



การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC
PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System
แบบครึ่งปฏิบัติการสำหรับการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ

โดย

ร้อยตำรวจโทณัฐวุฒิ เสาร์แก้ว

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (นิติวิทยาศาสตร์)

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ปีการศึกษา 2563

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC
PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System
แบบครึ่งปฏิบัติการสำหรับการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ

โดย

ร้อยตำรวจโทณัฐวุฒิ เสาร์แก้ว

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (นิติวิทยาศาสตร์)
คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

COMPARISON OF THE EFFICIENCY OF GLOBALFILER™ IQC
PCR AMPLIFICATION KIT AND POWERPLEX® FUSION 6C SYSTEM
WITH HALF VOLUME REACTION FOR FORENSIC TRACE DNA

BY

POL.LT. NATTAWOOT SAOKAEW



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE (FORENSIC SCIENCE)
FACULTY OF ALLIED HEALTH SCIENCES
THAMMASAT UNIVERSITY
ACADEMIC YEAR 2020
COPYRIGHT OF THAMMASAT UNIVERSITY

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิกิริยา สำหรับการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ
ชื่อผู้เขียน	ร้อยตำรวจโทณัฐภูมิ เสาร์แก้ว
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา/คณะ/มหาวิทยาลัย	นิติวิทยาศาสตร์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ ดร. รัชนิวรรณ อุ่นแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	พันตำรวจโทหญิง เกวลี จันทร์พันธุ์
ปีการศึกษา	2563

บทคัดย่อ

งานทางด้านนิติพันธุศาสตร์มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องนับตั้งแต่การคิดค้นวิธีการตรวจจำนวนซ้ำของ Short Tandem Repeat (STRs) หลายตำแหน่งด้วยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ ซึ่งในปี ค.ศ. 1997 ระบบฐานข้อมูลดีเอ็นเอ The Combined DNA Index System (CODIS) ได้รายงานตำแหน่ง STRs มาตรฐานในการตรวจพิสูจน์บุคคล 13 ตำแหน่ง และในปี ค.ศ. 2017 มีการเพิ่มจำนวนตำแหน่ง STRs พื้นฐานอีก 7 ตำแหน่ง รวมเป็น 20 ตำแหน่ง เพื่อพัฒนาประสิทธิภาพในการตรวจพิสูจน์ให้มากขึ้น อย่างไรก็ตามเทคนิคการวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธีนี้ มีค่าใช้จ่ายสูง การวิเคราะห์แบบครึ่งปฏิกิริยาของชุดน้ำยาตรวจดีเอ็นเออาจจะนำมาใช้แทนที่ได้ อย่างไรก็ตามต้องมีการศึกษาและประเมินประสิทธิภาพก่อนนำมาใช้จริงกับงานคดี งานวิจัยนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินและเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดน้ำยาตรวจดีเอ็นเอสำเร็จรูปสองชนิดที่สามารถตรวจ STRs ได้มากกว่า 20 ตำแหน่ง ได้แก่ GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิกิริยา โดยวิเคราะห์จาก การศึกษาสัญญาณรบกวนพื้นฐาน การศึกษาความไว และสโทแคสติก การศึกษาดีเอ็นเอผสม การศึกษาด้วยยับยั้ง การศึกษาความแม่นยำและความถูกต้อง และการศึกษาผลการตรวจดีเอ็นเอ จากตัวอย่างจริง ด้วยสารควบคุมเชิงบวก สารควบคุมเชิงลบ ดีเอ็นเอมาตรฐาน และตัวอย่างจากวัตถุพยานจริง จำนวน 31 ตัวอย่าง จากการประเมินประสิทธิภาพของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR

Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System พบว่าน้ำยาทั้งสองชุดมีปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมต่อการทดสอบเครื่องปฏิกิริยาเท่ากันที่ 0.5 นาโนกรัม และมีเกณฑ์ขั้นต่ำ และเกณฑ์สโ-แคสติกในการอ่านผลเท่ากับ 45, 610 RFU และ 60, 970 RFU ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำยาทั้งสองชนิดพบว่าน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C system ทนทานต่อตัวยับยั้ง 3 ชนิด (เมลานิน เฮมาทิน และฮิวมิกแอซิด) และให้ความสมดุลของพีคเฮเทอโรไซกัสที่ดีกว่า แต่ให้ค่าเฉลี่ยความสูงของพีคเฮเทอโรไซกัส และมีความไวต่อสัดส่วนรองของดีเอ็นเอผสมน้อยกว่าชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit นอกจากนี้ชุดน้ำยาทั้งสองชนิด สามารถตรวจวัดแอลลีลได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ และให้ผลที่สอดคล้องกันอย่างสมบูรณ์ เมื่อเปรียบเทียบความไวในการตรวจวัดแอลลีลแล้วพบว่าน้ำยาทั้งสองชนิดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.144$) จึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้น้ำยาทั้งสองชนิดแบบเครื่องปฏิกิริยาในงานตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอทางนิติวิทยาศาสตร์

คำสำคัญ: นิติพันธุศาสตร์, ลำดับซ้ำเรียงต่อเนื่องแบบสั้น, โกลบอลไฟเลอร์ไอควิซี, พาวเวอร์เพล็กซ์ซิกซี, เครื่องปฏิกิริยา

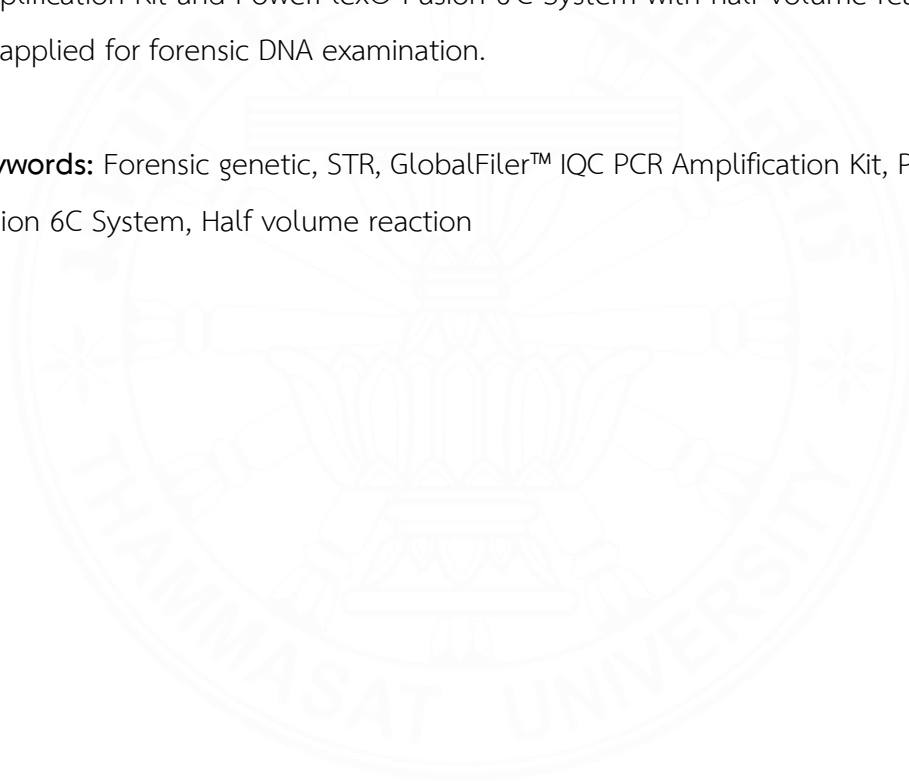
Thesis Title	COMPARISON OF THE EFFICIENCY OF GLOBALFILER™ IQC PCR AMPLIFICATION KIT AND POWERPLEX® FUSION 6C SYSTEM WITH HALF VOLUME REACTION FOR FORENSIC TRACE DNA
Author	Pol.Lt.Nattawoot Saokaew
Degree	Master of Science
Major Field/Faculty/University	Forensic Sciences Faculty of Allied Health Sciences Thammasat University
Thesis Advisor	Associate Professor Ratchaneewan Aunpad, Ph.D.
Thesis Co-Advisor	Pol.Lt. Col. Kewalee Junpan
Academic Year	2020

ABSTRACT

Forensic genetics has been consecutively improved since Short Tandem Repeat (STRs) analysis by multiplex PCR was discovered. In 1997, the Combined DNA Index System (CODIS) reported 13 core STRs loci for DNA-Based Human Identification. Since 2017, an additional of 7 STRs has been required in order to improve effectiveness of the method. Due to the high processing cost of full volume reaction, half volume reaction could be used to replace. However, it is necessary to validate and evaluate effectiveness of half volume reaction before applying in real case works. This study aims to evaluate and compare the performance of two commercial kits, GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit and PowerPlex® Fusion 6C, which can detect CODIS 20 STRs with half volume reaction through analysis of baseline noise, sensitivity and stochastic, DNA mixture, inhibitor tolerance, accuracy and precision and real-case work robustness by comparing positive control, negative control, standard material and 31 samples of real-case work. The results indicated that the optimal DNA concentration for half volume reaction of GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit and PowerPlex® Fusion 6C System was equal to 0.5 ng. The minimum threshold and stochastic threshold obtained

from GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit and PowerPlex® Fusion 6C System were 45 and 610 RFU and 60 and 970 RFU, respectively. PowerPlex® Fusion 6C System can tolerate to many inhibitors including melanin, hematin, and humic acid and gave better heterozygous balance, however it showed lower heterozygous peak height and poorer recovering of minor contributors of mixture profile. Both kits showed the same performance on accuracy and precision and case work profiling. The sensitivity of allele detection of PowerPlex® Fusion 6C System was not significantly different from that of GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit ($p=0.144$). In summary, GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit and PowerPlex® Fusion 6C System with half volume reaction could be applied for forensic DNA examination.

Keywords: Forensic genetic, STR, GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit, PowerPlex® Fusion 6C System, Half volume reaction



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้ได้รับความช่วยเหลือทั้งร่างกาย และแรงใจจากบุคคลหลายท่าน จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณทุกท่านที่ได้มอบความรู้ คำปรึกษา และข้อคิดเห็นอัน เป็นประโยชน์ต่อการทำวิทยานิพนธ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งท่านอาจารย์ที่ปรึกษา ท่านอาจารย์ที่ปรึกษา ร่วม และท่านคณะกรรมการทุกท่าน

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.รัชนิวรรณ อุ้นแพทย์ อาจารย์ที่ปรึกษา และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดวงเนตร พิพัฒน์สถิตพงศ์ จากบัณฑิตศึกษา คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ ให้คำปรึกษา ช่วยแก้ไขปัญหาในงานวิจัย ช่วยเหลือจัดหาวัสดุ และอุปกรณ์ในงานวิจัย รวมถึงดูแลข้าพเจ้าเป็นอย่างดีจนวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จ

ขอขอบพระคุณ พันตำรวจเอกหญิง แววกาญจน์ ดวงทาชม และ พันตำรวจโทหญิง เกวลี จันทรพันธุ์ จากกลุ่มงานตรวจชีววิทยาและดีเอ็นเอ สำนักงานพิสูจน์หลักฐานตำรวจ ที่จุดประกายให้ข้าพเจ้าสนใจในงานวิจัยนี้ รวมถึงให้คำปรึกษางานวิจัยในเชิงปฏิบัติ และช่วยติดต่อ จัดหาชุดน้ำยาตรวจดีเอ็นเอที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ นายจักรพงษ์ มานะโส และ น.ส.สุพรรณษา คงดี จากบริษัท ยีนพลัส จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการจัดหาวัสดุ และชุดน้ำยาที่ใช้ในงานวิจัย รวมถึงให้ความรู้ และ คำปรึกษาในงานวิจัยนี้ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ คุณปองทิพย์ ใจดี และบริษัท ไอ ที เอส (ไทยแลนด์) จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์ชุดน้ำยาที่ใช้ในงานวิจัย รวมถึงให้ความรู้ และคำปรึกษาในงานวิจัยนี้ ข้าพเจ้า ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณผู้ร่วมงานในกลุ่มงานตรวจชีววิทยาและดีเอ็นเอทุกท่าน ที่สนับสนุน แรงกาย แรงใจ ผลักดันให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี โดยเฉพาะ ร.ต.ท.ทนายวีร์ รมแก้ว และ ร.ต.อ.หญิง ปานชีวา ปัญจะเรือง

ขอขอบพระคุณครอบครัว ที่เป็นทุกอย่างในชีวิตของข้าพเจ้า และสนับสนุนค่าใช้จ่าย ต่าง ๆ สำหรับการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษานี้

ร้อยตำรวจโทณัฐภูมิ เสาร์แก้ว

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	(1)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	(3)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญตาราง	(11)
สารบัญภาพ	(13)
รายการสัญลักษณ์และคำย่อ	(15)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา	3
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.4 สมมติฐานการวิจัย	3
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ดีเอ็นเอ	4
2.1.1 น้ำตาลดีออกซีไรโบส (Deoxyribose)	4
2.1.2 ไนโตรจีนัสเบส	5
2.1.3 หมู่ฟอสเฟต	5
2.2 แหล่งที่อยู่ของดีเอ็นเอ	6
2.3 จีโนมมนุษย์	7

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.4 ลำดับซ้ำเรียงต่อเนื่องแบบสั้น (Short tandem repeat; STRs)	9
2.5 ชุดน้ำยาสำเร็จรูปสำหรับการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ	11
2.6 ชุดน้ำยาสำเร็จรูปสำหรับการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System	14
2.6.1 GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit	14
2.6.2 PowerPlex® Fusion 6C System	14
2.7 การเก็บและการจัดการตัวอย่าง (Sample collection)	17
2.8 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction)	18
2.9 การวัดปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Quantitation)	19
2.10 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (Amplification)	21
2.11 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA Analysis)	23
2.12 การตีความผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ (Interpretation)	25
2.13 การทดสอบความถูกต้องสำหรับห้องปฏิบัติการตรวจพิสูจน์ STRs ทางนิติวิทยาศาสตร์	28
2.13.1 การทดสอบความไวและการศึกษา Stochastic	28
2.13.2 การทดสอบตัวอย่างจากบุคคลอ้างอิง (Known) และตัวอย่างจริง หรือ Non-probative หรือ mock sample)	29
2.13.3 การทดสอบความแม่นยำ และความถูกต้อง	29
2.13.4 การทดสอบดีเอ็นเอผสม	29
2.13.5 การทดสอบการปนเปื้อนในห้องปฏิบัติการ	29
2.14 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	30
 บทที่ 3 วิธีการวิจัย	 46
3.1 วัสดุและอุปกรณ์	46
3.1.1 ตัวอย่างดีเอ็นเอ	46
3.1.2 ชุดน้ำยาสำเร็จรูปและสารเคมี	47

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.1.3 อุปกรณ์	48
3.1.4 เครื่องมือ	48
3.2 การตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ	49
3.2.1 การวัดปริมาณดีเอ็นเอ	49
3.2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	49
3.2.2.1 ชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit	49
3.2.2.2 ชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C System	50
3.2.3 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอ	50
3.3 การศึกษา Base line	51
3.4 การศึกษาความไว (Sensitivity) และ เกณฑ์สโตนแคสติง	51
3.5 การศึกษาดีเอ็นเอผสม	52
3.6 การศึกษาตัวยับยั้งในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Inhibitor study)	52
3.6.1 วิธีการเตรียมสารยับยั้ง	52
3.6.1.1 เมลานิน	52
3.6.1.2 เฮมาทิน	53
3.6.1.3 ฮิวมิกแอซิด	53
3.7 การศึกษาความแม่นยำและความถูกต้อง	53
3.7.1 การศึกษาความแม่นยำ (Precision study)	53
3.7.1.1 การศึกษาการทำซ้ำของขนาดดีเอ็นเอ (Repeatability of sizing)	53
3.7.1.2 การศึกษาการทำซ้ำของความสูงพีค (Repeatability of peak height)	53
3.7.2 การศึกษาการผลิตซ้ำ (Reproducibility)	53
3.7.3 การศึกษาความถูกต้อง (Accuracy study)	54
3.8 การประเมินประสิทธิภาพของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System เมื่อทดสอบด้วยตัวอย่างจริง	54

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.9 การวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อประเมินและเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิบัติการ	54
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	56
4.1 การศึกษา Base line	56
4.2 การศึกษาความไว (Sensitivity) และ เกณฑ์สโทแคสติก	58
4.2.1 การประเมินและเปรียบเทียบความไวของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิบัติการ	58
4.2.2 การประเมินและเปรียบเทียบความสมดุลพิกเฮเทอโรไซกัสของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิบัติการ	62
4.2.3 การประเมินและเปรียบเทียบเกณฑ์สโทแคสติกของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิบัติการ	64
4.2.4 การประเมินปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นที่เหมาะสมของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิบัติการ	67
4.3 การศึกษาดีเอ็นเอผสม	67
4.4 การศึกษาตัวยับยั้งในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Inhibitor study)	74
4.5 การศึกษาความแม่นยำและความถูกต้อง	77
4.5.1 การศึกษาความแม่นยำ	77
4.5.1.1 การศึกษาการทำซ้ำของขนาดดีเอ็นเอ (Repeatability of sizing)	77

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.5.1.2 การศึกษาการทำซ้ำของความสูงพีค (Repeatability of peak height)	77
4.5.1.3 การศึกษาการผลิตซ้ำ (Reproducibility study)	78
4.5.2 การศึกษาความถูกต้อง	78
4.6 การประเมินและเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิกิริยาเมื่อทดสอบด้วยตัวอย่างจริง	80
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	84
5.1 สรุปผลการวิจัย	84
5.2 ข้อเสนอแนะ	84
รายการอ้างอิง	85
ภาคผนวก	91
ภาคผนวก ก	92
ประวัติผู้เขียน	95

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	13
ชุดน้ำยาตรวจ STRs สำเร็จรูปที่พัฒนาในช่วงปี ค.ศ. 2000 ถึงปี ค.ศ. 2011	
2.2	15
ชื่อตำแหน่งและแอลลีลของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit	
2.3	16
ชื่อตำแหน่งและแอลลีลของชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C System	
2.4	19
ชื่อชุดน้ำยาสกัดดีเอ็นเอทางนิติวิทยาศาสตร์ และบริษัทผู้ผลิต	
2.5	23
ตัวบ่งชี้ที่เกี่ยวข้องกับตัวอย่างทางนิติวิทยาศาสตร์	
2.6	25
การตัดสินใจของผู้วิเคราะห์ในการตีความผลการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ	
2.7	32
งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาประสิทธิภาพของชุดน้ำยาตรวจ STRs	
3.1	47
ประเภทตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย	
3.2	49
สถานะพีซีอาร์แบบเรียลไทม์ของชุดน้ำยาสำเร็จรูป Quantifiler® HP	
3.3	50
สถานะที่ใช้ในปฏิกิริยา Multiplex PCR ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป GlobalFiler™ IQC PCR Amplification และ PowerPlex® Fusion 6C System	
3.4	52
การเตรียมตัวอย่างของการทดสอบตัวบ่งชี้ (เมลานิน เฮมาทิน และ ฮิวมิกแอซิด)	
4.1	56
การประเมินเกณฑ์ขั้นต่ำของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit แบบครึ่งปฏิกิริยา และวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรม ABI 3500	
4.2	57
การประเมินเกณฑ์ขั้นต่ำของชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิกิริยา และวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรม ABI 3500	
4.3	65
ความสูงของพีคของแต่ละแอลลีลที่ตรวจพบที่ชุดการทดสอบที่ปริมาณดีเอ็นเอ 8 pg-63 pg ของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit แบบครึ่งปฏิกิริยา	

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.4	ความสูงของพีคของแต่ละแอลลีลที่ตรวจพบที่ชุดการทดสอบที่ปริมาณ ดีเอ็นเอ 8 pg-63 pg ของชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิกิริยา	66
4.5	การวิเคราะห์ดีเอ็นเอผสมของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit แบบครึ่งปฏิกิริยา	69
4.6	การวิเคราะห์ดีเอ็นเอผสมของชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิกิริยา	71
4.7	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของค่าเฉลี่ยความสูงของพีคเฮเทอโรไซกัส ของการทดสอบความไวด้วยชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิกิริยา	77
4.8	ภาพรวมดีเอ็นเอที่ได้จากดีเอ็นเอมาตรฐาน 2391d component c ของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิกิริยา	79
4.9	ผลการทดสอบดีเอ็นเอจากตัวอย่างจริงของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิกิริยา	81
4.10	ผลการทดสอบดีเอ็นเอจากตัวอย่างจริงด้วยชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit (GF-IQC) และ PowerPlex® Fusion 6C (P-6C) แบบครึ่งปฏิกิริยา	82

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	องค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์	4
2.2	สายพอลินิวคลีโอไทด์ และการเข้าสู่สมของไนโตรจีนัสเบส	6
2.3	ลักษณะของพอลินิวคลีโอไทด์ ไครโมโซมภายในนิวเคลียส และดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรีย	7
2.4	องค์ประกอบของจีโนมมนุษย์	9
2.5	วิธีการสกัดดีเอ็นเอแบบ Solid-phase extraction	18
2.6	Taq man oligonucleotide และกระบวนการวัดปริมาณด้วย Taq man oligonucleotide	19
2.7	ปฏิกิริยา Real-time PCR	20
2.8	การคำนวณปริมาณดีเอ็นเอตัวอย่างจากค่า Threshold cycle (CT)	21
2.9	กระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์	22
2.10	ลักษณะภายนอกเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรม ABI 3500	24
2.11	ลักษณะภายในเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรม ABI 3500	24
2.12	อิเล็กโทรโฟโกราแกรม (Electropherogram) ของ DNA control 007 เมื่อทดสอบด้วยชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit	25
2.13	ลักษณะของพีคที่เป็น Stutter	26
2.14	ลักษณะของพีคที่เป็น Non-template addition	27
4.1	แผนภูมิแสดงค่าเฉลี่ยร้อยละของแอลลีลที่ตรวจวัดได้จากการทดสอบความไวของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิกิริยา	59
4.2	แผนภูมิแสดงค่าเฉลี่ยร้อยละของแอลลีลที่ตรวจวัดได้จากการทดสอบความไวของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิกิริยา ในช่วง 8 pg-63 pg	59
4.3	แผนภูมิแสดงค่าเฉลี่ยความสูงของพีคเฮเทอโรไซกัสจากการทดสอบความไวของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิกิริยา	61

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.4	แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความสมดุลของพีคเฮเทอโรไซกัสและความสูงของพีคจากการทดสอบความไวของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit แบบครึ่งปฏิบัติการ	63
4.5	แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความสมดุลของพีคเฮเทอโรไซกัส และความสูงของพีคจากการทดสอบความไวของชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิบัติการ	63
4.6	แผนภูมิแสดงการเปรียบเทียบสัดส่วนดีเอ็นเอผสมจากการทดลองกับสัดส่วนดีเอ็นเอผสมตามทฤษฎีระหว่างชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิบัติการ	68
4.7	แผนภูมิแสดงการเปรียบเทียบร้อยละแอลลีลที่ตรวจวัดได้และความสูงพีคของดีเอ็นเอมาตรฐาน 1224 ปริมาณ 0.5 ng ที่มีตัวยับยั้งเมลานิน ของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิบัติการ	75
4.8	แผนภูมิแสดงการเปรียบเทียบร้อยละแอลลีลที่ตรวจวัดได้และความสูงพีคของดีเอ็นเอมาตรฐาน 1224 ปริมาณ 0.5 ng ที่มีตัวยับยั้งเฮมาทินของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิบัติการ	76
4.9	แผนภูมิแสดงการเปรียบเทียบร้อยละแอลลีลที่ตรวจวัดได้และความสูงพีคของดีเอ็นเอมาตรฐาน 1224 ปริมาณ 0.5 ng ที่มีตัวยับยั้งฮิวมิกแอซิด ของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิบัติการ	76

รายการสัญลักษณ์และคำย่อ

สัญลักษณ์/คำย่อ	คำเต็ม/คำจำกัดความ
GF-IQC	GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit
P-6C	PowerPlex® Fusion 6C System
PHR	Heterozygous peak height ratio
STRs	Short Tandem Repeat
°C	องศาเซลเซียส
PCR	Polymerase chain reaction
ng	นาโนกรัม
pg	พิโคกรัม
mL	มิลลิลิตร
μL	ไมโครลิตร
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantitation
RFU	Relative Fluorescence Units

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาวิจัย

การตรวจพิสูจน์ทางชีววิทยาและดีเอ็นเอมีความสำคัญในกระบวนการยุติธรรม เนื่องจากดีเอ็นเอเป็นหนึ่งในวัตถุพยานที่สามารถเชื่อมโยงสถานที่เกิดเหตุเข้ากับผู้กระทำความผิด หรือผู้เสียหายได้⁽¹⁾ ส่งผลให้กระบวนการยุติธรรมของไทยคาดหวังในผลตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอมากขึ้น จากสถิติในช่วงปี พ.ศ. 2557 จนถึงพ.ศ. 2560 มีการส่งตัวอย่างจากสถานที่เกิดเหตุมาตรวจพิสูจน์ที่กลุ่มงานตรวจชีววิทยาและดีเอ็นเอ กองพิสูจน์หลักฐานกลาง สำนักงานพิสูจน์หลักฐานตำรวจ เพิ่มขึ้นเฉลี่ยปีละ 3,740 ตัวอย่าง คิดเป็น 30% ของแต่ละปี และในปี พ.ศ. 2561 มีตัวอย่างส่งตรวจพิสูจน์ที่มากถึง 35,021 ตัวอย่าง ซึ่งเพิ่มขึ้นถึง 18,226 ตัวอย่าง คิดเป็น 52% ของตัวอย่างในปี พ.ศ. 2560 ด้วยเหตุนี้ในแต่ละปีค่าใช้จ่ายสำหรับการยืนยันตัวบุคคล และการเชื่อมโยงบุคคลกับวัตถุพยานด้วยวิธีการตรวจพิสูจน์ทางชีววิทยาและดีเอ็นเอจึงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง

การตรวจพิสูจน์บุคคลด้วยดีเอ็นเอใช้การระบุแอลลีลของลำดับซ้ำเรียงต่อเนื่องแบบสั้น หรือ Short Tandem Repeat (STRs) มากกว่า 1 ตำแหน่งเพื่อลดโอกาสที่จะพบภาพรวมดีเอ็นเอ (DNA Profile) ที่เหมือนกันในกลุ่มประชากร⁽²⁾ โดยในปี ค.ศ. 1997 ห้องปฏิบัติการของ FBI (Federal Bureau of Investigation) ที่มีระบบฐานข้อมูลดีเอ็นเอ CODIS (The Combined DNA Index System) ได้รายงานตำแหน่ง STRs มาตรฐานในการตรวจพิสูจน์บุคคล 13 ตำแหน่ง ได้แก่ CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, vWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51 และ D21S11⁽³⁾ ต่อมาในปี ค.ศ. 2017 FBI ได้เพิ่มตำแหน่ง STRs อีก 7 ตำแหน่งประกอบด้วย D1S1656, D2S441, D2S1338, D10S1248, D12S391, D19S433 และ D22S1045 รวมเป็น 20 ตำแหน่ง⁽⁴⁾ เพื่อรองรับประชากรของโลกที่มากขึ้น ปัจจุบันผู้ผลิตหลายบริษัทจึงผลิตชุดน้ำยาสำเร็จรูปสำหรับการตรวจ STRs ที่ครอบคลุมทั้ง 20 ตำแหน่ง เช่น GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit หรือ PowerPlex® Fusion 6C System เป็นต้น^(5, 6) อย่างไรก็ตามเมื่อมีการเปลี่ยนมาใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปชุดใหม่ ห้องปฏิบัติการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอจะต้องมีการทดสอบความถูกต้องของชุดน้ำยาสำเร็จรูปชุดใหม่ก่อนใช้งานจริงเสมอเพื่อให้มั่นใจว่า ได้ผลการทดสอบที่ถูกต้อง

Scientific Working Group on DNA Analysis Method หรือ SWGDAM ⁽⁷⁾ ได้กำหนดแนวปฏิบัติในการทดสอบความถูกต้องของชุดน้ำยาสำเร็จรูปสำหรับการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอโดยระบุไว้ว่าห้องปฏิบัติการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอจะต้องทดสอบความถูกต้องของชุดน้ำยา และวิธีการปฏิบัติงานโดยใช้พารามิเตอร์ภายใต้การควบคุมในห้องปฏิบัติการ เช่น ความไว การวิเคราะห์ดีเอ็นเอผสม การทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงตรง การทดสอบการปนเปื้อน และการทดสอบตัวอย่างที่ได้มาจากวัตถุพยานจริง พารามิเตอร์ดังกล่าวจะถูกนำมาพิจารณาและประเมินเกณฑ์ขั้นต่ำ (Minimum threshold) และ เกณฑ์สโตแคสติก (Stochastic threshold) เพื่อใช้ตีความการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ ⁽⁸⁾ ปัจจุบันมีการรายงานถึงค่า Limit of Quantitation (LOQ) ที่ใช้สำหรับกำหนดเกณฑ์ขั้นต่ำ และ เกณฑ์สโตแคสติกของชุดน้ำยาสำเร็จรูปหลายชุด ⁽⁹⁻¹²⁾ แต่ยังไม่มีการรายงานเกณฑ์ดังกล่าวกับชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิกิริยา นอกจากนี้ยังมีการรายงานถึงความสำเร็จในการลดปริมาตรชุดน้ำยาสำเร็จรูป (Reduced volume) ชนิดอื่นสำหรับตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ ให้ผลการตรวจพิสูจน์ที่สอดคล้องกับการทดสอบด้วยปฏิกิริยาแบบเต็ม (Full volume reaction) ^(9, 13-18) ซึ่งการลดปริมาตรน้ำยาสำเร็จรูปจะช่วยลดงบประมาณในการตรวจพิสูจน์ได้ แต่ต้องทดสอบความถูกต้องเพื่อยืนยันความใช้ได้ และนำผลลัพธ์ที่ได้มาใช้ในการอ่านผลการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ เพื่อสร้างความเชื่อมั่นให้กับกระบวนการยุติธรรมว่า ผลการตรวจพิสูจน์นั้นมีความถูกต้องและเชื่อถือได้

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ในการศึกษาความถูกต้องของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิกิริยา (Half volume reaction) รวมถึงเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดน้ำยาสำเร็จรูปดังกล่าวด้วยพารามิเตอร์ที่ระบุไว้ในแนวปฏิบัติของ SWGDAM ด้วยสารควบคุม สารมาตรฐาน และตัวอย่างจริงจากสถานที่เกิดเหตุ ประโยชน์อันสำคัญของงานวิจัยนี้คือสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปใช้กำหนดแนวทางการอ่านผลการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ และวิเคราะห์ผลการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ ของกลุ่มงานตรวจชีววิทยาและดีเอ็นเอ กองพิสูจน์หลักฐานกลาง สำนักพิสูจน์หลักฐานตำรวจ เพื่อยืนยันความถูกต้อง เป็นมาตรฐานตามหลักสากล และสร้างความน่าเชื่อถือเพื่อนำผลการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอไปใช้ในกระบวนการยุติธรรม อันจะส่งผลให้ผู้กระทำความผิดได้รับโทษทางกฎหมาย และผู้เสียหายได้รับความยุติธรรมอย่างแท้จริง

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เพื่อประเมินประสิทธิภาพและความถูกต้องของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิกิริยา

1.2.2 เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิกิริยา

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 สามารถใช้ชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิกิริยา เพื่อประหยัดค่าใช้จ่ายในการตรวจพิสูจน์

1.3.2 สามารถนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษามาวางแผนแนวทางการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอของกลุ่มงานตรวจชีววิทยาและดีเอ็นเอ กองพิสูจน์หลักฐานกลาง สำนักงานพิสูจน์หลักฐานตำรวจ ตามมาตรฐานสากลได้

1.4 สมมติฐานการวิจัย

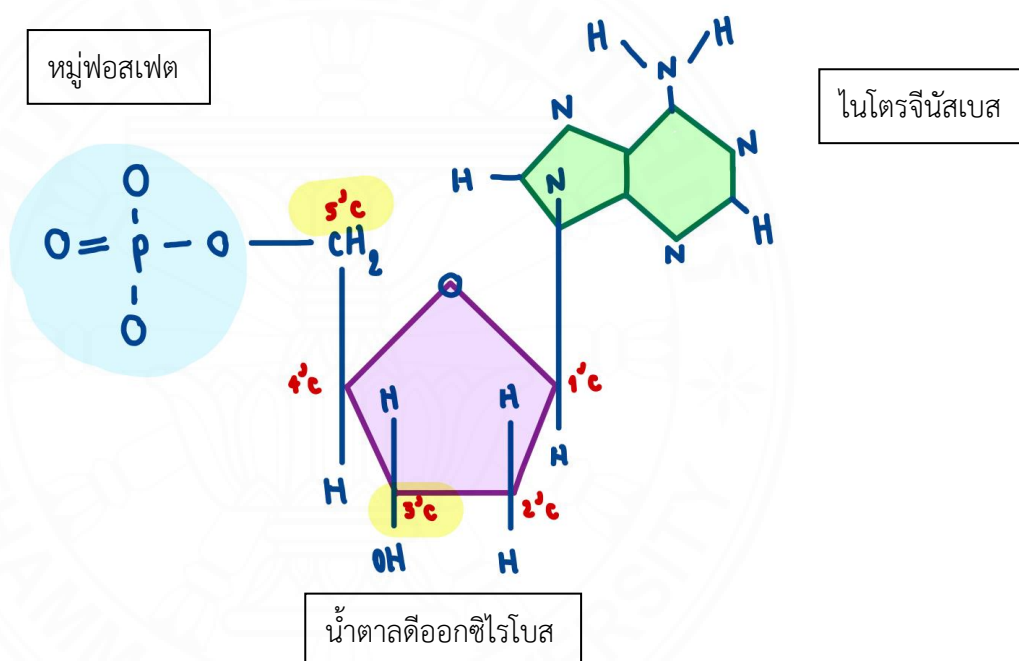
ชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิกิริยาให้ผลลัพธ์ที่ถูกต้อง มีความสอดคล้องกันและใช้ในการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอได้

บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอ (DNA) มีชื่อเต็มว่า กรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (Deoxyribonucleic acid) จัดเป็นสารชีวโมเลกุลประเภทกรดนิวคลีอิก (Nucleic acid) มีหน้าที่เก็บรหัสพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตและถ่ายทอดพันธุกรรมจากรุ่นสู่รุ่น หน่วยย่อยของดีเอ็นเอเรียกว่า นิวคลีโอไทด์ (Nucleotides) ⁽¹⁹⁾ (ภาพที่ 2.1) ประกอบด้วยส่วนประกอบ 3 ส่วนดังนี้



ภาพที่ 2.1 องค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์

2.1.1 น้ำตาลดีออกซีไรโบส (Deoxyribose)

คือน้ำตาลที่มีคาร์บอนเป็นส่วนประกอบ 5 อะตอม เรียกว่าเพนโตส (Pentose) คาร์บอนแต่ละตำแหน่งจะถูกตั้งชื่อเป็น 1'-5' เพื่อใช้บ่งชี้ว่าแต่ละตำแหน่งทำพันธะกับโครงสร้างใดเพื่อประกอบกันเป็นนิวคลีโอไทด์ ซึ่งแต่ละตำแหน่งมีรายละเอียดดังนี้

