

การตรวจสอบความถูกต้องของปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย STR บนโครโมโซมเอกซ์และวาย

Validation of DNA Amplification on X and Y Chromosomal STR Markers

วลัยภรณ์ วงศ์ศรีสกุลแก้ว และพงษ์พิชญ์ ภักดีณรงค์

สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์

ตำบลพระปฐมเจดีย์ อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม 73000

จิตติมา โชติวารนนท์, ธวัช รินทะชัย, ณภัทร ธนะโชครุ่งเรือง

และบุษบา ฤกษ์อำนวยโชค*

ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล

แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร 10400

Walaiporn Wongsrisakunkaew and Pongpisanu Phakdeenarong

Department of Forensic Science, Faculty of Science, Silpakorn University,

Phra Pathom Chedi, Muang, Nakhon Pathom 73000

Jittima Shotivaranon, Tawat Rinthachai, Napat Thanachokrungruang

and Budsaba Rerkamnuaychoke*

Department of Pathology, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University,

Thung Phaya Thai, Ratchathewi, Bangkok 10400

บทคัดย่อ

การศึกษานี้เป็นการประเมินวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบนโครโมโซมเอกซ์และวาย จากตัวอย่างเยื่อกระดูกแห้งที่เก็บบนแผ่น FTA เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมจากการปรับกระบวนการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างได้แก่ การลดปริมาตรน้ำยาสำเร็จรูป การลดจำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ การลดขั้นตอนการล้างแผ่น FTA และการใช้เซลล์เยื่อกระดูกแห้งจากแผ่น FTA โดยตรง จากผลการทดสอบของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบนโครโมโซมเอกซ์ (X-STR, X-short tandem repeat) และโครโมโซมวาย (Y-STR, Y-short tandem repeat) สามารถลดปริมาตรน้ำยาสำเร็จรูปเหลือร้อยละ 25 และ 20 ตามลำดับ และสามารถลดจำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยาดังกล่าวจาก 25 และ 30 รอบ ตามคำแนะนำในคู่มือการใช้งาน เป็น 22 และ 27 รอบ ตามลำดับ การใช้ตัวอย่างจากแผ่น FTA โดยตรงที่ผ่านการลดขั้นตอนการล้าง มีคุณภาพ STR profile ไม่แตกต่างกับการใช้สารละลายดีเอ็นเอ โดยคุณภาพของ STR profile ที่ตรวจวิเคราะห์ได้อย่างประสบความสำเร็จแบบ full profile จากเครื่องหมายพันธุกรรม X-STR และ Y-STR เป็นร้อยละ 98 และ 94 ของตัวอย่างเพศหญิงและเพศชายอย่างละ 50 ตัวอย่าง ตามลำดับ โดยสรุปผลการวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า

สามารถลดปริมาตรของชุดน้ำยาสำเร็จรูป และลดจำนวนรอบได้โดยให้ผล DNA profile ที่สมบูรณ์ ซึ่งเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายและลดเวลาการตรวจวิเคราะห์ วิธีการนี้สามารถประยุกต์ใช้ในการบริหารจัดการด้านงานบริการของห้องปฏิบัติการนิติพันธุศาสตร์ได้

คำสำคัญ : เครื่องหมาย STR บนโครโมโซมเอกซ์และวาย; เยื่อบุกระพุ้งแก้ม; ลดปริมาตรน้ำยาสำเร็จรูป; นิติพันธุศาสตร์

Abstract

This study involved the validation of commercial test kits on X and Y STR loci using buccal cells on FTA cards. The objectives were to reduce the amplification kit volume, PCR cycles and FTA washing step. The results showed that the amplification kit volume of X-STR and Y-STR were reduced to 25 and 20 %, respectively. The amplification cycles were reduced from 25 cycles and 30 cycles of the manufacturer recommendation to 22 and 27 cycles, respectively. In addition direct amplification of FTA cards with reduced washing step gave the same results as using DNA solution with standard washing step. These results demonstrated that successful STR full profiles of X-STR and Y-STR were 98 and 94 % of total female and male samples (n = 50 each), respectively. For summary, the current study demonstrated that the amplification kit volume and amplification cycles could be reduced while complete DNA profiles were obtained. This will provide benefit of cost reduction and save time. Moreover, it can be applied to forensic DNA routine service management.

Keywords: X and Y-STR; buccal cell; reduced reaction volume; forensic genetics

1. คำนำ

การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลที่มีประสิทธิภาพสูง ดีเอ็นเอจึงกลายเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่นิยมนำมาใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล รวมทั้งการยืนยันผู้กระทำผิดในคดีอาชญากรรมต่าง ๆ เทคนิคที่นำมาใช้ในการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอจำเป็นต้องใช้เครื่องมือและชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่มีราคาสูงซึ่งทำให้มีค่าใช้จ่ายสูง เช่น ในกรณีคดีล่วงละเมิดทางเพศคดีหนึ่ง ซึ่งใช้หลักฐานทางดีเอ็นเอในการคลี่คลายคดีเป็นส่วนใหญ่ มีตัวอย่างของผู้ต้องสงสัยทั้งหมด 156 รายการ ส่งผลให้มีค่าใช้จ่ายที่สูงถึง 420,000 บาท (ปิยะ, 2556) ถึงแม้การตรวจพิสูจน์ทางดีเอ็นเอต้องสูญเสียค่าใช้จ่ายสูง แต่ทางราชการ

