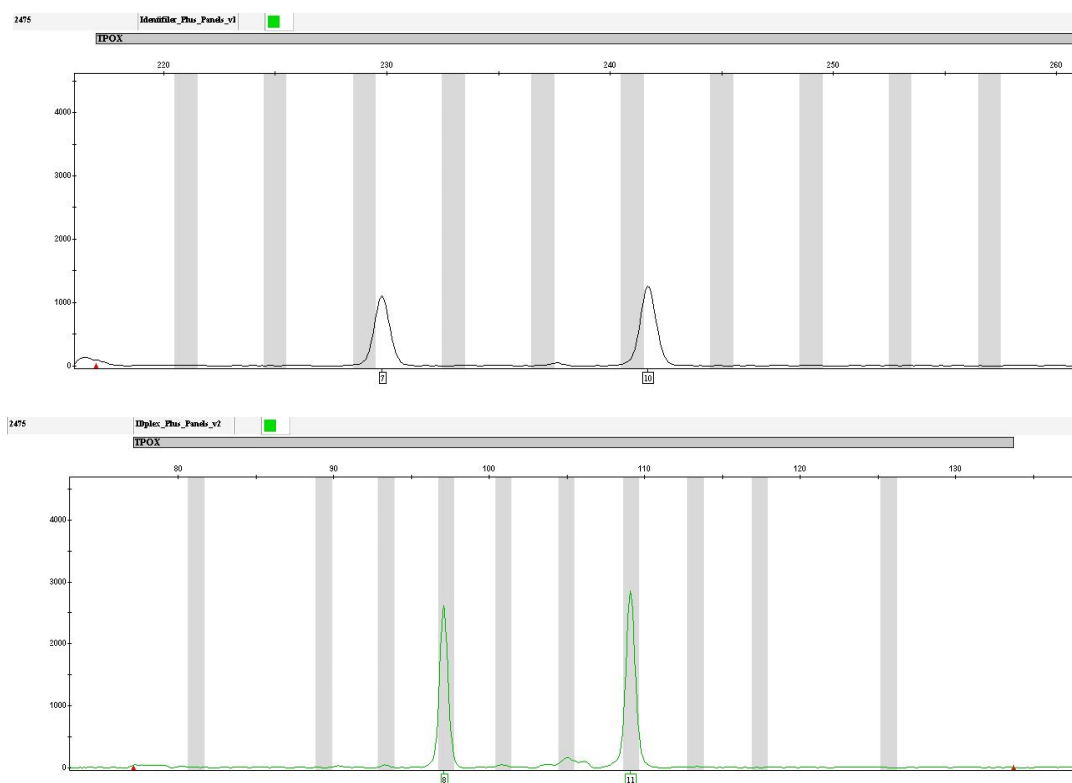
ตารางที่ 6 แสดงอัลลีลที่ตรวจวัดได้จากตัวอย่างวัตถุพยานจริงทั้งหมด 8 ชนิด เปรียบเทียบระหว่างชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus สีขาวแสดงถึงลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ (Full STR profile) สีแดงแสดงถึงตัวอย่างที่ชุดน้ำยา IDplex Plus สามารถให้จำนวนอัลลีลที่มากกว่า และสีฟ้าแสดงถึงตัวอย่างที่ชุดน้ำยา Identifiler® Plus สามารถให้จำนวนอัลลีลที่มากกว่า

ตัวอย่าง	ความเข้มข้น (ng/uL)	ปริมาณดีเอ็นเอ (ng)	Identifiler Plus	IDplex Plus
คราบเลือด 1	1.070	0.50	32	32
คราบเลือด 2	61.100	0.50	32	32
คราบเลือด 3	0.025	0.13	16	20
คราบเลือด 4	0.024	0.12	24	18
คราบเลือด 5	0.028	0.14	4	10
คราบเลือด 6	0.105	0.50	16	32
คราบเลือด 7	12.600	0.50	32	32
คราบเลือด 8	15.800	0.50	32	32
คราบเลือด 9	19.700	0.50	32	32
คราบเลือด 10	8.010	0.50	32	32
คราบเลือด 11	0.023	0.12	32	15
คราบเลือด 12	0.026	0.13	32	14
เยื่อกระดูกฟุ้งแถม 1	1.240	0.50	32	32
เยื่อกระดูกฟุ้งแถม 2	60.200	0.50	32	32
เยื่อกระดูกฟุ้งแถม 3	45.100	0.50	32	32
เยื่อกระดูกฟุ้งแถม 4	43.000	0.50	32	32
เยื่อกระดูกฟุ้งแถม 5	96.300	0.50	32	32
เยื่อกระดูกฟุ้งแถม 6	31.100	0.50	32	32
เยื่อกระดูกฟุ้งแถม 7	93.600	0.50	32	32
เยื่อกระดูกฟุ้งแถม 8	2.750	0.50	32	32
เยื่อกระดูกฟุ้งแถม 9	17.200	0.50	32	32
เยื่อกระดูกฟุ้งแถม 10	16.700	0.50	32	32
เยื่อกระดูกฟุ้งแถม 11	9.570	0.50	32	32
เยื่อกระดูกฟุ้งแถม 12	9.570	0.50	32	32
เยื่อกระดูกฟุ้งแถม 13	11.000	0.50	32	32
กันกรองบุหรี่ 1	1.760	0.50	32	30
กันกรองบุหรี่ 2	0.011	0.06	2	12
กันกรองบุหรี่ 3	0.025	0.13	16	16