- ตำแหน่ง 1' ทำพันธะกับไนโตรจีนัสเบส (Nitrogenous base) ด้วยพันธะ N-Glycosidic

- ตำแหน่ง 2' ประกอบด้วยอะตอมของไฮโดรเจน ลักษณะดังกล่าวทำให้ดีเอ็นเอแตกต่างจากอาร์เอ็นเอ (RNA) โดยอาร์เอ็นเอจะเป็นหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl) ด้วยเหตุนี้จึงเรียก

น้ำตาลที่เป็นส่วนประกอบของดีเอ็นเอว่า คือออกซีไรโบส (Deoxyribose) ส่วนอาร์เอ็นเอเรียกว่า น้ำตาลไรโบส (Ribose)

- ตำแหน่ง 3' เป็นที่อยู่ของหมู่ไฮดรอกซิล ซึ่งจะทำพันธะ 3'-5' ฟอสโฟไดเอสเทอร์ (3'-5' Phosphodiester bond) กับหมู่ฟอสเฟต (Phosphate group) ของนิวคลีโอไทด์ถัดไป และเรียกปลายด้านนี้ว่าด้าน 3'

- ตำแหน่ง 4' เป็นตำแหน่งที่ทำพันธะกับอะตอมของออกซิเจน

- ตำแหน่ง 5' จะเป็นส่วนที่ยื่นออกมาด้านข้าง ตรงปลายประกอบด้วยหมู่ -CH₂ ที่ทำพันธะกับหมู่ฟอสเฟตด้วยพันธะ 3'-5' ฟอสโฟไดเอสเทอร์ และเรียกปลายด้านนี้ว่าด้าน 5' ⁽²⁰⁾

2.1.2 ไนโตรจีนัสเบส

แบ่งเป็น 2 ประเภทได้แก่ เบสพิวรีน (Purine) และเบสไพริมิดีน (Pyrimidine)

- เบสพิวรีน : มีโครงสร้างเป็นวงแหวน 2 วง แบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ อะดีนีน (Adenine; A) และกัวนีน (Guanine; G) มีสูตรเคมีเป็น C₅H₅N₅ และ C₅H₆N₂O₂ ตามลำดับ

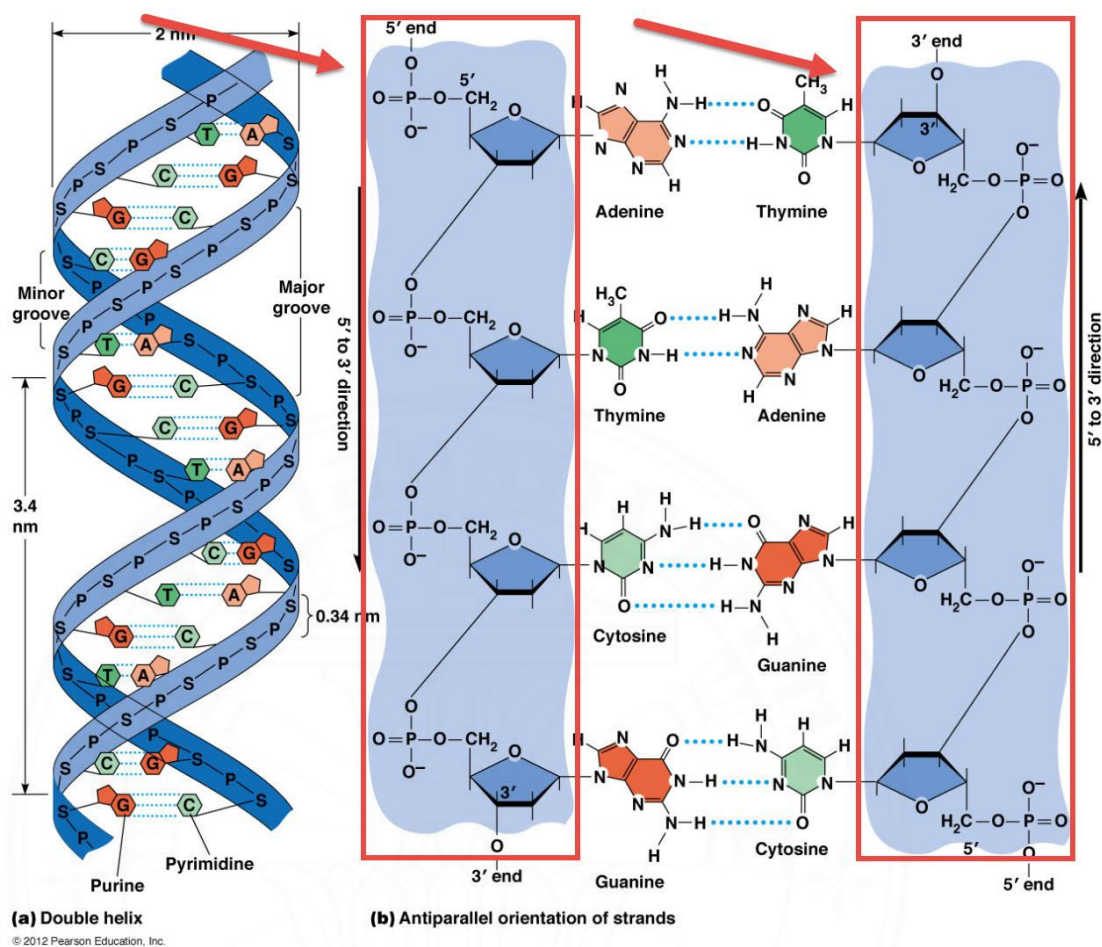
- เบสไพริมิดีน : มีโครงสร้างเป็นวงแหวนวงเดียว แบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ ไทมิน (Thymine; T) และไซโทซีน (Cytosine; C) มีสูตรเคมีเป็น C₅H₆N₂O₂ และ C₄H₄N₂O₂ ตามลำดับ

นอกจากนี้เบสพิวรีนยังทำพันธะไฮโดรเจนกับเบสไพริมิดีน โดยอะดีนีนคู่กับ ไทมิน (A-T) และ กัวนีนคู่กับไซโทซีน (G-C) เพื่อประกอบกันเป็นโครงสร้างของสายดีเอ็นเอที่เรียกว่า สภาวะคู่ขนานสลับทิศ (Anti-parallel polynucleotide strands) ⁽²¹⁾

2.1.3 หมู่ฟอสเฟต

หมู่ฟอสเฟตประกอบด้วยอะตอมฟอสฟอรัส 1 อะตอมที่ล้อมรอบด้วยอะตอมออกซิเจน ปกติแล้วอยู่ติดกับคาร์บอนตำแหน่ง 5' ของน้ำตาลดีออกซีไรโบส และสามารถทำพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์กับหมู่ไฮดรอกซิลกับคาร์บอนตำแหน่ง 3' ของนิวคลีโอไทด์ถัดไป ⁽²⁰⁾

พอลินิวคลีโอไทด์ (Polynucleotides) (ภาพที่ 2.2) คือ การต่อกันของนิวคลีโอไทด์ด้วยพันธะ 3'-5' ฟอสโฟไดเอสเทอร์จนเป็นสายยาว และเมื่อสายพอลินิวคลีโอไทด์มาเชื่อมเข้าด้วยกันเป็นสายคู่ (Double stranded) ด้วยพันธะไฮโดรเจนจากไนโตรจีนัสเบสที่เข้าคู่เป็นคู่สมกัน (Complementary) ทำให้ดีเอ็นเอมีโครงสร้างเป็นเกลียวคู่ (Double helix) โดยที่ทั้งสองสายมีทิศทางตรงข้ามกันเรียกว่าสภาวะคู่ขนานสลับทิศ (สายหนึ่งมีทิศทางจาก 3' ไป 5' และอีกสายหนึ่งมีทิศทางจาก 5' ไป 3') ⁽²⁰⁾

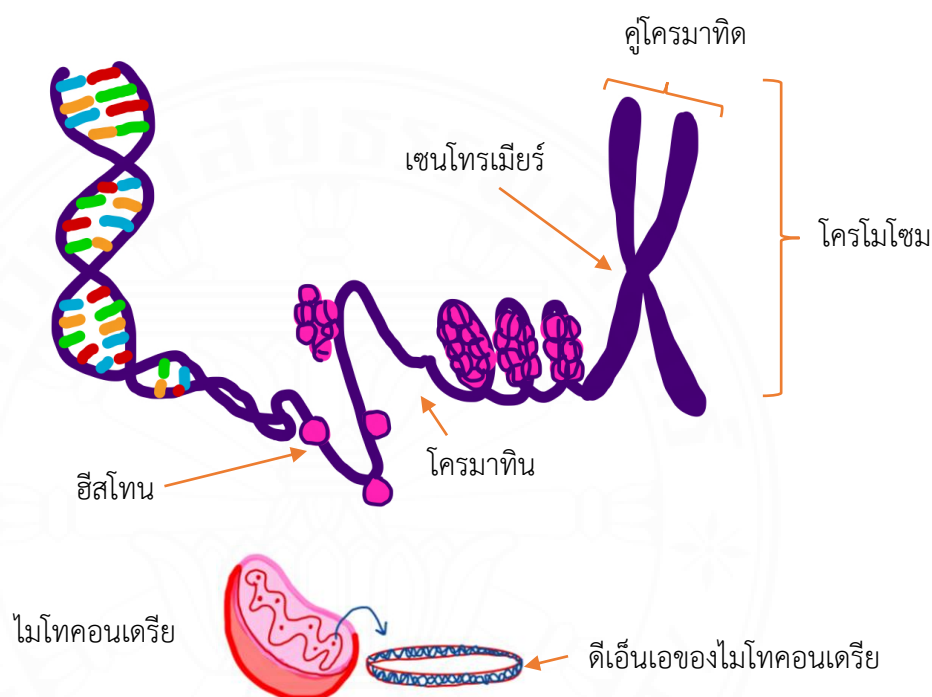


ภาพที่ 2.2 สายพอลินิวคลีโอไทด์ และการเข้าคู่สมของไนโตรจีนัสเบส (22)

2.2 แหล่งที่อยู่ของดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอเป็นสารพันธุกรรมของทั้งโพรแคริโอต (Prokaryotes) และยูแคริโอต (Eukaryotes) ในเซลล์โพรแคริโอต ดีเอ็นเอจะอยู่รวมกับส่วนประกอบอื่นภายในเซลล์ แต่ในยูแคริโอตดีเอ็นเอจะแยกส่วนกันกับส่วนประกอบอื่นโดยมีเยื่อหุ้มนิวเคลียส (Nuclear envelope) เป็นตัวแบ่ง นอกจากนี้สายดีเอ็นเอของยูแคริโอตจะพันรอบโปรตีนฮิสโตน (Histone) แล้วอัดกันเป็นเส้นเรียกว่าโครมาติน (Chromatin) ซึ่งมีลักษณะคล้ายเส้นด้าย (Threads) พบได้ในระยะอินเทอร์เฟส (Interphase) ของวัฏจักรเซลล์ แต่เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะก่อนไมโทซิส (Mitosis) โครมาตินจะอัดกันเป็นแท่งเรียกว่าโครโมโซม (Chromosome) ที่ประกอบด้วยโครมาทิด (Chromatid) สองแท่งมาเข้าคู่ด้วยกันที่ตำแหน่งเซนโทรเมียร์ (Centromere) เรียกว่าคู่โครมาทิด (Sister chromatids) (ภาพที่ 2.3) (23)

นอกจากนิวเคลียสแล้วไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) (ภาพที่ 2.3) เป็นอีกแหล่งหนึ่ง ที่พบดีเอ็นเอเช่นกัน มีการรายงานว่า 0.1% ของดีเอ็นเอทั้งหมดที่อยู่ในไมโทคอนเดรีย (Mitochondrial DNA) ประกอบด้วยรหัสพันธุกรรมขนาดประมาณ 20,000 คู่เบส ส่วนดีเอ็นเอ ในนิวเคลียส (Nuclear DNA) จะประกอบไปด้วยรหัสพันธุกรรมขนาดประมาณ 3.3 พันล้าน คู่เบส ดีเอ็นเอทั้งสองแหล่งจะเรียกรวมกันว่าจีโนม (Genome) หรือ จีโนมิกส์ดีเอ็นเอ (Genomic DNA) ⁽²⁴⁾



ภาพที่ 2.3 ลักษณะของพอลินิวคลีโอไทด์ โครโมโซมภายในนิวเคลียส และดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรีย

2.3 จีโนมมนุษย์

มีการศึกษาจีโนมของมนุษย์มาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1990 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้เข้าใจถึงลำดับ พันธุกรรมของมนุษย์ และในปี ค.ศ. 2001 ได้มีการรายงานข้อมูล 83-84% ของจีโนมมนุษย์ทั้งหมด ถึงแม้ว่าจะไม่ครอบคลุมจีโนมทั้งหมดแต่ก็ประกอบด้วยส่วนสำคัญ สำหรับส่วนที่เหลืออีก 16-17% เป็นเพียงส่วนท้ายของโครโมโซมที่เรียกว่า เทโลเมียร์ (Telomere) และบริเวณรอบเซนโทรเมียร์ ซึ่งทั้งสองบริเวณเป็นบริเวณที่แทบจะไม่มีลำดับที่เป็นยีน (Gene) กล่าวคือเป็นส่วนที่ไม่มีการแสดงออก ⁽²³⁾

นอกจากส่วนที่แสดงออกเป็นยีนและส่วนประกอบของยีนแล้ว จีโนมของมนุษย์กว่า 62% เป็นส่วนที่ไม่มีหน้าที่เรียกว่าบริเวณระหว่างยีน (Intergenic region) ส่วนใหญ่ประกอบด้วยยีน

ที่มีลำดับซ้ำกันหลาย ๆ ซ้ำ (Repetitive gene) (ภาพที่ 2.4) และสามารถแบ่งได้ 2 ประเภท ประกอบด้วย ⁽²³⁾

2.3.1 Interspersed repeats

คือ ลำดับที่มีส่วนซ้ำกระจายอยู่ภายในจีโนม

2.3.2 Tandemly repeated DNA

คือ ลำดับที่ซ้ำกันเองตั้งแต่หัวถึงท้ายตามลำดับซึ่ง Tandemly repeated DNA สามารถแบ่งได้เป็นอีก 2 ประเภทดังนี้

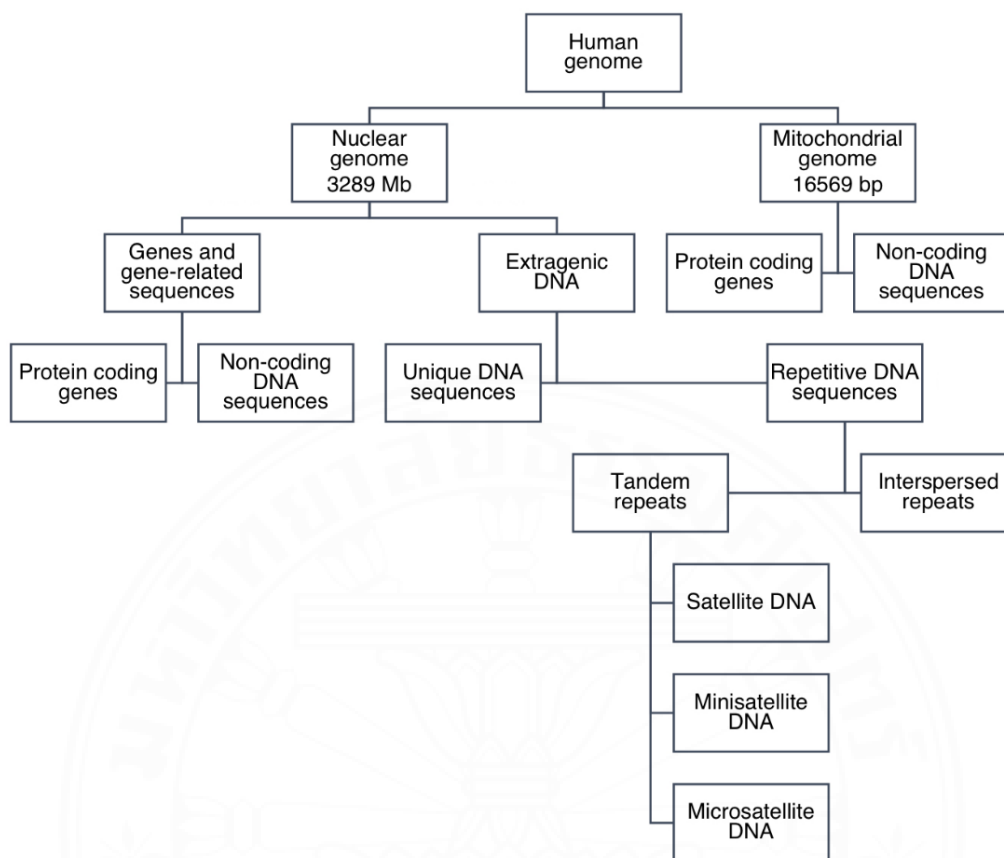
2.3.2.1 Minisatellites หรือ Variable number tandem repeat; VNTRs

ลำดับที่มีการซ้ำ 6-100 คู่เบส มีขนาดยาวที่สุดประมาณ 30,000 คู่เบส

2.3.2.2 Microsatellites หรือ Short tandem repeat; STRs

ลำดับที่มีการซ้ำ 1-6 คู่เบส และมีขนาดยาวที่สุดประมาณ 300 คู่เบส

ในช่วงแรกของการศึกษาจีโนมมนุษย์ นักวิทยาศาสตร์ให้ความสนใจกับส่วนของจีโนมที่แสดงออกเป็นยีนหรือส่วนประกอบของยีนมากกว่าบริเวณระหว่างยีน เพราะคิดว่าบริเวณดังกล่าวนี้เป็นส่วนของจีโนมที่ไม่มีประโยชน์ และได้เรียกยีนส่วนดังกล่าวว่า ยีนขยะ (Junk gene) แต่เมื่อมีการศึกษาและวิจัยส่วนบริเวณระหว่างยีนมากขึ้น จึงเริ่มประยุกต์ใช้ Microsatellites หรือ STRs ในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ โดยสิ่งมีชีวิตจะมีองค์ประกอบของ STRs ที่แตกต่างกันถึงแม้จะเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน ซึ่งเป็นเอกลักษณ์ของแต่ละบุคคล ดังนั้นจึงไม่มีบุคคลใดในโลกที่มีส่วนประกอบของ STRs เหมือนกัน ยกเว้นในฝาแฝดแท้ (Identical twins) และลักษณะของ STRs ในแต่ละบุคคลจะเรียกว่า ภาพรวมดีเอ็นเอ (DNA profile) หรือ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) นอกจากนี้ การศึกษาภาพรวมดีเอ็นเอยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการศึกษาความสัมพันธ์ทางเครือญาติและความสัมพันธ์ของกลุ่มประชากรได้ และใช้ได้ทั้งกับมนุษย์ สัตว์ และพืช ⁽²³⁾



ภาพที่ 2.4 องค์ประกอบของจีโนมมนุษย์⁽²⁵⁾

2.4 ลำดับซ้ำเรียงต่อเนื่องแบบสั้น (Short tandem repeat; STRs)

STRs ถูกนำมาประยุกต์ใช้กันอย่างแพร่หลายในด้านนิติวิทยาศาสตร์ เพราะสามารถเพิ่มจำนวน (Amplification) ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction; PCR) ได้ง่าย เนื่องจากมีขนาดเล็ก และส่วนที่ซ้ำกันนั้นมีความแตกต่างกันในแต่ละบุคคลจึงสามารถนำมาใช้ในการยืนยันตัวบุคคลได้ ซึ่ง STRs สามารถแบ่งประเภทได้ตามจำนวนหน่วยย่อย และรูปแบบของการซ้ำ⁽²⁶⁾ ดังนี้

2.4.1 ประเภทของ STRs ตามจำนวนหน่วยย่อย

2.4.1.1 Trinucleotide

เป็น STRs ที่มีหน่วยย่อย 3 คู่เบส เช่น (GCC) n

2.4.1.2 Tetranucleotide

เป็น STRs ที่มีหน่วยย่อย 4 คู่เบส เช่น (AATG)_n โดย STRs แบบนี้เป็นประเภทที่ถูกนำไปใช้มากที่สุด เพราะทำให้เกิดสิ่งแปลกปลอม (Artifacts) ที่เรียกว่า สตัทเตอร์ (Stutter) ได้น้อย และมีขนาดที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

2.4.1.3 Pentanucleotide

เป็น STRs ที่มีหน่วยย่อย 5 คู่เบส เช่น (AGAAA)_n

2.4.1.4 Hexanucleotide

เป็น STRs ที่มีหน่วยย่อย 6 คู่เบส เช่น (AGTACA)_n

2.4.2 ประเภทของ STRs ตามรูปแบบของการซ้ำ

2.4.2.1 Simple repeats

เป็น STRs ที่มีความยาว และลำดับเบสที่ซ้ำเหมือนกันทุกประการ เช่น (AATG)(AATG)(AATG) ของตำแหน่ง TPOX

2.4.2.2 Compound repeats

เป็น STRs ที่ประกอบด้วยลำดับเบส 2 หรือมากกว่า 2 ชุดเบสที่ซ้ำกัน เช่น (TCTA)(TCTG)(TCTA) ของตำแหน่ง vWA

2.4.2.3 Complex repeats

เป็น STRs ที่อาจจะประกอบด้วยความยาว และลำดับเบสที่หลากหลาย เช่น (TCTA)₄(TCTG)₆(TCTA)₃TA(TCTA)₃TCA(TCTA)₂TCCA TA (TCTA)₆ ของตำแหน่ง D21S11

2.4.2.4 Complex hypervariable repeats

เป็น STRs ที่มีความแตกต่างทั้งความยาว และลำดับเบสซึ่ง STRs แบบนี้ไม่นิยมใช้ในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ เพราะมีความซับซ้อนสูง ทำให้ยากต่อการตั้งชื่อแอลลีล (Allele) และประเมินความแปรปรวนในแต่ละห้องปฏิบัติการ อย่างไรก็ตามมีชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่มีการวิเคราะห์ด้วย STRs ประเภทนี้นั้นคือ ตำแหน่ง SE33 หรือ ACTBP2 ⁽²⁶⁾

สำหรับงานนิติวิทยาศาสตร์ ดีเอ็นเอที่ได้จากวัตถุพยาน มักเป็นดีเอ็นเอที่ไม่สมบูรณ์ซึ่งอาจเป็นดีเอ็นเอที่มีปริมาณน้อยและถูกทำลาย (Degraded DNA) หรือดีเอ็นเอที่มีการผสมกันระหว่างบุคคลจำนวน 2 คนขึ้นไป (Mixture DNA) ด้วยเหตุนี้ STRs จึงเหมาะสมกว่าการใช้ VNTRs เพราะมีขนาดเล็กกว่า (100-400 คู่เบส และ 400-1,000 คู่เบส ตามลำดับ) ทำให้ได้ผลผลิตพีซีอาร์ที่สมบูรณ์มากกว่า และโอกาสการหายไปของแอลลีล (Allele dropout) ต่ำกว่า จากที่กล่าวมาข้างต้นทำให้ STRs ประเภท Tetranucleotide ถูกเลือกใช้ในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ ⁽²⁶⁾

คุณสมบัติของ Tetranucleotide 4 ประการที่มีประโยชน์ในงานนิติวิทยาศาสตร์มีดังนี้

1. STRs เป็นแอลลิลที่มีขนาดเล็กเหมาะสำหรับการทำมัลติเพลกซ์พีซีอาร์ (Multiplex PCR)
2. STRs เป็นแอลลิลที่มีขนาดเล็กซึ่งช่วยลดโอกาสในการเกิดการหายไปของแอลลิล
3. STRs ทำให้ผลผลิตของพีซีอาร์นั้นมีขนาดเล็ก และได้ข้อมูลที่ครบถ้วนเหมาะสมสำหรับดีเอ็นเอที่ถูกทำลายหรือไม่สมบูรณ์
4. ลดโอกาสการเกิดสตัทเตอร์ ซึ่งมีประโยชน์ต่อการแปลผลดีเอ็นเอที่มีการผสมระหว่างบุคคล 2 คนขึ้นไป

สำหรับข้อกำหนดในการเลือกใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอของ STRs สำหรับการยืนยันตัวบุคคล ถูกอธิบายไว้ 6 ประการดังนี้

1. มีความสามารถในการแยกสูง โดยให้ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีมากกว่า 70% คือ สามารถแยกให้เห็นความแตกต่างของคู่แอลลิลเดียวกันในโครโมโซมที่ต่างกันได้มากกว่า 70% ขึ้นไป
2. แต่ละตำแหน่งจะต้องอยู่แยกกันในโครโมโซม เพื่อให้มั่นใจว่าจะไม่เกิดผลลัพธ์ที่คลุมเครืออันเกิดมาจากตำแหน่งที่อยู่ใกล้เคียงกัน
3. ให้ผลลัพธ์ที่ดีเมื่อเพิ่มจำนวนหลายตำแหน่งพร้อมกันด้วยวิธีมัลติเพลกซ์พีซีอาร์
4. มีโอกาสในการเกิดสตัทเตอร์ต่ำ
5. มีโอกาสในการเกิดการกลายพันธุ์ (Mutation) ต่ำ
6. ผลผลิตพีซีอาร์ของคู่แอลลิลต้องมีขนาด 90-500 คู่เบส ซึ่งมีขนาดเล็กและเหมาะสมกับการวิเคราะห์แบบมัลติเพลกซ์ แต่ยังคงให้ข้อมูลครบถ้วนเมื่อวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ถูกทำลายหรือไม่สมบูรณ์⁽²⁷⁾

2.5 ชุดน้ำยาสำเร็จรูปสำหรับการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ

ปัจจุบันเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เป็น STRs นั้นได้ถูกผลิตเป็นชุดน้ำยาโดยสามารถวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอหลายตำแหน่งภายในปฏิกิริยาเดียว หรือเรียกว่า มัลติเพลกซ์พีซีอาร์ (Multiplex PCR) ซึ่งประกอบไปด้วยคู่ไพรเมอร์ (Primers) หลายคู่ ในยุคแรกเริ่มของการพัฒนาชุดน้ำยาตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอนั้นมีเพียง STRs 4 ตำแหน่งเท่านั้นคือ TH01, FES/FPS, vWA และ F13A1⁽²⁸⁾ ซึ่งให้ความน่าจะเป็นที่ดีเอ็นเอตรงกัน (Matching) เพียง 1 ใน 10,000 ต่อมาได้มีการเพิ่มตำแหน่งเครื่องหมายดีเอ็นเอเข้าไปเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการตรวจพิสูจน์จึงเกิดการตรวจพิสูจน์ในยุคที่สอง⁽²⁹⁾ ซึ่งประกอบด้วย STRs 6 ตำแหน่ง คือ TH01, vWA, FGA, D8S1179, D18S51 และ D21S11 ให้ความน่าจะเป็นลดลงเป็น 1 ใน 50 ล้าน นอกจากนี้ยังมีการเพิ่มตำแหน่งที่เป็นโครโมโซมเพศ คือ อเมโลจีนิน (Amelogenin)⁽³⁰⁾ ในช่วงปี ค.ศ. 1996-1997 ห้องปฏิบัติการของ FBI (Federal Bureau of Investigation) ได้ร่วมมือกับนักนิติวิทยาศาสตร์ด้านดีเอ็นเอทั่วโลกจัดตั้ง ระบบ CODIS

(Combined DNA Index System) เพื่อกำหนดเครื่องหมายดีเอ็นเอ STRs พื้นฐานในการตรวจพิสูจน์ โดยมี 13 ตำแหน่ง คือ CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, vWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51 และ D21S11 เรียกว่า “The 13 CODIS core”⁽³⁾ ซึ่งมีความน่าจะเป็น 1 ใน ล้านล้าน⁽³¹⁾ และในช่วงปี ค.ศ. 2017 FBI ได้เพิ่มเครื่องหมายดีเอ็นเอ STRs เข้าไปอีก 7 ตำแหน่ง ประกอบด้วย D1S1656, D2S441, D2S1338, D10S1248, D12S391, D19S433 และ D22S1045 รวมเป็น 20⁽⁴⁾ ตำแหน่งเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการตรวจพิสูจน์ ดีเอ็นเอ โดยทั้ง 20 ตำแหน่ง จะต้องปรากฏในชุดน้ำยาตรวจสำเร็จรูปเพื่อเป็นมาตรฐานระดับสากล

โดยทั่วไปแล้วชุดน้ำยาสำเร็จรูปสำหรับการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอจะมีส่วนประกอบ 5 ส่วนดังนี้

1. ส่วนผสมของไพรเมอร์หลายชนิด (PCR primer mixture) ประกอบด้วยชุดไพรเมอร์หลายชนิดที่ถูกออกแบบมาเพื่อเพิ่มจำนวน STRs หลายตำแหน่งในปฏิกิริยาเดียว แต่ละชุดถูกติดฉลากด้วยสารฟลูออเรสเซนต์สำหรับการวิเคราะห์ผล

2. พีซีอาร์บัฟเฟอร์ (PCR buffer) ประกอบด้วยหน่วยย่อยของนิวคลีโอไทด์ (Deoxynucleotide triphosphate ; dNTPs), แมกนีเซียมไดคลอไรด์ และ สารประกอบอื่น ๆ ที่จำเป็นสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์

3. ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (DNA polymerase) เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ชุดน้ำยาสำเร็จรูปบางยี่ห้อจะผสมดีเอ็นเอพอลิเมอเรสรวมกับพีซีอาร์บัฟเฟอร์ไว้แล้ว เพื่อให้สะดวกแก่ผู้ใช้งาน

4. แอลลิลลิกเลดเดอร์ (Allelic ladder) เป็นแอลลิลที่ปกติพบได้ในกลุ่มประชากรที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นเพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอให้เป็นแอลลิล

5. ชุดควบคุมเชิงบวก (Positive control) เป็นจีโนมมนุษย์ที่ได้มาจากการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อใช้ตรวจสอบว่าชุดน้ำยาสำเร็จรูปแต่ละชุดนั้นสามารถทำงานได้อย่างปกติหรือไม่⁽²⁴⁾

หลังจากมีการประกาศระบบ 13 Core CODIS ของการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ ผู้ผลิตหลายบริษัท อาทิ Promega หรือ Applied Biosystem ได้เริ่มพัฒนาชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่สามารถเพิ่มจำนวนตำแหน่ง 13 Core CODIS ของโครโมโซมร่างกาย (Autosome) ในปฏิกิริยาพีซีอาร์เพียงครั้งเดียว และเพิ่มตำแหน่งอเมโลจินของโครโมโซมเพศ (Sex chromosome) โดยใช้ชื่อว่า PowerPlex 16, Identifiler, Profiler plus และ COfiler หลังจากนั้นมีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ชุดน้ำยาสำเร็จรูปเพิ่มมากขึ้น และเริ่มมีบริษัทอื่นพัฒนาน้ำยาสำเร็จรูปเพิ่มขึ้นเช่น บริษัท QIAGEN (ตารางที่ 2.1)⁽²⁶⁾

ตารางที่ 2.1 ชุดน้ำยาดตรวจ STRs สำเร็จรูปที่พัฒนาในช่วงปี ค.ศ. 2000 ถึง ปี ค.ศ. 2011 ⁽²⁶⁾

ชื่อ	ผู้ผลิต	วันที่เริ่มมีการผลิต
PowerPlex 16	Promega	พฤษภาคม ค.ศ. 2000
PowerPlex 16 BIO	Promega	พฤษภาคม ค.ศ. 2001
AmpFISTR Identifiler	Applied Biosystem	กรกฎาคม ค.ศ. 2001
AmpFISTR Profiler Plus	Applied Biosystem	กันยายน ค.ศ. 2001
PowerPlex ES	Promega	มีนาคม ค.ศ. 2002
PowerPlex SEfiler	Promega	กันยายน ค.ศ. 2002
AmpFISTR minifiler	Applied Biosystem	มีนาคม ค.ศ. 2007
AmpFISTR SEfiler Plus	Applied Biosystem	พฤศจิกายน ค.ศ. 2007
PowerPlex 16 HS	Promega	มีนาคม ค.ศ. 2009
PowerPlex ESX 16 & ESX 17	Promega	กันยายน ค.ศ. 2009
PowerPlex ESI 16 & ESI 17	Promega	กันยายน ค.ศ. 2009
AmpFISTR Identifiler Direct	Applied Biosystem	พฤศจิกายน ค.ศ. 2009
AmpFISTR Identifiler Plus	Applied Biosystem	มกราคม ค.ศ. 2010
AmpFISTR NGM	Applied Biosystem	มกราคม ค.ศ. 2010
Investigator Essplex	QIAGEN	เมษายน ค.ศ. 2010
Investigator Decaplex SE	QIAGEN	เมษายน ค.ศ. 2010
Investigator Triplex AFS QS	QIAGEN	เมษายน ค.ศ. 2010
Investigator Triplex DSF	QIAGEN	เมษายน ค.ศ. 2010
Investigator IDplex	QIAGEN	สิงหาคม ค.ศ. 2010
Investigator HDplex	QIAGEN	กันยายน ค.ศ. 2010
Investigator Hexaplex ESS	QIAGEN	กันยายน ค.ศ. 2010
Investigator Nanoplex ESS	QIAGEN	กันยายน ค.ศ. 2010
AmpFISTR NGM SElect	QIAGEN	ธันวาคม ค.ศ. 2010
PowerPlex 18D	Promega	กุมภาพันธ์ ค.ศ. 2011

2.6 ชุดน้ำยาสำเร็จรูปสำหรับการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System

2.6.1 GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit ⁽⁶⁾

GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit เป็นชุดน้ำยาตรวจ STRs สำเร็จรูประบบ 6 สีฟลูออเรสเซนซ์ที่สามารถตรวจดีเอ็นเอมนุษย์ได้ถึง 24 ตำแหน่ง ดังนี้

1. STRs จำนวน 21 ตำแหน่งบนโครโมโซมร่างกาย ประกอบด้วย 20 ตำแหน่งที่ CODIS กำหนดขึ้นเพื่อใช้สำหรับการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอคือ CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, vWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, D1S1656, D2S441, D2S1338, D10S1248, D12S391, D19S433 และ D22S1045 นอกจากนี้ยังประกอบด้วย ตำแหน่ง SE33 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีความสามารถในการจัดจำแนกสูง (Highly discriminating)

2. DYS391, Y indel และ Amelogenin บนโครโมโซมเพศ

นอกจากนี้ยังมีเครื่องหมายที่บ่งชี้ถึงคุณภาพของดีเอ็นเอ ที่มีชื่อเรียกว่า Internal Quality Control (IQC) โดยสามารถตรวจสอบความแตกต่างระหว่างตัวอย่างดีเอ็นเอที่ถูกทำลาย และ ดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยยั้งได้ นอกจากนี้ยังเป็นตัวควบคุมเชิงบวกที่บ่งบอกว่าปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ ชุดน้ำยาตรวจ STRs สำเร็จรูปนี้ เหมาะสำหรับดีเอ็นเอจากสถานที่เกิดเหตุที่ถูกทำลาย และ ปนเปื้อนด้วยยั้ง โดยสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอบุคคล 24 ตำแหน่ง ด้วยการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ เพียงปฏิกิริยาเดียว และให้ผลการตรวจที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างแต่ละบุคคลสูง ซึ่งเหมาะสมกับการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอบุคคลทางนิติวิทยาศาสตร์ที่สอดคล้องกับระบบฐานข้อมูลดีเอ็นเอบุคคลของโลก