ยังคงเลือกใช้วิธีการดังกล่าว เนื่องจากสมบัติของดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะสูง ให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่แม่นยำและใช้เวลาเพียงไม่นานในการตรวจพิสูจน์ซึ่งส่งผลดีต่อการพิจารณาคดี

Short tandem repeat (STR) เป็นบริเวณของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเรียงเป็นชุดซ้ำอย่างต่อเนื่อง ตั้งแต่ 2-7 คู่เบส นิยมนำมาใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมในการทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีความแปรผันทางพันธุกรรมสูงในแต่ละบุคคล ทำให้มีประสิทธิภาพในการจำแนกเอกลักษณ์บุคคลสำหรับการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอลำดับซ้ำบนโครโมโซมเอกซ์และวาย (X-STR and Y-STR) เป็น การตรวจเอกลักษณ์บุคคลอีกประเภทหนึ่ง ปัจจุบัน

มีการประยุกต์ใช้การตรวจวิเคราะห์ STR ของโครโมโซมเพศในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ทางนิติวิทยาศาสตร์ เช่น การตรวจหาความสัมพันธ์ทางสายเลือด หรือในกรณีที่มีการตรวจดีเอ็นเอบนอโทโซมมีข้อจำกัดบางประการ เช่น กรณีการตรวจความสัมพันธ์พ่อแม่ลูกที่มีผลการตรวจไม่ตรงกันในบางตำแหน่ง ซึ่งอาจเกิดจากการกลาย (mutation) ของดีเอ็นเอบนอโทโซม ทำให้ไม่สามารถสรุปผลการตรวจได้ โดยโครโมโซมเอกซ์และวายนำมาใช้ตรวจเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผล ในกรณีตรวจความสัมพันธ์พ่อกับลูกสาวจะใช้การตรวจโครโมโซมเอกซ์เพิ่มเติม ส่วนกรณีตรวจความสัมพันธ์พ่อกับลูกชาย จะใช้การตรวจดีเอ็นเอของโครโมโซมวายเพิ่มเติม นอกจากนี้ยังใช้ตรวจในคดีล่วงละเมิดทางเพศที่ตัวอย่างส่งตรวจมีการปนกันของดีเอ็นเอของเหยื่อและผู้ต้องสงสัย หรือกรณีที่มีผู้ต้องสงสัยหลายคนร่วมกันในคดี (multiple rape case) โครโมโซมวายจะนำมาใช้ตรวจจำแนกผู้ต้องหาในกรณีเหล่านี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Butler, 2011; Raziol *et al.*, 2014) สำหรับในตัวอย่างดีเอ็นเอของคนไทย มีการรายงานเกี่ยวกับข้อมูลการใช้เครื่องหมายพันธุกรรมบนอโทโซมและโครโมโซมวาย ซึ่งใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงของประชากรไทยได้ (Chantratita *et al.*, 2001; Rerkamnuaychoke *et al.*, 2001; Rerkamnuaychoke *et al.*, 2006; Shotiwaranon *et al.*, 2009; Siriboonphiphatthana *et al.*, 2010)

ขั้นตอนการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอประกอบด้วยขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ การวัดปริมาณดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ การแยกขนาดดีเอ็นเอ และการวิเคราะห์ผล ซึ่งมีงานวิจัยจำนวนมากที่พัฒนาและปรับปรุงขั้นตอนการตรวจพิสูจน์ เพื่อลดระยะเวลาการตรวจวิเคราะห์ รวมถึงการลดค่าใช้จ่ายลง แต่ยังคงคุณภาพของผลการตรวจพิสูจน์ไม่ต่างจากขั้นตอนการตรวจพิสูจน์แบบมาตรฐาน เช่น การปรับลดปริมาณน้ำยาสำเร็จรูปที่

