Thai J. Genet. 2015, 8(S) : 32–39

การตรวจสอบความถูกต้องของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอชุดซ้ำของเครื่องหมายดีเอ็นเอจำนวน 16 และ 22 ตำแหน่ง ในการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล

Validation study of DNA amplification in 16 and 22 STR markers for human identification

มัลลิกา สิงห์ลอ[1], พงษ์พิษณุ ภักดีณรงค์[1], จิตติมา โชติวรานนท์[2], ธวัช รินทะชัย[2], ณภัทรธนะโชค รุ่งเรือง[2], และ บุษบา ฤกษ์อำนวยโชค[2*]

Munlika Singlor[1], Pongpitsanu Pakdeenarong[1], Jittima Shotivaranon[2], Tawat Rinthachai[2], Napat Thanachokrungruang[2], and Budsaba Rerkamnuaychoke[2]*

[1]ภาควิชานิติวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม 73000

[2]ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400

[1]Department of Forensic Science, Faculty of Science, Silpakorn University, Nakornpathom 73000, Thailand

[2]Department of Pathology, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

**Corresponding author: budsaba.rer@mahidol.ac.th*

บทคัดย่อ

ปัจจุบันงานด้านนิติพันธุศาสตร์มีการประยุกต์ใช้ในกระบวนการยุติธรรม การพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล ตลอดจนการพิสูจน์ความสัมพันธ์บิดา-มารดา-บุตร ดังนั้นนักนิติพันธุศาสตร์ในห้องปฏิบัติการบริการ จึงมีความพยายามที่จะปรับปรุงกระบวนการบริการด้านการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ ให้มีความไว ความถูกต้อง ให้รายงานผลการตรวจวิเคราะห์ที่น่าเชื่อถือ และประหยัดค่าใช้จ่าย งานวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณภาพของ DNA profile ที่ได้จากการลดปริมาตรน้ำยาสำเร็จรูป ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมบนออโทโซมจำนวน 16 และ 22 ตำแหน่ง จากเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้ม ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป Investigator IDplex GO และ น้ำยา Investigator 24plex QS พบว่าสามารถลดปริมาณน้ำยาสำเร็จรูปเหลือร้อยละ 50 และ 25 ตามลำดับ โดยที่ให้ผล DNA profile ที่สมบูรณ์และสามารถนำมาใช้ในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลในทางนิติวิทยาศาสตร์ได้ และยังสามารถช่วยลดเวลาและต้นทุนค่าใช้จ่ายของห้องปฏิบัติการ

ABSTRACT

Recently the knowledge and skill of forensic genetics were applied to justice system, personal identification and paternity test. Therefore, forensic scientists in service laboratories try to develop laboratory process to increase the sensitivity and accuracy, to generate reliable results and to reduce cost. The purpose of this work is to study the quality of DNA profiles using reduced volume of commercial kits in 16 and 22 autosomal short tandem repeat (STR) markers from buccal cells using Investigator IDplex GO and Investigator 24plex QS kits, respectively. The results showed that complete DNA profiles of 16 and 22 STR markers can be obtained by reducing the kits to 50 and 25 %, respectively. The amplification volume reduction can be used to investigate DNA profiles in personal identification and can save the cost in the routine service laboratory.

คำสำคัญ: ดีเอ็นเอ; เครื่องหมายพันธุกรรมลำดับซ้ำ; พิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล; ดีเอ็นเอโปรไฟล์
Keywords: DNA; STR marker; personal identification; DNA profile

บทนำ

งานด้านนิติพันธุศาสตร์มีส่วนสำคัญอย่างยิ่ง ทั้งในด้านการแพทย์และกระบวนการยุติธรรม อาทิ การตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล การตรวจเพื่อยืนยันความสัมพันธ์บิดา-มารดา-บุตร อีกทั้งสามารถใช้เปรียบเทียบดีเอ็นเอเพื่อค้นหากรณีบุคคลสูญหายจากฐานข้อมูลดีเอ็นเอ เป็นต้น