กันกรองบูทรี4	0.024	0.12	32	32
กันกรองบูทรี5	0.109	0.50	32	30
กันกรองบูทรี6	10.500	0.50	32	32
กันกรองบูทรี7	0.667	0.50	32	32
เทปพันสายไฟ 1	0.015	0.08	8	10
เทปพันสายไฟ 2	0.262	0.50	32	32
เทปพันสายไฟ 3	0.262	0.50	32	32
เทปพันสายไฟ 4	0.162	0.50	13	8
เทปพันสายไฟ 5	0.022	0.11	13	5
ผม	5.630	0.50	32	32
เสื้อผ้า	10.100	0.50	31	32
ก้านสำลี 1	5.520	0.50	32	32
ก้านสำลี 2	0.011	0.05	12	23
ก้านสำลี 3	0.011	0.05	28	8
ก้านสำลี 4	0.057	0.29	22	18
ก้านสำลี 5	0.121	0.50	32	29
เทปขาวเหนียว 1	0.050	0.25	21	28
เฉลี่ย (SD)	13.14 (23.6)	0.37 (0.19)	27.07 (8.73)	26.44 (8.76)

ความไม่สอดคล้องของลายพิมพ์ STR (Non-concordance study)

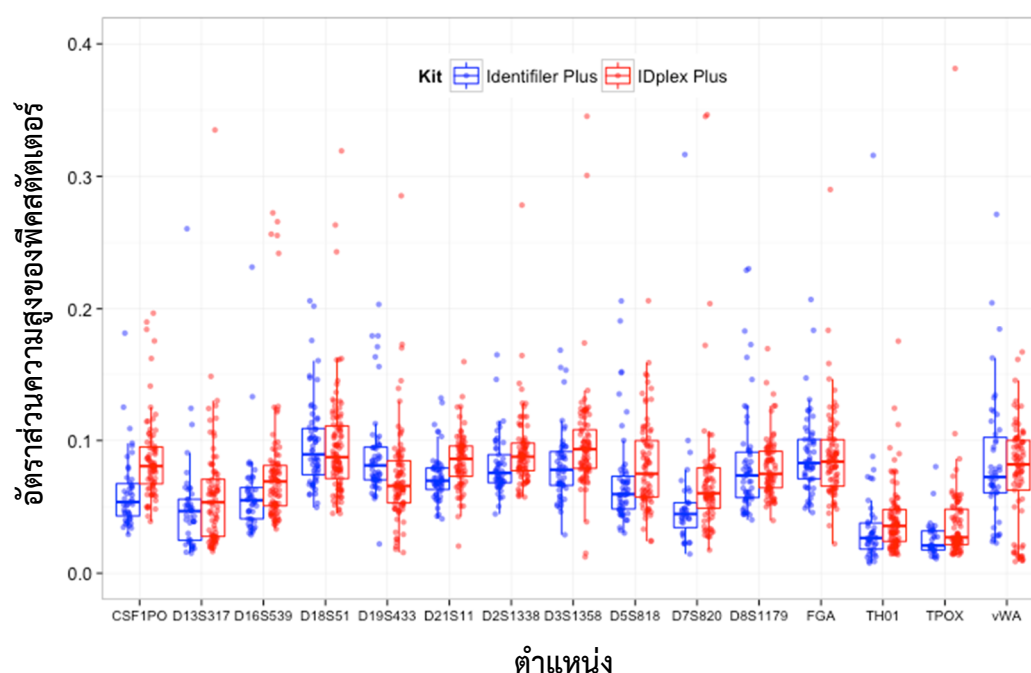
จากการศึกษาเปรียบเทียบทั้งหมด 726 อัลลีลด้วยตัวอย่างวัตถุพยานจริง พบว่ามีอัลลีลที่มีการรายงานผลจีโนไทป์ไม่สอดคล้องจำนวน 2 อัลลีล จากตำแหน่ง TPOX โดย ชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus ให้ผลจีโนไทป์เป็นอัลลีล 7 และ 10 มีความสูงของอัลลีล 1104 และ 1262 RFU ตามลำดับ ในขณะที่ข้อมูลจากชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus ให้ผลจีโนไทป์เป็น 8 และ 11 มีความสูงของอัลลีล 2623 และ 2855 RFU ตามลำดับ จากการสังเกตพบว่าอัลลีลจากชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus มีการเลื่อนขยับไปทางขวาของช่อง Bin ดังแสดงในรูปที่ 12



รูปที่ 12 แสดงความไม่สอดคล้องของอัลลีลในตำแหน่ง TPOX ของชุดน้ำยา Identifiler® Plus (ด้านบน) และอัลลีลจากชุดน้ำยา IDplex Plus (ด้านล่าง) ของตัวอย่างเลือดหมายเลข 2475

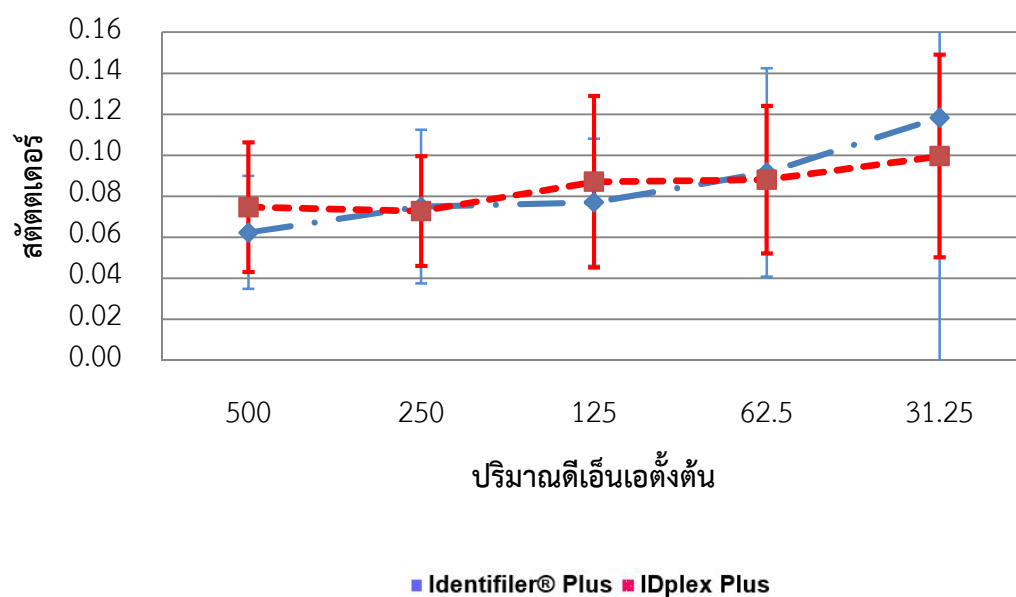
การศึกษาฟิคสตัตเตอร์ (Stutter study)