ใช้ จากการศึกษาในชุดน้ำยา Powerplex® Y23 พบว่าที่ปริมาตรรวม 5 ไมโครลิตร สามารถให้คุณภาพของ STR profile ที่เป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับถึงร้อยละ 90 (Raziol *et al.*, 2014) การปรับลดจำนวนรอบ (PCR cycle) หรือการปรับลดความเข้มข้นของดีเอ็นเอในชุดน้ำยาสำเร็จรูป Yfiler® พบว่าการลด-เพิ่ม PCR cycle (28-32 cycle) ไม่ส่งผลต่อคุณภาพ STR profile นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มข้นดีเอ็นเอต่ำสุดที่ทำให้ STR profile ครบสมบูรณ์ คือ 0.125 นาโนกรัม (Mulero *et al.*, 2006) สำหรับขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง ปัจจุบันนิยมนำแผ่น FTA มาใช้ เพื่อความสะดวกในการเก็บรักษาเซลล์เป้าหมาย ข้อดีของแผ่น FTA ได้แก่ สามารถเก็บรักษาดีเอ็นเอให้คงสภาพได้ที่อุณหภูมิห้อง และสามารถเก็บรักษาได้เป็นเวลาหลายปี (Wong *et al.*, 2012) ทำให้มีงานวิจัยที่พัฒนาให้สามารถประยุกต์ใช้กับตัวอย่างดีเอ็นเอที่เก็บบนแผ่น FTA เช่น การลดขนาดหัวเจาะแผ่น FTA (punch size) เพื่อช่วยลดการสูญเสียตัวอย่างในกรณีที่มีตัวอย่างดีเอ็นเอจำกัด (Wong *et al.*, 2012) หรือการพัฒนาประสิทธิภาพของชุดน้ำยาสำเร็จรูป ให้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่เก็บบนแผ่น FTA ได้โดยตรง ไม่ต้องผ่านขั้นตอนการสกัด หรือการล้างก่อน (Wang *et al.*, 2009 ; Laurin *et al.*, 2012) ทำให้ลดเวลาในการตรวจวิเคราะห์จาก 10-12 ชั่วโมง เหลือเพียง 6 ชั่วโมง (Tsukada *et al.*, 2011) แม้ว่าชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่ใช้ภายในห้องปฏิบัติการเหล่านี้ได้มีการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมจากบริษัทผู้ผลิตแล้ว เพื่อสะดวกต่อการใช้งานมาแล้วก็ตาม แต่ในทางนิติวิทยาศาสตร์ ผู้ปฏิบัติงานยังคงต้องการเทคนิคที่จะช่วยพัฒนาและปรับปรุงให้การตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ มีความไวสูง ประหยัดค่าใช้จ่าย และเพิ่มศักยภาพในการทำงานให้มากขึ้นกว่าเดิม

ดังนั้นผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบน

โครโมโซมเอกซ์และวายด้วยชุดน้ำยา Argus X-12 (QIAGEN, Germany) และ Yfiler® (Life Technologies, USA) ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทางนิติพันธุศาสตร์ โดยวิธีการทดลองที่ได้มีการปรับเปลี่ยนบางขั้นตอนจากวิธีการมาตรฐานที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ ซึ่งผลการศึกษานี้ จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงาน ลดค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์ และลดพื้นที่ในการจัดเก็บตัวอย่างส่งตรวจ นอกจากนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการพิสูจน์ดีเอ็นเอทางนิติพันธุศาสตร์ในงานบริการได้

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 กลุ่มตัวอย่าง

การศึกษานี้ใช้เซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มของตัวอย่างเพศหญิงและเพศชายอย่างละ 50 ตัวอย่าง ที่ถูกเก็บบนแผ่น FTA รุ่น Indicating FTA™ Mini Card ไว้ในปี พ.ศ. 2557 และ 2559 โดยตัวอย่างเหล่านี้เป็นสิ่งส่งตรวจที่เหลือจากการตรวจในงานประจำ (left-over specimen) ของห้องปฏิบัติการมนุษย์พันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี และผ่านการอนุมัติโครงการวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรม และวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดีแล้ว (เลขที่โครงการ ID 09-58-34)

2.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบนโครโมโซมเอกซ์และวายจากตัวอย่างที่เก็บบนแผ่น FTA

ตัวอย่างที่ใช้ในขั้นตอนนี้เป็นตัวอย่างที่ทราบข้อมูลของ STR profile เป็นเพศหญิงจำนวน 1 ตัวอย่าง ในการทดสอบปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบนโครโมโซมเอกซ์ด้วยชุดน้ำยา Argus X-12 และใช้ตัวอย่างเพศชายจำนวน 1 ตัวอย่าง ในการทดสอบปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบนโครโมโซมวายด้วยชุดน้ำยา Yfiler® และเจาะตัวอย่างเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มที่เก็บบนแผ่น FTA

โดยใช้ manual punch ยี่ห้อ Harris Micro-Punch (Ted Pella, USA) ขนาดหัวเจาะเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.2 มิลลิเมตร ตำแหน่งการเจาะเป็นแบบสุ่มในบริเวณที่มีเยื่อบุกระพุ้งแก้มซ้ายอยู่ (บริเวณพื้นที่สีขาว) จากนั้นล้างแผ่น FTA ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 200 ไมโครลิตร นาน 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง และ TE buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นาน 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง ทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Wong *et al.*, 2012) โดยใช้ FTA 1 punch ต่อหนึ่งปฏิกิริยา เตรียม PCR reaction mix ของชุดน้ำยาสำเร็จรูป Argus X-12 และ Yfiler® ตามคู่มือแนะนำการใช้งาน โดยชุดน้ำยาสำเร็จรูปทั้งสองนี้ มีปริมาตรของการทำปฏิกิริยามาตรฐานคือ 25 ไมโครลิตร ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Argus X-12 และ Yfiler® มี positive control เป็น control DNA 9947A และ AmpFSTR® control DNA 007 ตามลำดับ ส่วน negative control เป็นแผ่น FTA เปล่าขนาด 1.2 มิลลิเมตร จำนวน 1 punch การทดสอบการลดปริมาตรของชุดน้ำยาสำเร็จรูปแต่ละชนิดจะทดสอบทั้งหมด 5 ซ้ำ