2.6.2 PowerPlex® Fusion 6C System ⁽⁵⁾

PowerPlex® Fusion 6C System เป็นชุดน้ำยาตรวจ STRs สำเร็จรูประบบ 6 สีฟลูออเรสเซนซ์ที่สามารถตรวจดีเอ็นเอมนุษย์ได้ถึง 27 ตำแหน่ง ประกอบด้วย 18 ตำแหน่งโครโมโซมร่างกาย ตามประกาศของ CODIS คือ CSF1PO, FGA, TH01, vWA, D1S1656, D2S441, D2S1338, D3S1358, D7S820, D8S1179, D10S1248, D12S391, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433 และ D21S11 รวมถึง Amelogenin และ DYS391 บนโครโมโซมเพศ ส่วนตำแหน่ง Penta D, Penta E, D22S1045, D5S818, TPOX และ SE33 เป็นตำแหน่งที่เพิ่มขึ้นมาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกความแตกต่างของบุคคลซึ่งจะมีประโยชน์สำหรับระบบฐานข้อมูลบุคคล นอกจากนี้ยังมีตำแหน่ง DYS570 และ DYS576 บนโครโมโซม Y สำหรับการตรวจสอบเพศชาย ในกรณีที่ตำแหน่ง Amelogenin และ DYS391 เกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งตำแหน่งทั้งหมดสอดคล้องกับคำแนะนำจากทั้งระบบมาตรฐาน CODIS และ ESS

ตารางที่ 2.2 ชื่อตำแหน่งและแอลลีลของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit ⁽⁶⁾

STR Locus	Label	Alleles
D3S1358	6-FAM™	9-20
vWA		11-24
D16S539		5, 8-15
CSF1PO		6-15
TPOX		5-15
Y indel	VIC™	1-2
Amelogenin		X,Y
D8S1179		5-19
D21S11		24, 24.2, 25, 25.2, 26-28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36-38
D18S51		7-10, 10.2, 11-13, 13.2, 14-27
DYS391		7-13
D2S441	NED™	8-17
D19S433		6-12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 17.2, 18.2, 19.2
TH01		4-9, 9.3, 10, 11, 13.3
FGA		13-26, 26.2, 27-30, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 47.2, 48.2, 50.2, 51.2
D22S1045	TAZ™	8-19
D5S818		7-18
D13S317		5-16
D7S820		6-15
SE33		4.2, 6.3, 8-20, 20.2, 21, 21.2, 22.2, 23.2, 24.2, 25.2, 26.2, 27.2, 28.2, 29.2, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 34.2, 35, 35.2, 36, 37

ตารางที่ 2.2 ชื่อตำแหน่งและแอลลีลของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit (ต่อ)⁽⁶⁾

STR Locus	Label	Alleles
D10S1248	SID™	8-19
D1S1656		9-14, 14.3, 15, 15.3, 16, 16.3, 17, 17.3, 18.3, 19.3, 20.3
D12S391		14-19, 19.3, 20-27
D2S1338		11-28

ตารางที่ 2.3 ชื่อตำแหน่งและแอลลีลของชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C System ⁽⁵⁾

STR Locus	Label	Alleles
Amelogenin	FL-6C	X,Y
D3S1358		9-20
D1S1656		9-14, 14.3, 15, 15.3, 16, 16.3, 17, 17.3, 18, 18.3, 19, 19.3, 20.3
D2S441		8-11, 11.3, 12-17
D10S1248		8-19
D13S317		5-17
Penta E		5-25
D16S539		JOE-6C
D18S51	7-10, 10.2, 11-13, 13.2, 14-27	
D2S1338	10, 12, 14-28	
CSF1PO	5-16	
Penta D	2.2, 3.2, 5-17	
TH01	TMR-6C	3-9, 9.3, 10-11, 13.3
vWA		10-24
D21S11		24, 24.2, 25, 25.2, 26-28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36-38
D7S820		5-16
D5S818		6-18
TPOX		4-16

ตารางที่ 2.3 ชื่อตำแหน่ง และ แอลลีล ของชุดน้ำยาสำเร็จรูป PowerPlex® Fusion 6C System ⁽⁵⁾
(ต่อ)

STR Locus	Label	Alleles
D8S1179	CXR-6C	7-19
D12S391		14-17, 17.3, 18, 18.3, 19-27
D19S433		5.2, 6.2, 8-12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 17.2, 18, 18.2
SE33		4.2, 6.3, 8-20, 20.2, 21, 21.2, 22, 22.2, 23.2, 24.2, 25.2, 26.2, 27.2, 28.2, 29.2, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 34.2, 35-37, 39
D22S1045		7-20
DYS391	TOM-6C	5-16
FGA		14-18, 18.2, 19, 19.2, 20, 20.2, 21, 21.2, 22, 22.2, 23, 23.2, 24, 24.2, 25, 25.2, 26-30, 31.2, 32.2, 33.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 48.2, 50.2
DYS576		11-23
DYS570		10-25

2.7 การเก็บและการจัดการตัวอย่าง (Sample collection) ⁽²⁾

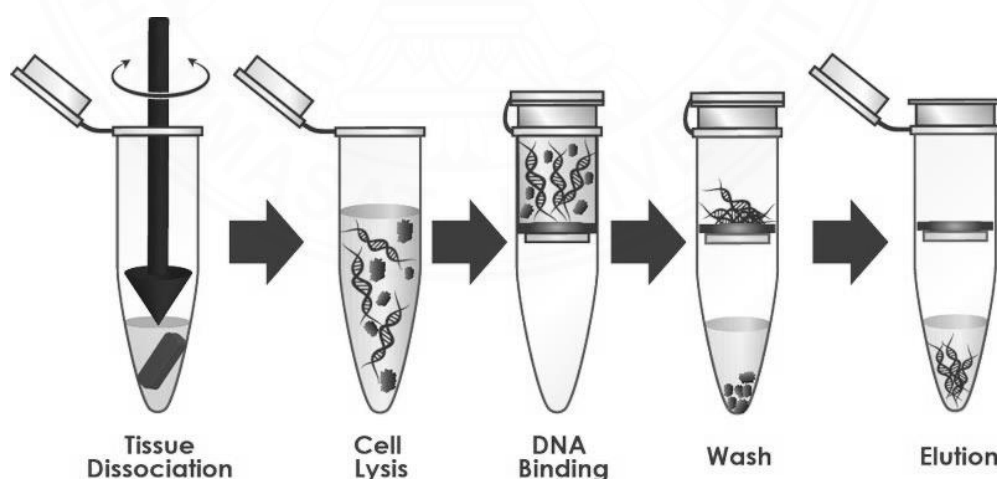
ในสถานที่เกิดเหตุสามารถพบดีเอ็นเอได้จากวัตถุพยานหลายประเภท แหล่งของดีเอ็นเอจากวัตถุพยานได้มาจากเซลล์ที่มีนิวเคลียส เช่น เลือด อสุจิ รากผม หรือดีเอ็นเอจากการสัมผัส หลักการสำคัญของการเก็บตัวอย่างวัตถุพยานดีเอ็นเอมีดังนี้

- ต้องระวังการปนเปื้อนดีเอ็นเอผู้อื่น โดยเฉพาะดีเอ็นเอจากผู้เก็บหรือบุคคลที่ไม่เกี่ยวข้อง โดยสวมอุปกรณ์ป้องกันตัวเอง (Personal Protection Equipment; PPE) อยู่เสมอขณะปฏิบัติงาน เช่น หมวกคลุมผม ถุงมือ ถุงคลุมเท้า และเสื้อกาวน์
- เก็บวัตถุพยานด้วยหีบห่อที่เหมาะสม เพื่อป้องกันวัตถุพยานถูกทำลายจากสภาวะแวดล้อม หรือปนเปื้อนดีเอ็นเอจากบุคคลอื่น หรือปนเปื้อนดีเอ็นเอจากวัตถุพยานชิ้นอื่น
- คราบโลหิต คราบอสุจิ และสารคัดหลั่งอื่น ๆ ต้องทำให้แห้งก่อนนำเข้าหีบห่อเสมอ
- เมื่อเก็บวัตถุพยานในหีบห่อที่เหมาะสมแล้วต้องหลีกเลี่ยงไม่ให้วัตถุพยานสัมผัสกับความชื้นเพราะทำให้ดีเอ็นเอนั้นถูกทำลาย

- การเก็บดีเอ็นเอจากพื้นผิวจะใช้สำลีพันปลายไม้ปลอดเชื้อจำนวน 2 ก้านเช็ดเก็บ โดยก้านแรกให้หยดน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2-3 หยดแล้วเช็ดพื้นผิวในบริเวณที่ต้องการ จากนั้นใช้ก้านสำลีแห้งเช็ดอีกครั้งหนึ่ง เรียกเทคนิคนี้ว่า Double swab
- ดีเอ็นเอที่บุคคลอ้างอิง (Reference DNA) ใช้สำลีพันปลายไม้เช็ดเก็บจากกระพุ้งแก้มในกรณีบุคคลนั้นยังมีชีวิต ส่วนผู้เสียชีวิตให้เก็บเลือดจากบาดแผลศพ

2.8 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction)

เป็นวิธีที่แยกดีเอ็นเอออกจากวัตถุดิบที่อยู่ในวัตถุพยาน โดยการย่อยเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อปลดปล่อยดีเอ็นเอออกมา (Cell lysis) จากนั้นตกตะกอนและชะล้างเอาโปรตีนออกเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ (Precipitation) สุดท้ายแยกเอาเฉพาะดีเอ็นเอออกมา (Elution) เพื่อใช้ในขั้นตอนเพิ่มจำนวนต่อไป ปัจจุบันวิธีที่นิยมใช้ในการสกัดดีเอ็นเอทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ คือวิธี Solid-phase DNA Extraction (ภาพที่ 2.5) ซึ่งใช้วัสดุตัวกลาง เช่น ซิลิกา (Silica particle) หรือ ผงแม่เหล็ก (Magnetic silica beads) โดยหลังจากที่ย่อยเซลล์แล้ว ดีเอ็นเอจะมาจับกับวัสดุตัวกลาง (Binding) แล้วใช้ Wash buffer ชะล้างส่วนประกอบอื่นที่ไม่ใช่ดีเอ็นเอออก สุดท้ายชะล้างดีเอ็นเอออกจากวัสดุตัวกลาง (Eluting) แล้วเก็บดีเอ็นเอไว้เพื่อใช้ในขั้นตอนการตรวจพิสูจน์ต่อไป ปัจจุบันมีชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปถูกผลิตออกมาจากหลายบริษัทซึ่งที่นิยมใช้ในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์จะมี 3 บริษัทตามตารางที่ 2.4 ⁽³²⁻³⁵⁾



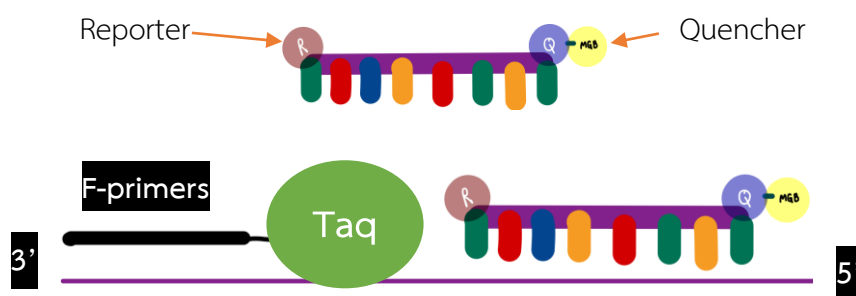
ภาพที่ 2.5 วิธีการสกัดดีเอ็นเอแบบ Solid-phase extraction ⁽³⁶⁾

ตารางที่ 2.4 ชื่อชุดน้ำยาสกัดดีเอ็นเอทางนิติวิทยาศาสตร์ และบริษัทผู้ผลิต ⁽²⁶⁾

ผู้ผลิต	QIAGEN	Promega	Applied Biosystems
สินค้า	QIAamp	DNA IQ	PrepFiler
วัสดุตัวกลางที่ใช้	Silica membrane	Magnetic silica beads	Magnetic silica beads
วิธีการชะล้าง	ปั่นเหวี่ยง	แม่เหล็ก	แม่เหล็ก

2.9 การวัดปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Quantitation)

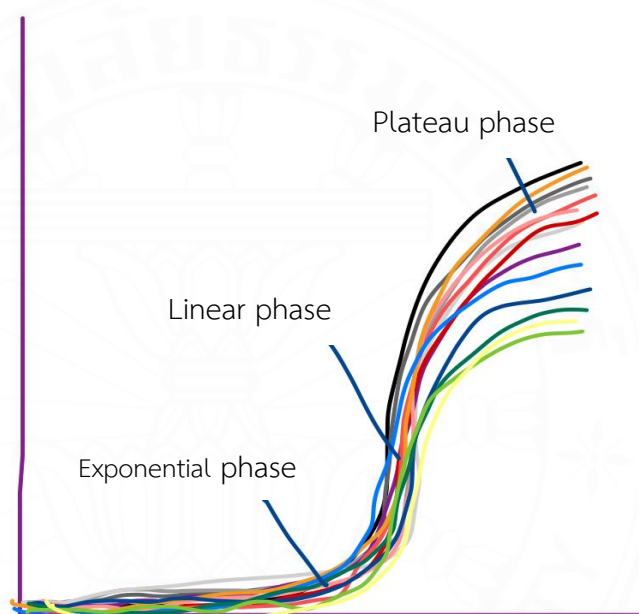
การวัดปริมาณดีเอ็นเอมีจุดประสงค์เพื่อให้ทราบความเข้มข้นของดีเอ็นเอ และใช้กำหนดปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA Template) ในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้หลักการ TaqMan ซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์สายสั้น ๆ ติดฉลากด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ เรียกว่า Probe (ภาพที่ 2.6) ที่เข้าจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายอย่างเฉพาะเจาะจง ด้านปลาย 5' ของ Probe จะติดฉลากด้วย Reporter dye (R) ที่เป็นสีฟลูออเรสเซนต์ เช่น FAM, VIC หรือ TAMRA ส่วนด้าน 3' ของ Probe ติดฉลากด้วย Quencher (Q) ซึ่งมีหน้าที่ดูดซับสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ ของ Reporter ทำให้ในสภาวะปกติไม่ปรากฏสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ แต่เมื่อมีกระบวนการพอลิเมอไรเซชัน จะเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอแทนที่ Probe ดังกล่าว ทำให้ Reporter ถูกปลดปล่อยและให้สัญญาณฟลูออเรสเซนต์ สัญญาณดังกล่าวจะถูกตัวตรวจจับ (Detector) และบันทึกปริมาณความเข้มแสงไว้ ซึ่งสามารถใช้คำนวณหาปริมาณของดีเอ็นเอต่อไป ⁽²⁶⁾ ปัจจุบันชุดน้ำยาส่งสำเร็จรูปที่นิยมใช้ในการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอ ได้แก่ ชุดน้ำยา Quantifiler, Quantifiler HP หรือ Quantifiler Duo จากบริษัท Applied Biosystems



ภาพที่ 2.6 Taq man oligonucleotide และกระบวนการวัดปริมาณด้วย Taq man oligonucleotide

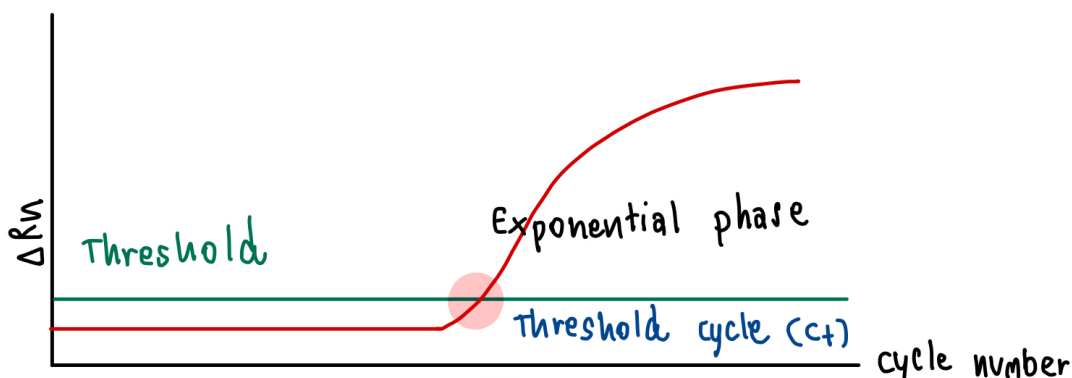
ปฏิกิริยาของ Real-Time PCR จะประกอบด้วย 3 ระยะ (ภาพที่ 2.7) ได้แก่

- Exponential phase เป็นระยะที่มีการจำลองดีเอ็นเอสายใหม่อย่างจำเพาะ
- Linear phase เป็นระยะที่องค์ประกอบพีซีอาร์เริ่มมีจำกัด ประสิทธิภาพในการจำลองตนเองเริ่มลดลง โดยจะเห็นกราฟเริ่มเป็นเส้นตรง
- Plateau phase เป็นระยะที่ปฏิกิริยาหยุดลงเนื่องจากองค์ประกอบพีซีอาร์หมด และไม่มีผลผลิตพีซีอาร์อีกต่อไป



ภาพที่ 2.7 ปฏิกิริยา Real-time PCR

การตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Real-Time PCR โดยคำนวณปริมาณดีเอ็นเอตัวอย่าง จากค่า Threshold cycle (CT) ซึ่งได้มาจากจุดตัดของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่สูงกว่า base line และ สัญญาณที่ต่ำที่สุดในระยะเอกซ์โพเนนเชียล (Exponential phase) (ภาพที่ 2.8) ของตัวอย่าง เทียบกับ CT ของกราฟมาตรฐานที่รู้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอแน่นอน โดยนำดีเอ็นเอที่รู้ความเข้มข้นแน่นอนมาเจือจางแบบลำดับส่วน 5 ความเข้มข้น เช่น 50, 5, 0.5, 0.05 และ 0.005 ng/ μ L จากนั้น นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์แบบถดถอย (Regression) จึงจะสามารถคำนวณปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างออกมาได้⁽³⁷⁾



ภาพที่ 2.8 การคำนวณปริมาณดีเอ็นเอตัวอย่างจากค่า Threshold cycle (CT)

2.10 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (Amplification)

มัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ คือ การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สนใจหลายตำแหน่งในปฏิกิริยาเดียว โดยการใช้คู่ไพรเมอร์มากกว่า 1 คู่ เทคนิคดังกล่าวใช้กันอย่างแพร่หลายในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ ที่ต้องตรวจเปรียบเทียบ STRs หลายตำแหน่ง^(21, 25, 33) องค์ประกอบของพีซีอาร์ประกอบไปด้วย 5 องค์ประกอบที่สำคัญดังนี้

- ดีเอ็นเอต้นแบบ (Template) คือ ดีเอ็นเอตัวอย่างทั้งจีโนมที่สกัดได้ และทราบความเข้มข้นที่แน่นอน เพราะต้องควบคุมปริมาณให้เหมาะสมกับปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อให้ได้ภาพรวมดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ (Complete profile)

- ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส คือ เอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ ปัจจุบันนิยมใช้ Taq DNA polymerase ที่ทนต่อความร้อนสูง

- ชุดไพรเมอร์ (Primers set) คือ ชุดของนิวคลีโอไทด์สายสั้น ๆ ที่จำเพาะต่อตำแหน่งดีเอ็นเอเป้าหมายมีหน้าที่เป็นจุดเริ่มต้นของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์จะใช้ไพรเมอร์หลายคู่ ดังนั้นการออกแบบให้แต่ละไพรเมอร์มีคุณสมบัติที่จับกับดีเอ็นเอต้นแบบใกล้เคียงกันจึงมีความสำคัญ

- นิวคลีโอไทด์ (dNTPs) คือ หน่วยย่อยของดีเอ็นเอ ใช้สำหรับต่อสายดีเอ็นเอสายใหม่

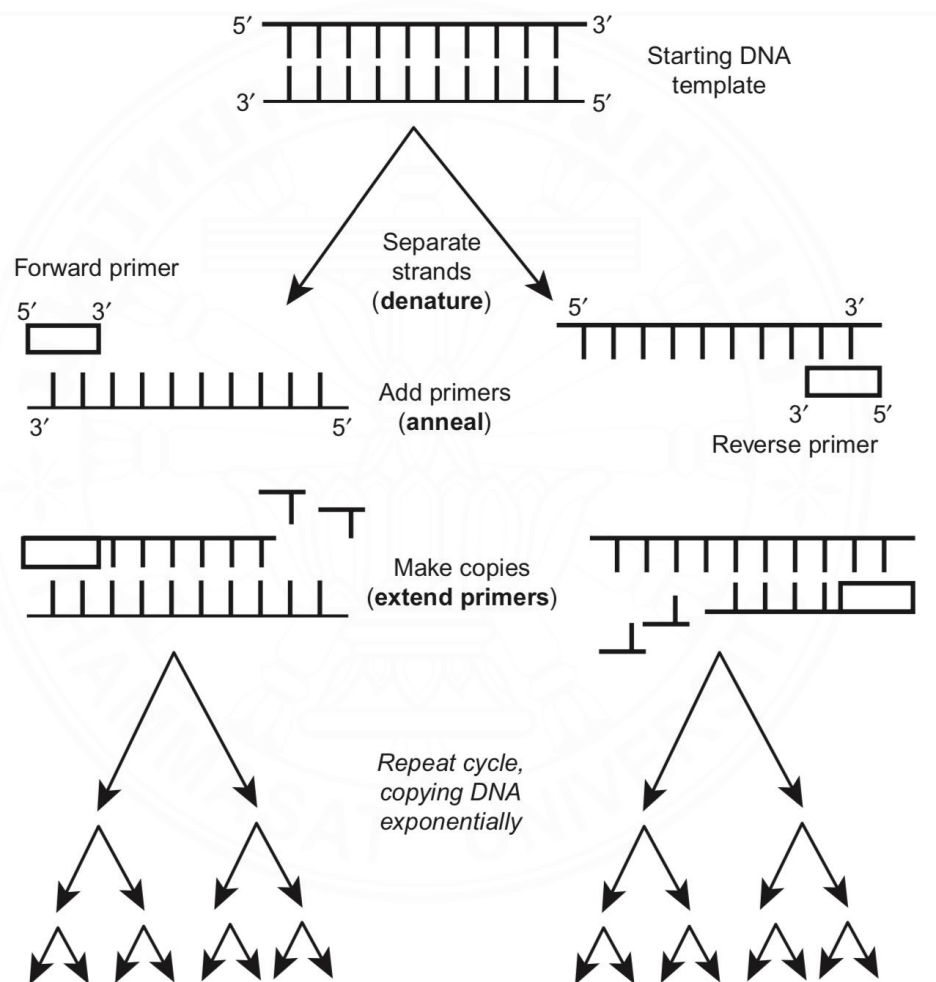
- พีซีอาร์บัฟเฟอร์ คือ สารเคมีหรือไอออนอื่นที่ควบคุมสภาวะของปฏิกิริยาให้เหมาะสม เช่น $MgCl_2$ หรืออัลบูมินโปรตีน

เมื่อองค์ประกอบของพีซีอาร์ครบถ้วน ปฏิกิริยาจะเริ่มขึ้นหลังจากมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ โดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า DNA thermal cycler ซึ่งขั้นตอนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอประกอบด้วย (ภาพที่ 2.9) 3 ขั้นตอนดังนี้

- การทำให้สูญเสียสภาพธรรมชาติ (Denaturation) เป็นขั้นตอนที่ใช้อุณหภูมิสูงประมาณ 90-95 °C เพื่อแยกดีเอ็นเอแยกสายคู่เป็นสายเดี่ยว

- แอนนีลลิง (Annealing) เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงประมาณ 50-65 °C เพื่อให้ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอต้นแบบอย่างจำเพาะในบริเวณเป้าหมาย

- เอกเทนชัน (Extension) เป็นขั้นตอนที่เพิ่มอุณหภูมิอีกครั้งเป็น 70-75 °C เพื่อให้ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้นตอนทั้งหมดจะนับเป็น 1 รอบของปฏิกิริยา หลังจากนั้นกระบวนการทั้งหมดจะเริ่มใหม่อีกครั้ง ประมาณ 25-35 รอบ เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอปริมาณมากพอสำหรับการตรวจพิสูจน์ต่อไป ⁽²⁾



ภาพที่ 2.9 กระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ⁽²⁶⁾

ปฏิกิริยาห่วงโซ่พอลิเมอเรสหรือพีซีอาร์ เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงสำหรับงานด้านชีวโมเลกุลโดยเฉพาะงานด้านการวินิจฉัยโรคติดเชื้อหรือการวิเคราะห์พันธุกรรม ข้อดีของเทคนิคดังกล่าวคือมีกรรมวิธีที่ง่าย สามารถประยุกต์ใช้กับตัวอย่างหรือสิ่งส่งตรวจที่หลากหลายและมีความไวสูงด้วยเหตุนี้เทคนิคพีซีอาร์จึงเป็นที่นิยมมากในปัจจุบัน อย่างไรก็ตามเทคนิคพีซีอาร์ยังมีข้อจำกัดเช่นกัน คือ มักมีความไวต่อตัวยับยั้ง (Inhibitors) โดยตัวยับยั้งคือ สารทุกชนิดที่ทำให้ผลเสียกับปฏิกิริยาและส่งผลให้ความไวของปฏิกิริยาพีซีอาร์ลดลง หรืออาจจะส่งผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ (False-negative) กลไกสำคัญของตัวยับยั้งคือการเข้าไปจับหรือขัดขวางเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสหรือสารเคมีอื่นที่สำคัญในปฏิกิริยา ทางนิติวิทยาศาสตร์ตัวยับยั้งที่พบบ่อยจากสิ่งส่งตรวจมีดังต่อไปนี้ตามตารางที่ 2.5 ⁽³⁸⁾

ตารางที่ 2.5 ตัวยับยั้งที่เกี่ยวข้องกับตัวอย่างทางนิติวิทยาศาสตร์

ชนิดของตัวอย่าง	ตัวยับยั้ง	กลไก	อ้างอิง
เลือด	เฮมาทิน	ยับยั้งการแยกดีเอ็นเอเป็นสายเดี่ยว	(39)
เนื้อเยื่อ หรือ กล้ามเนื้อ	คอลลาเจน	ยับยั้งเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส	(40)
เส้นผม เส้นขน	เมลานิน	ยับยั้งเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส	(39)
อุจจาระ	โพลีแซคคาไรด์	ยับยั้งเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส	(40)
คราบดิน	ฮิวมิคแอซิด	เข้าไปจับและดูดซับดีเอ็นเอพอลิเมอเรส และ เอนไซม์	(41)
กระดูก	ไอออนของ แคลเซียม	เข้าแย่งจับกับ co-factors ของ ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส	(39)

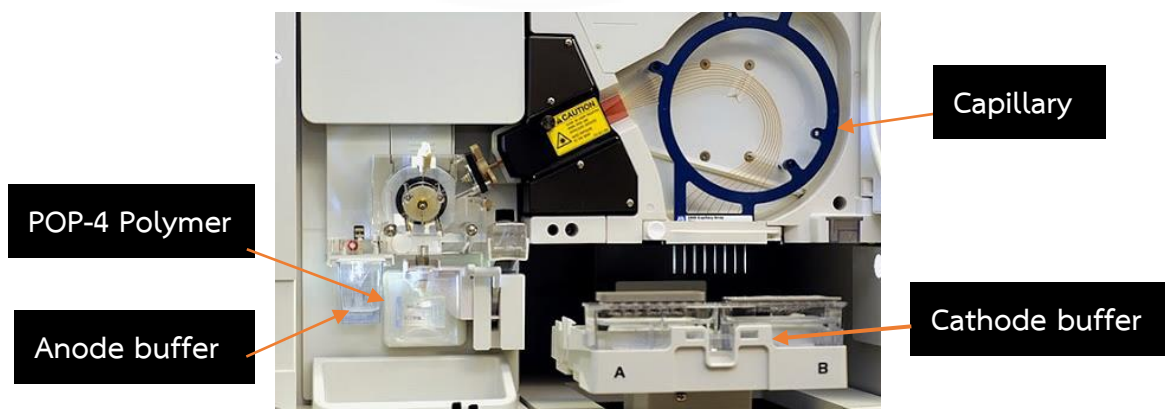
2.11 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA Analysis)

ปัจจุบันนิยมใช้วิธี แคพิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Capillary electrophoresis; CE) ด้วยเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรมอัตโนมัติ (ภาพที่ 2.10-2.11) หลักการทำงานของเครื่องมือดังกล่าวคือการแยกขนาด และการตรวจวัดดีเอ็นเอ ⁽²⁶⁾ โดยเริ่มจากการให้กระแสไฟฟ้ากับปลายแคพิลลารีที่จุ่มอยู่ในสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่าง ความต่างศักย์ที่เกิดขึ้นจากกระแสไฟฟ้าทำให้ดีเอ็นเอที่มีประจุลบนั้น ถูกความต่างศักย์จากขั้วบวกดึงเข้าสู่หลอดแคพิลลารี วิธีการดังกล่าวเรียกว่า Electrokinetic injection โดยดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กกว่าจะสามารถเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ ทำให้เกิดการแยกของดีเอ็นเอตามขนาดได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งสามารถแยก

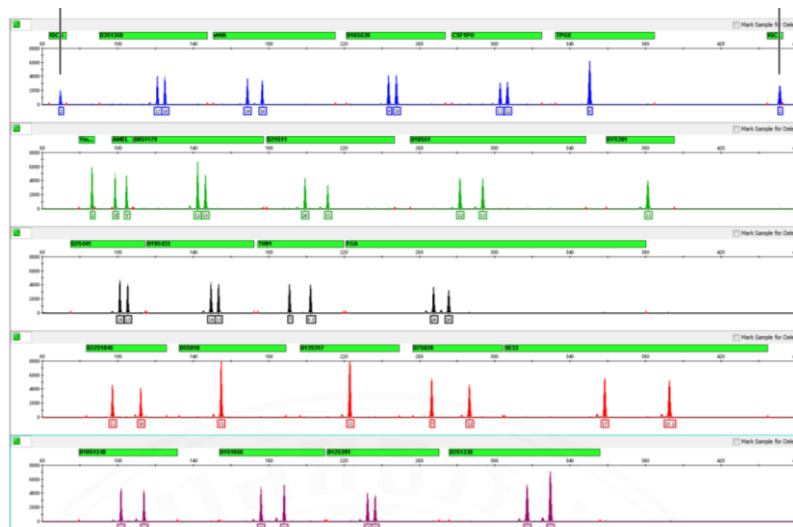
ความแตกต่างของขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ แม้แตกต่างกันเพียง 1 เบส⁽⁴²⁾ ดีเอ็นเอที่ถูกแยกด้วยความต่างศักย์ภายในแคพิลลารีจะเคลื่อนที่ไปยังบริเวณที่มีการตรวจวัด หรือ Detection cell และจับสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ด้วยกล้อง CCD โดยความเข้มแสงของฟลูออเรสเซนซ์เป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณดีเอ็นเอและรายงานเป็น Relative Fluorescence Unit (RFUs) สำหรับการบ่งบอกชนิด แอลลีลจะต้องนำขนาดของดีเอ็นเอที่แยกได้จากการวิเคราะห์ มาเปรียบเทียบกับแอลลีลลิกลิตเตอร์ (Allelic Ladder) ที่ทราบชนิดและขนาดของแอลลีลแน่นอน โดยทั้งตัวอย่างและแอลลีลลิกลิตเตอร์ ต้องทดสอบในชุดการทดลองเดียวกันเท่านั้น จึงจะบ่งบอกชนิดของแอลลีลได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ สุดท้ายนำข้อมูลที่ได้จากเครื่องมือมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป เช่น GeneMapper™ ID ได้เป็นอิเล็กโทรฟีโรแกรม (Electropherogram) (ภาพที่ 2.12) เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบดีเอ็นเอต่อไป⁽²⁶⁾



ภาพที่ 2.10 ลักษณะภายนอกเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรม ABI 3500⁽⁴³⁾



ภาพที่ 2.11 ลักษณะภายในเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรม ABI 3500⁽⁴³⁾



ภาพที่ 2.12 อิเล็กโทรฟีโรแกรม (Electropherogram) ของ DNA control 007
เมื่อทดสอบด้วยชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit⁽⁶⁾

2.12 การตีความผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ (Interpretation)

กระบวนการตีความผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอผู้วิเคราะห์ต้องตัดสินใจตัดสินผลลัพธ์จากข้อมูล 5 ประการ (ตารางที่ 2.6)

ตาราง 2.6 การตัดสินใจของผู้วิเคราะห์ในการตีความผลการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ⁽⁴⁴⁾

ข้อมูล	การตัดสินใจผลลัพธ์	วิธีการตัดสินใจ
ข้อมูล	พีคหรือสัญญาณรบกวน	เกณฑ์การวิเคราะห์ (Analytical threshold)
พีค	แอลลีลหรือสิ่งแปลกปลอม	เกณฑ์สตัทเตอร์ Stutter threshold
แอลลีล	เฮเทอโรไซโกท หรือ โฮโมไซโกท	เกณฑ์สโตแคสติก (Stochastic threshold)
ภาพรวมดีเอ็นเอ	จากบุคคลเดียวหรือดีเอ็นเอผสม	จำนวนพีคในแต่ละตำแหน่ง
ดีเอ็นเอผสม	เข้ากันได้กับภาพรวมดีเอ็นเอใด	สัดส่วนหลักหรือ สัดส่วนรอง

ข้อมูล (Data file) คือ ข้อมูลสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ได้จากเครื่องวิเคราะห์ดีเอ็นเอ ไฟล์ข้อมูลมีนามสกุลเป็น .fsa หรือ .hid เมื่อนำไปวิเคราะห์ในโปรแกรมสำเร็จรูป เช่น GeneMapper™ ID ข้อมูลดังกล่าวจะถูกเปลี่ยนเป็นขนาดและพีคของดีเอ็นเอที่แปรผันตรงกับ

ความเข้มแสงได้เป็น อิเล็กโทรโฟโแกรม เพื่อให้ทราบถึงชนิดแอลลีลในตัวอย่างผู้วิเคราะห์ต้องกำหนดเกณฑ์การวิเคราะห์ (Analytical threshold) เพื่อแยกพีคที่เป็นแอลลีลที่แท้จริงและสัญญาณรบกวนพื้นฐาน (Baseline noise) ซึ่งวิธีการที่นิยมใช้ในการหาค่าของเกณฑ์การวิเคราะห์ คือ การทดสอบหาเกณฑ์ต่ำสุดที่สามารถตรวจได้ หรือเกณฑ์ขั้นต่ำ (Minimum threshold) โดยการนำตัวควบคุมเชิงลบที่ใช้ในแต่ละห้องปฏิบัติการมาทดสอบด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่สนใจแล้ว คำนวณค่า Limit of Quantitation (LOQ) ตามสมการนี้

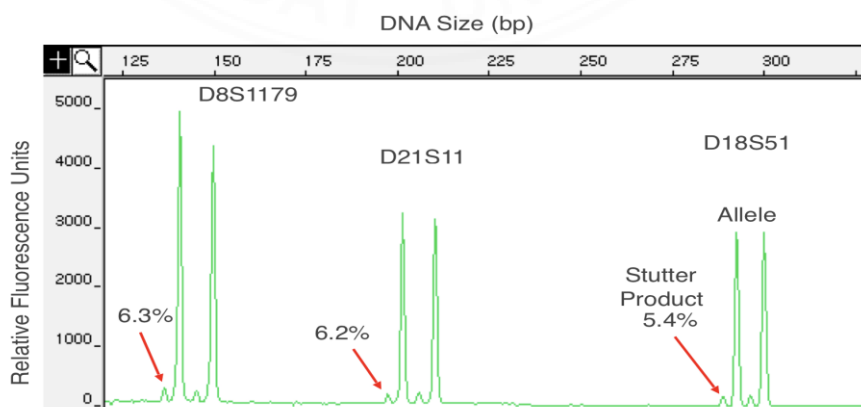
$$LOQ = \text{average} + 10 \text{ SD}^{(45)}$$