ผลการศึกษาความสูงฟิคสตัตเตอร์ (Stutter ratio) ระหว่างชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus ด้วยตัวอย่างวัตถุพยานจริง 57 ตัวอย่างที่รวบรวมจากกลุ่มงานตรวจพิสูจน์ชีววิทยาและดีเอ็นเอแยกตามตำแหน่ง STR ถูกแสดงในรูปที่ 13 จากข้อมูลพบว่าอัตราส่วนความสูงของฟิคสตัตเตอร์จากทั้งสองชุดน้ำยาแทบไม่มีความแตกต่างกัน



รูปที่ 13 แสดงอัตราส่วนความสูงของพีคสตัดเตอร์ของอัลลีลต่างๆ ในลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 15 ตำแหน่ง สีฟ้าคืออัตราส่วนความสูงของพีคสตัดเตอร์จากชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus และสีแดงแสดงสตัดเตอร์ของชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus (n=57)

นอกจากนี้อัตราส่วนความสูงของพีคสตัดเตอร์จากตัวอย่างดีเอ็นเอควบคุม 9947A และ 9948 ในช่วง 31.25 – 500 พิโคกรัมก็มีความใกล้เคียงกันจากในแต่ละตัวอย่างปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นที่เท่ากัน (รูปที่ 14) ชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus มีอัตราส่วนของสตัดเตอร์อยู่ในช่วงร้อยละ 6 – 11 และ ชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus อยู่ในช่วงร้อยละ 7 – 9 ความสูงของพีคเกิดสตัดเตอร์จากชุดน้ำยาทั้งสองชุดเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นในการเพิ่มปริมาณน้อยลง [38, 39] และเมื่อเปรียบเทียบค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) พบว่า ในช่วงความเข้มข้น 62.5 – 500 พิโคกรัม ของทั้งสองชุดน้ำยามีความใกล้เคียงกัน แต่พบความแตกต่างกันมากในตัวอย่างที่มีปริมาณ DNA 31.25 พิโคกรัม นั่นคือ ชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus มีค่า SD เท่ากับ 0.12 ในขณะที่ ชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus มีค่า SD แค่เพียง 0.04 แต่อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงอัตราส่วนความสูงของพีคสตัดเตอร์ของชุดน้ำยาทั้งสองยังอยู่ในช่วงที่เหมาะสม คือต่ำกว่าร้อยละ 15 ของอัลลีลจริง ตามข้อกำหนดสำหรับงานทางนิติวิทยาศาสตร์ [31]



รูปที่ 14 แสดงค่าเฉลี่ยอัตราส่วนความสำเร็จของพีซีอาร์จากตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีปริมาณตั้งต้นอยู่ในช่วง 500 – 31.25 พิโคกรัม ของชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus (สีฟ้า) และของชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus (สีแดง)

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สามารถนำไปใช้งานและมีผลทางกฎหมายจะต้องผ่านกระบวนการที่ถูกต้อง มีการควบคุมตามมาตรฐาน ซึ่งเริ่มตั้งแต่ขั้นตอนการเก็บรักษาวัตถุพยานต้องมีการป้องกันการปนเปื้อน ปริมาณดีเอ็นเอจะต้องเพียงพอต่อการเพิ่มปริมาณ ไม่มีตัวยับยั้งกระบวนการพีซีอาร์ มีการแปลผลที่ถูกต้อง ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ดีนั้นจะต้องพิจารณาจากหลายองค์ประกอบทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณ การเลือกใช้ชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอนั้นมีผลโดยตรงกับคุณภาพของลายพิมพ์ดีเอ็นเอและสำคัญต่อการนำไปใช้ในทางกฎหมาย ซึ่งสามารถพิจารณาประสิทธิภาพของชุดน้ำยาได้จากผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากตัวอย่างควบคุมและตัวอย่างจริงจากคดีความ โดยวิเคราะห์ด้วยพารามิเตอร์ต่างๆ เช่น Percent profile Inter-locus balance Inter-locus balance และ Concordance เป็นต้น ทั้งนี้การศึกษานี้ได้ทำการทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex ในมิติต่างๆดังต่อไปนี้

การทดสอบและเปรียบเทียบประสิทธิภาพในด้านความไววิเคราะห์ระหว่างทั้งสองชุดน้ำยา ผู้วิจัยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอควบคุมในการศึกษาเปรียบเทียบก็เพื่อให้ได้มาซึ่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ทราบอัลลีลแน่ชัดในแต่ละตำแหน่งดีเอ็นเอเป้าหมายทั้ง 16 ตำแหน่ง เพื่อให้ง่ายต่อการสังเกตและวิเคราะห์ว่าลายพิมพ์ที่ได้ปรากฏอัลลีลครบทุกตำแหน่งหรือไม่ และสามารถสังเกตถึงการเกิด Allelic drop-in และ Allelic drop-out ที่อาจเกิดขึ้นในตัวอย่างที่มีปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นน้อยได้ อัลลีลที่มีความสูงมากแสดงถึงปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นมากและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพสูง ผลการศึกษาพบว่า ชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus มีประสิทธิภาพที่ดีกว่าชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus มีการปรับปรุงและพัฒนาเคมีหรือองค์ประกอบต่างๆ ภายในชุดน้ำยาให้มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น รวมทั้งจากสภาวะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยกระบวนการพีซีอาร์จะเห็นว่า ชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus มีจำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณที่มากกว่ารวมทั้งมีการกำหนดเวลาในการฉีดสารเข้าสู่เครื่อง ABI 3130xl Genetic Analyzer มากกว่า ทำให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus ให้ผลความสูงของอัลลีลที่มากกว่า ทั้งนี้ ผลการทดสอบความไววิเคราะห์ชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus ในงานวิจัยนี้สอดคล้องกับผลการทวนสอบชุด