การศึกษานี้ใช้เครื่อง Thermal cycler รุ่น GeneAmp® PCR System 9700 Cyclor (Applied Biosystems) สภาวะมาตรฐานที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของชุดน้ำยา Argus X-12 คือ 94 °C 4 นาที ช่วงที่ 1 ประกอบด้วย 5 รอบ ของ 96 °C 30 วินาที 63 °C 120 วินาที และช่วงที่ 2 คือ 25 รอบ ของ 94 °C 30 วินาที 60 °C 120 วินาที 72 °C 75 วินาที และขั้นตอน extension ครั้งสุดท้ายที่ 68 °C นาน 60 นาที ส่วนสภาวะมาตรฐานในการทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในชุดน้ำยา Yfiler® คือ เริ่มต้นที่ 95 °C 11 นาที ตามด้วย 30 รอบ ของ 94 °C 1 นาที 61 °C 1 นาที 72 °C 1 นาที และขั้นตอน extension ครั้งสุดท้ายที่ 60 °C นาน 80 นาที

ผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้นำมาแยกขนาดด้วย

เครื่อง Applied Biosystems® 3130 Genetic Analyzer และวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม GeneMapper® ID Software ซึ่งค่าความสูงของพีค (peak height) ที่เป็นค่า cut-off คือ 100 RFU (relative fluorescence unit) โดยเกณฑ์การยอมรับความสมบูรณ์ของ STR profile ในงานวิจัยนี้ได้แก่ จะต้องได้ผลเป็น full profile และพีคมีลักษณะแหลม ความสูงพีคมีค่ามากกว่า 100 RFU

2.3 การลดขั้นตอนการล้างแผ่น FTA และลดระยะเวลาการทำให้แผ่น FTA แห้ง

การศึกษานี้จะใช้ปริมาตรที่น้อยที่สุดและยังให้ผล DNA profile ที่สมบูรณ์ที่สุดของชุดน้ำยา Argus X-12 (ปริมาตร 6.25 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยา 22 รอบ) และชุดน้ำยา Yfiler® (ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยา 27 รอบ) มาใช้ทดลองเพื่อลดขั้นตอนและระยะเวลาในการล้างแผ่น FTA จากสภาวะดังกล่าวจะทดสอบลดเวลาขั้นตอนทำให้แผ่น FTA แห้งที่อุณหภูมิ 60 °C โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ ที่ 0, 15 และ 60 นาที ทดสอบลดขั้นตอนในการล้างแผ่น FTA โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่มการทดลอง คือ (1) ล้างด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง และ TE buffer 1 ครั้ง (2) ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง และ TE buffer 2 ครั้ง โดยทั้งสองกลุ่มนี้ทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 15 นาที วิเคราะห์ผล profile ที่ได้เปรียบเทียบกับ known genotype ของตัวอย่าง

2.4 การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยสภาวะที่เหมาะสมจากการทดลอง

นำสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบนโครโมโซมเอกซ์และวาย มาทดสอบในตัวอย่างเยื่อกระดูกพุงแก้มเพศหญิงและชาย อย่างละ 50 ตัวอย่าง และเปรียบเทียบจีโนมกับฐานข้อมูลอ้างอิงของห้องปฏิบัติการมนุษยพันธุศาสตร์ที่ทดสอบด้วยดีเอ็นเอแบบสารละลาย เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของตำแหน่งพีคที่ได้ (accuracy)

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

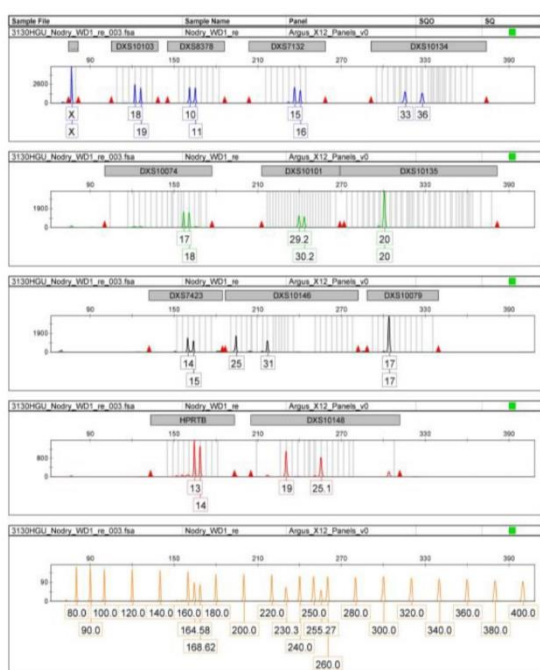
3.1 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบนโครโมโซมเอกซ์และวายจากตัวอย่างที่เก็บบนแผ่น FTA