ดังนั้น เกณฑ์การวิเคราะห์ หมายถึง ค่าที่กำหนดให้พีคที่มีค่าความสูงมากกว่าค่าดังกล่าวเป็นพีคของแอลลีลที่แท้จริง และพีคที่มีค่าความสูงน้อยกว่าค่าดังกล่าวเป็นพีคที่เกิดจากสัญญาณรบกวนพื้นฐาน^(44, 46)

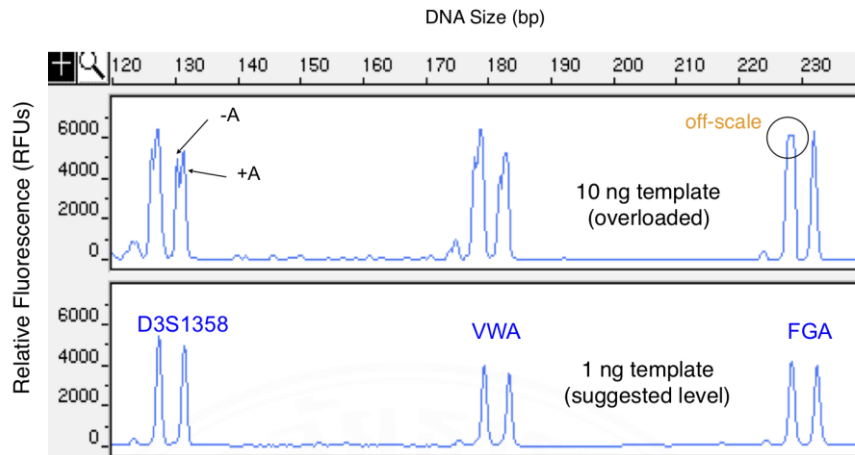
เมื่อทราบค่าของเกณฑ์การวิเคราะห์ แล้วผู้วิเคราะห์ต้องตรวจสอบถึงสิ่งแปลกปลอมที่ปรากฏในอิเล็กโทรโฟโแกรม ซึ่งอาจส่งผลให้ผู้วิเคราะห์ตีความผิดพลาดได้ สิ่งแปลกปลอมที่พบบ่อยในการตรวจวิเคราะห์มีดังนี้

- สดัตเตอร์ (Stutter) คือ พีคที่อยู่ด้านหน้าหรือด้านหลังพีคจริง 1 ชุด เกิดจากเลื่อนของเบสในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอจึงได้ผลผลิตที่มีเบสน้อยกว่า หรือมากกว่าแอลลีลจริง 1 ชุด ซึ่งปกติก็มีความสูงไม่เกิน 15% ของพีคจริง และมีโอกาสพบมากใน STRs ที่มีหน่วยการซ้ำน้อย ๆ เช่น dinucleotide หรือ trinucleotide (ภาพที่ 2.13)⁽⁴⁷⁾

- Non-template addition คือ เกิดจากการทำงานของ *taq* polymerase โดยการเติมอะดีนีนเพิ่มเข้าไปบริเวณท้าย (3') ของผลผลิตพีซีอาร์ บางครั้งกระบวนการดังกล่าวนี้เกิดได้อย่างไม่สมบูรณ์ทำให้พีคที่ได้มีลักษณะเป็นพีคหัวแตก (Split peak) (ภาพที่ 2.14)⁽⁴⁸⁾



ภาพที่ 2.13 ลักษณะของพีคที่เป็น Stutter⁽²⁾



ภาพที่ 2.14 ลักษณะของพีคที่เป็น Non-template addition ⁽²⁾

สตัทเตอร์ เป็นสิ่งแปลกปลอมที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์ดีเอ็นเอบุคคลเป็นอย่างมากโดยเฉพาะกับการวิเคราะห์ภาพรวมดีเอ็นเอแบบผสม (Mixture profile) จึงต้องมีการกำหนดค่า Stutter threshold เพื่อตัดพีคที่เชื่อว่าเป็นสตัทเตอร์ออก แล้วนำภาพรวมดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจเปรียบเทียบต่อไป ปกติแล้วจะกำหนดให้ค่า Stutter threshold เป็น 15% ของพีคจริง หรือบางห้องปฏิบัติการอาจทำการทดสอบหาค่าดังกล่าวเพื่อเป็นมาตรฐานในการวิเคราะห์ ⁽⁴⁷⁾

ตามกฎการแยก และการรวมกลุ่มอิสระของเมนเดล รุ่นลูกจะได้รับแอลลีลครึ่งหนึ่งมาจากบิดา และอีกครึ่งหนึ่งมาจากมารดา ในกรณีที่คู่แอลลีลมีลักษณะเดียวกันจะเรียกว่า ฮอโมไซกัส (Homozygous) และถ้าคู่แอลลีลมีลักษณะต่างกันจะเรียกว่า เฮเทอโรไซกัส (Heterozygous) ซึ่งในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบางครั้งครึ่งหนึ่งของคู่แอลลีล (Sister alleles) อาจจะไม่ถูกเพิ่มจำนวนขึ้นมา (Drop out) โดยเฉพาะเมื่อดีเอ็นเอต้นแบบมีความเข้มข้นต่ำ (Low-template) ความแปรปรวนนี้เรียกว่าผลกระทบสโทแคสติก ดังนั้นผู้วิเคราะห์จะต้องกำหนดเกณฑ์สโทแคสติกเพื่อใช้ตัดสินว่าพีคที่ปรากฏเป็น ฮอโมไซกัสหรือเฮเทอโรไซกัส ที่มีแอลลีลหนึ่งหายไป ซึ่งปัจจุบันนิยมใช้วิธีทดสอบความไวของชุดน้ำยาสำเร็จรูปเพื่อใช้กำหนดเกณฑ์สโทแคสติก โดยใช้ค่า RFU สูงสุดของแอลลีลที่เหลือ (Surviving sister allele) เป็นค่าดังกล่าว ^(44, 49)

ดีเอ็นเอที่ตรวจพบในสถานที่เกิดเหตุมีทั้งดีเอ็นเอผสม (Mixture DNA) และดีเอ็นเอจากแหล่งเดียว (Single-source) ถ้าตรวจพบพีคมากกว่า 2 พีคในบางตำแหน่งจะสามารถบ่งบอกได้ว่า วัตถุพยานที่ตรวจพบ มีดีเอ็นเอของบุคคลมากกว่า 1 คนขึ้นไป แต่ต้องแน่ใจว่าพีคดังกล่าวไม่ใช่พีคที่เกิดมาจากการปนเปื้อนดีเอ็นเอระหว่างการวิเคราะห์หรือพีคสตัทเตอร์ บางกรณีจะพบภาพรวมดีเอ็นเอ ที่มีสัดส่วนหลัก (Major contributors) และสัดส่วนรอง (Minor contributors) ซึ่งสามารถนำไปตรวจเปรียบเทียบ และระบุตัวบุคคลได้ว่ามาจากบุคคลอ้างอิงบุคคลใด อย่างไรก็ตาม

ต้องระมัดระวังในกรณีที่อาจแบ่งปันแอลลีลร่วมกัน (Sharing allele) แต่ถ้าพบพืชมามากกว่าหรือเท่ากับ 5 พืชขึ้นไป จะไม่สามารถใช้ภาพรวมดีเอ็นเอดังกล่าวตรวจสอบเปรียบเทียบหรือยืนยันตัวบุคคลได้⁽⁴⁴⁾

2.13 การทดสอบความถูกต้องสำหรับห้องปฏิบัติการตรวจพิสูจน์ STRs ทางนิติวิทยาศาสตร์

Scientific Working Group on DNA Analysis Method (SWGDM) ได้จัดทำแนวทางการทดสอบความถูกต้องของการตรวจพิสูจน์ STRs ทางนิติวิทยาศาสตร์ ซึ่งมีจุดประสงค์สำคัญเพื่อนำข้อมูลที่ได้จากการทดสอบดังกล่าวมาใช้ในการวิเคราะห์ผลดีเอ็นเอจากเครื่อง Capillary electrophoresis รวมถึงการประเมินภาพรวมดีเอ็นเอ ข้อจำกัดในการตรวจวิเคราะห์ (Limit of Detection) และความสมดุลของพีคเฮเทอโรไซกัส ซึ่งการทดสอบความถูกต้องนั้นจะแบ่งออกเป็น 5 ส่วนดังนี้^(7, 8)

2.13.1 การทดสอบความไวและการศึกษาสโตแคสติก

เป็นการศึกษาผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอในช่วงปริมาณดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน เพื่อนำมาวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่าง ๆ ดังนี้

- เกณฑ์การวิเคราะห์ คือ ค่าความสูงพีค (Peak height มีหน่วยเป็น RFU) ที่แยกความแตกต่างระหว่างสัญญาณรบกวนพื้นฐาน (Baseline noise) และ แอลลีลที่แท้จริง ซึ่งผู้วิเคราะห์สามารถกำหนดขึ้นได้จากการประเมินค่า LOQ ของสารควบคุมเชิงลบที่นำมาทดสอบ ด้วยชุดน้ำยาตรวจดีเอ็นเอสำเร็จรูป
- ช่วงปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสม (Dynamic range) คือช่วงของปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ให้ผลของภาพรวมดีเอ็นเอที่สมบูรณ์
- ปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสม (Optimal input DNA) คือปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ให้ผลของภาพรวมดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ และมีความสูงของพีคที่เหมาะสม
- ความสมดุลของพีคเฮเทอโรไซกัส (Heterozygous peak height balance) เป็นพารามิเตอร์สำคัญที่นำมาใช้ประเมินประสิทธิภาพของชุดน้ำยาตรวจดีเอ็นเอ ความสมดุลของพีคเฮเทอโรไซกัสสามารถคำนวณได้จาก Peak height ratio ตามสมการนี้

$$\text{Peak height ratio} = \frac{\text{RFU}_{\text{min}}}{\text{RFU}_{\text{max}}} \times 100$$

โดย RFU_{min} คือ ความสูงพีคเฮเทอโรไซกัสที่มีค่าน้อย

RFU_{max} คือ ความสูงพีคเฮเทอโรไซกัสที่มีค่ามาก

โดยปกติแล้วชุดน้ำยาตรวจดีเอ็นเอที่ดีจะต้องให้สมดุลของพีคเฮเทอโรไซกัสในช่วงไม่น้อยกว่า 60 -70% ⁽⁵⁰⁾ ในช่วงปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสม

- เกณฑ์สโทแคสติก คือ ค่ากำหนดที่ทำให้ผู้วิเคราะห์ใช้ในการตัดสินว่าพีคที่ปรากฏเป็นพีคโฮโมไซกัส หรือ เฮเทอโรไซกัสที่แอลลีลหายไป 1 แอลลีล

การทดสอบพารามิเตอร์ทั้งหมดที่กล่าวในข้างต้นสามารถทำได้โดยการเตรียมดีเอ็นเอที่ปริมาณตั้งแต่ 1 ng จนถึง 8 pg โดยการเจือจางแบบลำดับส่วน 2 เท่า (Two-fold dilution) และนำมาวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่าง ๆ มากกว่า 2 ซ้ำ

2.13.2 การทดสอบตัวอย่างจากบุคคลอ้างอิง (Known) และตัวอย่างจริง หรือ Non-probative หรือ mock sample

คือการทดสอบตัวอย่างดีเอ็นเอบุคคลอ้างอิงที่ทราบภาพรวมดีเอ็นเอแล้วจากการทดสอบด้วยชุดน้ำยา หรือดีเอ็นเอที่ได้จากตัวอย่างจริง จำนวน 5-10 ตัวอย่างขึ้นไป หรืออาจใช้ตัวอย่างมาตรฐาน ดีเอ็นเอมาตรฐาน ที่มีใบรับรองก็ได้

2.13.3 การทดสอบความแม่นยำ และความถูกต้อง

การทดสอบนี้ประเมินได้จากการวิเคราะห์แอลลีลลิกเลตเตอร์ของแต่ละชุดน้ำยา 5-10 ตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วย Capillary Electrophoresis โดยคำนวณจากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของขนาดแอลลีลที่ปรากฏบนแอลลีลลิกเลตเตอร์ ซึ่งจะต้องมีค่าน้อยกว่า 0.15 คู่เบส นอกจากนี้จะต้องทำการทดสอบการทำซ้ำ (Repeatability) และความสามารถในการผลิตซ้ำ (Reproducibility) ด้วยตัวอย่างเดียวกัน 5 ครั้ง จากผู้วิเคราะห์คนเดียวกัน และจากผู้วิเคราะห์คนอื่น หรือจากห้องปฏิบัติการอื่น ตามลำดับ

2.13.4 การทดสอบดีเอ็นเอผสม

การทดสอบนี้เป็นการผสมดีเอ็นเอบุคคลจำนวน 2 คน ตามสัดส่วนต่างๆ เช่น 19:1, 9:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:9 และ 1:19 เพื่อเป็นแนวทางการวิเคราะห์ดีเอ็นเอผสม

2.13.5 การทดสอบการปนเปื้อนในห้องปฏิบัติการ

การทดสอบนี้มีจุดประสงค์เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนในห้องปฏิบัติการจากการประเมินผลการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เป็นสารควบคุมเชิงลบ

2.14 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มีการศึกษาประสิทธิภาพของชุดน้ำยาตรวจพิสูจน์ STRs ด้วยพารามิเตอร์ต่าง ๆ ตามแนวทางของ SWGDAM งานวิจัยที่ผ่านมา มีการออกแบบการทดสอบค่อนข้างหลากหลาย (ตารางที่ 2.7)

2.14.1 การศึกษาประสิทธิภาพของชุดน้ำยาตรวจดีเอ็นเอแบบเต็มปฏิบัติการ

ปัจจุบันชุดน้ำยาตรวจ STRs ตามมาตรฐาน 20 ตำแหน่งของ CODIS เช่น GlobalFiler™ PCR amplification kit, PowerPlex® Fusion 6 C System หรือ QIAGEN® Investigator® 24plex QS ให้ผลภาพรวมดีเอ็นเอที่สมบูรณ์เมื่อทดสอบด้วยปริมาณดีเอ็นเอในช่วง 0.25 ng–2 ng แต่ให้ภาพรวมดีเอ็นเอที่ไม่สมบูรณ์เมื่อปริมาณดีเอ็นเอน้อยกว่า 63 pg^(9, 11, 14, 51-55) นอกจากนี้มีการรายงานช่วงปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมต่อปฏิบัติการแบบเต็มของชุดน้ำยา GlobalFiler™ ในช่วง 0.25 ng-1 ng⁽⁵⁴⁾ และค่าความสมดุลของพีคเฮเทอโรไซกัสเมื่อทดสอบด้วยปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสม จะอยู่ในช่วง 60%-80%^(11, 52, 54) ขึ้นอยู่กับชนิดของชุดน้ำยาตรวจ STRs และสภาพแวดล้อมในการทดลอง สำหรับเกณฑ์ขั้นต่ำหรือเกณฑ์การวิเคราะห์ งานวิจัยที่ผ่านมาใช้ทั้งสารควบคุมเชิงบวก และสารควบคุมเชิงลบในการวิเคราะห์และอ่านผลเฉพาะพีคที่สูงตั้งแต่ 1 RFU ขึ้นไป⁽¹⁰⁻¹²⁾ ข้อมูลที่ได้ถูกนำมาวิเคราะห์ค่า LOQ แล้วใช้ค่าดังกล่าวเป็นเกณฑ์ขั้นต่ำ หรือเกณฑ์การวิเคราะห์ในการตรวจวัดดีเอ็นเอ มีการรายงานถึงเกณฑ์การวิเคราะห์ของชุดน้ำยา GlobalFiler™ PCR amplification kit, PowerPlex® Fusion 6 C System, QIAGEN® Investigator® 24plex QS และ Verifiler™ Plus ด้วยสารควบคุมเชิงลบให้เกณฑ์ขั้นต่ำเป็น 40 RFU, 50 RFU, 50-60 RFU และ 60-80 RFU ตามลำดับ⁽¹⁰⁻¹²⁾ มีงานวิจัยที่ศึกษาเกณฑ์สโทแคสติคจากการทดสอบความไวของชุดน้ำยา Globalfiler™, QIAGEN® Investigator® 24plex QS, PowerPlex® Fusion 6C System และ Verifiler™ Plus และรายงานเกณฑ์-สโทแคสติคเท่ากับ 450 RFU, 240 RFU, 320 RFU และ 180 RFU^(10, 11) ตามลำดับ การวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการตรวจวัดดีเอ็นเอผสมของชุดน้ำยาตรวจ STRs ชนิดต่าง ๆ พบว่างานวิจัยส่วนใหญ่กำหนดอัตราส่วนดีเอ็นเอเพศชายต่อเพศหญิงแตกต่างกันแต่ไม่เกินสัดส่วนที่ 1:19 และ 19:1 ผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอผสมพบว่าน้ำยาบางชนิดไม่สามารถเพิ่มสัดส่วนรองของดีเอ็นเอผสมในช่วงสัดส่วนที่สัดส่วน 1:5 หรือมากกว่าสัดส่วนที่ 1:10 ได้^(9, 11, 14, 51, 53-55) ส่วนใหญ่แล้วชุดน้ำยา Globalfiler™ มีความไวต่อสัดส่วนรองของดีเอ็นเอผสมมากที่สุด (11, 54) การทดสอบความแม่นยำ

ประเมินได้จากการวิเคราะห์ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของขนาดแอลลีล ตามมาตรฐานแล้วต้องมีค่าไม่เกิน 0.15 คูเบส และไม่มีการวิจัยใดหรือชุดน้ำยาตรวจ STRs ชนิดใดที่รายงานค่าดังกล่าวเกินกว่าค่ามาตรฐาน การทดสอบความถูกต้องวิเคราะห์ได้ความสามารถในการทำซ้ำ ความสามารถในการผลิตซ้ำ และการทดสอบสารดีเอ็นเอมาตรฐาน จากงานวิจัยทั้งหมดพบว่าผลการทดสอบที่ได้มีความสอดคล้องกันทั้งหมด สำหรับการศึกษาด้วยับยั้งมักใช้ เฮมาทิน เมลานิน ฮิวมิกแอซิด แทนนิก-แอซิด คอลลาเจน หรือ แคลเซียม ที่พบได้บ่อยจากวัตถุพยานประเภทคราบโลหิต เส้นผม ดิน ไม้เนื้อเยื่อ หรือกระดูก ตามลำดับ^(9, 11, 14, 52, 54, 55) มีการรายงานว่าชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator® 24plex และ PowerPlex® Fusion 6C System สามารถทนทานต่อตัวยับยั้งได้ดีกว่า Globalfiler™ และ PowerPlex® Fusion 6C System⁽¹¹⁾ ทนทานตัวยับยั้งได้ดีที่สุดโดยเฉพาะเฮมาทิน การวิเคราะห์ตัวอย่างจริงนั้นสามารถใช้ตัวอย่างได้หลากหลายจากงานคดี พบว่าบางงานวิจัยมีตัวอย่าง 1 ตัวอย่างที่ให้ผลไม่สอดคล้องกัน และ 1-3 ตัวอย่างที่ไม่สามารถสรุปผลได้แต่ส่วนใหญ่แล้วจะมีความสอดคล้องอย่างสมบูรณ์^(14, 51, 53)

2.14.2 การศึกษาประสิทธิภาพของชุดน้ำยาตรวจดีเอ็นเอแบบครึ่งปฏิบัติการ

มีการรายงานถึงความสำเร็จในการวิเคราะห์ STRs ด้วยการลดปริมาณชุดน้ำยาตรวจ STRs^(9, 13-18) พบว่าการใช้ชุดน้ำยา Globalfiler™ แบบครึ่งปฏิบัติการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวัดแอลลีลเพิ่มขึ้น 19%⁽¹³⁾ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ปฏิบัติการแบบเต็ม และสามารถลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ได้ถึง 20%⁽¹⁵⁾ ด้วยเหตุนี้จึงมีการศึกษาประสิทธิภาพของชุดน้ำยาหลายชนิด เช่น PowerPlex® 18D, Identifiler® Direct systems, AmpFLSTR® Identifiler® Plus kit, Globalfiler™, PowerPlex® Fusion 6C System หรือ QIAGEN® Investigator® 24plex QS^(9, 14, 16, 17) พบว่าการใช้ครึ่งปฏิบัติการให้ผลไม่แตกต่าง หรือ ให้ผลที่ดีกว่าการใช้ปฏิบัติการแบบเต็ม นอกจากนี้มีงานวิจัยที่เปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดน้ำยาสองชนิด ได้แก่ AmpFLSTR® Identifiler® Plus kit และ QIAGEN's IDplex Plus kit โดยใช้ครึ่งปฏิบัติการ และได้อภิปรายว่าสามารถใช้ในการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอทางนิติวิทยาศาสตร์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ⁽¹⁶⁾ อย่างไรก็ตามชุดน้ำยาที่ใช้ในงานวิจัยดังกล่าวเป็นชุดน้ำยาที่ตรวจ STRs ได้น้อยกว่า 20 ตำแหน่ง ซึ่งปัจจุบันยังไม่มี การรายงานเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดน้ำยาตรวจ STRs ที่สามารถตรวจได้มากกว่า 20 ตำแหน่ง ตามมาตรฐาน CODIS ด้วยครึ่งปฏิบัติการ

ตารางที่ 2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาประสิทธิภาพของชุดน้ำยาตรวจ STRs

ปี	ผู้วิจัย	ชุดน้ำยา และ เครื่องมือ	ผลการทดสอบ
ค.ศ. 2013	Myers B.A. และคณะ	ชุดน้ำยา: PowerPlex® 18D และ Identifiler® Direct systems เครื่องมือ: ABI 3130XL	เปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดน้ำยา PowerPlex® 18D กับชุดน้ำยา Identifiler® Direct systems ด้วยดีเอ็นเอเยื่อกระดูกซี่โครงแบบกระดาด FTA ของอาสาสมัคร 400 คน พบว่าการใช้ครั้งปฏิบัติการให้ความสูงของพีคมากกว่าปฏิบัติการแบบเต็ม เมื่อใช้ injection time ที่ 5 และ 10 วินาที พบว่าทั้งสองชุดน้ำยาให้สมดุลของพีคเฮเทอโรไซกัสไม่แตกต่างกัน และสามารถเพิ่ม injection time เพื่อให้ได้ภาพรวมดีเอ็นเอที่สมบูรณ์มากขึ้น ⁽¹⁷⁾
ค.ศ. 2015	Iyavoo S. และคณะ	ชุดน้ำยา: AmpFLSTR® Identifiler® Plus kit เครื่องมือ: ABI Prism® 3100	ทดสอบการลดปริมาตรของชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus kit จาก 12.5 µL เป็น 10 µL จากการวิจัยพบว่าปฏิบัติการทั้งสองแบบให้ผลที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสามารถใช้ในการลดปริมาตรในการตรวจ STRs เพื่อลดค่าใช้จ่ายในการตรวจพิสูจน์ได้ถึง 20% ⁽¹⁵⁾
ค.ศ. 2015	Bogas V. และคณะ	ชุดน้ำยา: GlobalFiler™ PCR amplification kit เครื่องมือ: ABI Prism® 3130 และ ABI Prism® 3500	ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ถูกทำลาย และตัวอย่างที่มีตัวยับยั้ง จำนวน 12 ตัวอย่าง จากเลือดผู้บริจาคเพศชาย จำนวน 3 คน บนผ้าสามชนิด คือ ผ้ายีนส์ ผ้าฝ้าย และ ผ้าไลคา โดยทิ้งไว้ที่ระยะเวลา 1, 3, 7, 15, 30, 90 วัน และ 6, 12, 24 เดือน เมื่อทดสอบด้วยชุดน้ำยา GlobalFiler® พบว่า 6 ใน 14 ตัวอย่างสามารถให้ภาพรวมดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ที่ความเข้มข้นต่ำที่สุด 0.0049 ng/mL ⁽⁵⁶⁾

ตารางที่ 2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาประสิทธิภาพของชุดน้ำยาตรวจ STRs (ต่อ)

ปี	ผู้วิจัย	ชุดน้ำยา และ เครื่องมือ	ผลการทดสอบ
ค.ศ. 2016	Mattayat D. และคณะ	ชุดน้ำยา: AmpFLSTR® Identifiler® Plus kit และ QIAGEN's IDplex Plus kit เครื่องมือ: ABI 3130	เปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดน้ำยาสองชุดโดยใช้ครึ่งปฏิกิริยาดังนี้ การทดสอบความไว: จากการทดสอบด้วยปริมาณดีเอ็นเอที่ 500 pg, 250pg, 125 pg, 62.5 pg และ 31.25 pg พบว่าชุดน้ำยา Identifiler® Plus พบแอลลีลหายไปที่ปริมาณดีเอ็นเอเป็น 125 pg, 62.5 pg และ 31.25 pg ในขณะที่ ชุดน้ำยา ID plexPlus kit พบที่ 32.25 pg เท่านั้น นอกจากนี้ทั้งสองชุดน้ำยาพบภาพรวมดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ การทดสอบความเสถียร: พบว่าชุดน้ำยา IDplexPlus kit ทนต่อตัวยับยั้ง แคลเซียม เฮมาทิน ดีกว่า Identifiler® Plus แต่ ฮิวมิคแอซิด Identifiler® Plus ทนได้ดีกว่า การทดสอบสมดุลของพิกเฮเทอไรโซกัส: Identifiler® Plus มีสมดุลเฮเทอไรโซกัสที่ดีกว่า IDplexPlus kit อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การทดสอบจากตัวอย่างจริง: พบว่าตัวอย่างทั้งหมด 45 ตัวอย่าง ให้ผลที่ดี สอดคล้องกันและไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ⁽¹⁶⁾
ค.ศ. 2016	Ensenberger M.G. และคณะ	ชุดน้ำยา: The PowerPlex® Fusion 6C System เครื่องมือ: ABI 3130 และ ABI 3500	ทดสอบประสิทธิภาพของชุดน้ำยาโดยใช้ปฏิกิริยาแบบเต็มดังนี้ การทดสอบความจำเพาะ: พบว่าไพรเมอร์บางตัวสามารถจับกับตำแหน่งอื่นของสิ่งมีชีวิตอื่นที่ไม่ใช่มนุษย์ได้ การทดสอบความไว: พบแอลลีลหายไปที่ปริมาณดีเอ็นเอต่ำกว่า 125 pg และพบภาพรวมดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ในช่วงที่ปริมาณดีเอ็นเอเป็น 2 ng-250 pg โดยไม่เกิดการอิมตัวของเครื่องมือวัด

ตารางที่ 2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาประสิทธิภาพของชุดน้ำยาตรวจ STRs (ต่อ)

ปี	ผู้วิจัย	ชุดน้ำยา และ เครื่องมือ	ผลการทดสอบ
ค.ศ. 2016	Ensenberger M.G. และคณะ (ต่อ)	ชุดน้ำยา: The PowerPlex® Fusion 6C System เครื่องมือ: ABI 3130 และ ABI 3500	<p>การทดสอบความเสถียร: พบว่าที่ความเข้มข้นของตัวยับยั้ง เฮมาทิน และ ฮิวมิกแอซิด เท่ากับ 500mM และ 100 ng/μL ตามลำดับ ให้ภาพรวมดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ ส่วนแทนนิกแอซิด และ EDTA ความเข้มข้น 100 ng/μL และ 750 mM ให้ภาพรวมดีเอ็นเอเพียง 90% และ 99% ตามลำดับ</p> <p>การทดสอบความแม่นยำ: พบว่ามีความคลาดเคลื่อนเพียง 0.1 คู่เบส ซึ่งน้อยกว่าค่ามาตรฐานที่กำหนดไว้ที่ 0.45 คู่เบส</p> <p>การทดสอบจากตัวอย่างจริง: พบว่าตัวอย่างทั้งหมด 33 ตัวอย่าง มีความสอดคล้องกัน โดยมีเพียง 4 ตัวอย่างเท่านั้นที่ตรวจไม่พบภาพรวมดีเอ็นเอ</p> <p>การทดสอบความสำเร็จในการทำซ้ำ: พบภาพรวมดีเอ็นเอที่สอดคล้องกันทั้งหมด</p> <p>การทดสอบดีเอ็นเอผสม: พบแอลลีลของสัดส่วนรองหายไปในส่วนส่วนของดีเอ็นเอผสมที่มี เพศหญิง: เพศชายเป็น 19:1, 9:1, 1:5, 1:9 และ 1:19 แต่ให้แอลลีลทุกตำแหน่งของสัดส่วนรองที่สัดส่วน 1:2, 2:1 และ 5:1</p> <p>การทดสอบการลดปริมาณของปฏิกิริยา: พบว่าสามารถใช้ครึ่งปฏิกิริยากับชุดน้ำยานี้ได้⁽¹⁴⁾</p>

ตารางที่ 2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาประสิทธิภาพของชุดน้ำยาตรวจ STRs (ต่อ)

ปี	ผู้วิจัย	ชุดน้ำยา และ เครื่องมือ	ผลการทดสอบ
ค.ศ. 2017	Ludeman M.J. และ คณะ	ชุดน้ำยา: Globalfiler™ เครื่องมือ: ABI 3500XL	<p>ทดสอบประสิทธิภาพของชุดน้ำยาโดยใช้ปฏิกิริยาแบบเต็มดังนี้</p> <p>การทดสอบความจำเพาะ: พบไพรเมอร์บางตัวสามารถจับกับตำแหน่ง ยีนของลิงชิมแปนซี สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่น สัตว์ที่ไม่ใช่สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และจุลินทรีย์ได้</p> <p>การทดสอบความเสถียร: ชุดน้ำยา Globalfiler™ ทนทานต่อตัวยับยั้งประเภท เฮมาทิน ฟีนอล-คลอโรฟอร์ม และ ฮิวมิกแอซิด มากกว่าชุดน้ำยา Identifiler™ Plus และ NGM SElect™ และ ชุดน้ำยา Globalfiler™ ถูกยับยั้งโดยเฮมาทินอย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้นของเฮมาทินเท่ากับ 0.6 mM ส่วนฟีนอล-คลอโรฟอร์ม ที่ 0.25-0.5 µL และ ฮิวมิกแอซิด 100-300 ng ใน 1 ปฏิกิริยา พบว่ายังตรวจพบแอลลีลอยู่</p> <p>การทดสอบความไว: พบแอลลีลหายไปทีปริมาณดีเอ็นเอต่ำกว่า 62.5 pg และพบภาพรวมดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ในช่วงที่ปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 250 ng และ 125 pg</p> <p>การทดสอบจากตัวอย่างจริง: พบว่าตัวอย่างทั้งหมด 15 ตัวอย่างชุดน้ำยา Globalfiler™ ตรวจพบแอลลีลได้มากกว่า Identifiler® Plus</p> <p>การทดสอบดีเอ็นเอผสม: เมื่อทดสอบดีเอ็นเอผสมที่มีอัตราส่วนเพศหญิง: เพศชายเป็น 0:1, 1:1, 5:1, 8:1 และ 1:0 พบแอลลีลของสัดส่วนรองหายไปเพียงสัดส่วนที่ 1:8 ⁽⁵⁵⁾</p>

ตารางที่ 2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาประสิทธิภาพของชุดน้ำยาตรวจ STRs (ต่อ)

ปี	ผู้วิจัย	ชุดน้ำยา และ เครื่องมือ	ผลการทดสอบ
ค.ศ. 2017	Brito P. และคณะ	ชุดน้ำยา: Globalfiler™ เครื่องมือ: ABI Prism® 3500	ทดสอบดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นต่ำ (Low template DNA) ทั้งหมด 126 ตัวอย่าง (ช่วงการทดสอบที่ 1) และ 19 ตัวอย่าง (ช่วงการทดสอบที่ 2) ด้วยชุดน้ำยา ที่ลดปริมาตรของปฏิกิริยา จาก 25 µL เป็น 12.5 µL ผลปรากฏว่าการทดสอบแบบครึ่งปฏิกิริยาได้ภาพรวมดีเอ็นเอสมบูรณ์มากขึ้นถึง 19% ⁽¹³⁾
ค.ศ. 2017	Lin SW. และคณะ	ชุดน้ำยา: The PowerPlex® Fusion 6C System, Globalfiler™ และ QIAGEN® Investigator® 24plex QS เครื่องมือ: ABI 3500XL	ทดสอบประสิทธิภาพของชุดน้ำยาโดยใช้ปฏิกิริยาแบบเต็มดังนี้ การทดสอบตัวยับยั้ง: น้ำยา QIAGEN® Investigator® 24plex QS ให้ภาพรวมดีเอ็นเอที่สมบูรณ์เมื่อเติมฮิวมิคแอซิด และแทนนิกแอซิด ความเข้มข้นสูงถึง 450 และ 2500 ng/µL ตามลำดับ น้ำยาชนิดอื่น ให้ผลภาพรวมดีเอ็นเอที่สมบูรณ์เมื่อเติมฮิวมิคแอซิด 300 ng/µL The PowerPlex® Fusion 6C System และ Globalfiler™ มีภาพรวมดีเอ็นเอที่สมบูรณ์หรือเกือบสมบูรณ์เมื่อเติม แทนนิกแอซิดความเข้มข้นเท่ากับ 625 และ 1250 ng/µL ดังนั้นชุดน้ำยา Investigator® 24plex QS ทนทานต่อตัวยับยั้ง มากกว่าชุดน้ำยา The PowerPlex® Fusion 6C System และ Globalfiler™ การทดสอบความไว: ชุดน้ำยาทั้ง 4 ชนิดพบแอลลีลหายไปทีปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 0.1 ng และพบภาพรวมดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ในช่วงที่ปริมาณดีเอ็นเอเป็น 0.25 ng, 0.5ng และ 1 ng และ น้ำยา Globalfiler™ และให้ผลดีที่สุดที่สุดในชุดน้ำยาทั้งหมด

ตารางที่ 2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาประสิทธิภาพของชุดน้ำยาตรวจ STRs (ต่อ)

ปี	ผู้วิจัย	ชุดน้ำยา และ เครื่องมือ	ผลการทดสอบ
ค.ศ. 2017	Lin SW. และคณะ (ต่อ)	ชุดน้ำยา: The PowerPlex® Fusion 6C System, Globalfiler™ และ QIAGEN® Investigator® 24plex QS เครื่องมือ: ABI 3500XL	การทดสอบดีเอ็นเอผสม: เมื่อทดสอบดีเอ็นเอผสมที่มีอัตราส่วนเพศหญิง: เพศชายเป็น 30:1, 15:1, 6:1, 3:1 และ 3:2 พบว่าชุดน้ำยา Globalfiler™, The PowerPlex® Fusion 6 C System และ QIAGEN® Investigator® 24plex QS มีแอลลีลของสัดส่วนรองหายไปในทุกสัดส่วน ยกเว้น 3:2 ⁽⁵⁴⁾
ค.ศ. 2017	Tan J. และคณะ	ชุดน้ำยา: The PowerPlex® Fusion 6C System, Globalfiler™ และ QIAGEN® Investigator® 24plex QS เครื่องมือ: ABI 3500XL	ทดสอบประสิทธิภาพของชุดน้ำยาโดยใช้ปฏิกิริยาแบบเต็มดังนี้ การทดสอบเกณฑ์การวิเคราะห์: ชุดน้ำยา: The PowerPlex® Fusion 6C System, Globalfiler™ และ QIAGEN® Investigator® 24plex QS ให้เกณฑ์การวิเคราะห์ที่ทดสอบด้วย 29 รอบปฏิกิริยาพีซีอาร์เท่ากับ 50 RFU, 40 RFU และ 50 RFU ตามลำดับ แต่เมื่อทดสอบด้วย 30 รอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ ชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator® ให้เกณฑ์การวิเคราะห์เป็น 60 RFU ส่วนน้ำยาอื่นให้ผลเหมือนการทดสอบที่ 29 รอบ ปฏิกิริยาพีซีอาร์ การทดสอบความไวและสโทแคสติก: ชุดน้ำยาทั้งหมดพบแอลลีลหายไปที่ปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 250 pg และพบภาพรวมดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ในช่วงที่ปริมาณดีเอ็นเอเป็น 0.5 ng เมื่อทดสอบด้วย 29 รอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ ชุดน้ำยา: Globalfiler™, QIAGEN® Investigator® 24plex QS และ The PowerPlex® Fusion 6C System ให้เกณฑ์สโทแคสติกเท่ากับ 450 RFU, 240 RFU และ 320 RFU ตามลำดับ