น้ำยาโดยผู้ผลิตและผลงานวิจัยทดสอบประสิทธิภาพของชุดน้ำยาซึ่งทดสอบโดย Wang และคณะ เมื่อปี 2012 [7, 40] ซึ่งให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกันคือที่ปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้น 1000 - 62.5 พิโคกรัม สามารถตรวจวัดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ ในขณะที่ปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้น 31 พิโคกรัม ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ไม่สมบูรณ์ ส่วนผลการทวนสอบชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus จากผู้ผลิตก็มีผลที่สอดคล้องกับผลการศึกษาในงานวิจัยนี้เช่นกัน คือจากตัวอย่างดีเอ็นเอควบคุม ปริมาณ 32.25 พิโคกรัม เริ่มมีอัลลีลหายไปจากลายพิมพ์จำนวน 1 ถึง 2 อัลลีล [41]

การพิจารณาถึงความสมดุลของอัลลีลในแต่ละตำแหน่งและระหว่างตำแหน่งในลายพิมพ์ดีเอ็นเอก็มีความสำคัญ โดยพารามิเตอร์ที่ศึกษาในงานวิจัยนี้คือ ค่า Intra-locus balance บ่งบอกถึงความสมดุลระหว่างสองอัลลีลใน STR ตำแหน่งหนึ่งๆ ในกรณีที่ เป็น Heterozygous alleles และค่า Inter-locus balance บ่งบอกถึงความสมดุลของความสูงของอัลลีลในแต่ละลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เนื่องจากว่ากระบวนการพีซีอาร์เป็นปฏิกิริยาแบบสุ่ม หรือที่เรียกว่า Stochastic reaction ทำให้มีโอกาสเกิดความไม่สมดุล (Imbalance) ทั้งสองแบบนี้ขึ้น ซึ่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มาจากบุคคลคนเดียว (Single-source profile) นั้น ความสูงของทั้งสองอัลลีลในตำแหน่งเดียวกันและผลรวมของความสูงของอัลลีลในแต่ละตำแหน่งในลายพิมพ์ดีเอ็นเอเดียวกันก็ควรจะมีค่าที่ใกล้เคียงกัน การเกิดความไม่สมดุลในลายพิมพ์ดีเอ็นเอจะส่งผลให้การแปลผลมีความยุ่งยากมากขึ้น เช่น ไม่สามารถยืนยันได้ว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอนั้นๆ เป็นดีเอ็นเอที่ได้มาจากบุคคลคนเดียวหรือเป็นดีเอ็นเอผสมของบุคคลมากกว่า 1 คน เป็นต้น [29, 30] และการเกิดความไม่สมดุลในแต่ละตำแหน่ง STR มีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นจากตัวอย่างดีเอ็นเอลดลง [40] ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในงานวิจัยนี้

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพความทนทานต่อแคลเซียมของชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus โดยผู้ผลิต เมื่อมีการเติมแคลเซียมความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ลงในสารละลายพีซีอาร์ผสมและนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่พบสมบูรณ์ทุกตัวอย่าง และเมื่อความเข้มข้นของแคลเซียมมากขึ้น ความสูงของอัลลีลและจำนวนอัลลีลที่ตรวจวัดได้ลดลง [41] ส่วนการทวนสอบชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifier® Plus โดยผู้ผลิตในด้านความทนทานต่อฮิวมิกแอซิด ปริมาณ 50-150 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร พบว่าสามารถตรวจวิเคราะห์อัลลีลได้ครบถ้วนทุกตำแหน่งในทุกตัวอย่าง ในขณะที่การทวนสอบความทนทานของชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus ต่อฮิวมิกแอซิดปริมาณ 100 - 250 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร พบว่าไม่สามารถให้ผลลาย

พิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์เมื่อปริมาณฮิวมิก 225 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรขึ้นไป ในส่วนของเฮมาดินผู้ผลิตได้รายงานผลการทวนสอบ ชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus ว่าสามารถทนทานต่อเฮมาดินปริมาณ 100 – 300 ไมโครโมลาร์ได้และผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้นั้นสมบูรณ์ และการศึกษาทวนสอบชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus จากผู้ผลิตรายงานว่าสามารถให้ผลเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ทุกครบบทตำแหน่งเมื่อความเข้มข้นของเฮมาดินไม่เกิน 750 ไมโครโมลาร์ และที่ปริมาณ 1,000 ไมโครโมลาร์เป็นต้นไปจะตรวจวัดได้ลายพิมพ์ที่ไม่สมบูรณ์ (น้อยกว่าร้อยละ 50) ทั้งนี้ผลการทดสอบกับแคลเซียมและเฮมาดินมีความสอดคล้องกับผลการทดสอบในงานวิจัยนี้ ส่วนความคงทนต่อเฮมาดินในชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus ในงานวิจัยนี้แตกต่างกันกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ชัดเจน ในขณะที่ผลจากชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus มีความสอดคล้องกัน ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากวิธีการศึกษาทดลอง โดยการทดสอบความคงทนต่อตัวยับยั้งการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของชุด AmpFLSTR® Identifiler® Plus มีการใช้ดีเอ็นเอตั้งต้นปริมาณ 1,000 พิโคกรัม ในขณะที่ การทดสอบของชุด QIAGEN® Investigator IDplex Plus ใช้ดีเอ็นเอตั้งต้น 500 พิโคกรัมเหมือนกับในงานวิจัยนี้