วัตถุพยานทางชีวภาพ เช่น เลือด หรือ เซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้ม เป็นตัวอย่างพื้นฐานที่ห้องปฏิบัติการทางนิติพันธุศาสตร์ใช้ในการสกัดสารพันธุกรรม โดยห้องปฏิบัติการส่วนมากจะใช้กระดาษกรอง (FTA® paper) ในการเก็บรักษาตัวอย่าง (Brito *et al*., 2011) เนื่องจากบนกระดาษกรอง เคลือบด้วยสารเคมีบางชนิดที่ช่วยในการทำลายโปรตีน, ย่อยเซลล์ และดักจับดีเอ็นเอไว้กับไฟเบอร์ ทำให้ดีเอ็นเอมีความเสถียรและช่วยรักษาสภาพเซลล์ไว้ได้เป็นระยะเวลานาน ทั้งนี้ยังมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพ สามารถนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ได้โดยตรงจากกระดาษกรองที่เจาะได้ และผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ (Smith *et al*., 2004)

Short tandem repeat (STR) คือส่วนของดีเอ็นเอที่มีการซ้ำกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดย 1 หน่วยซ้ำมีความยาวประมาณ 1- 6 คู่เบส เรียงตัวซ้ำต่อเนื่องกันหลายชุด พบกระจายอยู่ทั่วจีโนม แต่ละบุคคลจะมีจำนวนชุดซ้ำไม่เท่ากัน ซึ่งจำนวนซ้ำนี้จะเป็นลักษณะเฉพาะที่ทำให้เกิดความแตกต่างในแต่ละบุคคล และสามารถศึกษาโดยการใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) แต่ก่อนที่จะนำ STR marker ไปใช้ควรที่จะทำการศึกษาข้อมูลในกลุ่มประชากรนั้นๆ เช่น ผลงานวิจัยเก็บฐานข้อมูลตำแหน่งเครื่องหมายพันธุกรรมจากกลุ่มประชากรในแต่ละภูมิภาคของประเทศไทย (Shotivaranon *et al*., 2009) โดยนำผลที่ได้มาช่วยในการเลือกใช้ STR marker ที่เหมาะสมแก่กลุ่มตัวอย่างทางการวิจัย ในปัจจุบันหลักการตรวจวิเคราะห์ autosomal STR จึงเป็นเกณฑ์พิจารณาเบื้องต้นในกลุ่มงานนิติพันธุศาสตร์ ซึ่งเป็นหลักการที่ได้รับความยอมรับเป็นอย่างสูงในการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลและหาความสัมพันธ์ บิดา-มารดา-บุตร (Chakraborty *et al*., 1999) และเครื่องหมายพันธุกรรมเป็นส่วนสำคัญที่จะช่วยในการวิเคราะห์ โดยชุดน้ำยาสำเร็จรูปทั่วไปจะใช้เครื่องหมายพันธุกรรมจำนวน 13 ตำแหน่ง ของ Combined DNA Index System (CODIS) เป็นฐานข้อมูลหลัก (Opel *et al*., 2007) แต่ทั้งนี้ ได้มีผลการศึกษาวิจัย ชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่สามารถวิเคราะห์เครื่องหมายพันธุกรรมได้มากกว่า 13 ตำแหน่ง ซึ่งใช้เวลาในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอนานถึง 3 ชั่วโมง (Yuan *et al*., 2012) ฉะนั้น หลายบริษัทจึงได้มีการพัฒนาชุดน้ำยาสำเร็จรูปให้สามารถวิเคราะห์เครื่องหมายพันธุกรรมได้ถึง 22 ตำแหน่ง (Fujii *et al*., 2014) และได้พัฒนาชุดน้ำยาเป็น rapid direct PCR เพื่อลดระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอให้สั้นลง เป็นการประหยัดเวลาในการปฏิบัติงาน (Wang *et al*., 2009) นอกจากนี้การเพิ่มเครื่องหมายพันธุกรรมหลายตำแหน่ง ที่ครอบคลุมทั้ง CODIS และ European Standard Set (ESS) ซึ่งมีความเหมาะสมที่จะใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างอ้างอิงทางนิติวิทยาศาสตร์ และหาความสัมพันธ์บิดา-มารดา-บุตร (Scherer *et al*., 2013)