ตารางที่ 2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาประสิทธิภาพของชุดน้ำยาตรวจ STRs (ต่อ)

ปี	ผู้วิจัย	ชุดน้ำยา และ เครื่องมือ	ผลการทดสอบ
ค.ศ. 2017	Tan J. และคณะ (ต่อ)	ชุดน้ำยา: The PowerPlex® Fusion 6C System, Globalfiler™ และ QIAGEN® Investigator® 24plex QS เครื่องมือ: ABI 3500XL	การทดสอบด้วยบัลย์: เมื่อทดสอบ เฮมาทิน ฮิวมิคแอซิด แทนนิกแอซิด และ EDTA กับน้ำยาทั้งหมดพบว่า - ชุดน้ำยา The PowerPlex® Fusion 6C System ทนทานเฮมาทินได้ดีที่สุดโดยพบภาพรวมดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ที่มีความเข้มข้นของเฮมาทินมากถึง 2 mM - ชุดน้ำยาทั้งหมดทนต่อ ฮิวมิคแอซิดได้ดีโดยสามารถตรวจพบแอลลีลได้ 67%, 81% และ 90% เมื่อมีความเข้มข้นของฮิวมิคแอซิดมากถึง 500 ng/μL สำหรับ Globalfiler™, QIAGEN® Investigator® 24plex QS และ The PowerPlex® Fusion 6C ตามลำดับ - ชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator® 24plex QS System ทนทานแทนนิกแอซิด และ EDTA ได้ดีที่สุด โดยพบภาพรวมดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ที่มีความเข้มข้นของแทนนิกแอซิด และ EDTA ถึง 1000 ng/μL และ 2 mM ตามลำดับ ⁽¹¹⁾
ค.ศ. 2017	Cisana S. และคณะ	ชุดน้ำยา: The PowerPlex® Fusion 6C System เครื่องมือ: ABI 3500	ทดสอบประสิทธิภาพของชุดน้ำยาโดยใช้ปฏิกิริยาแบบเต็มดังนี้ การทดสอบความไว: พบภาพรวมดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ที่มีปริมาณดีเอ็นเอเป็น 125 pg และพบแอลลีลหายไปเมื่อปริมาณดีเอ็นเอต่ำลงที่ 62.5 pg และ 31.25 pg การทดสอบด้วยบัลย์: ชุดน้ำยานี้ทนทานต่อ Urea ที่ 1M และได้ภาพรวมดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ เมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นที่ 2M พบภาพรวมดีเอ็นเอที่ไม่สมบูรณ์

ตารางที่ 2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาประสิทธิภาพของชุดน้ำยาตรวจ STRs (ต่อ)

ปี	ผู้วิจัย	ชุดน้ำยา และ เครื่องมือ	ผลการทดสอบ
ค.ศ. 2017	Cisana S. และคณะ (ต่อ)	ชุดน้ำยา: The PowerPlex® Fusion 6C System เครื่องมือ: ABI 3500	<p>การทดสอบดีเอ็นเอผสม: พบแอลลีลของสัดส่วนรองหายไปในส่วนหนึ่งของดีเอ็นเอผสมที่มี เพศหญิง: เพศชาย เป็น 1:10, 1:5, 5:1 และ 10:1 แต่ให้แอลลีลทุกตำแหน่งของสัดส่วนรองเพียงสัดส่วน 1:1 เท่านั้น</p> <p>การทดสอบผลกระทบจากสารเคมีในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ: การสกัดด้วยวิธี Chelex®100, QIAmp DNA micro kit และ Phenol-Chloroform ให้ผลภาพรวมดีเอ็นเอไม่แตกต่างกัน และได้ผลลัพธ์ของภาพรวมดีเอ็นเอที่สอดคล้องกันทั้งหมด</p> <p>การทดสอบความแม่นยำ: พบส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของขนาดแอลลีลไม่เกิน 0.1 คู่เบสซึ่งน้อยกว่าค่ามาตรฐานที่ 0.5 คู่เบส</p> <p>การทดสอบดีเอ็นเอจากตัวอย่างจริง: ตัวอย่างดีเอ็นเอจากกระพุ้งแก้ม โลหิต เนื้อเยื่อ ดีเอ็นเอจากการสัมผัส และตัวอย่างดีเอ็นเอผสม ทั้งหมด 22 ตัวอย่าง พบภาพรวมดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ 7 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบดีเอ็นเอ 1 ตัวอย่าง และพบภาพรวมดีเอ็นเอที่ไม่สมบูรณ์ และภาพรวมดีเอ็นเอของดีเอ็นเอผสม 14 ตัวอย่าง และเป็นภาพรวมดีเอ็นเอที่สอดคล้องกับภาพรวมดีเอ็นเอที่ได้จากการทดสอบด้วยน้ำยาชุดอื่น 20 ตัวอย่าง ส่วนอีก 2 ตัวอย่างที่เหลือตรวจไม่พบดีเอ็นเอกับชุดน้ำยาที่ใช้เปรียบเทียบ จึงไม่สามารถสรุปผลได้⁽⁵¹⁾</p>

ตารางที่ 2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาประสิทธิภาพของชุดน้ำยาตรวจ STRs (ต่อ)

ปี	ผู้วิจัย	ชุดน้ำยา และ เครื่องมือ	ผลการทดสอบ
ค.ศ. 2018	Elwick K. และ คณะ	ชุดน้ำยา: Investigator® 24plex QS kit และ GlobalFiler® PCR Amplification kit เครื่องมือ: 3500	<p>เปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดน้ำยา Investigator® 24plex QS kit และ GlobalFiler® PCR Amplification kit แบบเต็มปฏิกิริยา</p> <p>การทดสอบความไว: จากการทดสอบปริมาณดีเอ็นเอที่ 1 ng, 800 pg, 500 pg, 250 pg, 125 pg, 62.5 pg, 31.25 pg, 15.62 pg และ 7.8 pg พบว่าชุดน้ำยา GlobalFiler® PCR Amplification kit มีความไวสูงกว่า Investigator® 24plex QS kit ซึ่ง GlobalFiler® PCR Amplification kit พบแอลลีลหายไปที่ปริมาณดีเอ็นเอเป็น 62.5 pg ในขณะที่ Investigator® 24plex QS kit พบที่ 125 pg</p> <p>การทดสอบความสมดุล: พบว่า GlobalFiler® PCR Amplification kit พบความสมดุลของพีคเฮเทอโรไซกัสที่ปริมาณดีเอ็นเอเป็น 125 pg เท่ากับ 88%-73% ในขณะที่ Investigator® 24plex QS kit เท่ากับ 88%-64%</p> <p>การทดสอบตัวยับยั้ง: ชุดน้ำยา Investigator® 24plex QS kit สามารถทนต่อตัวยับยั้งได้ดีกว่า GlobalFiler® PCR Amplification kit เมื่อทดสอบด้วยฮิวมิคแอซิด, เฮมาทิน, เมลานิน, คอลาเจน และ แคลเซียม⁽⁵²⁾</p>

ตารางที่ 2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาประสิทธิภาพของชุดน้ำยาตรวจ STRs (ต่อ)

ปี	ผู้วิจัย	ชุดน้ำยา และ เครื่องมือ	ผลการทดสอบ
ค.ศ. 2019	Almohammed E. และ Hadi S.	ชุดน้ำยา: GlobalFiler® PCR Amplification kit เครื่องมือ: 3500	<p>ทดสอบประสิทธิภาพของชุดน้ำยาโดยใช้ปฏิกิริยาแบบเต็มดังนี้</p> <p>การทดสอบเกณฑ์ขั้นต่ำ: พบค่า Limit of Quantitation (LOQ) เท่ากับ 50 RFU ในช่องสีม่วง (SID™)</p> <p>การทดสอบความไว: พบแอลลีลหายไปที่ปริมาณดีเอ็นเอต่ำกว่า 62.5 pg และพบภาพรวมดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ในช่วงที่ปริมาณดีเอ็นเอเป็น 1 ng-250 pg</p> <p>การทดสอบความจำเพาะ: พบไพรเมอร์บางตัวสามารถจับกับดีเอ็นเอของสุนัข แกะ สุกร กระต่าย และ หนู ได้</p> <p>การทดสอบการลดปริมาณของปฏิกิริยา: พบว่าสามารถใช้ครึ่งปฏิกิริยากับชุดน้ำยานี้ด้วยปริมาณดีเอ็นเอเป็น 0.5 ng</p> <p>การทดสอบความสำเร็จในการทำซ้ำ: พบภาพรวมดีเอ็นเอที่สอดคล้องกันทั้งหมด</p> <p>การทดสอบจากตัวอย่างจริง: พบว่าตัวอย่างทั้งหมด 64 ตัวอย่างมีความสอดคล้องกันทั้งหมดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifier® Plus kit</p> <p>การทดสอบดีเอ็นเอผสม: พบแอลลีลของสัดส่วนรองหายไปในส่วนส่วนของดีเอ็นเอผสมที่มี เพศหญิง: เพศชายเป็น 19:1 และ 1:19 สำหรับสัดส่วนที่ 1:1, 1:3, 3:1, 1:9 และ 9:1 ไม่พบการหายไปของแอลลีลที่เป็นสัดส่วนรอง</p>

ตารางที่ 2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาประสิทธิภาพของชุดน้ำยาตรวจ STRs (ต่อ)

ปี	ผู้วิจัย	ชุดน้ำยา และ เครื่องมือ	ผลการทดสอบ
ค.ศ. 2019	Almohammed E. และ Hadi S. (ต่อ)	ชุดน้ำยา: GlobalFiler® PCR Amplification kit เครื่องมือ: 3500	การทดสอบความเสถียร: พบว่าที่ความเข้มข้นของตัวยับยั้ง เฮมาทิน และ ฮิวมิกแอซิด เท่ากับ 500mM และ 100 ng/μL ตามลำดับ ให้ภาพรวมดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ ส่วนแทนนิกแอซิด และ EDTA ความเข้มข้น 100 ng/μL และ 750 mM ให้ภาพรวมดีเอ็นเอเพียง 90% และ 99% ตามลำดับ การทดสอบความแม่นยำ: พบว่าแอลลีลมีขนาด แตกต่างกันไม่เกิน 0.50 คู่เบส ⁽⁹⁾
ค.ศ. 2019	Feng X. และคณะ	ชุดน้ำยา: The PowerPlex® Fusion 6C System เครื่องมือ: ABI 3130XL	ทดสอบประสิทธิภาพของชุดน้ำยาโดยใช้ปฏิกิริยาแบบเต็มดังนี้ การทดสอบความไว: พบแอลลีลหายไปทีปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 31.25 pg และช่วงที่ดีเอ็นเอมีความเข้มข้นระหว่าง 1 ng ถึง 62.5 pg ให้ภาพรวมดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ การทดสอบความจำเพาะ: พบว่าไพรเมอร์บางตัวสามารถจับกับตำแหน่งอื่นของพวกสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม บางชนิดเช่น ลิงชิมแปนซี และ ลิงแสม ได้ การทดสอบความเสถียร: ด้วยตัวยับยั้ง 4 ชนิดประกอบด้วย เฮมาทิน ฮิวมิกแอซิด อินดิโก ฮีโมโกลบิน และ EDTA พบว่าที่ทุกความเข้มข้นของตัวยับยั้งให้ภาพรวมดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ การทดสอบดีเอ็นเอผสม: พบว่าอัตราส่วนดีเอ็นเอเพศชายต่อเพศหญิงที่ 1:1 และ 1:4 ให้ภาพรวมดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ แต่ที่อัตราส่วน 1:9 และ 1:19 เกิดการหายไปของแอลลีล

ตารางที่ 2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาประสิทธิภาพของชุดน้ำยาตรวจ STRs (ต่อ)

ปี	ผู้วิจัย	ชุดน้ำยา และ เครื่องมือ	ผลการทดสอบ
ค.ศ. 2019	Feng X. และคณะ (ต่อ)	ชุดน้ำยา: The PowerPlex® Fusion 6C System เครื่องมือ: ABI 3130XL	การทดสอบความแม่นยำ: พบว่ามีส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเป็น 0.02-0.071 0.08 คู่เบส ซึ่งต่ำกว่าค่ามาตรฐานที่กำหนดไว้ที่ 0.15 คู่เบส การทดสอบจากตัวอย่างจริง: พบว่าตัวอย่างทั้งหมด 85 ตัวอย่างมีความสอดคล้องกัน มีเพียง 1 ตัวอย่างเท่านั้นที่ให้ผลไม่สอดคล้องกัน การทดสอบความสำเร็จในการทำซ้ำและความสามารถในการผลิตซ้ำ: ตัวอย่างทั้งหมดให้ผลที่สอดคล้องกันทั้งหมด ⁽⁵³⁾
ค.ศ. 2019	วงศ์กร กิ่งสนั่น และคณะ	ชุดน้ำยา: QIAGEN® Investigator® 24plex QS และ AmpFLSTR® Identifier® Plus เครื่องมือ: ABI 3500	เปรียบเทียบความไวของชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator® 24plex QS และ AmpFLSTR® Identifier® Plus kit ด้วยดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นสูง ดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นต่ำ และดีเอ็นเอที่มีตัวยับยั้ง จำนวน 40 ตัวอย่าง พบว่าการทดสอบด้วยชุดน้ำยา Investigator® 24plex QS ที่มีปริมาณดีเอ็นเอเป็น 1.0 ng/μL ด้วยปฏิกิริยาแบบเต็มและครึ่งปฏิกิริยา พบว่าให้ค่าการตรวจพบแอลลีลเท่ากัน สำหรับที่ปริมาณดีเอ็นเอเป็น 0.5 ถึง 0.0625 ng/μL ครึ่งปฏิกิริยา ให้ค่าการตรวจพบแอลลีลสูงกว่า อย่างไรก็ตามทั้งสองให้ค่าการตรวจพบแอลลีลและความสมดุลของพีคเฮเทอโรไซกัสใกล้เคียงกัน จึงสามารถนำมาใช้ตรวจพิสูจน์ทางดีเอ็นเอได้อย่างมีประสิทธิภาพ ⁽¹⁸⁾

ตารางที่ 2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาประสิทธิภาพของชุดน้ำยาตรวจ STRs (ต่อ)

ปี	ผู้วิจัย	ชุดน้ำยา และ เครื่องมือ	ผลการทดสอบ
ค.ศ. 2019	Tay J.W. และคณะ	ชุดน้ำยา: PowerPlex® Fusion, Verifiler™ Plus และ Investigator® 24plex QS เครื่องมือ: ABI 3500XL	เปรียบเทียบความไว และสัญญาณรบกวนพื้นฐาน ของชุดน้ำยาสามชุด คือ PowerPlex® Fusion, Verifiler™ Plus และ Investigator® 24plex QS พบว่าชุดน้ำยา Investigator® 24plex QS มีสัญญาณรบกวนพื้นฐานน้อยที่สุดเมื่อใช้ชุดควบคุมเชิงลบ และชุดน้ำยา Verifiler™ Plus สัญญาณรบกวนพื้นฐานน้อยที่สุดเมื่อใช้ชุดควบคุมเชิงบวก นอกจากนี้ชุดน้ำยา Verifiler™ Plus มีความไวมากที่สุด โดยสามารถตรวจพบแอลลิลถึง 50% ของปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่มีดีเอ็นเอต้นแบบ 8 pg ในขณะที่ น้ำยา PowerPlex® Fusion และ Investigator® 24plex QS ตรวจพบแอลลิล 25% และ 4% ตามลำดับ นอกจากนี้ภาพรวมดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ พบได้ที่ดีเอ็นเอต้นแบบ 63 pg ของชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion และ Verifiler™ Plus และ 125 pg ของชุดน้ำยา Investigator® 24plex QS โดยสรุป น้ำยา Verifiler™ Plus มีความไวมากที่สุด และ สัญญาณรบกวนพื้นฐานน้อยที่สุด ⁽¹²⁾
ค.ศ. 2019	Zhong C. และคณะ	ชุดน้ำยา: PowerPlex® Fusion, Verifiler™ Plus เครื่องมือ: ABI 3500XL	ทดสอบความไวของชุดน้ำยา Verifiler™ Plus พบว่าชุดน้ำยาดังกล่าวให้ภาพรวมดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ที่ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ 125 pg และสามารถตรวจพบแอลลิลได้ที่ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบเพียง 16 pg ซึ่งมีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะใช้กับตัวอย่างที่ปริมาณดีเอ็นเอน้อย ดีเอ็นเอที่ถูกทำลาย หรือ ดีเอ็นเอที่มีตัวบ่งชี้ ⁽⁵⁷⁾

ตารางที่ 2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาประสิทธิภาพของชุดน้ำยาตรวจ STRs (ต่อ)

ปี	ผู้วิจัย	ชุดน้ำยา และ เครื่องมือ	ผลการทดสอบ
ค.ศ. 2019	Janaahi N.A.	ชุดน้ำยา: Verifiler™ Plus เครื่องมือ: ABI 3500	ทดสอบประสิทธิภาพและความถูกต้องของชุดน้ำยา Verifiler™ Plus ด้วยตัวอย่างเลือด 15 ตัวอย่าง แบบเต็มปฏิกิริยา และเยื่อบุกระพุงแก้ม 15 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างแสดงภาพรวมดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ที่ปริมาณดีเอ็นเอต่ำที่สุด 0.062 ng แต่เมื่อปริมาณของดีเอ็นเอต่ำกว่า 250 pg แอลลีลบางตำแหน่งจะมีค่าความสมดุลของพีคเฮเทอโรไซกัสต่ำกว่า 60% และรายงานเกณฑ์การวิเคราะห์ และ เกณฑ์สโทแคสติก เป็น 80 RFU และ 150 RFU ตามลำดับ ⁽¹⁰⁾

บทที่ 3 วิธีการวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 ตัวอย่างดีเอ็นเอ

ตัวอย่างดีเอ็นเอได้มาจากดีเอ็นเอที่สกัดแล้วที่เหลือจากการตรวจพิสูจน์ ในคดีอาญาที่พนักงานสอบสวนได้ส่งมอบให้ทางห้องปฏิบัติการกลุ่มงานตรวจชีววิทยาและดีเอ็นเอ กองพิสูจน์หลักฐานกลาง สำนักงานพิสูจน์หลักฐานตำรวจ ซึ่งเป็นตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้มาจาก กระพุ้งแก้ม คราบโลหิต คราบอสุจิ ดีเอ็นเอจากการสัมผัส เส้นผม เส้นขน เล็บ ก้นบูทหรือ และสารคัดหลั่งจากช่องคลอด ทั้งหมด 31 ตัวอย่าง ซึ่งได้มาจากการคำนวณปริมาณตัวอย่าง ที่ทำการตรวจพิสูจน์ของห้องปฏิบัติการกลุ่มงานตรวจชีววิทยาและดีเอ็นเอ กองพิสูจน์หลักฐานกลาง สำนักงานพิสูจน์หลักฐานตำรวจ สำนักงานตำรวจแห่งชาติ ในช่วงเดือนมกราคม-มิถุนายน ปี พ.ศ.2563 ดังนี้

จำนวนตัวอย่างจากสิ่งส่งตรวจทั้งหมด	5,468 ตัวอย่าง
จำนวนตัวอย่างที่จะใช้ในการศึกษา	3,461 ตัวอย่าง

คำนวณขนาดของกลุ่มตัวอย่างที่ต้องการ (n) จากสูตร
$$n = \frac{(Z\alpha)^2(P)(Q)}{(d)^2}$$

เมื่อ P คือ สัดส่วนของลักษณะที่สนใจในประชากร เท่ากับ 0.63

Q คือ 1-P เท่ากับ 0.37

d คือ ค่าความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับให้เกิดขึ้นได้ เท่ากับ 0.18

Z α คือ ค่ามาตรฐานที่ระดับความเชื่อมั่น 95% หรือนัยสำคัญ 0.05 เท่ากับ 1.96

$$n = \frac{(1.96)^2(0.63)(0.37)}{(0.18)^2}$$

$$n = 27.6$$

ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จะใช้ตัวอย่างทั้งหมด 31 ตัวอย่าง ประกอบด้วยประเภทตัวอย่าง ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ประเภทตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย

ลำดับ	ประเภทตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง
1	ก้านสำลีเช็ดเยื่อบุกระพุ้งแก้ม	6
2	โลหิตสด	3
3	คราบโลหิต	3
4	เนื้อเยื่อ	1
5	คราบอสุจิ	2
6	เส้นขน	1
7	เล็บ	2
8	ก้นบุหรี่	2
9	สารคัดหลั่งจากช่องคลอด	2
10	แปรงสีฟัน	1
11	ดีเอ็นเอจากการสัมผัส	8
	รวม	31

3.1.2 ชุดน้ำยาสำเร็จรูปและสารเคมี

- 3.1.2.1 GlobalFiler™ IQC PCR Amplification kit
- 3.1.2.2 PowerPlex® Fusion 6C system
- 3.1.2.3 Quantifiler® HP DNA Quantification Kit
- 3.1.2.4 สารควบคุมเชิงบวก DNA 007
- 3.1.2.5 สารควบคุมเชิงบวก DNA 2008M
- 3.1.2.6 ดีเอ็นเอมาตรฐาน DNA 1230
- 3.1.2.7 ดีเอ็นเอมาตรฐาน DNA 1224
- 3.1.2.8 ดีเอ็นเอมาตรฐาน DNA 2391d component c
- 3.1.2.9 Nuclease-free-water
- 3.1.2.10 GeneScan™ 600 LIZ® Size standard v2.0
- 3.1.2.11 Wen ILS 500
- 3.1.2.12 Hi-Di™ Formamide
- 3.1.2.13 POP4® Polymer
- 3.1.2.14 Anode buffer container (ABC)

- 3.1.2.15 Cathode buffer container (CBC)
- 3.1.2.16 เมลานิน (Synthetic melanin, Sigma Aldrich)
- 3.1.2.17 เฮมาทิน (Hematin porcine, Sigma aldrich)
- 3.1.2.18 ฮิวมิกแอซิด (Humic acid, Sigma aldrich)
- 3.1.2.19 0.1 M Sodium hydroxide
- 3.1.2.20 0.5 N Ammonium hydroxide
- 3.1.2.21 Low TE⁻⁴

3.1.3 อุปกรณ์

- 3.1.3.1 ไมโครปิเปตต์ขนาด 2, 10, 20 200 และ 1,000 μ L
- 3.1.3.2 ปิเปตต์ทีปขนาด 10, 20 200 และ 1,000 μ L
- 3.1.3.3 ไมโครเพลทขนาด 96 หลุม
- 3.1.3.4 ออปติกไมโครเพลทขนาด 96 หลุม
- 3.1.3.4 แผ่นปิดไมโครเพลท
- 3.1.3.5 फिल्मปิดออปติกไมโครเพลท (MicroAmp® Clear adhesive film)
- 3.1.3.6 ฟิชอาร์สตรีป และแคป ขนาด 0.2 mL
- 3.1.3.7 หลอดไมโครเซนติฟิวก์ปลดเชื้อ 1.5 mL
- 3.1.3.8 หลอดเซนติฟิวก์ปลดเชื้อ 15 mL
- 3.1.3.9 ขวดวัดปริมาตร 100 mL
- 3.1.3.10 กระบอกตวง
- 3.1.3.11 ปีกเกอร์

3.1.4 เครื่องมือ

- 3.1.4.1 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบเรียลไทม์
(Applied Biosystems® 7500 Real-time PCR system)
- 3.1.4.2 เครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรมอัตโนมัติ
(Applied Biosystems® 3500 Genetic analyzer)
- 3.1.4.3 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม
(GeneAmp® PCR system 9700 with the gold-plated silver 96-well)
- 3.1.4.4 เครื่องปั่นเหวี่ยง

3.1.4.5 เครื่องผสมสารแบบเขย่า

3.1.4.6 โปรแกรม 7500 Fast System Sequence Detection Software

3.1.4.7 โปรแกรม GeneMapper® ID-X V.1.4

3.2 การตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ

3.2.1 การวัดปริมาณดีเอ็นเอ

การวัดปริมาณดีเอ็นเอใช้เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป Quantifiler® HP แต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วย Quantifiler® HP primer Mix 4 µL, Quantifiler® THP PCR Reaction Mix 5 µL และ ดีเอ็นเอต้นแบบ 1 µL เติมส่วนผสมทั้งหมดลงในออปติกไมโครเพลท 96 หลุมพร้อมกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 50, 5, 0.5, 0.05 และ 0.005 µL แล้วนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบเรียลไทม์ ภายใต้สภาวะดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 สภาวะปฏิกิริยาพีซีอาร์แบบเรียลไทม์ของชุดน้ำยาสำเร็จรูป Quantifiler® HP ⁽³⁷⁾

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	รอบ
Initial Denaturation	95 °C	2 นาที	1
Denaturation	95 °C	10 นาที	1
Annealing	50 °C	15 วินาที	40
Extension	60 °C	1 นาที	-

3.2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

3.2.2.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit แบบครึ่งปฏิกิริยา

แต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วย Primer set 1.25 µL , Master mix 3.75 µL และดีเอ็นเอต้นแบบ 7.5 µL เติมส่วนผสมทั้งหมดลงในหลอดพีซีอาร์ขนาด 2 µL แล้วนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม GeneAmp® PCR system 9700 ภายใต้สภาวะดังตารางที่ 3.3

3.2.2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิบัติการ

แต่ละปฏิบัติการประกอบด้วย Primer set 2.5 µL, Reaction Mix 2.5 µL และ ดีเอ็นเอต้นแบบ 7.5 µL เติมส่วนผสมทั้งหมดลงใน หลอดพีซีอาร์ขนาด 2 µL จากนั้นนำเข้าเครื่อง เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม GeneAmp® PCR system 9700 ภายใต้สภาวะดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 สภาวะที่ใช้ในปฏิบัติการ Multiplex PCR ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป GlobalFiler™ IQC PCR Amplification และ PowerPlex® Fusion 6C System ^(5, 6)

		GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit		PowerPlex® Fusion 6C System	
		อุณหภูมิ (°C)	เวลา	อุณหภูมิ (°C)	เวลา
Initial incubation		95	1 นาที	96	1 นาที
cycles (29 cycles)	Denature	94	10 วินาที	96	5 วินาที
	Anneal/ extend	59	90 วินาที	60	60 วินาที
Final Extension		60	5 นาที	60	10 นาที
Final hold		4	-	4	-

3.2.3 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอใช้เทคนิค Capillary electrophoresis โดยในแต่ละปฏิบัติการประกอบด้วยผลผลิตพีซีอาร์ หรือ แอลลีลลิกเลตเตอร์ 1 µL, Hi-Di™ Formamide 9.5 µL และ GeneScan™ LIZ 600 0.5 µL หรือ WEN ILS 500 0.5 µL (สำหรับ GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System ตามลำดับ) เติมส่วนผสมทั้งหมดลงในไมโครเพลทขนาด 96 หลุม ปิดด้วยแผ่นปิดไมโครเพลท แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 3 นาที ทำให้เย็นทันทีด้วยกล่องน้ำแข็ง จากนั้นนำเข้าเครื่อง ABI 3500 Genetic analyzer ซึ่งเป็นเครื่องแคพิลลารีอีเล็กโทรโฟรีซิส (Capillary electrophoresis) ดีเอ็นเอจะถูกดึงเข้าสู่หลอดแคพิลลารีด้วยแรงดันไฟฟ้า 1.2 kV เป็นเวลา 15 วินาที แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม GeneMapper® ID-X version 1.4

3.3 การศึกษา Base line

ใช้ผลการทดสอบของตัวควบคุมเชิงลบ คือ Low TE⁴ จากการทดสอบความไว และการทดสอบดีเอ็นเอผสม (ในหัวข้อที่ 3.4 และ 3.5) ทั้งหมด 9 ตัวอย่าง อ่านผลเฉพาะพีคที่สูงตั้งแต่ 1 RFU ขึ้นไป ข้อมูลที่ได้นำมาคำนวณค่า LOQ ในทุกช่องสีฟลูออเรสเซนซ์ แล้วนำค่าดังกล่าวมาประเมินเกณฑ์ขั้นต่ำในการอ่านผล

3.4 การศึกษาความไว และ เกณฑ์สโตนแคสติง

3.4.1 ใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1224 ในการทดสอบ โดยนำไปวัดปริมาณดีเอ็นเอตามข้อ 3.2.1 ทั้งหมด 3 ครั้ง

3.4.2 ใช้ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐาน 1224 ที่วัดได้ (ng/μL) เจือจางดีเอ็นเอดังกล่าวให้ได้ปริมาณเป็น 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.063, 0.031, 0.016 และ 0.008 ng ใน 1 ปฏิกริยาพีซีอาร์ของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System

3.4.3 นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิกริยา (ตามข้อ 3.2.2) ทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.4.4 วิเคราะห์ดีเอ็นเอตามข้อ 3.2.3 โดยใช้ค่า LOQ ที่ได้จากการศึกษา base line ตามข้อ 3.3 เป็นเกณฑ์ในการวิเคราะห์

3.4.5 ประเมินความไวของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิกริยา โดยวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยร้อยละของแอลลิลที่ตรวจวัดได้จากการทดสอบความไวในแต่ละปริมาณดีเอ็นเอ

3.4.6 ประเมินปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นที่เหมาะสม (Opimal input DNA) โดยใช้เกณฑ์พิจารณาตาม Gavazaj F.Q. และคณะ 3 ประการ คือ 1) มีความสูงของพีคที่เหมาะสม สมดุล และถูกต้อง 2) ไม่ปรากฏพีคที่มีความสูงเกินที่เครื่องมือวัดได้ หรือ Off scale peaks และ 3) ให้ภาพรวมดีเอ็นเอที่สมบูรณ์และไม่ปรากฏการหายไปของแอลลิล⁽⁵⁸⁾ ช่วงปริมาณดีเอ็นเอที่มีคุณสมบัติตามเกณฑ์ดังกล่าวจะถูกประเมินให้เป็นปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมกับชุดน้ำยาแต่ละชนิด

3.4.7 ประเมินความสมดุลของพีคเฮเทอโรไซกัส โดยวิเคราะห์จากค่า Peak height ratio (PHR) ของแต่ละปริมาณดีเอ็นเอ

3.4.8 เกณฑ์สโตนแคสติง โดยประเมินด้วยการหาความสูงของพีค Surviving sister allele ที่สูงที่สุดของการทดสอบความไว

3.5 การศึกษาดีเอ็นเอผสม

เตรียมดีเอ็นเอมาตรฐาน 1224 (เพศชาย) และดีเอ็นเอมาตรฐาน 1230 (เพศหญิง) ให้ได้สัดส่วนเป็น 1:0, 1:1, 1:2, 1:4, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 และ 0:1 และมีปริมาณดีเอ็นเอเป็นปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมจากการศึกษาตามข้อ 3.4.6 จากนั้นนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิกิริยา ตามข้อ 3.2.2 แล้ววิเคราะห์ดีเอ็นเอ ตามข้อ 3.2.3 นำแอลลีลที่ตรวจสอบได้ที่สัดส่วนต่าง ๆ มาวิเคราะห์ผล โดยใช้ความสูงพีคของดีเอ็นเอมาตรฐาน 1230 (เพศหญิง)หารด้วยดีเอ็นเอมาตรฐาน 1224 (เพศชาย) ในแต่ละเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) แล้วหาค่าเฉลี่ยของสัดส่วนเพศหญิงต่อเพศชายเพื่อใช้ค่าดังกล่าวเปรียบเทียบกับสัดส่วนตามทฤษฎี

3.6 การศึกษาตัวยับยั้งในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Inhibitor study)

ใช้เมลานิน เฮมาทิน และฮิวมิกแอซิด ความเข้มข้น 4 ระดับ (ตารางที่ 3.4) และใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1224 ด้วยปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมจากการศึกษาตามข้อ 3.4.6 มาเพิ่มปริมาณด้วยชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System ตามข้อ 3.2.2 จากนั้นวิเคราะห์ดีเอ็นเอ ตามข้อ 3.2.3 และวิเคราะห์การยับยั้งของตัวยับยั้งทั้งสามชนิดจากค่าร้อยละแอลลีลที่ตรวจสอบได้ และค่าเฉลี่ยความสูงของพีคของแต่ละชุดการทดลอง

ตารางที่ 3.4 การเตรียมตัวอย่างของการทดสอบตัวยับยั้ง (เมลานิน เฮมาทิน และ ฮิวมิกแอซิด)

ตัวยับยั้ง	หน่วย	ความเข้มข้นของตัวยับยั้ง				
		0	1	2	3	4
เมลานิน	ng/ μ L	0	40	60	80	100
เฮมาทิน	μ M	0	500	750	1000	1250
ฮิวมิกแอซิด	ng/ μ L	0	50	100	200	300

3.6.1 วิธีการเตรียมสารยับยั้ง

3.6.1.1 เมลานิน

เตรียมเมลานิน ให้ได้ความเข้มข้นเป็น 1 mg/mL Stock solution ในตู้ดูดไอสารเคมี โดยชั่งเมลานิน 100 mg และค่อย ๆ เติม 0.5 N แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ลงไป 10 mL จนแน่ใจว่าเมลานินละลายจนหมด จากนั้นใช้สารละลายดังกล่าวปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรให้ได้ 100 mL เก็บสารเคมีไว้ที่ -20°C ในบริเวณที่ไม่มีแสงเพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

3.6.1.2 เฮมาทิน

เตรียมเฮมาทินให้เป็น 10 M เฮมาทิน Stock solution โดยชั่งเฮมาทิน 1.5838 g และค่อย ๆ เติม 0.1 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ ลงไป 10 mL จนแน่ใจว่าเฮมาทินละลายจนหมดจากนั้นค่อย ๆ เติมสารละลายดังกล่าวไปอีก 240 mL เก็บสารเคมีไว้ที่ 4 °C ในบริเวณที่ไม่มีแสงเพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

3.6.1.3 ฮิวมิกแอซิด

เตรียมฮิวมิกแอซิดให้เป็น 1 mg/mL Stock solution โดยชั่ง ฮิวมิก-แอซิด 100 mg และค่อย ๆ เติม Nuclease-free water ปลอดเชื้อ ลงไป 10 mL จนแน่ใจว่าฮิวมิกแอซิดละลายจนหมด จากนั้นใช้สารละลายดังกล่าวปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรให้ได้ 100 mL เก็บสารเคมีไว้ที่ 4 °C ในบริเวณที่ไม่มีแสงเพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

3.7 การศึกษาความแม่นยำและความถูกต้อง

3.7.1 การศึกษาความแม่นยำ (Precision study)

3.7.1.1 การศึกษาการทำซ้ำของขนาดดีเอ็นเอ (Repeatability of sizing)

ใช้แอลลิคัลเลคเตอร์ของชุดน้ำยาทั้งสองชนิดคือ GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System ชุดน้ำยาละ 32 ตัวอย่าง ทดสอบด้วยเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรม ABI 3500 ตามวิธีตามข้อ 3.2.3 โดยวิเคราะห์ความคลาดเคลื่อนด้วยวิธีของ Smith R.N.^(14, 59) จากขนาดของแอลลิคัลที่ตรวจพบได้ในแต่ละ injection ด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ซึ่งยอมรับได้ที่น้อยกว่า 0.15 bp