3.1.1 ดีเอ็นเอบนโครโมโซมเอกซ์ทดสอบด้วยชุดน้ำยา Argus X-12 ในตัวอย่างเยื่อกระดูกพุงแก้มเพศหญิงที่ปริมาตรน้ำยา 25, 12.5, 6.25 และ 5 ไมโครลิตร ปริมาตรที่ให้ผล STR profile สมบูรณ์ คือ 25 และ 12.5 ไมโครลิตร สำหรับที่ปริมาตร 6.25 และ 5 ไมโครลิตร เกิด over amplification เป็นจำนวนมาก ซึ่งเป็นผลจากมีปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นสูง ดังนั้นจึงปรับสภาวะโดยการลดจำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลงมาที่ 22-24 รอบ เลือกปริมาตรที่ 6.25 ไมโครลิตร มาทดสอบ โดยทั้ง 3 สภาวะ (สภาวะที่ใช้จำนวนรอบ 22, 23 และ 24 รอบ) ให้ผล STR profile สมบูรณ์ทั้งหมด สำหรับการเกิด over amplification และการมี product PCR มากขึ้นเมื่อลดปริมาตรน้ำยา อาจเป็นผลมาจากองค์ประกอบในการทำปฏิกิริยาแต่ละส่วนไม่สมดุลกัน ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมในปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยานี้คือ 6.25 ไมโครลิตร และทำปฏิกิริยา 22 รอบ (รูปที่ 1A)

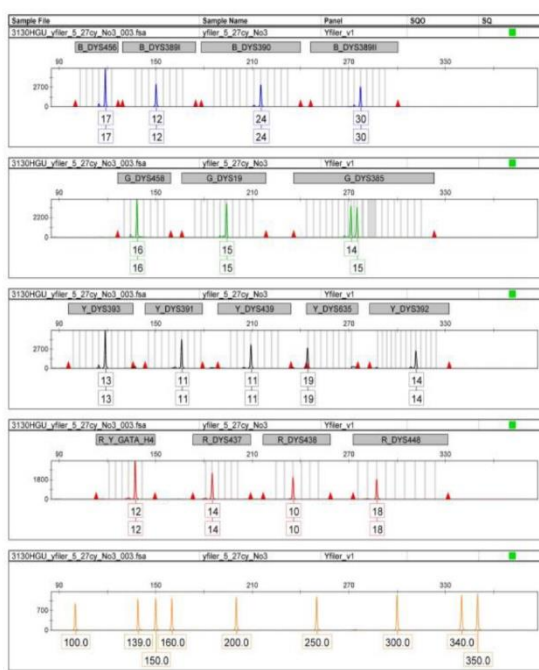
3.1.2 ดีเอ็นเอบนโครโมโซมวาย ทดสอบด้วยชุดน้ำยา Yfiler® ใช้ตัวอย่างเยื่อกระดูกพุงแก้มเพศชาย และลดปริมาตรน้ำยาเช่นเดียวกับการทดสอบในโครโมโซมเอกซ์ ปริมาตรที่ให้ผล STR profile สมบูรณ์ คือ 25, 12.5 และ 6.25 ไมโครลิตร ส่วนผล STR profile ที่ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เกิด over amplification และลักษณะพีคไม่คมแหลม ตั้งแต่การทดลองครั้งแรก ข้อสังเกตจากผลการทดลอง 6.25 ไมโครลิตร นั้น แม้ให้พีคครบสมบูรณ์ทุก profile แต่ลักษณะพีคในบางตำแหน่งมีฐานพีคค่อนข้างกว้าง โดยพบลักษณะนี้ 3 ใน 5 ครั้งของ

การทดลอง ซึ่งทั้ง 2 กรณี อาจเป็นผลจากความเข้มข้นดีเอ็นเอไม่เหมาะสม ผู้วิจัยจึงใช้ปริมาตรที่ 6.25 ไมโครลิตร และทดลองเจาะแผ่น FTA ในบริเวณตำแหน่งต่าง ๆ กัน ได้แก่ บริเวณที่มีสีขาวชัดเจนซึ่งเป็นบริเวณส่วนกลางของตัวอย่าง และบริเวณที่มีสีขาวจาง ๆ ซึ่งมักอยู่บริเวณรอบนอก (รูปที่ 2) ผลการทดลองพบว่าตัวอย่างที่เจาะจากบริเวณที่มีสีขาวจาง จะให้ผล STR profile สมบูรณ์มากกว่าในบริเวณที่มีสีขาวชัดเจน เนื่องจากการ

เก็บตัวอย่างเยื่อบุกระพุ้งแก้มใช้แผ่น foam-tipped applicator ชูดบริเวณกระพุ้งแก้มด้านในปาก และป้ายลงบนแผ่น FTA ทำให้ตัวอย่างในบริเวณต่าง ๆ มีปริมาณของเซลล์แตกต่างกัน ดังนั้นหากเจาะแผ่น FTA ตำแหน่งต่างกัน จะทำให้ความเข้มข้นดีเอ็นเอที่ได้แตกต่างกันไปด้วย ความเข้มข้นดีเอ็นเอที่ไม่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา จะมีผลกระทบต่อความสมบูรณ์ของพีคและได้ STR profile ลดลง (Laurin *et al.*, 2012)



(A)

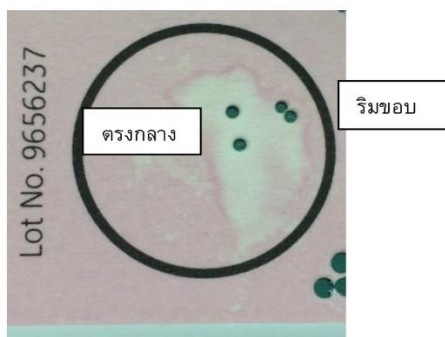


(B)