จากการทดลองและเปรียบเทียบประสิทธิภาพในด้านความทนทานต่อตัวยับยั้งการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทั้งสามชนิดระหว่างชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus ในงานวิจัยนี้ พบว่าตัวยับยั้งกระบวนการทั้งสามชนิดมีผลให้ความสูงของพีคและจำนวนของอัลลีลที่ตรวจวัดได้ลดลงเมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุมบวกซึ่งไม่มีการเติมตัวยับยั้งใดๆลงไป ในสารละลายฟิซอร์ผสม และประสิทธิภาพของกระบวนการฟิซอร์ลดลงเมื่อมีแคลเซียมฮิวมิกแอซิดและเฮมาดินในสารละลายเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับในงานวิจัยที่ผ่านมาได้เคยมีการศึกษาผลของตัวยับยั้งปฏิกิริยาฟิซอร์ที่สามารถพบได้มากโดยเฉพาะในตัวอย่างที่เป็นกระดูก นั่นคือ แคลเซียมไอออน ซึ่งมีผลต่อกระบวนการทำงานของแมกนีเซียมไอออนและเอ็นไซม์ *Taq polymerase* ในกระบวนการฟิซอร์ [42] ในส่วนของฮิวมิกแอซิดซึ่งพบมากในดิน ส่งผลกระทบต่อกระบวนการฟิซอร์ ทำให้ลดประสิทธิภาพการจับกันระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบ และเฮมาดินซึ่งพบได้ในเม็ดเลือดแดงเป็นตัวยับยั้งที่เชื่อว่ามีผลลดความสามารถการทำงานของ *Taq polymerase* ในกระบวนการฟิซอร์ [43] ผลการเปรียบเทียบปรากฏว่าชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus สามารถทนทานต่อตัวยับยั้งการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ดีกว่าชุดน้ำยา AmpFLSTR®

Identifiler® Plus เมื่อพิจารณาจากความสูงของอัลลีลและจำนวนอัลลีลที่ตรวจวัดได้ ประสิทธิภาพในด้านนี้มีความสำคัญต่องานนิติวิทยาศาสตร์อย่างยิ่ง โดยเฉพาะตัวอย่างที่มีโอกาสพบมากในสถานที่เกิดเหตุ ได้แก่ คราบเลือด ชิ้นส่วนกระดูก หรือตัวอย่างที่เปื้อนดิน โดยเฉพาะตัวอย่างที่มีปริมาณดีเอ็นเอเนื้่อยๆ ชุดน้ำยาที่มีประสิทธิภาพในการคงทนต่อตัวยับยั้งยั้งมีความสำคัญมาก เพื่อให้ได้มาซึ่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอของบุคคลผู้เกี่ยวข้องกับคดีไปใช้ในกระบวนการยุติธรรมต่อไป

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอมักจะพบพิศตัตเตอร์อยู่เสมอๆ สัตตเตอร์สามารถเกิดได้ทุกตำแหน่ง STR พิศตัตเตอร์นั้นมึผลทำให้การวิเคราะห์และแปลผลมีความยุ่งยากขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งในลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความสูงของอัลลีลสูงๆหรือเป็นรูปแบบผสม ในการทวนสอบชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณ STR จากบริษัทผู้ผลิตจะต้องมีการศึกษาสตัตเตอร์ที่เกิดขึ้นใน STR ตำแหน่งต่างๆด้วยเพื่อเป็นเกณฑ์ใช้กำหนดในการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในงานทางนิติวิทยาศาสตร์ [44, 45] จากผลการศึกษาลักษณะการเกิดพิศตัตเตอร์ พบแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของอัตราส่วนความสูงสตัตเตอร์มากขึ้นเมื่อหน่วยซ้ำของ STR หรือขนาดของ STR เพิ่มขึ้น [31] ในตำแหน่งที่มีลักษณะการซ้ำของชุดเบสเป็นแบบ Simple repeat (ตำแหน่ง D16S539, CSF1PO, D5S818, D18S51, D13S317, TPOX, D7S820 และ TH01) กับ STR ตำแหน่งที่เป็น Compound repeat (D2S1338, D3S1358, D8S1179, D19S433, D21S11 และ vWA) [1] นอกจากนี้ในรูปแบบ Complex repeat นั้นอัตราส่วนการเกิดสตัตเตอร์จะขึ้นอยู่กับความยาวของของหน่วยซ้ำที่ยาวที่สุดในอัลลีลนั้นๆ ซึ่งเป็นไปตามการทดลองศึกษาการเกิดพิศตัตเตอร์โดย Brookes และคณะ [7, 31, 38] อย่างไรก็ตามอัตราความสูงสตัตเตอร์ที่เกิดขึ้นจากการทดลองน้อยอยู่ในช่วงที่ไม่เกินร้อยละ 15 ของความสูงของอัลลีลจริง ซึ่งเป็นช่วงที่รับได้ในงานทางนิติวิทยาศาสตร์

จากศึกษาประสิทธิภาพของชุดน้ำยาทั้งสองเพื่อนำไปใช้ตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอจากวัตถุพยานจริงทั้ง 8 ชนิด พบค่าเฉลี่ยอัลลีลของชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus เท่ากับ 27.07 และ 26.44 ตามลำดับ จากการทดลองพบว่าในตัวอย่างที่มีปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสม กล่าวคือ มีปริมาณดีเอ็นเอ 0.5 นาโนกรัมในสารละลายยีสี่อาร์ จะสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จำนวนอัลลีลที่ใกล้เคียงกันหรือเท่ากัน แต่เมื่อปริมาณดีเอ็นเอต่ำกว่า 0.5 นาโนกรัม ผลการทดลองพบว่า ชุดน้ำยาทั้งสองมีการเกิด Allele drop out ซึ่งบางตัวอย่างเช่น ตัวอย่างเลือดที่ 3 ตรวจพบจำนวนอัลลีลจากชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus น้อย