ชุดน้ำยา Investigator IDplex GO (QIAGEN , Hilden , Germany) ประกอบด้วย 16 STR marker ได้แก่ 13 CODIS , D2S1338 , D19S433 และ Amelogenin โดยใช้ปริมาตรสารตามมาตรฐานในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ระบุโดยผู้ผลิต (standard protocol) เท่ากับ 27 ไมโครลิตร ด้วยหลักการ Direct amplification ซึ่งจะลดขั้นตอนการทำตัวอย่างให้บริสุทธิ์ (purification) หรือสกัดดีเอ็นเอ (extraction) ออกไปจากการวิเคราะห์ โดยในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใช้เวลาประมาณ 48 – 55 นาที ขึ้นอยู่กับประเภทตัวอย่างวิเคราะห์ ทำให้ประหยัดเวลาและสามรถทราบผลวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็ว ส่วนชุดน้ำยา Investigator 24plex QS (QIAGEN , Hilden , Germany) เป็น multiplex PCR โดยปริมาตรสารตามมาตรฐานที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ระบุโดยผู้ผลิต (standard protocol) เท่ากับ 25 ไมโครลิตร ใช้เวลาในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอประมาณ 60 นาที ซึ่งประกอบด้วย 22 STR marker ได้แก่ CODIS, European Standard Set, SE33, DYS391 และ Amelogenin ช่วยให้วิเคราะห์ผลครอบคลุมมากยิ่งขึ้น ทั้งนี้ ผู้ทดลองใช้ชุดน้ำยา

สำเร็จรูปซึ่งมีความถูกต้อง น่าเชื่อถืออยู่แล้ว แต่มีราคาค่าใช้จ่ายที่สูง จึงมีการทดลองลดปริมาตรของน้ำยาสำเร็จรูปลงเพื่อลดค่าใช้จ่าย แต่ยังคงความถูกต้องของ DNA profile อยู่เมื่อเทียบกับ DNA profile ที่ทำปฏิกิริยาที่ปริมาตรสารตามมาตรฐานที่ระบุโดยผู้ผลิต โดยผลจากการลดปริมาตรนั้นจะช่วยลดค่าใช้จ่ายเกี่ยวกับชุดน้ำยาทดสอบและเครื่องมือทางห้องปฏิบัติการได้เป็นอย่างดี ทั้งนี้กระบวนการวิเคราะห์ที่นำมาใช้ในงานด้านพันธุศาสตร์ ควรมีความรวดเร็ว ให้ผลแม่นยำ น่าเชื่อถือ เพราะผลการตรวจดีเอ็นเอเป็นหลักฐานสำคัญอีกชิ้นหนึ่งในการตรวจพิสูจน์ข้อเท็จจริงในกระบวนการยุติธรรม ที่สร้างความเชื่อมั่นได้เป็นอย่างดี

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณภาพของ DNA profile ทั้ง 16 และ 22 ตำแหน่ง หลังเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มในหลอดทดลอง

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

ตัวอย่างเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มที่เก็บบนกระดาษกรอง FTA ที่เหลือจากงานประจำทางห้องปฏิบัติการ (Left over specimens) ในช่วงปี 2557 จากห้องปฏิบัติการมนุษย์พันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี จำนวน 50 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มของคนไทย เพศชาย 25 ตัวอย่าง และ เพศหญิง 25 ตัวอย่าง (Approved number: ID 09-58-35 ย รับรองโดยคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล)

การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอทั้งหมด 50 ตัวอย่าง โดยการเจาะแผ่นตัวอย่างกระดาษกรอง FTA ขนาด 1.2 มิลลิเมตร บริเวณตรงกลางแผ่นตัวอย่าง (Wang *et al*., 2009) ใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม distilled water (DW) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที แล้วดูด DW ทิ้งให้หมด และเติม TE buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที แล้วดูด TE buffer ทิ้งให้หมด และสุดท้ายเติม TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำหลอดทดลองมาผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เมื่อครบเวลา นำมาผสมให้เข้ากัน และดูดส่วนใสไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยอิเล็กโทรฟอรีซีส