3.7.1.2 การศึกษาการทำซ้ำของความสูงพีค (Repeatability of peak height)

ใช้ผลการวิเคราะห์ความไวของดีเอ็นเอมาตรฐาน 1224 จากการศึกษาตามข้อ 3.4 เพื่อตรวจสอบความสอดคล้องของความสูงพีคชุดน้ำยาดังกล่าวเมื่อทำซ้ำทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย RSD หรือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

3.7.2 การศึกษาการผลิตซ้ำ (Reproducibility)

นำสารควบคุมเชิงบวก ดีเอ็นเอมาตรฐาน 007 (สำหรับชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit) และ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 2008M (สำหรับชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C System) มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ชุดน้ำยาละ 5 ซ้ำ ด้วยวิธีตามข้อ 3.2.2 และ 3.2.3 โดยแต่ละซ้ำให้ทดสอบในชุดการทดลอง และช่วงเวลาที่แตกต่างกัน เพื่อตรวจสอบความสอดคล้อง

ของชุดน้ำยาดังกล่าวเมื่อทำซ้ำทั้งหมด 5 ซ้ำ โดยต้องให้ผลที่สอดคล้องกันทุกประการจึงจะยอมรับได้ว่าชุดน้ำยาให้ผลถูกต้อง

3.7.3 การศึกษาความถูกต้อง (Accuracy study)

นำตัวอย่างดีเอ็นเอมาตรฐาน 2391d component c มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยน้ำยาทั้งสองชนิดคือ GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System ด้วยวิธีตามข้อ 3.2.2 และ 3.2.3 และวิเคราะห์ความสอดคล้องของชุดน้ำยาดังกล่าวเปรียบเทียบกับใบรับรองผลดีเอ็นเอมาตรฐาน ซึ่งต้องให้ผลสอดคล้องกันทุกประการถึงจะยอมรับได้ว่าชุดน้ำยาให้ผลถูกต้อง

3.8 การประเมินประสิทธิภาพของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิบัติการเมื่อทดสอบด้วยตัวอย่างจริง

ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอจาก ข้อ 3.1 จำนวน 31 ตัวอย่าง มาทดสอบด้วยชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิบัติการด้วยขั้นตอนตามข้อ 3.2.2 และ 3.2.3 แต่ละชุดการทดลองทดสอบทั้งหมด 2 ซ้ำ จากนั้นนำมาวิเคราะห์ร้อยละของแอลลีลที่ตรวจพบ และความสอดคล้อง (Concordance)

3.9 การวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อประเมินและเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิบัติการ

3.9.1 Limit of detection (LOQ)

วิเคราะห์ได้จากสูตร

$$\text{LOQ} = \text{average} + 10 \text{ SD}$$

โดย average คือ ค่าเฉลี่ยความสูงของพีคทั้งหมด
และ SD คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.9.2 ค่าร้อยละของแอลลีลที่ตรวจวัดได้

ค่าร้อยละของแอลลีลที่ตรวจวัดได้หาได้จาก

$$\%allele\ detection = \frac{allele\ count}{total\ allele} \times 100$$

โดย %allele detection คือ ค่าร้อยละแอลลีลที่ตรวจวัดได้

allele count คือ จำนวนแอลลีลที่ตรวจวัดได้

และ total allele คือ จำนวนแอลลีลทั้งหมด

3.9.3 ค่าความสมดุลของพีคเฮเทอโรไซกัส

วิเคราะห์ได้จากสูตร

$$Peak\ height\ ratio\ (PHR) = \frac{RFU_{min}}{RFU_{max}} \times 100$$

โดย RFUmin คือ ความสูงพีคเฮเทอโรไซกัสที่มีค่าน้อย

และ RFUmax คือ ความสูงพีคเฮเทอโรไซกัสที่มีค่ามาก

3.9.4 การเปรียบเทียบทางความไวของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR

Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิกิริยา

นำผลการวิเคราะห์ร้อยละของแอลลีลที่ตรวจพบ และสมดุลของพีคเฮเทอโรไซกัส จากการศึกษาความไวของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิกิริยา มาวิเคราะห์เปรียบเทียบด้วยสถิติแบบ Wilcoxon signed-rank test เพื่อให้ทราบว่าทั้งสองชุดนั้นมีประสิทธิภาพแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การศึกษา Base line

จากการวิเคราะห์สัญญาณรบกวนพื้นฐาน (Background noise) เพื่อประเมินเกณฑ์ขั้นต่ำ โดยการทดสอบสารควบคุมเชิงลบจำนวน 9 ตัวอย่าง ด้วยชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิกิริยากับเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรม ABI 3500 แล้วอ่านผลเฉพาะพีคที่สูงตั้งแต่ 1 RFU ได้ผลดังตารางที่ 4.1 และ 4.2

ตารางที่ 4.1 การประเมินเกณฑ์ขั้นต่ำของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit แบบครึ่งปฏิกิริยา และวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรม ABI 3500

ช่องสี	ค่าสูงสุด (RFU)	ค่าเฉลี่ย (RFU)	SD	LOD (ค่าเฉลี่ย +3SD)	LOQ (ค่าเฉลี่ย +10SD)	เกณฑ์ขั้นต่ำ (RFU)
สีฟ้า	36	6.00	2.76	14.27	33.56	35
สีเขียว	32	9.68	3.49	20.14	44.53	45
สีเหลือง	45	4.47	2.49	11.94	29.37	30
สีแดง	31	8.57	3.27	18.36	41.23	45
สีม่วง	41	8.81	3.48	19.24	43.57	45
สีส้ม	50	5.75	4.85	20.32	54.30	55

ค่า LOQ ของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit แบบครึ่งปฏิกิริยาอยู่ที่ 29.37 และ 44.53 RFU สำหรับช่องสีเหลืองและสีเขียวตามลำดับ ในช่องสีส้มมีค่า LOQ เท่ากับ 54.30 RFU แต่เนื่องจากช่องสีส้มไม่ได้ถูกใช้ในการตรวจสอบแอลลีลในตัวอย่าง ในการประเมินเกณฑ์ขั้นต่ำจะคัดเฉพาะค่า LOQ ที่มีค่าสูงที่สุดของช่องสีฟ้า สีเขียว สีเหลือง สีแดง และสีม่วง ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ LOQ ในช่องสีดังกล่าวแล้ว เกณฑ์ขั้นต่ำของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit ที่ทดสอบด้วยครึ่งปฏิกิริยา และวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรม ABI 3500 มีค่าเท่ากับ 45

ตารางที่ 4.2 การประเมินเกณฑ์ขั้นต่ำของชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิบัติการ และวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรม ABI 3500

ช่องสี	ค่าสูงสุด (RFU)	ค่าเฉลี่ย (RFU)	SD	LOD (ค่าเฉลี่ย +3SD)	LOQ (ค่าเฉลี่ย +10SD)	เกณฑ์ขั้นต่ำ (RFU)
สีฟ้า	44	8.76	3.34	18.79	42.20	45
สีเขียว	51	12.31	4.29	25.17	55.16	60
สีเหลือง	28	5.92	2.34	12.94	29.30	30
สีแดง	33	9.73	3.29	19.60	42.62	45
สีม่วง	25	7.99	2.92	16.75	37.19	40
สีส้ม	26	3.33	2.21	9.97	25.47	30

ค่า LOQ ของชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิบัติการอยู่ที่ 29.30 และ 55.16 RFU สำหรับช่องสีเหลืองและสีเขียวตามลำดับ ในช่องสีส้มมีค่า LOQ เท่ากับ 25.47 RFU เนื่องจากช่องสีส้มไม่ได้ถูกใช้ในการตรวจสอบแอลลีลในตัวอย่าง ในการประเมินเกณฑ์ขั้นต่ำจะตัดเฉพาะค่า LOQ ที่มีค่าสูงที่สุดของช่องสีฟ้า สีเขียวสีเหลือง สีแดง และสีม่วง ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ LOQ ในช่องสีดังกล่าวแล้ว เกณฑ์ขั้นต่ำของชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C System ที่ทดสอบด้วยครึ่งปฏิบัติการ และวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรม ABI 3500 มีค่าเท่ากับ 60

เมื่อเปรียบเทียบเกณฑ์ขั้นต่ำของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิบัติการ กับเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรม ABI 3500 พบว่าชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit ให้เกณฑ์ขั้นต่ำที่น้อยกว่าชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C System ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Tay J.W. และคณะ⁽¹²⁾ ที่ได้ศึกษา Base line ของชุดน้ำยาสามชุด คือ PowerPlex® Fusion 6C System, Verifiler™ Plus และ Investigator® 24plex QS แบบเต็มปฏิบัติการด้วยเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรม ABI 3500XL พบว่าชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C System ให้ค่า LOQ สูงที่สุดในชุดน้ำยาทั้งสามชนิด คือ 96.10 RFU ในช่องสีเหลือง และงานวิจัยของ Tan J. และคณะ ได้รายงานค่า LOQ สูงสุดที่ 46.63 RFU ในช่องสีเหลืองเช่นเดียวกัน⁽¹¹⁾ แต่งานวิจัยนี้ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิบัติการที่ทดสอบกับเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรม ABI 3500 มีค่า LOQ สูงสุดเท่ากับ 55.16 RFU ในช่องสีเขียวซึ่งอาจเป็นเพราะการทดสอบดังกล่าวเป็นการวิเคราะห์แบบครึ่งปฏิบัติการ

และมีผลกระทบจากปัจจัยอื่น เช่น สภาวะแวดล้อมของ กระแสไฟฟ้า อุณหภูมิ หรือประสิทธิภาพของ เครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรม (ABI 3500 และ ABI 3500XL) จึงทำให้ผลการวิจัยแตกต่างกัน นอกจากนี้ค่า LOQ .ที่ได้จากชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิกิริยามีค่าใกล้เคียงกับ LOQ ที่ได้จากปฏิกิริยา แบบเต็ม โดยของงานวิจัยของ Tan J. และคณะ⁽¹¹⁾ และ Almohammed E. และ Hadi S.⁽⁹⁾ ได้รายงานค่า LOQ ของชุดน้ำยา GlobalFiler™ และ เท่ากับ 38.04 RFU และ 50 RFU ในช่อง สีเขียว และสีม่วง ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นเห็นว่าเกณฑ์ขั้นต่ำของครึ่งปฏิกิริยา นั้นมีค่าใกล้เคียงกับปฏิกิริยาแบบเต็ม

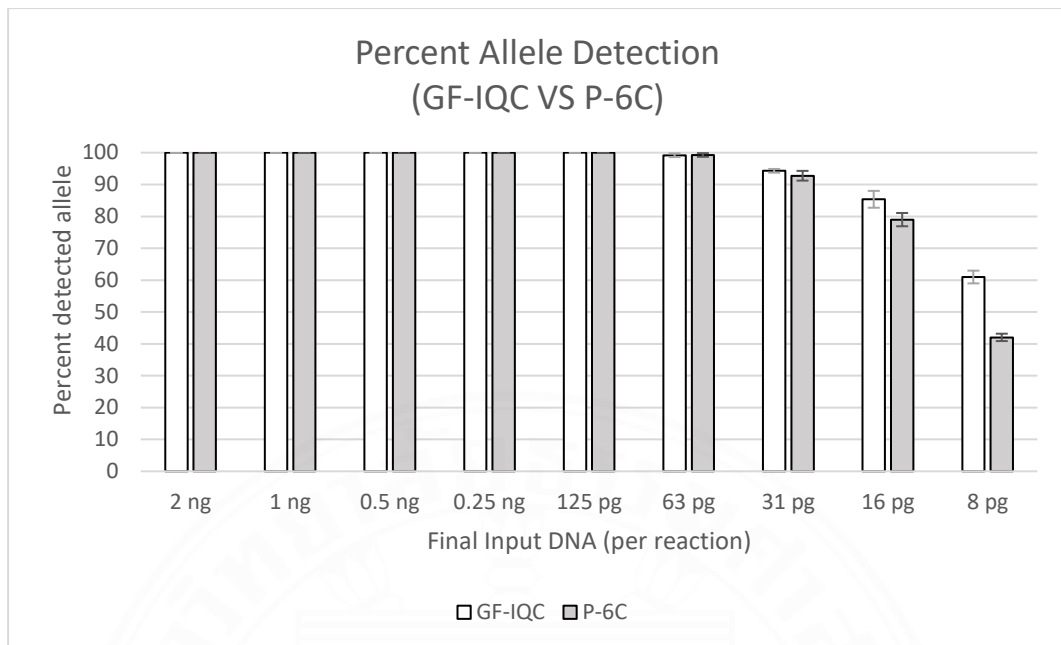
4.2 การศึกษาความไว และ สโทแคสติก

จากการทดสอบความไวของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิกิริยาดำเนินการตามมาตรฐาน 1224 ที่มีปริมาณ ดีเอ็นเอเป็น 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.063, 0.031, 0.016 และ 0.008 ng และวิเคราะห์ผลตาม เกณฑ์ขั้นต่ำจากการทดลองที่ 4.1 ประเมินผลได้ดังนี้

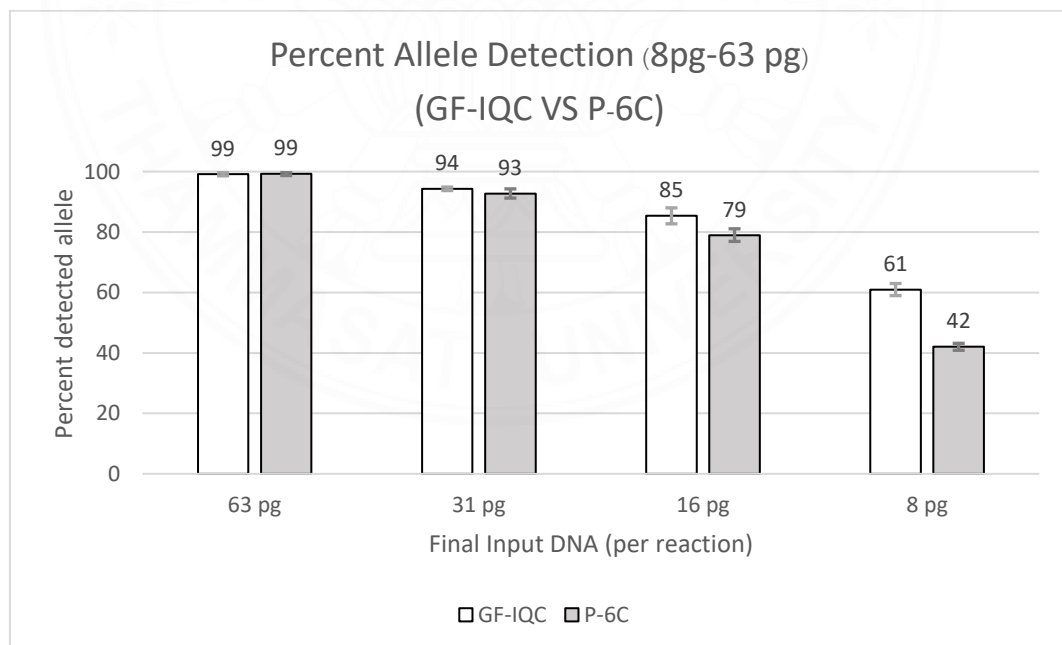
4.2.1 การประเมินและเปรียบเทียบความไวของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิกิริยา

ภาพที่ 4.1-4.2 แสดงค่าเฉลี่ยร้อยละของแอลลีลที่ตรวจวัดได้และค่าเฉลี่ยความ สูงของพีคเฮเทอโรไซกัสของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิกิริยา พบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละของแอลลีลที่ตรวจวัดได้ แปรผันตรงกับปริมาณดีเอ็นเอ และพบภาพรวมดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ (Complete profile) ในช่วงปริมาณดีเอ็นเอที่ 125 pg-2 ng แต่ปริมาณดีเอ็นเอที่ 8 pg-63 pg พบการหายไปของแอลลีล (Allele drop out) อย่างน้อย 1 ตำแหน่ง ในอย่างน้อย 1 ซ้ำของชุดการทดสอบส่งผลให้พบภาพรวม ดีเอ็นเอที่ไม่สมบูรณ์ (Partial profile) ในช่วงปริมาณดีเอ็นเอดังกล่าว

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละของแอลลีลที่ตรวจวัดได้ของน้ำยาทั้งสองชุด เฉพาะในช่วงปริมาณดีเอ็นเอที่มีการหายไปของแอลลีล (31 pg, 16 pg และ 8 pg) ตามภาพที่ 4.2 พบว่าชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit ให้ค่าเฉลี่ยร้อยละของแอลลีลที่ตรวจวัด ได้มากกว่า PowerPlex® Fusion 6C System เป็น 94%:93%, 85%:79% และ 61%:42% ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแอลลีลที่ตรวจวัดได้ของน้ำยาทั้งสองชุดด้วยวิธี Wilcoxon signed-rank test พบว่าให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% ที่ p -value เท่ากับ 0.144



ภาพที่ 4.1 แผนภูมิแสดงค่าเฉลี่ยร้อยละของแอลลีลที่ตรวจวัดได้จากการทดสอบความไวของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิกิริยา



ภาพที่ 4.2 แผนภูมิแสดงค่าเฉลี่ยร้อยละของแอลลีลที่ตรวจวัดได้จากการทดสอบความไวของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิกิริยา ในช่วง 8 pg-63 pg

ผลการทดสอบความไวของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit สอดคล้องกับงานวิจัยของ Elwic K. และคณะ (52) Ludeman M.J. และคณะ⁽⁵⁵⁾ และ Almohammed E. และ Hadi S.⁽⁹⁾ ที่ทดสอบความไวของชุดน้ำยา GlobalFiler™ Kit (พัฒนามาจากบริษัทเดียวกันกับชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit) พบว่าปฏิกิริยาแบบเต็มให้ภาพรวมดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ที่ปริมาณดีเอ็นเอมากกว่าหรือเท่ากับ 125 pg และพบการหายไปของแอลลีล เมื่อปริมาณดีเอ็นเอน้อยกว่าหรือเท่ากับ 62.5 pg^(9, 52) ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยของ Tan J. และคณะ⁽¹¹⁾ ที่พบภาพรวมดีเอ็นเอสมบูรณ์จากปริมาณดีเอ็นเอเป็น 500 pg และที่ปริมาณดีเอ็นเอ 250 pg หรือต่ำกว่าพบการหายไปของแอลลีล

เมื่อเปรียบเทียบความไวของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit ด้วยเครื่องปฏิกิริยาในงานวิจัยนี้ กับงานวิจัยในข้างต้นที่ทดสอบชุดน้ำยา GlobalFiler™ Kit ด้วยปฏิกิริยาแบบเต็มพบว่ามีความไวใกล้เคียงกันตามงานวิจัยของ Elwic K. และคณะ (52) Ludeman M.J. และคณะ⁽⁵⁵⁾ และ Almohammed E. และ Hadi S.⁽⁹⁾ และมีความไวมากกว่างานวิจัยของ Tan J. และคณะ⁽¹¹⁾ จึงมีความเป็นไปได้ที่ใช้ชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit แบบเครื่องปฏิกิริยาในตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ

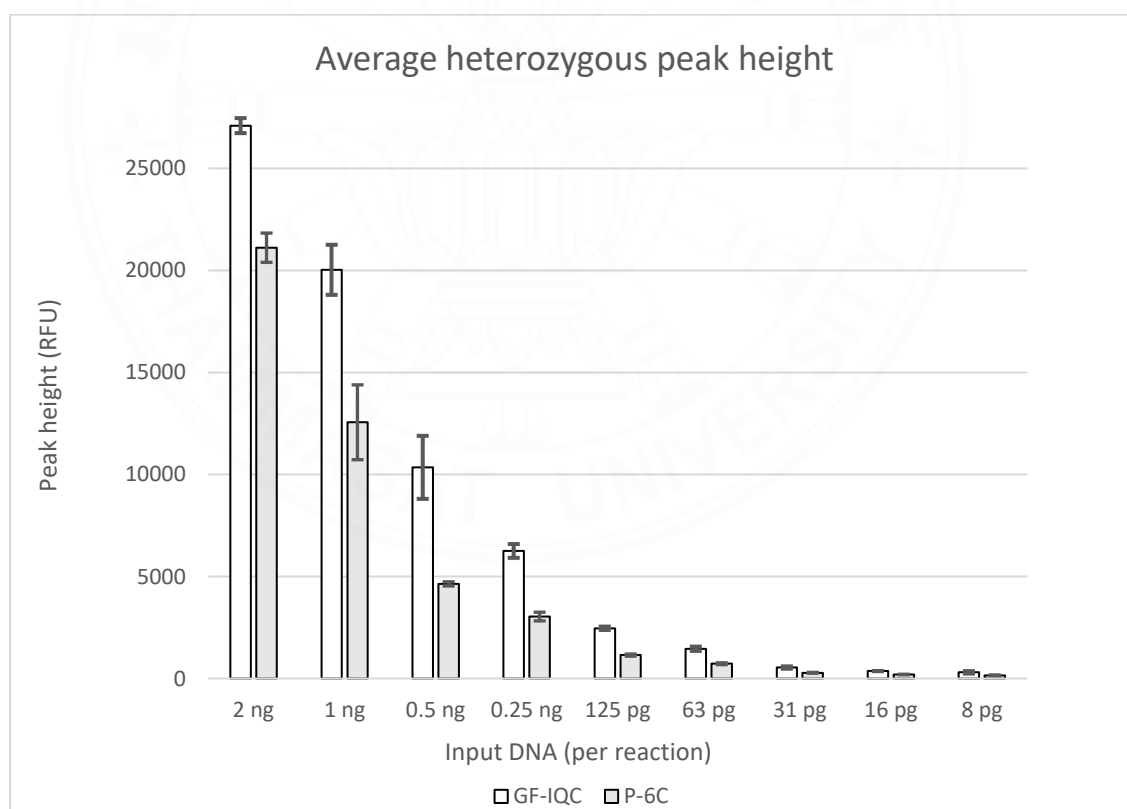
ผลการทดสอบความไวของชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C System แบบเครื่องปฏิกิริยาแตกต่างกับงานวิจัยของ Feng X. และคณะ⁽⁵³⁾ และ Tan J. และคณะ⁽¹¹⁾ ที่ทดสอบความไวของชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C System แบบเต็มปฏิกิริยา พบการหายไปของแอลลีลที่ปริมาณดีเอ็นเอต่ำกว่า 31.25 pg และ 250 pg ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการทดสอบนี้ให้ผลใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Cisana S. และคณะ⁽⁵¹⁾ ที่ทดสอบความไวของชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C System แบบเต็มปฏิกิริยา ผลการทดสอบพบว่าปฏิกิริยาที่มีปริมาณดีเอ็นเอต่ำกว่าหรือเท่ากับ 62.5 pg พบการหายไปของแอลลีล

เมื่อเปรียบเทียบความไวของชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C System ด้วยเครื่องปฏิกิริยาในงานวิจัยนี้ กับงานวิจัยในข้างต้นที่ทดสอบชุดน้ำยาดังกล่าวด้วยปฏิกิริยาแบบเต็มพบว่ามีความไวต่ำกว่า Feng X. และคณะ⁽⁵³⁾ แต่มีความไวมากกว่างานวิจัยของ Tan J. และคณะ⁽¹¹⁾ อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ให้ความไวใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Cisana S. และคณะ⁽⁵¹⁾ จึงมีความเป็นไปได้ที่ใช้ชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C System แบบเครื่องปฏิกิริยาในตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ

จากการอภิปรายในข้างต้นจะเห็นว่าชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบเครื่องปฏิกิริยา ให้ผลที่ดีและใกล้เคียงกับปฏิกิริยาแบบเต็มเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่น จึงมีความเป็นไปได้ในการใช้เครื่องปฏิกิริยา เพื่อประหยัดค่าใช้จ่ายในการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอได้ และสอดคล้องกับงานวิจัยที่รายงานถึงความสำเร็จในการใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปชนิดอื่นสำหรับตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอแบบเครื่องปฏิกิริยา^(13, 16) ซึ่ง Brito P. ได้รายงานว่

การใช้ชุดน้ำยา Globalfiler™ แบบครึ่งปฏิบัติการให้ภาพรวมดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ขึ้นถึง 19% ดังนั้นจึงเป็นไปได้ในการใช้ GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิบัติการในการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอทางนิติวิทยาศาสตร์ได้

ค่าเฉลี่ยความสูงของพีคเฮเทอโรไซกัสจะแปรผันตรงกับปริมาณของดีเอ็นเอ เมื่อปริมาณดีเอ็นเอมากขึ้นทำให้ค่าเฉลี่ยความสูงของพีคเฮเทอโรไซกัสสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความสูงของพีคเฮเทอโรไซกัสของน้ำยาทั้งสองชุดแบบครึ่งปฏิบัติการ พบว่าชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit ให้ค่าเฉลี่ยความสูงของพีคเฮเทอโรไซกัสที่สูงกว่าชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C System ในทุกชุดการทดลอง (ภาพที่ 4.3) และเมื่อเปรียบเทียบทางสถิติด้วยวิธี Wilcoxon signed-rank test พบว่าให้ผลที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% ที่ p -value เท่ากับ 0.008 งานวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Tan J. และคณะ⁽¹¹⁾ และ Lin SW. และคณะ⁽⁵⁴⁾ ที่รายงานว่าชุดน้ำยา Globalfiler™ มีค่าความสูงของพีคเฮเทอโรไซกัสสูงกว่า PowerPlex® Fusion 6C System



ภาพที่ 4.3 แผนภูมิแสดงค่าเฉลี่ยความสูงของพีคเฮเทอโรไซกัสจากการทดสอบความไวของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิบัติการ

4.2.2 การประเมินและเปรียบเทียบความสมดุลพีคเฮเทอโรไซกัสของชุดน้ำยา

GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบ ครึ่งปฏิบัติการ

ความสมดุลของพีคเฮเทอโรไซกัสจะวิเคราะห์จากค่า Heterozygous Peak Height Ratio หรือ PHR ซึ่งชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิบัติการให้ผลตามภาพที่ 4.4 และ 4.5

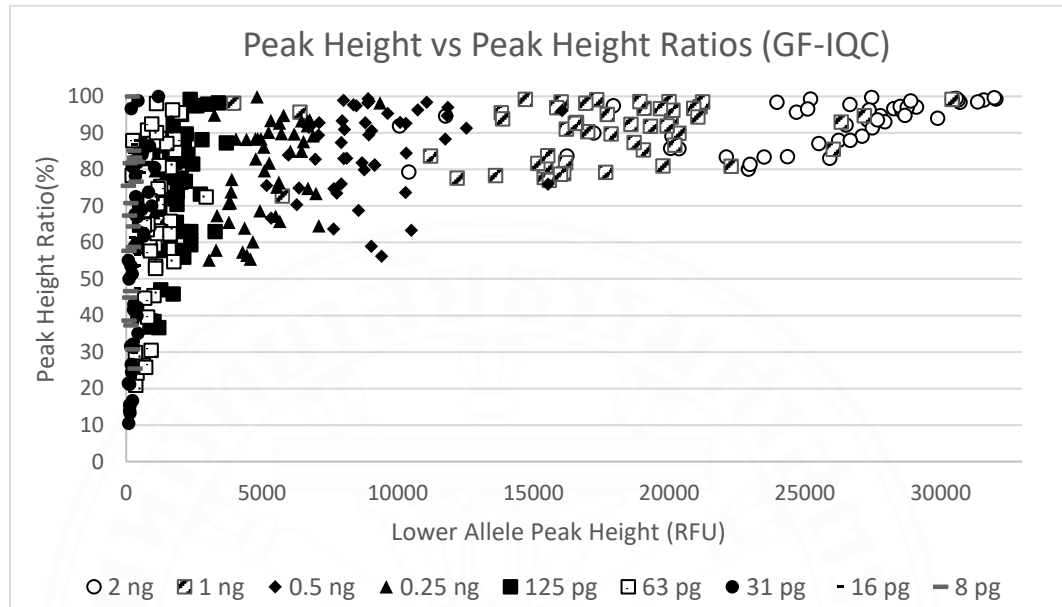
จากการวิเคราะห์ค่า PHR ของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit แบบครึ่งปฏิบัติการพบว่าชุดการทดลองที่มีปริมาณดีเอ็นเอ 0.5 ng-2 ng พบค่า PHR เท่ากับ 56% และ 59% จำนวน 2 ตำแหน่ง (จากปริมาณดีเอ็นเอที่ 0.5 ng) นอกจากนั้นพบค่า PHR อย่างน้อย 60% ขึ้นไป ส่วนชุดการทดลองที่มีปริมาณดีเอ็นเอ 125 pg พบค่า PHR ในช่วง 37%-99% และในช่วงปริมาณดีเอ็นเอที่ต่ำกว่า 125 pg พบค่า PHR ที่ค่อนข้างหลากหลาย รวมถึงแอลลีลที่หายไป (Allele drop out) ซึ่งค่า PHR ที่ต่ำที่สุดคือ 10% เมื่อปริมาณดีเอ็นเอลดลง ความสมดุลของพีคเฮเทอโรไซกัสก็จะลดลงเนื่องจากผลกระทบของสโทแคสติก

จากการวิเคราะห์ค่า PHR ของชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิบัติการพบว่าชุดการทดลองที่มีปริมาณดีเอ็นเอ 0.5 ng-2 ng พบค่า PHR อย่างน้อย 60% ขึ้นไป ส่วนชุดการทดลองที่มีปริมาณดีเอ็นเอ 125 pg พบค่า PHR ในช่วง 49%-100% และในช่วงปริมาณดีเอ็นเอที่ต่ำกว่า 125 pg จะพบ ค่า PHR ที่ค่อนข้างหลากหลาย รวมถึงแอลลีลที่หายไป (Allele drop out) ซึ่งค่า PHR ที่ต่ำที่สุดคือ 8% เมื่อปริมาณดีเอ็นเอลดลง ความสมดุลของพีคเฮเทอโรไซกัสลดลงเนื่องจากผลกระทบของสโทแคสติก เช่นเดียวกับชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit

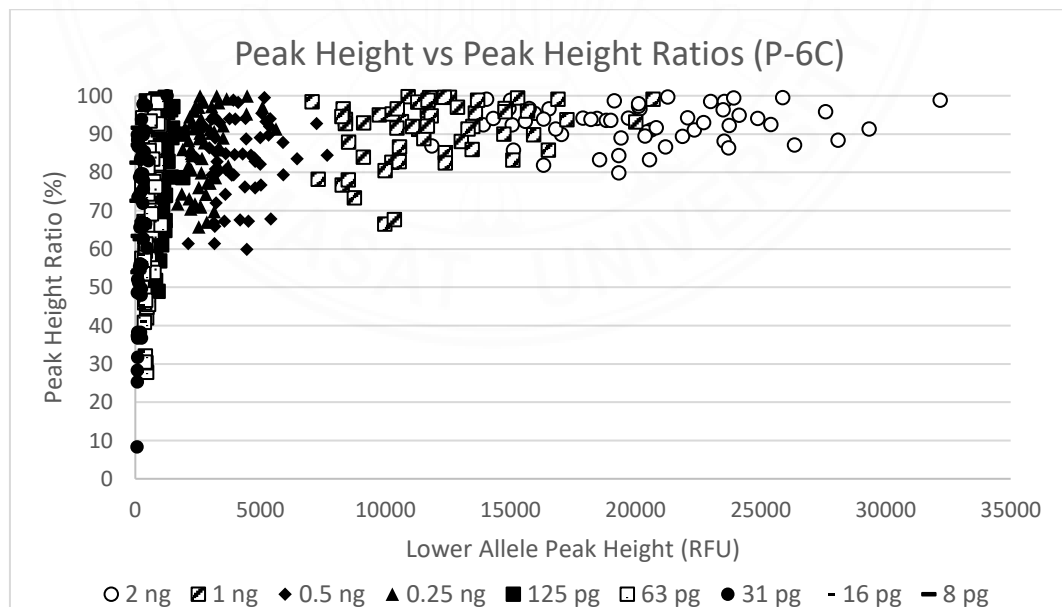
ความสมดุลของพีคเฮเทอโรไซกัสเป็นพารามิเตอร์ที่สามารถใช้ประเมินประสิทธิภาพของชุดน้ำยาตรวจดีเอ็นเอซึ่งชุดน้ำยาที่สมควรให้ค่า PHR ที่มากกว่าหรือเท่ากับ 60% ⁽⁵⁰⁾ จากการทดสอบความสมดุลของพีคเฮเทอโรไซกัสของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิบัติการ พบว่าชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C System ให้ค่า PHR ที่สูงกว่า GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit เล็กน้อย

งานวิจัยของ Tan J. และคณะ ⁽¹¹⁾ ได้เปรียบเทียบ PHR ของ PowerPlex® Fusion 6C System และ GlobalFiler™ ด้วยปฏิบัติการแบบเต็มพบว่า ชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C System ให้ค่า PHR สูงกว่า GlobalFiler™ เล็กน้อย และเมื่อมีปริมาณดีเอ็นเอมากขึ้น พบว่าค่า PHR เพิ่มขึ้น นอกจากนี้งานวิจัยของ Lin SW และคณะ ⁽⁵⁴⁾ ได้รายงานไว้ว่า ชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion

6C System ให้ค่าสมดุลที่ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ GlobalFiler™, Identifiler plus และ Investigator 24plex ซึ่งงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นสอดคล้องกับงานวิจัยนี้



ภาพที่ 4.4 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความสมดุลของพีคเฮเทอโรไซกัสและความสูงของพีคจากการทดสอบความไวของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit แบบครึ่งปฏิบัติการ



ภาพที่ 4.5 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความสมดุลของพีคเฮเทอโรไซกัสและความสูงของพีคจากการทดสอบความไวของชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิบัติการ

4.2.3 การประเมินและเปรียบเทียบเกณฑ์สโตนแคสติค ของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิบัติการ

เกณฑ์สโตนแคสติคประเมินได้จากการหาค่าความสูงของพีค Surviving sister allele^(44, 49) ที่มีค่ามากที่สุดจากชุดการทดสอบความไว จากผลการทดสอบตามข้อ 4.2.1 พบว่าชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit แบบครึ่งปฏิบัติการพบ Surviving sister allele มีค่ามากที่สุดเท่ากับ 607 RFU จากตำแหน่ง D19S433 ที่ปริมาณดีเอ็นเอ 16 pg (ตารางที่ 4.3) และชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิบัติการพบ Surviving sister allele มีค่ามากที่สุดเท่ากับ 969 RFU จากตำแหน่ง Amelogenin ที่ปริมาณดีเอ็นเอ 63 pg (ตารางที่ 4.4) ดังนั้นเกณฑ์ขั้นสโตนแคสติคของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit ที่ทดสอบด้วยครึ่งปฏิบัติการ และวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรม ABI 3500 มีค่าเท่ากับ 610 และ 970 ตามลำดับ



ตารางที่ 4.3 ความสูงของพีคของแต่ละแอลลีลที่ตรวจพบที่ชุดการทดสอบที่ปริมาณดีเอ็นเอ 8 pg-63 pg ของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit แบบครึ่งปฏิกิริยา