รูปที่ 1 ผล STR profile ที่ได้จากสภาวะที่เหมาะสมในปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบนโครโมโซมเอกซ์และวาย (A) ผล X-STR profile ที่ปริมาตร 6.25 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยา 22 รอบ (B) ผล Y-STR profile ที่ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยา 27 รอบ

ต่อมาจึงปรับลดจำนวนรอบในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอให้อยู่ในช่วง 27-29 รอบ พบว่าผล STR profile ที่ได้สมบูรณ์ทั้งหมด สำหรับที่ปริมาตรน้ำยา 5 ไมโครลิตร ผู้วิจัยทดลองใช้จำนวนรอบปฏิกิริยา 27 รอบ และทำทั้งหมด 5 ซ้ำ

พบว่าให้ผล STR profile ครบสมบูรณ์ทั้งหมด ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมในปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยานี้ คือ 5 ไมโครลิตร และทำปฏิกิริยา 27 รอบ (รูปที่ 1B)



รูปที่ 2 ตำแหน่งการเจาะแผ่น FTA บริเวณตรงกลาง (มีสีขาชัดเจน) จะเป็นบริเวณที่มีตัวอย่างเซลล์มาก และบริเวณริมขอบ (มีสีขาจาง) จะเป็นบริเวณที่มีตัวอย่างเซลล์น้อย

3.2 ผลการลดขั้นตอนการล้างแผ่น FTA และลดระยะเวลาการทำให้แผ่น FTA แห้ง

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมของชุดน้ำยาทั้ง 2 ชนิด แล้ว ต่อมาจึงทดลองลดขั้นตอนการล้างและทำให้แผ่น FTA แห้ง ผลการทดลองพบว่าทำให้แผ่น FTA แห้งที่ 0 และ 15 นาที ให้ผล profile ครบสมบูรณ์ เมื่อเทียบกับการทำให้แห้งที่ 60 นาที ส่วนการลดจำนวนครั้งในขั้นตอนการล้าง พบว่าการล้างแผ่น FTA ด้วยน้ำกลั่นและ TE buffer เพียง 1 ครั้ง ให้ผล profile ที่ครบสมบูรณ์เช่นกัน ผลสรุปของการหาสภาวะที่เหมาะสมที่ช่วยลดระยะเวลา ค่าใช้จ่าย

ได้มากที่สุด และยังคงคุณภาพของ STR profile คือที่ปริมาตรรวม 6.25 ไมโครลิตรที่ 22 รอบปฏิกิริยา (X-STR) และที่ปริมาตรรวม 5 ไมโครลิตร 27 รอบปฏิกิริยา (Y-STR) โดยผ่านขั้นตอนการล้างเพียง 1 ครั้ง ซึ่งสามารถลดเวลาการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอได้ถึงร้อยละ 27 (ตารางที่ 1)

3.3 ผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยสภาวะที่เหมาะสมจากการทดลอง

ผลการประเมินคุณภาพของ X-STR profile ในกลุ่มตัวอย่างเพศหญิงด้วยชุดน้ำยา Argus X-12 จำนวน 50 ตัวอย่าง พบว่าให้ผลความสำเร็จเป็น full profile ที่ร้อยละ 98 (49/50 ตัวอย่าง) โดยตำแหน่งที่มีแอลลีลขาดหายไป คือ DXS8378 และคุณภาพของ Y-STR profile ในกลุ่มตัวอย่างเพศชายด้วยชุดน้ำยา Yfiler® ให้ผลความสำเร็จเป็น full profile ที่ร้อยละ 94 (47/50 ตัวอย่าง) ตำแหน่งที่ขาดหายไป คือ B_DYS389II เนื่องจากด้วยทั้ง 2 ตำแหน่ง ข้างต้นมีความสูงของพีคไม่เกินค่า cut off ที่ 100 RFU นอกจากนี้ได้เปรียบเทียบผล DNA profile ที่ได้กับฐานข้อมูลของห้องปฏิบัติการ พบว่าผลที่ได้จากงานวิจัยนี้ตรงกับฐานข้อมูลทั้งหมด

การวิเคราะห์ heterozygous imbalance ของ X-STR profile จะวิเคราะห์จากตัวอย่างที่ให้ผลที่มีจีโนไทป์เป็นแบบ heterozygous allele (ตารางที่ 2) โดยค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนของพีคแบบ hetero-

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบเวลาในกระบวนการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากวิธีมาตรฐานซึ่งใช้สารละลายดีเอ็นเอกับวิธีที่ได้จากการทดลองที่ใช้ตัวอย่างบนแผ่น FTA ในงานวิจัยครั้งนี้

ขั้นตอนการวิเคราะห์	เวลาที่ใช้	
	วิธีมาตรฐานในงานประจำ	วิธีที่ได้จากงานวิจัยครั้งนี้
การล้างแผ่น FTA ตัวอย่าง	30 นาที	10 นาที
การสกัดดีเอ็นเอ	30 นาที	-
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	3 ชั่วโมง	2 ชั่วโมง 45 นาที
รวม	4 ชั่วโมง	2 ชั่วโมง 55 นาที