ชุดน้ำยา Investigator IDplex GO นำแผ่นตัวอย่างเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มจำนวน 50 ตัวอย่าง มาเจาะด้วยหัวเจาะขนาด 1.2 มิลลิเมตร ใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 1 แผ่น โดยเตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ประกอบด้วย Fast reaction mix ปริมาตร 3.75 ไมโครลิตร, primer mix ปริมาตร 8.75 ไมโครลิตร และ Investigator STR GO Punch buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ปริมาตรรวมเท่ากับ 13.5 ไมโครลิตร นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Thermal cycler โดยใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้ ขั้นตอน initial melting step ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 8 นาที 1 รอบ, 28 รอบ ของ 2 ขั้นตอนย่อย ประกอบด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส 10 วินาที และ annealing ที่อุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียส 38 วินาที และ final extension step ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส 1 นาที 1 รอบ จากนั้นตรวจดูความสมบูรณ์ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิธีการอิเล็กโทรฟอรีซีสด้วยเครื่อง ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer นำผลผลิตพีซีอาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ใส่ไปผสมในถาดหลุมพีซีอาร์ ที่มีส่วนผสมของ Hi-Di formamide ปริมาตร 12 ไมโครลิตร และ DNA size standard 550 (BTO) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร จากนั้นนำไป denature ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที และทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส 3 นาที จึงนำเข้าเครื่องอิเล็กโทรฟอรีซีสและแปลผลข้อมูลโดยโปรแกรม STR Profile Software Gene Mapper ID V3.2

ชุดน้ำยา Investigator 24plex QS นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้ม จำนวน 50 ตัวอย่าง ใส่ลงในหลอดทดลองมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย Fast reaction mix 2.0 ปริมาตร 1.875 ไมโครลิตร, primer mix ปริมาตร 0.625 ไมโครลิตร, template DNA 0.5 นาโนกรัม และ nuclease – free water ปริมาตรรวมเท่ากับ 6.25 ไมโครลิตร นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Thermal cycler โดยใช้อุณหภูมิ

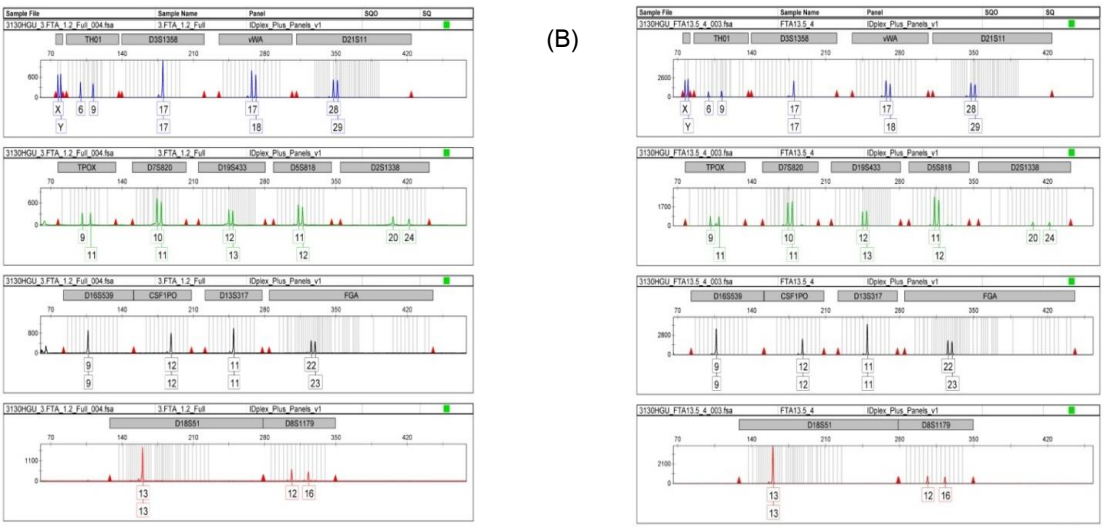
ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้ ขั้นตอน initial melting step ที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส 30 วินาที 1 รอบ, ที่อุณหภูมิ 64 องศาเซลเซียส 55 วินาที 3 รอบ และ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 วินาที 1 รอบ, 27 รอบ ของ 3 ขั้นตอนย่อย ประกอบด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส 10 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียส 55 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 วินาที และ final extension step ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส 2 นาที 1 รอบ จากนั้น นำไปตรวจดูความสมบูรณ์ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยวิธีการอิเล็กโทรฟอรีซีส ด้วยเครื่อง ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer นำผลผลิตพีซีอาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ใส่ไปผสมในถาดหลุมพีซีอาร์ที่มีส่วนผสมของ Hi-Di formamide ปริมาตร 12 ไมโครลิตร และ DNA size standard 550 (BTO) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร จากนั้นนำไป denature ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที แล้วนำเข้าเครื่องอิเล็กโทรฟอรีซีส และแปลผลข้อมูลโดยโปรแกรม STR Profile Software Gene Mapper ID–1.3