ปริมาณ ดีเอ็นเอ	ชุดการทดสอบ	D3S1358		vWA		D16S539		CSF1PO	TPOX	Y indel	AMEL		D8S1179		D21S11		D18S51	DYS391	D2S441	D19S433			
		15	19	11	16	11	12	12	8	2	X	Y	13	16	29	31.2	14	11	14	14	15.2		
63 pg	1	1674	1261	1138	1857	1812	2124	2996	1529	1191	2460	1618	1616	338	1784	2020	3400	394	2531	1984	2077		
	2	1960	777	1452	846	1220	1379	2034	1234	1938	1489	1710	886	744	1646	1162	3611	802	2290	1113	333		
	3	1696	1761	1130	1809	776	855	1685	984	2354	4061	2944	1286	943	773	1217	3690	1116	2518	1211	789		
31 pg	1	115	542	753	242	423	331	999	658	544	1293	1041	422	217	126	816	843	299	475	179	173		
	2	359	610	347	478	533	359	545	840	516	985	852	360	297	375	627	1340	-	1526	844	264		
	3	856	121	405	495	171	319	350	564	378	966	129	589	694	191	778	1196	165	1145	75	136		
16 pg	1	214	274	222	193	510	-	83	428	1019	329	806	135	159	340	428	302	256	444	301	634		
	2	360	562	185	237	172	-	525	225	92	-	311	372	99	421	632	1175	185	953	-	607*		
	3	272	479	-	157	383	171	141	352	695	88	271	677	219	302	323	1669	-	510	185	-		
8 pg	1	-	-	-	367	-	-	163	267	-	-	512	-	-	256	115	217	-	158	156	334		
	2	-	-	184	124	471	-	89	342	-	-	-	193	-	94	243	178	-	774	182	-		
	3	168	450	-	-	-	361	412	574	719	270	317	-	497	120	-	832	-	406	-	90		
ปริมาณ ดีเอ็นเอ	ชุดการทดสอบ	TH01		FGA		D22S1045		D5S818		D13S317		D7S820		SE33		D10S1248		D1S1656		D12S391		D2S1338	
		6	8	23	24	16	10	12	10	13	10	11	14	25.2	13	14	15	17	18	19	17	23	
63 pg	1	272	213	2009	1075	1413	632	2395	1995	1607	1172	843	1012	2227	1112	1134	1260	1999	856	504	3189	1748	
	2	-	423	1192	1074	1666	1071	2023	914	2999	1049	1767	1534	886	1868	1181	1502	673	1136	995	1398	858	
	3	264	232	1233	1111	2033	1558	1165	391	1612	1490	1208	668	1031	1227	876	2733	706	938	1015	2583	1611	
31 pg	1	-	179	77	358	489	773	81	1026	634	415	982	229	1370	483	153	271	219	174	-	-	387	
	2	-	263	321	474	1211	428	1217	554	803	594	398	1016	635	114	729	181	680	302	513	929	1327	
	3	79	-	445	637	1177	1109	818	568	676	431	426	267	-	272	631	200	100	629	262	394	986	
16 pg	1	153	94	293	251	584	267	336	-	397	-	-	587	176	402	314	561	212	317	184	381	664	
	2	143	-	186	-	208	383	205	191	376	-	334	479	605	177	125	226	98	-	-	506	791	
	3	-	-	284	538	451	246	-	213	-	72	85	729	241	158	402	314	201	117	505	799	328	
8 pg	1	-	91	-	357	116	194	-	444	-	320	-	-	360	168	97	232	-	-	174	1259	321	
	2	74	98	420	-	226	165	233	-	-	264	410	-	-	170	139	491	403	-	83	-	228	
	3	-	214	467	358	150	-	-	371	309	132	225	302	367	-	438	236	447	-	-	-	174	

หมายเหตุ (-) แสดงการหายไปของแอลลีล และ (*) แสดง Surviving sister allele ที่มีค่าสูงที่สุด

ตารางที่ 4.4 ความสูงของพีคของแต่ละแอลลีลที่ตรวจพบที่ชุดการทดสอบที่ปริมาณดีเอ็นเอ 8 pg-63 pg ของชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิกิริยา

ปริมาณ ดีเอ็นเอ	ชุดการทดสอบ	Amelogenin		D3S1358		D1S1656		D2S441	D10S1248		D13S317		Penta E		D16S539		D18S51	D2S1338		CSF1PO	Penta D		TH01		vWA	
		X	Y	15	19	15	17	14	13	14	10	13	17	20	11	12	14	17	23	12	9	12	6	8	11	16
63 pg	1	969*	-	446	1063	1034	692	3141	845	557	456	1018	400	1248	496	679	1806	661	557	1532	961	551	436	251	906	773
	2	1592	442	1082	885	829	625	1910	517	1136	422	1394	673	1222	712	702	2418	255	334	1510	807	764	499	671	601	700
	3	1244	379	1021	1541	808	371	2149	635	362	997	1081	328	614	863	402	1518	832	694	1269	733	945	357	874	667	952
31 pg	1	239	482	207	163	508	318	1267	417	-	237	645	335	220	93	253	1294	263		447	173	90	79	88	166	300
	2	-	543	193	344	462	766	1073	408	613	295	410	121	105	523	200	1525	172	262	929	466	307	88	230	329	322
	3	-	282	65	778	301	308	530	220	-	529	637	246	126	141	-	665	-	98	416	351	411	211	265	277	70
16 pg	1	-	198	72	-	125	230	887	279	-	498	-	-	100	173	124	153	93	205	253	119	137	61	99	121	11
	2	-	267	132	-	277	334	404	113	133	399	143	68	93	176	221	460	225	63	419	423	468	229	-	182	138
	3	121	61	-	-	119	-	730	275	-	757	680	-	69	77	217	250	397	154	150	327	145	125	130	202	-
8 pg	1	-	233	119	-	-	-	140	-	147	-	-	-	-	-	-	172	235		-	80	66	-	-	120	-
	2	-	202	84	61	-	108	-	-	-	-	226	-	-	252	137	93	111		-	-	-	-	-	-	-
	3	-	124	-	364	-	-	-	-	-	-	184	229	-	389	261	-	-	110	-	160	180	-	125	94	-
ปริมาณ ดีเอ็นเอ	ชุดการทดสอบ	D21S11		D7S820		D5S818		TPOX	D8S1179		D12S391		D19S433		SE33		D22S1045		DYS391	FGA		DYS576		DYS570		
		29	31.2	10	11	10	12	8	13	16	18	19	14	15.2	14	25.2	16	11	23	24	18	17				
63 pg	1	807	1014	739	552	377	628	661	420	451	545	743	662	1030	987	756	1120	121	313	295	547	547				
	2	745	1383	799	925	904	888	926	645	553	1067	707	494	402	1063	874	1114	163	672	399	832	711				
	3	695	426	909	981	809	1062	1077	341	508	593	635	921	637	498	613	1077	233	590	316	294	230				
31 pg	1	317	353	470	262	262	83	357	205	246	188	252	373	297	-	161	229	119	251	71	450	198				
	2	570	-	404	315	92	104	115	75	201	277	238	241	257	279	234	389	377	69	142	109	87				
	3	228	476	436	448	246	367	352	323	427	126	-	116	132	359	395	164	74	136	110	134	149				
16 pg	1	219	128	220	355	176	156	147	140	152	330	122	402	-	124	-	107	-	107	114	391	86				
	2	-	90	84	252	143	76	257	-	253	115	-	430	177	-	-	98	84	218	143	-	272				
	3	-	194	138	183	74	-	356	115	72	177	120	220	-	335	112	425	-	-	-	85	61				
8 pg	1	121	-	194	310	-	-	114	69	-	-	110	109	172	124	108	-	-	-	-	134	-				
	2	189	102	-	67	-	99	210	-	116	-	85	110	120	-	135	89	-	-	-	211	-				
	3	375	-	-	113	60	-	-	77	-	-	101	-	-	118	-	-	-	-	-	126	-				

หมายเหตุ (-) แสดงการหายไปของแอลลีล และ (*) แสดง Surviving sister allele ที่มีค่าสูงที่สุด

4.2.4 การประเมินค่าปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นที่เหมาะสมของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิกิริยา

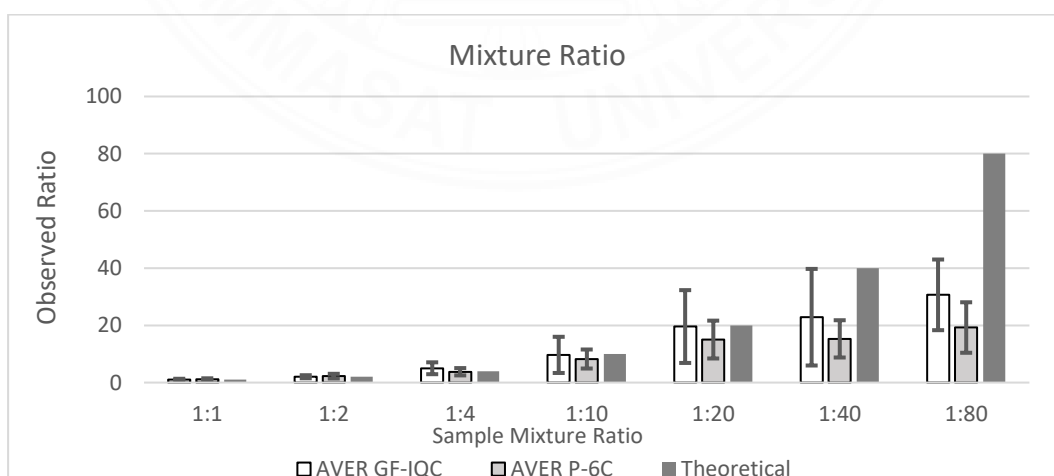
Gavazaj F.Q. และคณะ⁽⁵⁸⁾ ได้ให้เกณฑ์การพิจารณาปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นที่เหมาะสมของชุดน้ำยาตรวจดีเอ็นเอไว้ 3 ประการ คือ 1) มีคุณภาพของพีคที่เหมาะสม สมดุล และถูกต้อง 2) ไม่ปรากฏพีคที่มีความสูงเกินที่เครื่องมือวัดได้ หรือ Off scale peaks และ 3) ให้ภาพรวมดีเอ็นเอที่สมบูรณ์และไม่ปรากฏการหายไปของแอลลีล ชุดน้ำยาทั้งสองชนิดให้ภาพรวมดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ ที่ปริมาณดีเอ็นเอน้อยกว่า 2 ng และมากกว่า 125 pg แต่ปริมาณดีเอ็นเอที่ 1 ng มีการปรากฏของ Off scale peaks และ ที่ปริมาณดีเอ็นเอเป็น 125 pg พบบางตำแหน่งที่มีค่า PHR ต่ำกว่า 56% และ 60% (ของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System ตามลำดับ) ด้วยเหตุนี้ชุดน้ำยาทั้งสองชนิดมีปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับครึ่งปฏิกิริยา เป็น 0.5 ng และพบว่าทั้งสองชุดน้ำยามีปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นที่เหมาะสมแบบครึ่งปฏิกิริยาเป็นครึ่งหนึ่งของปฏิกิริยาแบบเต็มตามคู่มือจากผู้ผลิต

4.3 การศึกษาดีเอ็นเอผสม

จากการนำดีเอ็นเอ Control DNA 1224 (เพศชาย) และ Control DNA 1230 (เพศหญิง) มาผสมให้ได้สัดส่วนเป็น 1:0, 1:1, 1:2, 1:4, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 และ 0:1 และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ 0.5 ng จากการศึกษิตตามข้อ 4.2.4 เมื่อทดสอบด้วยชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิกิริยา ได้ผลดังนี้

ชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit ไม่พบการหายไปของสัดส่วนรอง (Minor contributor) ที่สัดส่วนของดีเอ็นเอผสมเป็น 1:1, 1:2 และ 1:4 แต่พบการหายไปของสัดส่วนรองที่สัดส่วน 1:10, 1:20, 1:40 และ 1:80 (ตารางที่ 4.5) โดยสัดส่วนที่ 1:10 พบการหายไปของแอลลีลในตำแหน่ง DYS391, D12S391 และ D2S1338 เมื่อเปรียบสัดส่วนดีเอ็นเอผสมจากการทดลองกับสัดส่วนดีเอ็นเอผสมตามทฤษฎี พบว่าสัดส่วนของดีเอ็นเอผสมที่ 1:1, 2:1, 4:1, 10:1, 20:1, 40:1 และ 80:1 (เพศหญิง:เพศชาย) ตามทฤษฎี มีสัดส่วนที่ได้จากการทดลอง เป็น 1.1, 2.0, 5.0, 9.7, 19.6, 22.9 และ 30.7 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.6) ซึ่งสัดส่วนของดีเอ็นเอผสมที่ 40:1 และ 80:1 จะมีค่าจากการทดลองแตกต่างจากสัดส่วนตามทฤษฎี เพราะผลกระทบสโตคาสติกของดีเอ็นเอที่มีปริมาณน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นพบว่าปฏิกิริยาแบบเต็มของชุดน้ำยา GlobalFiler™ มีความไวต่อสัดส่วนรองของดีเอ็นเอผสมในสัดส่วนที่น้อยกว่า 1:10 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้^(9, 11, 54, 55)

ชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C System ไม่พบการหายไปของสัดส่วนรอง (Minor contributor) เพียงสัดส่วนของดีเอ็นเอผสมที่ 1:1 เท่านั้น สำหรับสัดส่วนที่ 1:2, 1:4, 1:10, 1:20, 1:40 และ 1:80 (ตารางที่ 4.6) พบการหายไปของแอลลีล โดยสัดส่วนที่ 1:1 พบการหายไปของแอลลีล Y ของตำแหน่ง Amelogenin และเมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนดีเอ็นเอผสมจากการทดลองกับสัดส่วนดีเอ็นเอผสมตามทฤษฎี พบว่าสัดส่วนของดีเอ็นเอผสมที่ 1:1, 2:1, 4:1, 10:1, 20:1, 40:1 และ 80:1 (เพศหญิง:เพศชาย) ตามทฤษฎี มีสัดส่วนที่ได้จากการทดลอง เป็น 11.2, 2.3, 3.8, 8.2, 15.0, 15.3 และ 19.2 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.6) ซึ่งสัดส่วนของดีเอ็นเอผสมที่ 40:1 และ 80:1 จะมีค่าจากการทดลองแตกต่างจากสัดส่วนตามทฤษฎีเพราะผลกระทบสโทแคสติคของดีเอ็นเอที่มีปริมาณน้อยเช่นเดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นพบว่า ปฏิกริยาแบบเต็มของชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C System มีความไวต่อสัดส่วนรองของดีเอ็นเอผสมในสัดส่วนที่ค่อนข้างหลากหลายได้แก่ 1:1, 1:1.5, 1:4 และ 1:5 (Cisana S. และคณะ⁽⁵¹⁾ Lin SW. และคณะ⁽⁵⁴⁾ Feng X. และคณะ⁽⁵³⁾ และ Ensenberger M.G.⁽¹⁴⁾ ตามลำดับ) งานวิจัยนี้ทดสอบ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิกริยาซึ่งมีความไวต่อสัดส่วนรองเท่ากับ 1:2 และอยู่ในช่วงความไวของปฏิกริยาแบบเต็มจากงานวิจัยที่กล่าวในข้างต้น และเมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนดีเอ็นเอผสมจากการทดลองกับสัดส่วนดีเอ็นเอผสมตามทฤษฎีระหว่างทั้งสองชุดน้ำยา (ภาพที่ 4.6) พบว่าชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit มีค่าสัดส่วนหลักใกล้เคียงค่าทฤษฎีมากกว่า และ มีความไวต่อสัดส่วนรองได้ดีกว่าชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C System สอดคล้องกับงานวิจัยของ Lin SW. และคณะ⁽⁵⁴⁾ และ Tan J. และคณะ⁽¹¹⁾ ที่ทดสอบด้วยปฏิกริยาแบบเต็มพบว่าชุดน้ำยา GlobalFiler™ มีความไวต่อสัดส่วนรองของดีเอ็นเอผสมมากกว่า PowerPlex® Fusion 6C System



ภาพที่ 4.6 แผนภูมิแสดงการเปรียบเทียบสัดส่วนดีเอ็นเอผสมจากการทดลองกับสัดส่วนดีเอ็นเอผสมตามทฤษฎีระหว่างชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิกริยา

ตารางที่ 4.5 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอผสมของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit แบบครึ่งปฏิบัติการ

MF	D3S158			vWA			D16S539			CSF1PO		TPOX		Y-indel
Samplename	15	17	19	11	14	16	11	12	13	10	12	8	11	2
1230	15	17	-	-	14	16	-	12	13	10	12	8	11	-
1224	15	-	19	11	-	16	11	12	-	-	12	8	-	2
1:1	9830	4810	2974	6223	8383	10439	6191	11066	5000	4131	16979	11887	5502	11347
1:2	11665	7435	2931	3438	7553	10730	3905	9322	5157	6104	10983	11888	5700	7722
1:4	9898	8424	825	2343	8068	8995	1842	9515	6901	9103	8893	10130	5011	4876
1:10	9906	11578	1397	1592	9318	9769	1304	8359	9518	11065	10221	7336	4992	1342
1:20	10466	11544	-	465	7909	13184	1238	9765	12441	9890	9390	11533	7996	2262
1:40	10814	10257	-	297	9715	8792	-	9581	9063	7752	8044	6139	5558	-
1:80	6415	6879	352	380	8733	6939	-	6180	6384	6063	6902	6105	5886	-
MF	Amelogenin		D8S1179			D21S11				D18S51			DYS391	
Samplename	X	Y	11	13	16	28	29	31.2	32.2	12	14	15	11	
1230	X	-	11	13	-	28	-	-	32.2	12	-	15	-	
1224	X	Y	-	13	16	-	29	31.2	-	-	14	-	11	
1:1	30183	7870	8056	18701	7568	10038	8027	6732	8631	8821	17007	9421	7585	
1:2	30105	7491	7910	16900	5872	12317	5179	3572	7452	10478	8430	10261	3380	
1:4	29024	4144	11556	15165	1892	10524	1529	3162	9015	9214	5452	12284	1734	
1:10	30546	2543	14229	11454	449	12162	1099	2112	14638	11531	3039	11823	-	
1:20	30149	1338	13856	19754	373	15965	973	-	13217	16261	2069	11970	728	
1:40	28800	674	12830	13783	-	10035	912	-	9084	11713	1890	10478	690	
1:80	26119	-	10109	12205	-	11205	-	-	9019	9631	-	9239	-	

(-) แสดงแอลลีลที่หายไป และพื้นที่หลังสีเทา แสดงตำแหน่งที่มีแอลลีลเหมือนกัน

ตารางที่ 4.5 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอผสมของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit แบบครึ่งปฏิบัติการ (ต่อ)

MF	D5S818			D13S317				D7S820			SE33			
Sample name	10	11	12	9	10	11	13	8	10	11	14	20	25.2	29.2
1230		11	12	9	-	11	-	8	10	-	-	20	-	29.2
1224	10	-	12	-	10	-	13	-	10	11	14	-	25.2	-
1:1	7590	9457	13294	8217	6426	6595	8846	7680	15920	6203	7788	5701	8111	8643
1:2	4054	7364	13368	12414	5616	10544	4347	9180	15286	5392	4350	6341	3352	5546
1:4	2159	9503	8060	10323	2689	12459	2020	9351	13313	2504	2141	8038	1426	9640
1:10	1886	12167	10486	15359	2005	15635	1656	13135	12602	2115	1047	11756	954	11658
1:20	1127	11186	12729	14006	-	14152	631	14369	11628	303	360	13648	411	10622
1:40	-	11137	10117	14275	-	10213	286	9130	8696	533	211	9751	-	10418
1:80	-	9037	8020	10350	-	9267	-	10477	10242	-	-	8421	-	7932
MF	D10S1248			D1S1656				D12S391			D2S1338			
Sample name	13	14	16	15	17	17.3	17.3	18	19	21	17	23	24	
1230	13	-	16	15	-	17.3	17.3	-	-	21	-	23	24	
1224	13	14	-	15	17	-	-	18	19	-	17	23	-	
1:1	13669	9315	6508	19168	6942	9346	7104	5244	6269	5954	6638	15602	6650	
1:2	12299	3779	7994	12881	4132	11458	5572	3622	3402	5440	4086	17387	10465	
1:4	10833	1962	9603	14087	1435	10582	6530	2370	1429	7278	3267	18445	12544	
1:10	12851	1554	9361	14155	1746	15906	9692	-	201	7346	-	15462	12998	
1:20	11305	794	11001	16109	-	15971	8326	-	668	9856	1460	15862	16721	
1:40	10757	-	9251	12163	-	11716	8755	-	-	9451	270	13653	12929	
1:80	5570	276	9125	9718	-	9606	7684	-	-	5880	186	8371	8755	

หมายเหตุ (-) แสดงแอลลีลที่หายไป และพื้นที่หลังสีเทา แสดงตำแหน่งที่มีแอลลีลเหมือนกัน

ตารางที่ 4.6 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอผสมของชุดน้ำยาของชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิบัติการ

MF	Amelogenin		D3S1358			D1S656			D2S441		D10S1248			D13S317				
Sample name	X	Y	15	17	19	15	17	17.3	11	14	13	14	16	9	10	11	13	
1230	X	-	15	17	-	15	-	17.3	11	14	13	-	16	9	-	11	-	
1224	X	Y	15	-	19	15	17	-	-	14	13	14	-	-	10	-	13	
1:1	10301	2648	6769	4780	6312	6362	2373	5008	4894	14579	10919	3820	4054	3868	5261	5631	3708	
1:2	12019	-	6983	4776	1908	9250	1660	5113	7319	12300	9359	3261	5359	5178	3389	7580	2068	
1:4	10893	-	5068	4715	1378	5018	825	5659	5744	10752	8481	1894	4343	6566	2436	6210	1908	
1:10	12431	-	7831	6499	893	7583	723	7810	8727	10808	8378	646	7371	7258	1051	9007	354	
1:20	11562	-	6754	6834	340	7854	301	5380	7506	8929	6224	783	5782	8339	799	7678	191	
1:40	11730	-	6257	5286	-	5137	-	6581	7721	7323	9064	-	7209	8976	-	7694	272	
1:80	10852	-	7452	7354	-	6163	-	5420	8876	9094	6278	-	8730	7146	-	8312	-	
MF	Penta E				D16S539			D18S51			D2S1338			CSF1PO		Penta D		
Sample name	5	12	17	20	11	12	13	12	14	15	17	23	24	10	12	8	9	12
1230	5	12	-	-	-	12	13	12	-	15	-	23	24	10	12	8	9	-
1224	-	-	17	20	11	12	-	-	14	-	17	23	-	-	12	-	9	12
1:1	3461	2951	2277	2511	3700	7604	3952	4639	6958	5416	3138	6016	3127	3546	10753	4579	8132	3696
1:2	6414	4321	1840	1747	2653	7320	5253	6027	4954	4836	2527	8553	4682	3099	7690	4467	7658	1408
1:4	5049	3028	1544	724	1626	5853	4568	4966	3823	6234	1466	4989	4278	5625	6482	4604	6304	1728
1:10	4500	4651	247	556	1400	7872	6071	7950	2163	9527	1218	6473	4301	5128	7211	5316	7397	358
1:20	5556	4998	-	-	-	7230	6712	8363	-	8085	-	6760	5672	6644	6925	5870	6748	1053
1:40	5939	5231	-	-	681	5200	4807	6977	-	6963	256	5886	5537	6460	7481	7593	6843	-
1:80	4904	4249	360	-	626	5183	5992	7317	-	9433	279	7476	5945	8168	4988	6963	6417	-

(-) แสดงแอลลีลที่หายไป และพื้นที่หลังสีเทา แสดงตำแหน่งที่มีแอลลีลเหมือนกัน

ตารางที่ 4.6 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอผสมของชุดน้ำยาของชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิกิริยา (ต่อ)

MF	TH01				vWA			D21S11				D7S820			D5S818			
Sample name	6	8	9	9.3	11	14	16	28	29	31.2	32.2	8	10	11	10	11	12	
1230	-	-	9	9.3	-	14	16	28	-	-	32.2	8	10	-	-	11	12	
1224	6	8	-	-	11	-	16	-	29	31.2	-	-	10	11	10	-	12	
1:1	3151	4111	2615	3791	4048	4188	7356	3676	3889	4729	3701	4669	8473	2901	2822	3931	6444	
1:2	1931	1670	3651	3086	1588	3250	5695	4257	2730	2739	3353	4510	4856	1957	2790	3991	5231	
1:4	990	636	3854	5483	1400	4091	5963	5262	859	2055	4993	5316	4367	1370	1129	4106	4908	
1:10	578	425	4251	5270	919	5031	6278	5808	813	1607	6558	5125	6263	555	1253	5694	5690	
1:20	-	344	4464	4485	384	5099	6213	5419	-	1246	6909	4970	4320	202	660	5410	5301	
1:40	313	242	4151	3209	311	5965	5794	4741	277	-	5474	5421	5584	-	-	5331	3279	
1:80	-	240	3827	4546	-	5436	5178	5436	-	-	4531	5397	6146	201	-	5672	3567	
MF	TPOX		D8S1179				D12S391				D19S433			SE33			D22S1045	DYS391
Sample name	8	11	11	13	16	17.3	18	19	21	13	14	15.2	14	20	25.2	29.2	16	11
1230	8	11	11	13	-	17.3	-	-	21	13	-	15.2	-	20	-	29.2	16	
1224	8	-	-	13	16	-	18	19	-	-	14	15.2	14	-	25.2	-	16	11
1:1	10452	2479	3228	5566	2810	3105	3496	2639	3918	2558	2050	5617	2799	3758	3120	3382	12961	1661
1:2	7465	3965	3794	5168	911	5385	2546	2154	2995	4694	1319	7188	2523	3908	2376	2890	8015	1116
1:4	4317	4911	3118	4849	951	3175	1074	527	3513	3346	519	4472	1597	4838	1241	4816	10378	760
1:10	4790	5800	5183	4451	477	5324	1007	577	4225	5305	440	4959	729	4890	715	4103	10283	363
1:20	6093	4734	5225	4495	-	6110	-	-	4039	4707	202	5453	496	4832	318	6497	10978	
1:40	5817	5250	4451	4812	-	4949	-	-	3828	5426	-	5474	-	4933	-	4400	9383	
1:80	3777	5400	3349	3374	-	4497	-	-	5431	4730	-	5062	-	4835	-	4691	10063	

(-) แสดงแอลลิลที่หายไป และพื้นที่หลังสีเทา แสดงตำแหน่งที่มีแอลลิลเหมือนกัน

ตารางที่ 4.6 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอผสมของชุดน้ำยาของชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิกิริยา (ต่อ)

MF	FGA			DYS576	DYS570
Sample name	22	23	24	18	17
1230	22	-	24	-	-
1224	-	23	24	18	17
1:1	3071	3461	6237	4094	2349
1:2	3725	3009	5905	2099	2106
1:4	2709	593	3613	1089	1271
1:10	5029	1169	6003	929	357
1:20	4394	-	5102	222	583
1:40	3932	-	4988	-	-
1:80	5054	-	4634	226	-

(-) แสดงแอลลีลที่หายไป และพื้นที่หลังสีเทา แสดงตำแหน่งที่มีแอลลีลเหมือนกัน

4.4 การศึกษาตัวยับยั้งในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Inhibitor study)

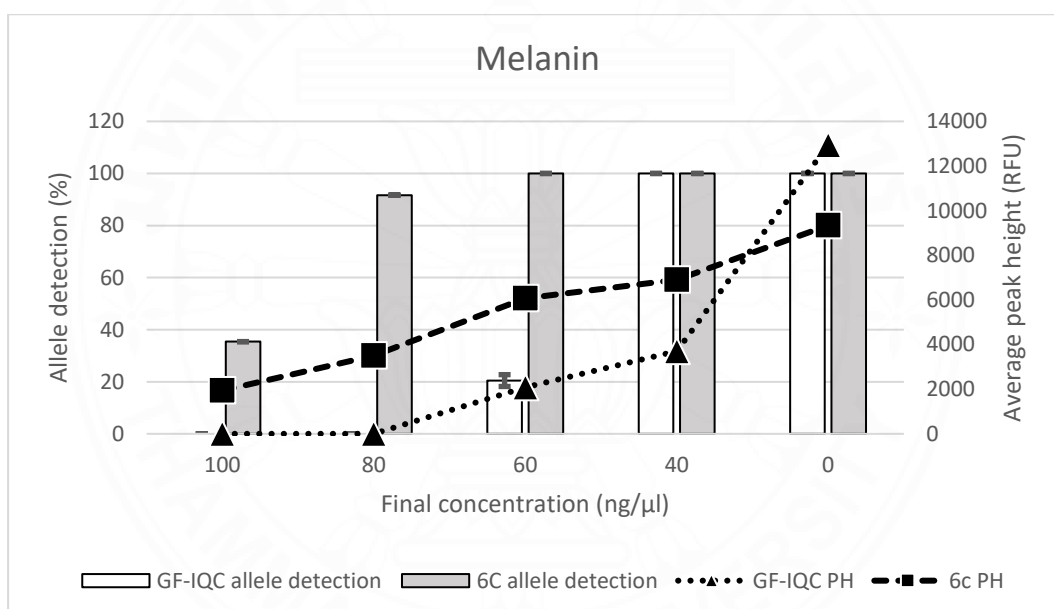
ในการศึกษาตัวยับยั้ง 3 ชนิด คือ เมลานิน เฮมาทิน และ ฮิวมิกแอซิด ต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิบัติการด้วยดีเอ็นเอมาตรฐาน 1224 ที่ปริมาณ 0.5 ng พบว่าน้ำยาทั้งสองชุดมีความสูงของพีคลดลงเมื่อความเข้มข้นของตัวยับยั้งทั้ง 3 ชนิดเพิ่มขึ้น และค่าเฉลี่ยร้อยละแอลลีสที่ตรวจวัดได้นั้นแสดงผลตามภาพที่ 4.7, 4.8 และ 4.9

ชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit แบบครึ่งปฏิบัติการด้วยสภาวะที่มีเมลานิน ความเข้มข้น 0, 40, 60, 80 และ 100 ng/μL พบค่าเฉลี่ยร้อยละแอลลีสที่ตรวจวัดได้เป็น 100%, 100%, 20%, 0% และ 0% ตามลำดับ สภาวะที่มีเฮมาทินความเข้มข้น 0, 500, 750, 1000 และ 1250 μM พบค่าเฉลี่ยร้อยละแอลลีสที่ตรวจวัดได้เป็น 100%, 99%, 47%, 0% และ 0% ตามลำดับ และ สภาวะที่มีฮิวมิกแอซิดความเข้มข้น 0, 50, 100, 200 และ 300 ng/μL พบค่าเฉลี่ยร้อยละแอลลีสที่ตรวจวัดได้เป็น 100%, 100%, 100%, 8% และ 5% ตามลำดับ

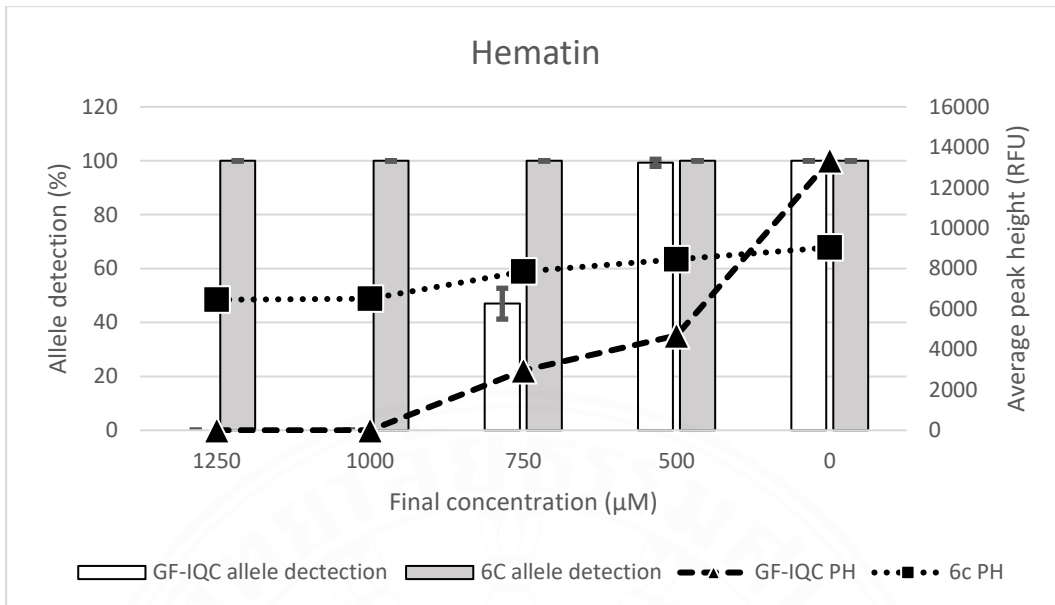
สำหรับชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิบัติการด้วยสภาวะที่มีเมลานินความเข้มข้น 0, 40, 60, 80 และ 100 ng/μL พบค่าเฉลี่ยร้อยละแอลลีสที่ตรวจวัดได้เป็น 100%, 100%, 100%, 92% และ 35% ตามลำดับ สภาวะที่มีเฮมาทินความเข้มข้น 0, 500, 750, 1000 และ 1250 μM พบค่าเฉลี่ยร้อยละแอลลีสที่ตรวจวัดได้เป็น 100% ทั้งหมด และ สภาวะที่มีฮิวมิกแอซิดความเข้มข้น 0, 50, 100, 200 และ 300 ng/μL พบค่าเฉลี่ยร้อยละแอลลีสที่ตรวจวัดได้เป็น 100%, 100%, 100%, 33% และ 0% ตามลำดับ

มีการรายงานถึงความเข้มข้นของเมลานิน 40 ng/μL เริ่มยับยั้งปฏิบัติการแบบเต็มของชุดน้ำยา GlobalFiler™⁽⁵²⁾ ในขณะที่การใช้ครึ่งปฏิบัติการของงานวิจัยนี้ ชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit เริ่มถูกยับยั้งที่ความเข้มข้นของเมลานินที่ 60 ng/μL เห็นได้ว่าครึ่งปฏิบัติการค่อนข้างทนต่อเมลานินมากกว่าปฏิบัติการแบบเต็ม นอกจากนี้มีการรายงานว่าเฮมาทิน 600-1000 μM และ ฮิวมิกแอซิดความเข้มข้น 200 ng/μL ยับยั้งปฏิบัติการแบบเต็มของ GlobalFiler™ ได้⁽⁵²⁾ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ที่ครึ่งปฏิบัติการของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit ถูกยับยั้งด้วยเฮมาทิน 750 μM ฮิวมิกแอซิดที่ 200 ng/μL และยังมีผลการรายงานถึงฮิวมิกแอซิดที่ความเข้มข้น 300 ng/μL เริ่มยับยั้งปฏิบัติการแบบเต็มของชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C System⁽¹¹⁾ สำหรับงานวิจัย ครึ่งปฏิบัติการของชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C System เริ่มถูกยับยั้งด้วยเมลานินที่ความเข้มข้น 200 ng/μL เห็นได้ว่าปฏิบัติการแบบเต็มนั้นทนทานต่อฮิวมิกแอซิดได้ดีกว่าเช่นกัน