กว่า ข้อมูลจากชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus ในขณะที่ตัวอย่างที่ 4 ตรวจพบจำนวนอัลลีลจากชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus น้อยกว่าข้อมูลจากชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifier® Plus ในภาพรวม ทั้งสองชุดน้ำยามีจำนวนอัลลีลที่ตรวจวัดได้ใกล้เคียงกันมาก จึงเป็นการยืนยันว่าชุดน้ำยาทั้งสองนั้นมีประสิทธิภาพที่ใกล้เคียงกันสามารถใช้แทนกันได้สำหรับตัวอย่างจากคดีจริง

สำหรับความสอดคล้องของอัลลีลที่ตรวจพบ ผลปรากฏว่าชุดน้ำยาทั้งสองสามารถให้ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สอดคล้องกันเกือบทั้งหมด (ร้อยละ 99.7) ซึ่งสาเหตุของความแตกต่างที่พบ (ร้อยละ 0.3) อาจมาจากการมีไพรเมอร์ที่ต่างกันในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกระบวนการพีซีอาร์ ทำให้อาจเกิดความแปรผันตรงตำแหน่งที่เป็น Primer binding site ส่งผลให้เกิดเป็นผลจีโนไทป์ที่ไม่สอดคล้องกันได้ ทั้งนี้ ทั้งสองชุดน้ำยาไม่พบ Allelic drop in อีกด้วย

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus ซึ่งเป็นชุดน้ำยาที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ตำแหน่งเป้าหมาย 16 ตำแหน่งที่เหมือนกัน จากผลการศึกษาในงานวิจัยนี้ ชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus นั้นแสดงผลความไววิเคราะห์และความทนทานต่อตัวยับยั้งกระบวนการพีซีอาร์ที่ดีกว่า ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดีกับวัตถุพยานทางนิติวิทยาศาสตร์ซึ่งอาจเป็นตัวอย่างที่มีดีเอ็นเอ ปริมาณน้อยและเสื่อมสภาพ และสามารถนำมาตรวจวิเคราะห์กับวัตถุพยานทางชีวภาพหลากหลาย ชนิดจากคดีต่างๆได้จริง ให้ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เชื่อถือได้ จึงกล่าวได้ว่าชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus สามารถนำมาใช้แทน ชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus ใน ห้องปฏิบัติการได้ นักนิติวิทยาศาสตร์สามารถใช้ชุดน้ำยาชุดใหม่ได้โดยไม่ต้องเปลี่ยนแปลงเครื่องมือ และขั้นตอนการทำงานมาตรฐานเดิมและสามารถนำผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากชุดน้ำยาใหม่ไปใช้ ร่วมกับฐานข้อมูลเดิมได้ ซึ่งในหน่วยงานทางนิติวิทยาศาสตร์อย่างสำนักงานพิสูจน์หลักฐานตำรวจ สำนักงานตำรวจแห่งชาติ มีการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอมากกว่า 40,000 ตัวอย่างในแต่ละปี จะทำให้ หน่วยงานประหยัดงบประมาณได้มากถึง 18 ล้านบาทต่อปี อีกทั้งยังช่วยลดเวลาในการตรวจพิสูจน์ ชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus จึงเป็นอีกตัวเลือกที่ดีสำหรับการตรวจพิสูจน์ใน หน่วยงานทางนิติวิทยาศาสตร์ทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ

เอกสารอ้างอิง

1. Butler, J.M., *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodologies*. 2012, Massachusetts: Academic Press.
2. Butler, J.M., *Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing*. J Forensic Sci, 2006. **51**(2): p. 253-65.
3. Hares, D.R., *Expanding the CODIS core loci in the United States*. Forensic Sci Int Genet, 2012. **6**(1): p. e52-4.
4. Hares, D.R., *Addendum to expanding the CODIS core loci in the United States*. Forensic Science International-Genetics, 2012. **6**(5): p. E135-E135.
5. Hill, C.R., et al., *Concordance and population studies along with stutter and peak height ratio analysis for the PowerPlex (R) ESX 17 and ESI 17 Systems*. Forensic Sci Int Genet, 2011. **5**(4): p. 269-75.
6. Thanakiatkrai, P. and T. Kitpipit, *Current STR-based techniques in forensic science*. Maejo International Journal of Science and Technology, 2013. **7**(1): p. 1-15.
7. Biosystems, A., *AmpFLSTR® Identifiler® Plus PCR Amplification Kit User Guide*. 2012.
8. Odriozola, A., et al., *Evaluation of the sensitivity of two recently developed STR multiplexes for the analysis of chimerism after haematopoietic stem cell transplantation*. Int J Immunogenet, 2013. **40**(2): p. 88-92.
9. Builes, J.J., et al., *New alternative for human identification. Investigator IDplex Kit – QIAGEN® reproducibility: Latin American interlaboratory study*. Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 2011. **3**(1): p. e83-e84.
10. Melo, F., A. Amorim, and C. Alves, *Comparative performance between “next generation” multiplex systems and the new European Standard Set of STR markers in the Portuguese Population*. Forensic Science International: Genetics, 2014. **8**(1): p. 137-142.