ผลการทดลองและวิจารณ์

การลดปริมาตรน้ำยาในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

ตัวอย่าง FTA ชายและหญิง รวม 50 ตัวอย่าง ใช้ในการวิเคราะห์ DNA profile ที่ 16 ตำแหน่ง นั้นได้ใช้ชุดน้ำยา Investigator IDplex GO ด้วยวิธี direct PCR มาเป็นทางเลือกในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากตัวอย่างเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มที่เก็บอยู่บนกระดาษกรอง FTA ซึ่งแตกต่างจากกระบวนการวิเคราะห์อื่นที่ต้องนำตัวอย่างมาผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ (purification) หรือสกัดดีเอ็นเอ (extraction) ออกก่อน โดยได้ทำการวิเคราะห์จนได้ปริมาตรที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาคือ ร้อยละ 50 ของปริมาตรที่ใช้ตามปรกติ เพียง 13.5 ไมโครลิตร และตัวอย่าง FTA ขนาด 1.2 มิลลิเมตร เจาะบริเวณตรงกลางแผ่นตัวอย่าง FTA เพื่อให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาแบบ direct PCR (Wang *et al.*, 2009) ใช้เวลาในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพียง 1 ชั่วโมง 10 นาที ช่วยย่นระยะเวลาการทำงานประจำได้ถึง 1 ชั่วโมง (ตารางที่ 1) ในการเปรียบเทียบ DNA profile โดยดูจากความสูงพีค heterozygote ในแต่ละตำแหน่งมีความใกล้เคียงกัน หรือต่างกันไม่เกิน 50% ของพีคที่สูงที่สุด อ้างอิงจากงานวิจัยของ Wong *et al.,* (2012) ซึ่งสอดคล้องกับผล DNA profile ที่ปรากฏ (รูปที่ 1, 2) ความสมบูรณ์และสมดุลของความสูงพีคและสามารถตรวจนับ STR marker ได้ครบทั้ง 16 ตำแหน่ง จาก 50 ตัวอย่าง โดยนำตำแหน่ง STR marker ที่นับได้ในแต่ละตัวอย่าง คิดเป็นผลสำเร็จร้อยละ 98.75 (48/50 ตัวอย่าง) เมื่อเทียบกับ DNA profile ที่ใช้ปริมาตรสารตามมาตรฐานที่ระบุโดยผู้ผลิต โดยมีค่า cut off : 100 RFU (relative fluorescence unit) (รูปที่ 1)

(A) (B)



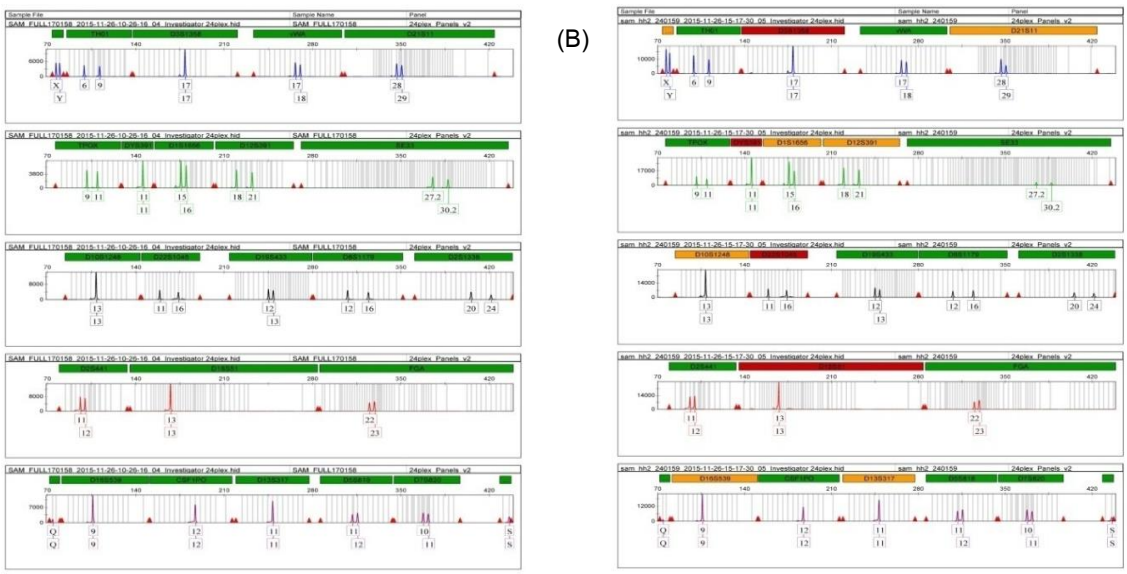
รูปที่ 1 DNA profiles จากการวิเคราะห์ด้วยชุดน้ำยา Investigator IDplex GO (A) DNA profiles จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ปริมาตรปรกติ (B) DNA profiles จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ปริมาตรร้อยละ 50 ของปรกติ