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบเวลาในกระบวนการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากวิธีมาตรฐานซึ่งใช้สารละลายดีเอ็นเอกับวิธีที่ได้จากผลการทดลองที่ใช้ตัวอย่างบนแผ่น FTA ในงานวิจัยครั้งนี้

Locus	Average $\pm$ SD*	Total peak balance / Total heterozygous allele (n)	% Peak balance**
DXS10103	0.88 $\pm$ 0.06	38/38	100
DXS8378	0.88 $\pm$ 0.05	35/35	100
DXS7132	0.89 $\pm$ 0.05	41/41	100
DXS10134	0.90 $\pm$ 0.07	40/40	100
DXS10074	0.86 $\pm$ 0.11	31/36	86
DXS10101	0.85 $\pm$ 0.13	40/44	90
DXS10135	0.81 $\pm$ 0.13	37/47	79
DXS7423	0.92 $\pm$ 0.04	28/28	100
DXS10146	0.84 $\pm$ 0.08	39/42	93
DXS10079	0.86 $\pm$ 0.06	40/41	98
HPRTB	0.91 $\pm$ 0.04	37/37	100
DXS10148	0.82 $\pm$ 0.10	41/46	89
G_DYS385***	0.75 $\pm$ 0.10	33/50	66

อัตราส่วนความสูงของพีคที่เป็นแบบ heterozygous allele = smaller peak height / higher peak height ในแต่ละ locus; *SD = standard deviation; **Peak balance = ค่าอัตราส่วนความสูงของพีคที่เป็นแบบ heterozygous allele ที่มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 0.7; ***ตำแหน่งพันธุกรรมของ Y-STR marker

zygous allele (อัตราส่วนของพีคแบบ heterozygous allele = smaller peak height / higher peak height ในแต่ละ locus) อยู่ในช่วง 0.81 ถึง 0.92 ซึ่งพีคที่ได้มีความสมดุลตามเกณฑ์การยอมรับ heterozygous peak threshold (>0.70) สำหรับตำแหน่งพันธุกรรมใน Y-STR ที่ให้ผลเป็น heterozygous allele มีเพียง 1 ตำแหน่ง คือ G_DYS385 ซึ่งค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนความสมดุลพีคที่ได้ คือ 0.75 ส่วนคุณภาพในด้านความสูงของพีคพบว่าในแต่ละตำแหน่งพันธุกรรมมีความแปรปรวนค่อนข้างมากดังตารางที่ 3 ค่ากลางต่ำสุดของ X-STR คือ 595 RFU (DXS10101) และค่ากลางสูงสุดคือ 7570 RFU (Amelogenin) ในส่วนของ Y-STR ค่ากลางต่ำสุดและค่ากลางสูงสุดที่ได้ คือ 406 RFU

(Y_DYS439) และ 3624 RFU (G_DYS458) ตามลำดับ

4. สรุป

การศึกษานี้เป็นการหาสภาวะที่เหมาะสมของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เพื่อช่วยลดค่าใช้จ่าย ลดเวลา และลดขั้นตอนการทำงาน รวมทั้งลดพื้นที่สำหรับจัดเก็บดีเอ็นเอในรูปแบบสารละลาย โดยใช้การเก็บตัวอย่างบนแผ่น FTA แทน จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสามารถให้ผล X-STR profile ที่สมบูรณ์ได้ที่ปริมาตรรวม 6.25 ไมโครลิตรด้วยชุดน้ำยา Argus X-12 (ลดปริมาตรน้ำยาสำเร็จรูปเหลือร้อยละ 25) และใช้ปริมาตรรวมของชุดน้ำยา Yfiler® เพียง 5

ตารางที่ 3 ค่ากลางของความสูงของพีคในแต่ละตำแหน่งพันธุกรรมซึ่งได้จากการทดลองในตัวอย่างเพศหญิง (X-STR profile) และเพศชาย (Y-STR profile) กลุ่มละ 50 ตัวอย่าง

Locus	Argus X-12 (X-STR)	Locus	Yfiler® (Y-STR)
	Median (Min-Max)		Median (Min-Max)
Amelogenin	7570 (2318-8756)	B_DYS456	1343 (292-4692)
DXS10103	3018 (607-7376)	B_DYS389I	3144 (796-8657)
DXS8378	1922 (308-7200)	B_DYS390	948 (217-4477)
DXS7132	2756 (539-7674)	B_DYS389II	652 (102-2737)
DXS10134	1078 (115-4752)	G_DYS458	3624 (579-9099)
DXS10074	1367 (165-5045)	G_DYS19	1323 (301-4494)
DXS10101	595 (118-2321)	G_DYS385	1009 (162-3169)
DXS10135	1897 (334-7142)	Y_DYS393	2516 (420-7799)
DXS7423	2280 (659-7203)	Y_DYS391	3180 (459-7655)
DXS10146	1886 (713-5163)	Y_DYS439	406 (102-1926)
DXS10079	2782 (711-6946)	Y_DYS635	1889 (242-7842)
HPRTB	2646 (957-5022)	Y_DYS392	695 (115-2285)
DXS10148	1338 (402-4337)	R_Y_GATA	1305 (246-4014)
		R_DYS437	3322 (529-7726)
		R_DYS438	1092 (214-4392)
		R_DYS448	1468 (247-4100)