11. Tvedebrink, T., et al., *Performance of two 17 locus forensic identification STR kits-Applied Biosystems's AmpFLSTR(R) NGMSElect and Promega's PowerPlex(R) ESI17 kits*. Forensic Sci Int Genet, 2012. **6**(5): p. 523-31.
12. Butler, J., *Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers*. 2nd ed. 2005, Burlington, Massachusetts: Elsevier.
13. Hidayat, N.K. *DNA and RNA*. 2013; Available from: <http://dnarnanews.blogspot.com/2013/04/what-is-three-parts-of-nucleotide.html>.
14. Hashiyada, M. *DNA biometrics*. 2011; Available from: <http://www.intechopen.com/books/biometrics/dna-biometrics>.
15. FBI. *CODIS -- NDIS Statistic*. 2013 [cited 2013 22 October]; Available from: <http://www.fbi.gov/about-us/lab/biometric-analysis/codis/ndis-statistics>.
16. Welch, L.A., et al., *European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI): Evaluation of new commercial STR multiplexes that include the European Standard Set (ESS) of markers*. Forensic Science International-Genetics, 2012. **6**(6): p. 819-826.
17. Markov, G. *Genetic Testing*. 2013 [cited 2015 24/12]; Available from: <http://genetics.thetech.org/ask-a-geneticist/dna-accidents>.
18. Laurin, N., A. DeMoors, and C. Fregeau, *Performance of Identifiler Direct and PowerPlex 16 HS on the Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer for processing biological samples archived on FTA cards*. Forensic Sci Int Genet, 2012. **6**(5): p. 621-9.
19. Tucker, V.C., et al., *Developmental validation of the PowerPlex® ESI 16 and PowerPlex® ESI 17 Systems: STR multiplexes for the new European standard*. Forensic Sci Int Genet, 2011. **5**(5): p. 436-448.
20. Flores, S., et al., *Internal validation of the GlobalFiler Express PCR Amplification Kit for the direct amplification of reference DNA samples on a high-throughput automated workflow*. Forensic Sci Int Genet, 2014. **10**: p. 33-9.
21. Souto, L., et al., *Evaluation of the PowerPlex Fusion System in a sample from East Timor*. Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 2013. **4**(1): p. e105-e106.

22. Greenspoon, S.A., et al., *Validation and implementation of the PowerPlex® 16 BIO system STR multiplex for forensic casework*. Journal of forensic sciences, 2004. **49**(1): p. 71-80.
23. Tucker, V.C., et al., *Developmental validation of the PowerPlex(R) ESX 16 and PowerPlex(R) ESX 17 Systems*. Forensic Sci Int Genet, 2012. **6**(1): p. 124-31.
24. Barbaro, A., P. Cormaci, and S. Votano, *Direct PCR by the AmpFLSTR NGM™ kit for database purpose*. Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 2011. **3**(1): p. e103-e104.
25. Barbaro, A., P. Cormaci, and A. Agostino, *Validation of AmpFLSTR NGM SElect™ PCR amplification kit on forensic samples*. Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 2011. **3**(1): p. e67-e68.
26. Buckleton, J., et al., *Utilising allelic dropout probabilities estimated by logistic regression in casework*. Forensic Sci Int Genet, 2014. **9**: p. 9-11.
27. Romanini, C., et al., *A comparison of AmpFLSTR Identifiler™ Kit versus AmpFLSTR Identifiler Plus™ Kit in challenging bone samples by using normal and increased PCR cycle number*. Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 2011. **3**(1): p. e514-e515.
28. Dixon, L., et al., *Analysis of artificially degraded DNA using STRs and SNPs—results of a collaborative European (EDNAP) exercise*. Forensic science international, 2006. **164**(1): p. 33-44.
29. Debernardi, A., et al., *One year variability of peak heights, heterozygous balance and inter-locus balance for the DNA positive control of AmpFLSTR(c) Identifiler(c) STR kit*. Forensic Sci Int Genet, 2011. **5**(1): p. 43-9.
30. Balding, D.J. and J. Buckleton, *Interpreting low template DNA profiles*. Forensic Sci Int Genet, 2009. **4**(1): p. 1-10.
31. Brookes, C., et al., *Characterising stutter in forensic STR multiplexes*. Forensic Sci Int Genet, 2012. **6**(1): p. 58-63.
32. Gill, P., et al., *An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA*. Forensic Sci Int Genet, 2000. **112**(1): p. 17-40.

33. Tvedebrink, T., et al., *Statistical model for degraded DNA samples and adjusted probabilities for allelic drop-out*. Forensic Sci Int Genet, 2012. **6**(1): p. 97-101.
34. Hill, C.R., et al., *Concordance testing comparing STR multiplex kits with a standard data set*. Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 2011. **3**(1): p. e188-e189.
35. Hill, C.R., et al., *Concordance study between the AmpFLSTR MiniFiler PCR amplification kit and conventional STR typing kits*. J Forensic Sci, 2007. **52**(4): p. 870-3.
36. Vallone, P.M., C.R. Hill, and E.L. Butts, *Concordance study of direct PCR kits: PowerPlex 18D and Identifiler Direct*. Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 2011. **3**(1): p. e353-e354.
37. Welch, L., et al., *European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI): evaluation of new commercial STR multiplexes that include the European Standard Set (ESS) of markers*. Forensic Science International: Genetics, 2012. **6**(6): p. 819-826.
38. Mulero, J.J., C.W. Chang, and L.K. Hennessy, *Characterization of the N+3 stutter product in the trinucleotide repeat locus DYS392*. J Forensic Sci, 2006. **51**(5): p. 1069-73.
39. Whitaker, J., E. Cotton, and P. Gill, *A comparison of the characteristics of profiles produced with the AMPFLSTR[®] SGM Plus[™] multiplex system for both standard and low copy number (LCN) STR DNA analysis*. Forensic Science International, 2001. **123**(2): p. 215-223.
40. Wang, D.Y., et al., *Developmental validation of the AmpFLSTR(R) Identifiler(R) Plus PCR Amplification Kit: an established multiplex assay with improved performance*. J Forensic Sci, 2012. **57**(2): p. 453-65.
41. QIAGEN, *Developmental validation report of the Investigator® IDplex Plus Kit*. 2012.
42. Opel, K.L., D. Chung, and B.R. McCord, *A Study of PCR Inhibition Mechanisms Using Real Time PCR*. Journal of Forensic Sciences, 2010. **55**(1): p. 25-33.

43. Akane, A., et al., *Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification*. J Forensic Sci, 1994. **39**(2): p. 362-72.
44. Walsh, P.S., N.J. Fildes, and R. Reynolds, *Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA*. Nucleic acids research, 1996. **24**(14): p. 2807-2812.
45. Levinson, G. and G.A. Gutman, *Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution*. Mol Biol Evol, 1987. **4**(3): p. 203-21.