ในส่วนการวิเคราะห์ DNA profile ที่ 22 ตำแหน่งนั้น ใช้ชุดน้ำยา Investigator 24plex QS ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาตรที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา คือ ร้อยละ 25 ของปริมาตรที่ใช้ตามปรกติเพียง 6.25 ไมโครลิตร ต่อความเข้มข้นดีเอ็นเอปริมาณ 0.5 นาโนกรัม (ตารางที่ 1) โดยวัดค่าความเข้มข้นจากตัวอย่างเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มชายและหญิง รวม 50 ตัวอย่าง ที่ทำการสกัดไว้ ซึ่งให้ผล DNA profile ที่สมบูรณ์มีความสูงพีคสมดุลและสามารถตรวจนับ STR marker ได้ครบทั้ง 22 ตำแหน่ง คิดเป็นผลสำเร็จร้อยละ100 (50/50 ตัวอย่าง) เมื่อเทียบกับ DNA profile ที่ใช้ปริมาตรสารตามมาตรฐานโดยมีค่า cut off: 175 RFU (รูปที่ 2)

ตารางที่ 1 ตารางเปรียบเทียบปริมาตรน้ำยา และเวลาในกระบวนการวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากวิธีที่ใช้ปฏิบัติในงานประจำกับวิธีที่ได้จากผลการทดลองในงานวิจัย

Analytical steps	Investigator IDplex GO		Investigator 24plex QS	
	Estmate time of routine	Estmate time of research	Estmate time of routine	Estmate time of research
Punching of FTA disks	15 min	15 min	15 min	15 min
Washing of FTA disks	30 min	-	30 min	30 min
Extraction	30 min	-	30 min	30 min
PCR set-up and cycling	55 min	55 min	60 min	60 min
Volume per reaction	27 µl (standard protocol)	13.5 µl	25 µl (standard protocol)	6.25 µl

(A) (B)



รูปที่ 2 DNA profiles จากการวิเคราะห์ด้วยชุดน้ำยา Investigator 24plex QS (A) DNA profiles จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ปริมาตรปรกติ (B) DNA profiles จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ปริมาตรร้อยละ 25 ของปรกติ

อัตราส่วนร้อยละความสูงของพีค heterozygote

ค่าเฉลี่ยอัตราส่วนร้อยละความสูงของพีค heterozygote ซึ่งกำหนดจากแต่ละ locus บน profile ทั้ง 50 ตัวอย่าง ที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ด้วยชุดน้ำยา Investigator IDplex GO และ Investigator 24plex QS โดยคำนวณจากความสูง (หน่วย RFU) ของพีคที่ต่ำที่สุดในแอลลีล ต่อพีคที่สูงที่สุดในแอลลีลที่อยู่ในตำแหน่งเดียวกัน (ตารางที่ 2) พบว่าอัตราส่วนร้อยละความสูงพีค heterozygote อยู่ระหว่างช่วงร้อยละ 80.4 (ตำแหน่ง vWA) ถึงร้อยละ99.7 (ตำแหน่ง D5S818) ที่กระดาษกรอง FTA ขนาด 1.2 มิลลิเมตร ต่อ 13.5 ไมโครลิตร จากชุดน้ำยา Investigator IDplex GO และร้อยละ 76.7 (ตำแหน่ง SE33) ถึงร้อยละ 99.4 (ตำแหน่ง DYS391) ที่ template DNA 0.5 นาโนกรัม ต่อ 6.25 ไมโครลิตร จากชุดน้ำยา Investigator 24plex QS ซึ่งช่วงอัตราส่วนร้อยละความสูงพีคที่สูงสุดจากชุดน้ำยา Investigator IDplex GO คือ D5S818 ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับผลงานวิจัยของ Collins *et al.* (2004) ที่ให้ผลในช่วงร้อยละ 82 ถึง 90 เมื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ปริมาตร 25 ไมโครลิตร และความเข้มข้นดีเอ็นเอ 0.25 – 3.0 นาโนกรัม