ไมโครลิตร (ลดลงเหลือร้อยละ 20) สามารถลดจากปริมาตรที่แนะนำในคู่มือการใช้งานถึง 4 และ 5 เท่าตามลำดับ จากผลการศึกษาี้แสดงให้เห็นได้ว่าสามารถใช้ตัวอย่างโดยตรงจากแผ่น FTA สำหรับทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองได้โดยผ่านเพียงขั้นตอนการล้างเท่านั้น การใช้ตัวอย่างโดยตรงจากแผ่น FTA นี้ ยังช่วยลดขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอและพื้นที่ในการจัดเก็บดีเอ็นเอที่เป็นสารละลายอีกด้วย โดยความสำคัญในขั้นตอนการล้างแผ่น FTA ในการศึกษาี้ เพื่อทำลายสารยับยั้งการทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (polymerase inhibitor) ที่มีอยู่ในแผ่น FTA ซึ่งมีรายงานว่า การลดปริมาตรของปฏิกิริยาล้างนั้นจะส่งผลให้

สารยับยั้งการทำปฏิกิริยามีความเข้มข้นมากขึ้น การล้างแผ่น FTA ก่อนนำมาใช้เพียง 1 ครั้ง จะช่วยให้ปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอประสบความสำเร็จและมีประสิทธิภาพ (Raziel *et al.*, 2014)

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ บุคลากรของห้องปฏิบัติการมนุษยพันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำจนกระทั่งทำให้งานวิจัยนี้สามารถสำเร็จลุล่วงมาได้ด้วยดี

6. รายการอ้างอิง

ปิยะ วงษ์ไพศาล, นิติวิทยาศาสตร์ช่วยคลี่คลายคดีอาชญากรรม : ดีเอ็นเอช่วยแพะหลุดพ้น, แหล่งที่มา : <http://forensicnews.isranews>, 22 กรกฎาคม 2558.

Butler, J.M., 2012, *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*, Elsevier Academic Press, USA.

Chantratita, W., Rerkamnuaychoke, B., Jomsawat, U., Thanakitgosate, J., Ruangvithayanon, T. and Rojanasunan, P., 2001, Thai population data on tetrameric STR loci-D3S1358, vWA, FGA, TH01, CSF1PO, D5S818, D13S317 and D7S820, *Forensic Sci. Int.* 115: 113-115.

Gaines, M.L., Wojtkiewicz, P.W., Valentine, J.A. and Brown, C.L., 2002, Reduced volume PCR amplification reactions using the AmpFSTR® Profiler Plus™ kit, *J. Forensic Sci.* 47: 1224-1237.

Laurin, N., DeMoors, A. and Frégeau, C., 2012, Performance of identifiier direct and PowerPlex on the Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer for processing biological samples archived on FTA cards, *Forensic Sci. Int. Genet.* 6: 621-629.

Raziel, A., Dell' Ariccia-Carmon, A. and Zamir, A., 2014, Reduction of Powerplex® Y23 reaction volume for genotyping buccal cell samples on FTA™ card, *J. Forensic Sci.* 60: 152-156.

Rerkamnuaychoke, B., Chantratita, W., Jomsawat, U., Thanakitgosate, J., Ruangvithayanon, T. and Rojanasunan, P., 2001, Database of nine tetrameric STR loci-

D3S1358, vWA, FGA, D8S1179, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317 and D7S820 in Thai population, *Forensic Sci. Int.* 119: 123-125.

Rerkamnuaychoke, B., Rinthachai, T., Shotivaranon, J., Jomsawat, U., Siriboonpiputtana, T., Chaiatchanarat, K., Pasomsub, E. and Chantratita, W., 2006, Thai population data on 15 tetrameric STR loci-D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D5S818 and FGA, *Forensic Sci. Int.* 158: 234-237.

Shotivaranon, J., Chirachariyavej, T., Leetrakool, N. and Rerkamnuaychoke, B., 2009, DNA database of populations from different parts in the Kingdom of Thailand, *Forensic Sci. Int. Genet.* 4(1): e37-e38.

Siriboonphiphatthana, T., Jomsawat, U., Rinthachai, T., Thanakitgosate, J., Shotivaranon, J., Limsuwanachot, N., Polyorat, P. and Rerkamnuaychoke, B., 2010, Y-chromosomal STR haplotypes in Central Thai population, *Forensic Sci. Int. Genet.* 4(3): e71-e72.

Tsukada, K., Harayama, Y., Shimizu, M., Kurasawa, Y. and Kasahara, K., 2011, Fast PCR amplification of AmpFSTR Yfiler, *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.* 3(1): e190-e191.

Wang, D.Y., Chang, C.W., Oldroyd, N.J. and Hennessy, L.K., 2009, Direct amplication of STRs from blood or buccal cell samples, *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.* 2: 113-114.

Wong, H.Y., Simon Lim, E.S. and Tan-Siew,
W.F., 2012, Amplification volume reduction
on DNA database samples using FTA™

classic card, Forensic Sci. Int. Genet 6:
176-179.