ภาคผนวก ก. บทความวิจัยสำหรับเผยแพร่

ภาคผนวก ข. บทความวิจัยเกี่ยวกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์

จากผลการดำเนินงานโครงการวิจัย ทางคณะนักวิจัยได้ผลการวิจัยหรือประโยชน์อื่นที่สามารถชี้แจงเป็นข้อๆ ได้ดังนี้

1. สร้างองค์ความรู้เรื่องประสิทธิภาพของชุดน้ำยาสองชุดที่ถูกใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในงานนิติวิทยาศาสตร์ ทั้งในตัวอย่างควบคุมและในตัวอย่างจากคดีจริงที่ครอบคลุมตัวอย่างหลากหลายรูปแบบที่สามารถพบได้
2. คณะวิจัยทราบถึงวิธีการในการเปรียบเทียบเชิงลึก และต้นทุนที่ใช้ในการเปรียบเทียบชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งจะเป็นประโยชน์กับการวางแผนในการทำการทดลองในอนาคตต่อไป
3. ได้เผยแพร่องค์ความรู้จากข้อข้างต้นในการประชุมร่วมกับเจ้าหน้าที่จากสำนักงานตำรวจแห่งชาติ โดยองค์ความรู้ได้ถูกนำไปใช้ประกอบการพิจารณาเปลี่ยนชุดน้ำยาสำหรับการตรวจดีเอ็นเอในงานนิติวิทยาศาสตร์
4. ได้ผลิตมหาบัณฑิตระดับปริญญาโทหนึ่งคนที่มีความรู้และทักษะในการทำการทดสอบเปรียบเทียบชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งมีศักยภาพที่จะเป็นกำลังของหน่วยงานทางนิติวิทยาศาสตร์ในประเทศไทยต่อไป
5. ได้เสริมสร้างเครือข่ายวิจัยระหว่างหน่วยงานของรัฐสามหน่วยงานผ่านความร่วมมือในการทำโครงการวิจัยนี้

ภาคผนวก ค. ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ และกิจกรรมที่ ดำเนินการมาและผลที่ได้รับตลอดโครงการ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus กับ QIAGEN® Investigator IDplex Plus โดยพิจารณาจากพารามิเตอร์ทางนิติวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องทั้งหมดจำนวน 7 ประเภท ได้แก่ peak heights, percent profiles, intralocus balance, interlocus balance, stutter ratio, allelic drop-in และ allelic drop-out ภายใต้สภาวะควบคุม
2. เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus กับ QIAGEN® Investigator IDplex Plus โดยพิจารณาจากพารามิเตอร์ทางนิติวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องทั้งหมดจำนวน 7 ประเภท ได้แก่ peak heights, percent profiles, intralocus balance, interlocus balance, stutter ratio, allelic drop-in และ allelic drop-out โดยทดสอบกับตัวอย่างวัตถุพยานชีวภาพในคดีจริง

ผลที่ได้รับ

1. ผลการศึกษาความไวและความคงทนต่อตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ทั้ง 3 ชนิดในการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ จากชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus กับ QIAGEN® Investigator IDplex Plus
2. ผลศึกษาประสิทธิภาพของการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอจากชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus กับ QIAGEN® Investigator IDplex Plus จากตัวอย่างวัตถุพยานชีวภาพในคดีจริงจำนวน 8 ประเภท
3. ผลการเปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ทั้งหมดที่ได้จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอระหว่างชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus กับ QIAGEN® Investigator IDplex Plus ซึ่งสำนักงานพิสูจน์หลักฐานตำรวจ สำนักงานตำรวจแห่งชาตินำผลการศึกษาในครั้งนี้ ไปใช้ประกอบการตัดสินใจโครงการเปลี่ยนชุดน้ำยาตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ ภายใต้หน่วยงานในกำกับทั่วประเทศ
4. ผลงานตีพิมพ์ทางวิชาการในวารสารนิติวิทยาศาสตร์นานาชาติที่น่าเชื่อถือ ซึ่งอยู่ในฐานข้อมูล ISI และมีค่า Impact factor ไม่ต่ำกว่า 2.0 จำนวน 1 ฉบับ ภายในปีพ.ศ. 2559 และ

Proceedings จากการนำเสนอเผยแพร่ผลงานในงานประชุมทางวิชาการที่เกี่ยวข้องกับนิติ
พันธุศาสตร์ จำนวน 1 ฉบับ ภายในปีพ.ศ. 2558

ความสอดคล้องของวัตถุประสงค์กับผลที่ได้รับ

เดือนที่	ผลที่ ได้รับ ข้อที่	ผลที่ได้รับจากกิจกรรมที่วางแผนไว้	ตอบสนอง วัตถุประสงค์ ข้อที่
1-6	1-2	-ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ ระหว่างชุดน้ำยา AmpFISTR® Identifier® Plus กับ QIAGEN® Investigator IDplex Plus ที่น่าเชื่อถือ -สำนักงานพิสูจน์หลักฐานตำรวจ สำนักงานตำรวจแห่งชาติ ได้นำผลการศึกษาในครั้งนี้ ไปใช้ประกอบการตัดสินใจ โครงการเปลี่ยนชุดน้ำยาตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ ภายใต้ หน่วยงานในกำกับทั่วประเทศ	1 และ 2
6-12	3-4	-Proceeding จากการนำเสนอเผยแพร่ผลงานในงานประชุม ทางวิชาการที่เกี่ยวข้องกับนิติพันธุศาสตร์ จำนวน 1 ฉบับ ภายในปีพ.ศ. 2558 -ผลงานตีพิมพ์ทางวิชาการในวารสารนิติวิทยาศาสตร์ นานาชาติที่น่าเชื่อถือ ซึ่งอยู่ในฐานข้อมูล ISI และมีค่า Impact factor ไม่ต่ำกว่า 2.0 จำนวน 1 ฉบับ ภายในปีพ.ศ. 2559	1 และ 2