ตารางที่ 2 อัตราส่วนร้อยละความสูงของพีค heterozygote จาก STR[a] แต่ละตำแหน่ง

Marker	Investigator IDplex GO		Investigator 24plex QS	
	Peak height range (RFU)[b]	Average Heterozygote peak height ratio±SD (%)	Peak height range (RFU)[b]	Average heterozygote peak height ratio± SD (%)
D8S1179	689 -785	87.7 ± 0.9	6791 - 7609	89.2 ± 0.9
D21S11	600 - 667	89.9 ± 0.8	7247 - 7985	90.7 ± 0.9
D7S820	2215 - 2418	91.5 ± 0.9	6410 - 6822	93.9 ± 0.9
CSF1P0	1170 - 1242	94.1 ± 0.8	6646 - 7267	91.4 ± 0.9
D3S1358	1567 - 1709	91.7 ± 0.9	15901 - 17798	89.3 ± 0.8
TH01	1294 - 1378	93.9 ± 0.9	21245 - 21963	96.7± 0.9
D13S317	2050 - 2261	90.6 ± 0.9	10930 - 11986	91.1 ± 0.9
D16S539	1408 - 1630	86.3 ± 0.8	18505 - 20439	90.5 ± 0.9
D2S1338	500 - 602	83.0 ± 0.7	3623 - 4179	86.6 ± 0.9
D19S433	1032 - 1143	90.2 ± 0.9	11110 - 12242	90.7 ± 0.9
vWA	1596 - 1983	80.4 ± 0.9	14395 - 16654	86.4 ± 0.8
TPOX	1248 - 1279	97.5 ± 0.9	19312 - 19878	97.1 ± 0.9
D18S51	1288 - 1476	87.2 ± 0.9	13697 - 15305	89.4 ± 0.9
D5S818	1089 - 1040	99.7 ± 0.9	8819 - 9835	89.6 ± 0.9
FGA	1453 - 1630	89.1 ± 0.9	9094 - 10099	90.0 ± 0.9
DYS391			11652 - 11711	99.4 ± 0.9
D1S1656			19937 - 21955	90.8 ± 0.8
D12S391			17829 - 20028	89.0 ± 0.9
SE33			3774 - 4916	76.7 ± 0.7
D10S1248			13792 - 14963	92.1 ± 0.8
D22S1045			6326 - 7393	85.5 ± 0.9
D2S441			14185 - 15934	89.0 ± 0.9

[a]อัตราส่วนร้อยละความสูงของพีค heterozygote คำนวณจากการวิเคราะห์ตัวอย่างเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้ม 50 ตัวอย่าง จากชุดน้ำยา Investigator IDplex GO และ Investigator 24plex QS. [b]ความสูงพีค ต่ำสุดและสูงสุด ในแต่ละตำแหน่ง

การเปรียบเทียบผล DNA profile

จากการศึกษานี้ได้ตรวจสอบอัตราส่วนร้อยละความสูงของพีค heterozygote หรือ intralocus balance มีค่าเริ่มต้นที่ร้อยละ 70 (Collins *et al*., 2004; Butler, 2005) การเปรียบเทียบผล profile ทั้ง 50 ตัวอย่าง จากการใช้ชุดน้ำยา Investigator IDplex GO ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ พบว่า มีจำนวน 3 ตัวอย่างไม่ปรากฏ profile ในตำแหน่ง D2S1338 เช่นเดียวกับผลงานวิจัยของ Wang *et al.* (2012) ที่พบว่ามีการหายไปของตำแหน่ง D2S1338 ซึ่งมีอัตราส่วนร้อยละความสูงของพีค heterozygote ที่ร้อยละ 33.9 จากการวิเคราะห์ได้ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอซ้ำ (re-amplified) โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยการใช้ตัวอย่างบน FTA ขนาด 1.2 มิลลิเมตร จำนวน 2 วง ใส่ในปฏิกิริยา ปรากฏว่าผล profile ในตำแหน่ง D2S1338 อัตราส่วนร้อยละความสูงของพีค heterozygote มากกว่าร้อยละ 70

ผลการศึกษาวิจัยได้แสดงถึงประสิทธิภาพของชุดน้ำยา Investigator IDplex GO และ Investigator 24plex QS จากการลดปริมาตรน้ำยาเป็น 13.5 และ 6.25 ไมโครลิตร ตามลำดับ โดยให้ DNA profile ที่สมบูรณ์ และการเจาะตัวอย่างบนกระดาษกรอง FTA ควรเจาะบริเวณศูนย์กลางของตัวอย่าง เพื่อให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมแก่การนำตัวอย่างไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยส่งผลให้ได้ DNA profile ที่สมบูรณ์ และมีความสูงพีคที่สมดุลกันในแต่ละตำแหน่ง นอกจากนี้การทำปฏิกิริยา direct PCR จะช่วยย่นระยะเวลาในการวิเคราะห์ตัวอย่าง และช่วยลดต้นทุนค่าใช้จ่ายทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งจากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่า การวิเคราะห์ STR marker ทั้ง 16 และ 22 ตำแหน่ง ด้วยชุดน้ำยา Investigator IDplex GO และ Investigator 24plex QS สามารถที่จะนำไปใช้กับตัวอย่างในงานตรวจวิเคราะห์ด้านนิติพันธุศาสตร์ คือเมื่อลดปริมาตรแล้วผล DNA profile ยังถูกต้องอยู่

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนบางส่วนจากทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์ จากเงินงบประมาณแผ่นดิน บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ปีการศึกษา 2559 ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ ห้องปฏิบัติการมนุษย์พันธุศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี ในความช่วยเหลือแนวทางการทำงาน และคำปรึกษาซึ่งจำเป็นอย่างยิ่งในการดำเนินการ ทำให้งานวิจัยสามารถสำเร็จลุล่วงมาได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

Butler JM (2005) Forensic DNA typing.2nd ed. Elsevier, USA.

Brito P, Lopes V, Bogas V, Balsa F, Andrade L, Serra A, *et al.* (2011) Amplification of non-FTA samples with AmpFISTR®Identifiler® Direct PCR Amplification Kit. Forensic SciInt Genet Supplement Ser 3: 371-372.

Chakraborty R, Stivers DN, Su B, Zhong Y, Budowle B (1999) The utility of short tandem repeat loci beyond human identification: implications for development of new DNA typing systems. Electrophoresis 20: 1682-1696.

Collins PJ, Hennessy LK, Leibelt CS, Roby PK, Reeder DJ, Foxall PA (2004) Developmental validation of a single-tube amplification of the 13 CODIS STR loci, D2S1338, D19S433 and Amelogenin: the AmpFISTR®Identifiler® PCR amplification kit. J Forensic Sci 49: 1-13.

Fujii K, Iwashima Y, Kitayama T (2014) Allele frequencies for 22 autosomal short tandem repeat loci obtained by PowerPlex Fusion in a sample of 1501 individuals from the Japanese population. Int J Legal Med 16: 243-237.

Opel KL, Chung DT, Drabek J, Butler JM, McCord BR (2007) Developmental validation of reduced-size STR Miniplex primer sets. J Forensic Sci 52: 1263-1271.

Shotivaranon J, Chirachariyavej T, LeetrakoolN, Rerkamnuaychoke B (2009) DNA database of populations from different parts in the Kingdom of Thailand. Forensic Sci Int Genet 4: 37-38.

Smith LM, Burgoyne LA (2004) Collecting, archiving and processing DNA from wildlife samples using FTA databasing paper. BMC Ecol 4.

Scherer M, Alsdorf B, Bochmann L, Prochnow A, Engel H (2013) Development of the Investigator STR GO! Kits for the direct amplification of reference samples. Forensic Sci Int Genet Supplement Ser 4: 15-16.

Wang DY, Chang CW, Oldroyd NJ, Hennessy LK (2009) Direct amplification of STRs from blood or buccal cell samples. Forensic Sci Int Genet Supplement Ser 2: 113-114.

Wong HY, Lim ESS (2012) Amplification volume reduction on DNA database samples using FTA ™ Classic Cards. Forensic Sci Int Genet 6: 176-179.

Yuan G, Shen C, Wang H, Liu W (2012) Genetic data provided by 21 autosomal STR loci from Chinese Tujia ethnic group. Mol Biol Rep 39: 10265-10271.