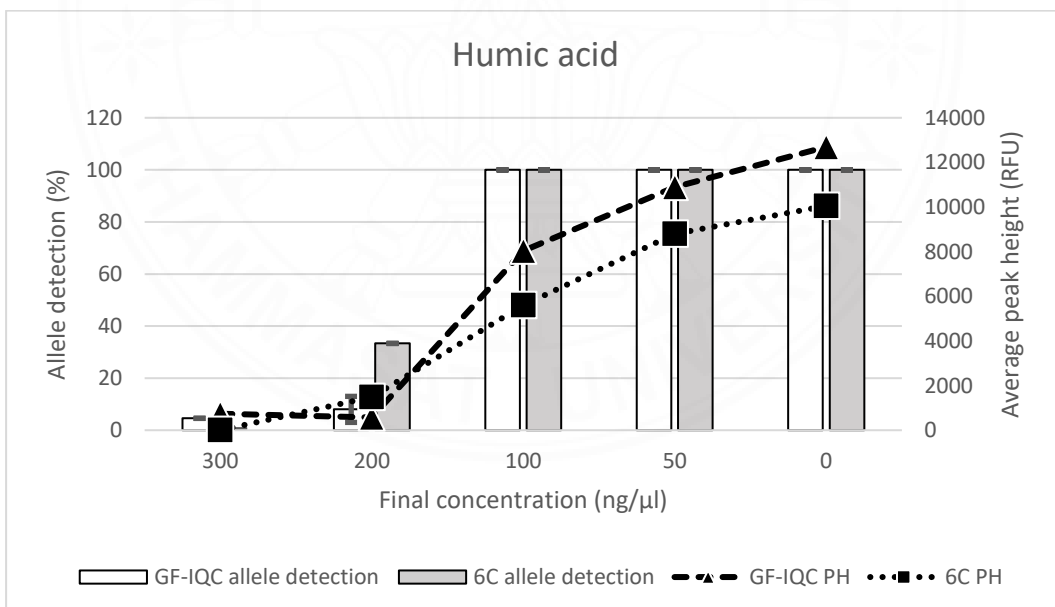
เมื่อเปรียบเทียบความทนต่อตัวยับยั้งของน้ำยาทั้งสองชุดพบว่าชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C System มีความทนทานต่อตัวยับยั้งมากกว่า GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit โดยเฉพาะตัวยับยั้งเฮมาทินที่ให้ค่าเฉลี่ยแอลลีลที่ตรวจวัดได้สูงถึง 100% ถึงแม้ว่าความเข้มข้นของเฮมาทินสูงถึง 1250 μM ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Tan J. และคณะ ⁽¹¹⁾ ที่รายงานถึงความทนทานของเฮมาทินความเข้มข้น 2000 μM ต่อปฏิกิริยาแบบเต็มของชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C System นอกจากนี้ในสภาวะปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่มีเมลานิน และเฮมาทิน PowerPlex® Fusion 6C System จะให้ความสูงพีคที่มากกว่าชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit อย่างไรก็ตามในสภาวะปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่มีอิวมิคแอซิดชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit จะให้ความสูงพีคสูงกว่า



ภาพที่ 4.7 แผนภูมิแสดงการเปรียบเทียบร้อยละแอลลีลที่ตรวจวัดได้และความสูงพีคของดีเอ็นเอมาตรฐาน 1224 ปริมาณ 0.5 ng ที่มีตัวยับยั้งเมลานิน ของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิกิริยา



ภาพที่ 4.8 แผนภูมิแสดงการเปรียบเทียบร้อยละแอลลีลที่ตรวจวัดได้และความสูงพีคของดีเอ็นเอมาตรฐาน 1224 ปริมาณ 0.5 ng ที่มีตัวยับยั้งเฮมาทิน ของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิกิริยา



ภาพที่ 4.9 แผนภูมิแสดงการเปรียบเทียบร้อยละแอลลีลที่ตรวจวัดได้และความสูงพีคของดีเอ็นเอมาตรฐาน 1224 ปริมาณ 0.5 ng ที่มีตัวยับยั้งฮิวมิคแอซิด ของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิกิริยา

4.5 การศึกษาความแม่นยำและความถูกต้อง

4.5.1 การศึกษาความแม่นยำ

4.5.1.1 การศึกษาการทำซ้ำของขนาดดีเอ็นเอ (Repeatability of sizing)

เมื่อนำแอลลีลลิคเลตเตอร์ของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System ชนิดละ 32 ตัวอย่าง มาทดสอบพบว่า ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของขนาดแอลลีลมีค่าอยู่ในช่วง 0.006-0.053 และ 0.016-0.056 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าไม่เกิน 0.15 ตามเกณฑ์ของ Smith R.N. ^(14, 59) ดังนั้นจึงมั่นใจได้ว่าเมื่อทำการทดสอบตัวอย่างด้วยชุดน้ำยาทั้งสองชุดกับเครื่อง ABI 3500 Genetic analyzer จะสามารถอ่านผลขนาดและชนิดของแอลลีลได้ถูกต้องและเที่ยงตรง

4.5.1.2 การศึกษาการทำซ้ำของความสูงพีค (Repeatability of peak height)

height)

จากการนำข้อมูลค่าเฉลี่ยความสูงของพีคเฮเทอโรไซกัสของการทดสอบความไวด้วยชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิกิริยาพบว่าน้ำยาทั้งสองชุดมีค่าเฉลี่ยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD) เท่ากับ 8% ตามตารางที่ 4.7 ค่า RSD แสดงถึงความเที่ยงในการทดสอบสามซ้ำในแต่ละปริมาณดีเอ็นเอ โดยถ้าค่า RSD มีค่าน้อยแสดงว่าในการทดสอบนั้นมีความเที่ยงสูง อย่างไรก็ตามจากการทบทวนวรรณกรรมไม่พบว่ามีข้อกำหนดค่า RSD ที่ยอมรับได้ของการทดสอบหาความเที่ยงของความสูงของพีคเฮเทอโรไซกัส แต่มีการรายงานว่าการทดสอบเชิงปริมาณของ qPCR ซึ่งมีการกำหนดเกณฑ์ที่ยอมรับได้ที่ค่า RSD เท่ากับ 23%⁽⁶⁰⁾

ตารางที่ 4.7 ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของค่าเฉลี่ยความสูงของพีคเฮเทอโรไซกัสของการทดสอบความไวด้วยชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิกิริยา

ปริมาณดีเอ็นเอ	ค่าเฉลี่ยความสูงของพีค (RFU)		ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (RFU)		RSD (%)	
	GF-IQC	P-6C	GF-IQC	P-6C	$\frac{SD}{AVER} \times 100$	
					GF-IQC	P-6C
2 ng	27097	25508	368	718	1	3
1 ng	20030	17467	1228	1835	6	15
0.5 ng	10349	7942	1545	102	15	2

ตารางที่ 4.7 ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของค่าเฉลี่ยความสูงของพีคเฮเทอโรไซกัสของการทดสอบความไวด้วยชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิบัติการ (ต่อ)

ปริมาณดีเอ็นเอ	ค่าเฉลี่ยความสูงของพีค (RFU)		ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (RFU)		RSD (%)	
	GF-IQC	P-6C	GF-IQC	P-6C	$\frac{SD}{AVER} \times 100$	
					GF-IQC	P-6C
0.25 ng	6253	5386	339	213	5	7
125 pg	2463	2036	82	52	3	4
63 pg	1461	1208	105	45	7	6
31 pg	539	450	57	20	11	7
16 pg	365	314	6	12	2	6
8 pg	304	285	62	27	20	18
				เฉลี่ย	8	8

4.5.1.3 การศึกษาการผลิตรซ้ำ (Reproducibility study)

จากการนำ Control DNA 007 (สำหรับชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit) และ 2008M (สำหรับชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C System) มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ชุดน้ำยาละ 5 ซ้ำ พบว่าสารควบคุมเชิงบวกแต่ละชนิดให้ผลที่สอดคล้องกันทั้งหมด

4.5.2 การศึกษาความถูกต้อง

จากการนำตัวอย่างดีเอ็นเอมาตรฐาน 2391d component c มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยน้ำยาทั้งสองชนิดคือ GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิบัติการพบว่าน้ำยาทั้งสองชุดให้ผลการทดสอบที่สอดคล้องกับผลการทดสอบในใบรับรองตัวอย่างดีเอ็นเอมาตรฐานทุกตำแหน่ง (ภาคผนวก ก) (ตารางที่ 4.8)

ตารางที่ 4.8 ภาพรวมดีเอ็นเอที่ได้จากดีเอ็นเอมาตรฐาน 2391d component c ของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิบัติการ

STR	PowerPlex® Fusion 6C System	GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit	2391d component c
Amelogenin	X,Y	X,Y	X,Y
D3S1358	14,18	14,18	14,18
D1S1656	15,16	15,16	15,16
D2S441	11,14	11,14	11,14
D10S1248	12,16	NA	12,16
D13S317	12,14	12,14	12,14
Penta E	12,14	NA	12,14
D16S539	9,12	9,12	9,12
D18S51	16,18	16,18	16,18
D2S1338	23,24	23,24	23,24
CSF1PO	10,11	10,11	10,11
Penta D	9,13	NA	9,13
TH01	8,9.3	8,9.3	8,9.3
vWA	14,17	14,17	14,17
D21S11	29,31	29,31	29,31
D7S820	9,10	9,10	9,10
D5S818	13,15	13,15	13,15
TPOX	8,10	8,10	8,10
D8S1179	12,15	12,15	12,15
D12S391	17,18	17,18	17,18
D19S433	13,15	13,15	13,15
SE33	17,18	17,18	17,18
D22S1045	14,15	NA	14,15
DYS391	10	10	10
FGA	22,23	22,23	22,23
DYS576	17	NA	17
DYS570	18	NA	18
Y-indel	NA	1	-

หมายเหตุ NA หมายถึง ไม่สามารถวิเคราะห์แอลลีลในชุดน้ำยาได้,-หมายถึง ไม่ปรากฏในใบรับรองสารมาตรฐาน

4.6 การประเมินและเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิกิริยาเมื่อทดสอบด้วยตัวอย่างจริง

เมื่อทำการทดสอบตัวอย่างดีเอ็นเอจำนวน 31 ตัวอย่างด้วยชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System พบว่ามี 30 ตัวอย่างที่ตรวจพบดีเอ็นเอ และ 1 ตัวอย่างตรวจไม่พบดีเอ็นเอ (ตารางที่ 4.9) และเมื่อนำตัวอย่างที่ได้ภาพรวมดีเอ็นเอเป็นดีเอ็นเอบุคคลเดี่ยว (Single profile) มาวิเคราะห์ความสอดคล้องของ (Concordance) พบว่าชุดน้ำยาทั้งสองชนิด ให้ผลที่สอดคล้องกันทั้งหมด (ตารางที่ 4.10) แต่ตัวอย่างรหัส S24 (ก้านสำลีเช็ดเล็บ) ให้ผลที่แตกต่างเล็กน้อย โดยชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C System ให้ภาพรวมดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ แต่ชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit ให้ภาพรวมดีเอ็นเอที่ไม่สมบูรณ์ ซึ่งมี 1 ซ้ำเกิดการหายไปของแอลลีล 24 ในตำแหน่ง SE33 เนื่องจากดีเอ็นเอต้นแบบมีลักษณะเป็นดีเอ็นเอเสื่อมสภาพ (Degraded template) จึงทำให้แอลลีลขนาดใหญ่ที่แตกหักได้ง่าย ถูกเพิ่มปริมาณด้วยดีเอ็นเอพอลิเมอร์สไดยากกว่าดีเอ็นเอขนาดเล็ก

เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นพบว่างานวิจัยนี้มีให้ผลเหมือนกับงานวิจัยของ Mattayat D. และคณะ⁽¹⁶⁾ ที่ทดสอบความสอดคล้องของชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifier® Plus kit และ QIAGEN's IDplex Plus kit แบบครึ่งปฏิกิริยาด้วยตัวอย่างที่ได้จากคดีระเบิด ซึ่งพบว่าน้ำยาทั้งสองชนิดให้ผลที่สอดคล้องกันโดยสมบูรณ์ อีกทั้งงานวิจัยนี้ยังให้ผลเหมือนการศึกษาความสอดคล้องของชุดน้ำยาสองชนิดแบบเต็มปฏิกิริยาซึ่ง Ensenberger M.G. และคณะ⁽¹⁴⁾ และ Cisana S. และคณะ⁽⁵¹⁾ ได้รายงานว่าชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C System และน้ำยาชนิดอื่น แบบเต็มปฏิกิริยา ทดสอบด้วยตัวอย่างหลายประเภทแล้วให้ผลที่สอดคล้องกันโดยสมบูรณ์ อย่างไรก็ตามยังมีงานวิจัยที่น้ำยาทั้งสองชนิดให้ผลไม่สอดคล้องกันในตัวอย่างบางประเภท เช่นงานวิจัยของ Feng X. และคณะ⁽⁵³⁾ ที่พบว่าเมื่อทดสอบดีเอ็นเอจากงานคดี 85 ตัวอย่าง ด้วยชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C System และ PowerPlex® 21 System แบบเต็มปฏิกิริยา พบว่ามี 1 ตัวอย่างที่ให้ผลไม่สอดคล้องกัน เนื่องจาก PowerPlex® Fusion 6C System มีความไวต่อดีเอ็นเอมากกว่าจึงเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบุคคลอื่นที่น่าจะเป็นสัดส่วนรองเพิ่มขึ้นมา

ตารางที่ 4.9 ผลการทดสอบดีเอ็นเอจากตัวอย่างจริงของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิบัติการ

ลำดับ	ประเภทของภาพรวมดีเอ็นเอ	ปริมาณดีเอ็นเอ (ng)	จำนวนภาพรวมดีเอ็นเอที่ตรวจพบ (ตัวอย่าง)	
			GF-IQC	P-6C
1	ภาพรวมดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ (Full profile)	0.15-0.50	19	20
2	ภาพรวมดีเอ็นเอที่ไม่สมบูรณ์ (Partial profile)	0.50	5	4
3	ภาพรวมดีเอ็นเอของดีเอ็นเอผสม (Mixture profile)	0.15-0.50	6	6
4	ตรวจไม่พบดีเอ็นเอ (No profile)	0.5	1	1
		รวม	31	31

ตารางที่ 4.10 ผลการทดสอบดีเอ็นเอจากตัวอย่างจริงด้วยชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit (GF-IQC) และ PowerPlex® Fusion 6C (P-6C) แบบครึ่งปฏิบัติการ

ลำดับ	รหัส	ตัวอย่าง	ประเภทตัวอย่าง	ความเข้มข้นดีเอ็นเอ (ng/μL)	ภาพรวมดีเอ็นเอ		ร้อยละแอลลีลที่ตรวจวัดได้ (%)				ความสอดคล้อง
					GF-IQC	P-6C	GF-IQC	SD	P-6C	SD	
1	S1	Buccal swab	Buccal swab	15.34	Full profile	Full profile	100	0	100	0	Yes
2	S2	Buccal swab	Buccal swab	11.80	Full profile	Full profile	100	0	100	0	Yes
3	S3	Buccal swab	Buccal swab	5.25	Full profile	Full profile	100	0	100	0	Yes
4	S4	Buccal swab	Buccal swab	3.12	Full profile	Full profile	100	0	100	0	Yes
5	S5	Buccal swab	Buccal swab	4.37	Full profile	Full profile	100	0	100	0	Yes
6	S6	Buccal swab	Buccal swab	5.54	Full profile	Full profile	100	0	100	0	Yes
7	S7	Fresh blood	Blood	13.92	Full profile	Full profile	100	0	100	0	Yes
8	S8	Fresh blood	Blood	5.03	Full profile	Full profile	100	0	100	0	Yes
9	S9	Fresh blood	Blood	1.34	Full profile	Full profile	100	0	100	0	Yes
10	S10	Blood stain (Cotton swab)	Blood	0.13	Full profile	Full profile	100	0	100	0	Yes
11	S11	Blood stain (paper)	Blood	1.47	Full profile	Full profile	100	0	100	0	Yes
12	S12	Blood stain (Jeans)	Blood	1.46	Full profile	Full profile	100	0	100	0	Yes
13	S13	Tissue	Tissue	5.52	Full profile	Full profile	100	0	100	0	Yes
14	S14	Hair	Hair	0.42	Partial profile	Partial profile	63	6	59	0	Yes
15	S15	Fingernails	Nail	1.12	Partial profile	Partial profile	99	2	99	1	Yes
16	S16	Fingernails	Nail	6.01	Partial profile	Partial profile	97	5	99	1	Yes
17	S17	Semen on Wipes	Semen	0.30	Full profile	Full profile	100	0	100	0	Yes
18	S18	Semen on paper	Semen	3.73	Partial profile	Partial profile	96	0	92	6	Yes

ตารางที่ 4.10 ผลการทดสอบดีเอ็นเอจากตัวอย่างจริงด้วยชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit (GF-IQC) และ PowerPlex® Fusion 6C System (P-6C) แบบครึ่งปฏิบัติการ

ลำดับ	รหัส	ตัวอย่าง	ประเภทตัวอย่าง	ความเข้มข้นดีเอ็นเอ (ng/μL)	ภาพรวมดีเอ็นเอ		ร้อยละแอลลีลที่ตรวจวัดได้ (%)				ความสอดคล้อง
					GF-IQC	P-6C	GFIQC	SD	P-6C	SD	
19	S22	Swab of screw cap	Touched DNA	0.09	Full profile	Full profile	100	0	100	0	Yes
20	S24	Swab of nail	Touched DNA	0.54	Partial profile	Full profile	99	2	100	100	Yes
21	S25	Tape lifting of towel	Touch of fabric	0.08	Full profile	Full profile	100	0	100	0	Yes
22	S27	Toothbrush	Toothbrush	1.76	Full profile	Full profile	100	0	100	0	Yes
23	S28	Cigarette butts	Cigarette butts	0.02	Full profile	Full profile	100	0	100	0	Yes
24	S29	Cigarette butts	Cigarette butts	0.51	Full profile	Full profile	100	0	100	0	Yes

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ประเมินและเปรียบเทียบชุดน้ำยาตรวจดีเอ็นเอสำเร็จรูป 2 ชนิด ได้แก่ GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิกิริยา ด้วยสารควบคุมเชิงบวก สารควบคุมเชิงลบ สารมาตรฐาน และ ตัวอย่างจริงจากสถานที่เกิดเหตุตามพารามิเตอร์ที่ระบุไว้ในแนวปฏิบัติของ SWGDAM จากทดสอบพบว่าน้ำยาทั้งสองชุดมีปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมต่อครึ่งปฏิกิริยาเป็น 0.5 ng โดยชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit สามารถอ่านผลด้วยเกณฑ์ขั้นต่ำที่ 45 RFU และเกณฑ์สโตนแคสติงที่ 610 RFU ในขณะที่ชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C System สามารถอ่านผลด้วยเกณฑ์ขั้นต่ำที่ 60 RFU และเกณฑ์สโตนแคสติงที่ 970 RFU นอกจากนี้ชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C System มีสมมูลของพีคเฮเทอโรไซกัสดีกว่าเล็กน้อย และทนต่อตัวยับยั้ง 3 ชนิด ได้แก่ เมลานิน เฮมาทิน และ ฮิวมิกแอซิดได้ดีกว่าชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit อย่างไรก็ตามชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit ให้ความสูงพีคที่สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญและมีความไวต่อสัดส่วนรองของดีเอ็นเอผสมได้มากกว่าชุดน้ำยา PowerPlex® Fusion 6C System นอกจากนี้ชุดน้ำยาทั้งสองชนิดมีความเที่ยงตรงและแม่นยำ ในการตรวจวัดขนาดและชนิดของแอลลีล โดยสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างจริงจากสถานที่เกิดเหตุ สารควบคุมเชิงบวก และสารมาตรฐานได้ถูกต้องและสอดคล้องกัน รวมถึงมีความไวในการทดสอบดีเอ็นเอไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System แบบครึ่งปฏิกิริยาสามารถนำไปใช้ในงานด้านนิติพันธุศาสตร์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

5.2 ข้อเสนอแนะ

ควรทดสอบปฏิกิริยาแบบเต็มของชุดน้ำยา GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit และ PowerPlex® Fusion 6C System เพื่อเปรียบเทียบความไวของชุดน้ำยาดังกล่าวแบบครึ่งปฏิกิริยา โดยใช้คาร์บอนอะลูมิเนียมที่ตรวจวัดได้เป็นพารามิเตอร์ในการเปรียบเทียบค่าทางสถิติ เพื่อให้มั่นใจว่าสามารถใช้ครึ่งปฏิกิริยาในการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอได้

รายการอ้างอิง

1. Lee H.C., Gaensslen R.E., Bigbee P.D. and Kearney J.J. J Forensic Identif. 1991;41:344–56.
2. Butler JM. Forensic DNA typing : biology, technology, and genetics of STR markers. 2nd ed. ed: Elsevier Academic Press; 2005.
3. Budowle B., Moretti T.R., Niezgoda S.J. and Brown BL, editors. Proceedings of the Second European Symposium on Human Identification 1998; Madison, Wisconsin Promega Corporation.
4. Hares DR, editor Selection and implementation of expanded CODIS core loci in the United States 2015; Netherlands: ELSEVIER SCIENCE B V AMSTERDAM.
5. PowerPlex® Fusion 6C System: Promega; [Available from: <https://worldwide.promega.com/products/forensic-dna-analysis-ce/str-amplification/powerplex-fusion-6c-system/?catNum=DC2705>.
6. GlobalFiler™ and GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Hits User guide: Appliedbiosystem; 2019 [Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A43565#/A43565>.
7. Methods SWGoDA. SWGDAM Guidelines for the Validation of Probabilistic Genotyping Systems 2015. Available from: https://1ecb9588-ea6f-4feb-971a-73265dbf079c.filesusr.com/ugd/4344b0_813b241e8944497e99b9c45b163b76bd.pdf.
8. Internal Validation Guide of Autosomal STR Systems for Forensic Laboratories. Promega; 2013.
9. Almohammed E and Hadi S. Internal validation of GlobalFiler™ kit using reduced reaction volume. Forensic Sci Int Genet Suppl Ser. 2019;7(1):878-83.
10. Janaahi NA, Ghafri RA and Qamar SA. Forensic evaluation of VeriFiler™ Plus 6-dye chemistry kit composed of 23 loci with casework samples. Forensic Sci Int Genet Suppl Ser. 2019;7(1):892-6.
11. Tan J, Tan Y, Ng S, Tay A, Phua Y, Tan W, et al. A preliminary evaluation study of new generation multiplex STR kits comprising of the CODIS core loci and the European Standard Set loci. J Forensic Leg Med. 2017;52.

12. Tay JW, Murakami JA, Cooper PL and Rye MS. Sensitivity and baseline noise of three new generation forensic autosomal STR kits: PowerPlex® Fusion, VeriFiler™ Plus and Investigator® 24plex QS. *Forensic Sci Int Genet.* 2019;1-4.
13. Brito P, Gouveia N, Bogas V, Bento AM, Balsa F, Lopes V, et al. Evaluation and comparative analysis on reduction of Globalfiler™ reaction volume in low template samples. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser.* 2017;6:362-4.
14. Ensenberger MG, Lenz KA, Matthies LK, Hadinoto GM, Schienman JE, Przech AJ, et al. Developmental validation of the PowerPlex® Fusion 6C System. *Forensic Sci Int Genet.* 2016;21:134-44.
15. Iyavoo S, Cummings S, Wolejko A, Furmanczyk D, Graham R, Myers R, et al. Reduced volume PCR amplification using AmpFLSTR® Identifiler® kit. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser.* 2015;5:398-9.
16. Mattayat D, Kitpipit T, Phetpeng S, Asawutmangkul W and Thanakiatkrai P. Comparative performance of AmpFLSTR® Identifiler® Plus PCR amplification kit and QIAGEN® Investigator® IDplex Plus kit. *Sci Justice.* 2016;56(6):468-74.
17. Myers BA, King JL and Budowle B. Evaluation and comparative analysis of direct amplification of STRs using PowerPlex® 18D and Identifiler® Direct systems. *Forensic Sci Int Genet.* 2012;6(5):640-5.
18. วงศกร กังสนันท์. การเปรียบเทียบชุดน้ำยา Qiagen® Investigator® 24plex QS และชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus PCR Amplification ในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ [วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต]. ปทุมธานี: มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์; 2017.
19. Lieberman M, Peet A, Chansky M and Marks AD. Marks' basic medical biochemistry : a clinical approach. 4th ed. ed: Wolters Kluwer / Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
20. Brenner S, Broughton WJ and Miller JH. *Encyclopedia of genetics*: Academic Press; 2002.
21. Blanco A and Blanco G. *Medical biochemistry*: Academic; 2017.
22. Alberts B. *Molecular biology of the cell*. 6th ed. ed: Garland Science, Taylor and Francis Group; 2015.
23. Brown TA. *Genomes*. T.A. Brown. 2nd ed. ed: Wiley-Liss; 2002.

24. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981;290(5806):457-65.
25. Ismail B, Al A, Zahra M and Al-Khafaji Z. Study of Genetic Variations of 15 Autosomal short Tandem Repeats (STRs) and Amelogenin Loci to Establish Database for Iraqi Population 2014.
26. Butler JM. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. Waltham, MA: Academic Press; 2012.
27. Gill P, Urquhart A, Millican E, Oldroyd N, Watson S, Sparkes R, et al. A new method of STR interpretation using inferential logic--development of a criminal intelligence database. *Int J Legal Med.* 1996;109(1):14-22.
28. Kimpton C, Fisher D, Watson S, Adams M, Urquhart A, Lygo J, et al. Evaluation of an automated DNA profiling system employing multiplex amplification of four tetrameric STR loci. *Int J Legal Med.* 1994;106(6):302-11.
29. Kimpton CP, Oldroyd NJ, Watson SK, Frazier RRE, Johnson PE, Millican ES, et al. Validation of highly discriminating multiplex short tandem repeat amplification systems for individual identification. *Electrophoresis*. 1996;17(8):1283-93.
30. Sullivan KM, Mannucci A, Kimpton CP and Gill P. A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. *BioTechniques*. 1993;15(4):636-8, 40-1.
31. Chakraborty R, Stivers DN, Su B, Zhong Y and Budowle B. The utility of short tandem repeat loci beyond human identification: implications for development of new DNA typing systems. *Electrophoresis*. 1999;20(8):1682-96.
32. Allan Tereba, Rex Bitner, Susan Koller, Craig Smith, Daniel Kephart and Steven Ekenberg, inventors; Promega Corp, assignee. Simultaneous isolation and quantitation of DNA. United States 2004.
33. Barbaro A, Cormaci P and Agostino A. Validation of PrepFiler™ forensic DNA extraction kit (Applied Biosystems). *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser*. 2009;2:176-7.
34. Greenspoon SA, Ban JD, Sykes K, Ballard EJ, Edler SS, Baisden M, et al. Application of the BioMek 2000 Laboratory Automation Workstation and the DNA IQ

- System to the extraction of forensic casework samples. *J Forensic Sci.* 2004;49(1):29-39.
35. Greenspoon SA, Scarpetta MA, Drayton ML and Turek SA. QIAamp spin columns as a method of DNA isolation for forensic casework. *J Forensic Sci.* 1998;43(5):1024-30.
36. Nucleic Acid Extraction Method: The Rise of Magnetic Bead Extraction 2018 [Available from: <https://www.epruibiotech.com/nano-wiki/nucleic-acid-extraction-method-the-rise-of-magnetic-bead-extraction/>.
37. Quantifiler™ HP DNA Quantification Kit Applied Biosystems™. p. https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4482911#.
38. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L and Johne R. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol.* 2012;113(5):1014-26.
39. Opel KL, Chung D and McCord BR. A Study of PCR Inhibition Mechanisms Using Real Time PCR. 2010:25.
40. Abu Al-Soud W and Rådström P. Effects of Amplification Facilitators on Diagnostic PCR in the Presence of Blood, Feces, and Meat. 2000.
41. Abbaszadegan M, Huber MS, Gerba CP and Pepper IL. Detection of enteroviruses in groundwater with the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol.* 1993(5):1318-24.
42. Butler J. Effects of Sample Matrix and Injection. 1997. p. 125-34.
43. Applied Biosystem 3500/3500 XL Genetic Analyzer User Guide. Applied Biosystem; 2009.
44. Butler JM. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Interpretation.* Oxford, England: Academic Press; 2015.
45. Gilder JR, Doom TE, Inman K and Krane DE. Run-specific limits of detection and quantitation for STR-based DNA testing. *J Forensic Sci.* 2007;52(1):97-101.
46. Bregu J, Conklin D, Coronado E, Terrill M, Cotton RW and Grgicak CM. Analytical thresholds and sensitivity: establishing RFU thresholds for forensic DNA analysis. *J Forensic Sci.* 2013;58(1):120-9.
47. Brookes C, Bright JA, Harbison S and Buckleton J. Characterising stutter in forensic STR multiplexes. *Forensic Sci Int Genet.* 2012;6(1):58-63.

48. Magnuson VL, Ally DS, Nylund SJ, Karanjawala ZE, Rayman JB, Knapp JI, et al. Substrate nucleotide-determined non-templated addition of adenine by Taq DNA polymerase: implications for PCR-based genotyping and cloning. *BioTechniques*. 1996;21(4):700-9.
49. Klein S, editor Approaches to estimating a stochastic threshold. California Association of Criminalistics meeting; 2011; Sacramento, CA: Department of Justice.
50. Kirkham A, Haley J, Haile Y, Grout A, Kimpton C, Al-Marzouqi A, et al. High-throughput analysis using AmpFLSTR® Identifiler® with the Applied Biosystems 3500xl Genetic Analyser. *Forensic Sci Int Genet*. 2013;7(1):92-7.
51. Cisana S, Cerri N, Bosetti A, Verzeletti A and Cortellini V. PowerPlex® Fusion 6C System: evaluation study for analysis of casework and database samples. 2017.
52. Elwick K, Mayes C and Hughes-Stamm S. Comparative sensitivity and inhibitor tolerance of GlobalFiler® PCR Amplification and Investigator® 24 plex QS kits for challenging samples. *Leg Med*. 2018;32:31-6.
53. Feng X, Zhang X, Wang H, Liu C, Chen L, Li S, et al. Validation of the PowerPlex Fusion 6C system: a six-dye STR system for forensic case applications. *Australian J Forensic Sci*. 2019;51(3):280-308.
54. Lin S-w, Li C and Ip SCY. A selection guide for the new generation 6-dye DNA profiling systems. *Forensic Sci Int Genet*. 2017;30:34-42.
55. Ludeman MJ, Zhong C, Mulero JJ, Lagacé RE, Hennessy LK, Short ML, et al. Developmental validation of GlobalFiler™ PCR amplification kit: a 6-dye multiplex assay designed for amplification of casework samples. *Int J Legal Med*. 2018;132(6):1555-73.
56. Bogas V, Carvalho M, Corte-Real F and Porto MJ. Testing the behavior of GlobalFiler® PCR amplification kit with degraded and/or inhibited biological samples. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser*. 2015;5:21-3.
57. Zhong C, Green R, Norona W, Mulero J, Eardley R, Ge J, et al. Applied Biosystems VeriFiler Plus PCR Amplification Kit with internal quality control system provides confident answers with challenging forensic samples. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser*. 2019;7(1):441-3.

58. Gavazaj FQ, Mikerezi, II, Morina VH, Cakaj FA, Maloku EB, Gavazaj BB, et al. Optimization of DNA concentration to amplify short tandem repeats of human genomic DNA. *Bosn J Basic Med Sci.* 2012;12(4):236-9.
59. Smith RN. Accurate size comparison of short tandem repeat alleles amplified by PCR. *BioTechniques.* 1995;18(1):122-8.
60. Ewing M, Thompson J, McLaren R, Purpero V, Thomas K, Dobrowski P, et al. Human DNA Quantification and Sample Quality Assessment: Developmental Validation of the PowerQuant® System. *Forensic Sci Int Genet.* 2016;23.





ภาคผนวก ก

ใบรับรองสารมาตรฐาน 2391d component c



National Institute of Standards & Technology

Certificate of Analysis

Standard Reference Material® 2391d

PCR-Based DNA Profiling Standard

This Standard Reference Material (SRM) is intended primarily for use in the standardization of forensic and paternity quality assurance procedures for polymerase chain reaction (PCR)-based genetic testing, for instructional law enforcement or non-clinical research purposes, and for quality assurance when assigning values to in-house control materials. It is not intended for any human or animal clinical diagnostic use. This SRM is composed of well-characterized human deoxyribonucleic acid (DNA) in two forms; genomic DNA (Components A through D) and DNA to be extracted from cells that have been spotted onto FTA paper (Component E). The complete listing of Components is included in Table 1. A unit of SRM 2391d is composed of one vial of each of five components packaged together in one box.

Certified Values: A NIST certified value is a value for which NIST has the highest confidence in its accuracy in that all known or suspected sources of bias have been investigated or taken into account [1]. The certified values for the components in SRM 2391d were derived from a combination of Capillary Electrophoresis (CE) and Next Generation Sequencing (NGS)-based characterizations that allowed for the counting and direct sequencing of short tandem repeats (STRs) at a locus. High confidence allele calls were established by using multiple PCR-based STR typing kits and NGS-based kits and technologies. The STR allele calls certified in SRM 2391d are traceable to the natural unit count one by virtue of counting the number of repeat units through the analysis of CE and NGS data [2]. Tables 2 and 3 list CE and NGS-based methods used for characterization of the autosomal STR loci, Y-STR loci, and X-STR loci.

Table 4 lists genotypes for 35 Certified autosomal STR loci plus the sex-typing locus Amelogenin. Table 5 lists Certified haplotypes for 28 Certified Y-STR loci. Table 6 lists Certified genotypes/haplotypes for seven X-STR loci.

Information Values: A NIST Information Value is data that may be of interest and use to the SRM user, but insufficient information is available to assess the highest confidence of the assignment [1]. Information Values have been assigned to the DNA concentrations of Components A through D (Table 1), the number of cells per paper punch of Component E (Table 1), and the genotypes/haplotypes (when typed exclusively with CE methods) of the five Components at 13 autosomal STR loci (Table 7), three Y-STR loci (Table 8), five X-STR loci (Table 9), 30 Insertion and Deletion (Indel) loci (Table 10), and 20 Insertion and Null allele (INNU) loci (Table 11). Information Values are also assigned to 101 autosomal identity single nucleotide polymorphism (SNP) loci, 34 Y-SNP loci, 188 autosomal ancestry and phenotype SNP loci, and whole mitochondrial genome DNA (mtDNA) sequences determined by sequencing.

Expiration of Certification: The certification of SRM 2391d is valid, within the measurement uncertainty specified, until 04 June 2024, provided the SRM is handled and stored in accordance with the instructions given in this certification (see "Instructions for Use"). The certification is nullified if the SRM is damaged, contaminated, or otherwise modified.

Overall direction and coordination of the technical activities leading to certification were under the leadership of C.R. Steffen of the NIST Biomolecular Measurement Division.

Analytical determinations and technical measurements leading to the certification of this SRM were performed by E.L. Romsos, A. Tona, L.A. Borsuk, K.M. Kiesler, S. Riman, and K.B. Gettings of the NIST Biomolecular Measurement and Biosystems and Biomaterials Divisions.

Statistical consultation was provided by H.K. Iyer of the NIST Statistical Engineering Division.

Michael J. Tarlov, Chief
Biomolecular Measurement Division

Gaithersburg, MD 20899
Certificate Issue Date: 21 June 2019

Steven J. Choquette, Director
Office of Reference Materials

SRM 2391d

Page 1 of 11

Maintenance of SRM Certification: NIST will monitor this SRM over the period of its certification. If substantive technical changes occur that affect the certification before the expiration of this certificate, NIST will notify the purchaser. Registration (see attached sheet or register online) will facilitate notification.

Support aspects involved in the issuance of this SRM were coordinated through the NIST Office of Reference Materials.

NOTICE AND WARNINGS TO USER

Warning: SRM 2391d components are human source materials. The suppliers of the source materials used to prepare this product found the materials to be non-reactive when tested for hepatitis B surface antigen (HBsAg), human immunodeficiency virus (HIV), hepatitis C virus (HCV), and human immunodeficiency virus 1 antigen (HIV-1Ag) by Food and Drug Administration (FDA) licensed tests. However, because no test method can offer complete assurance that HIV, hepatitis viruses, or other infectious agents are absent, this SRM should be handled at the Biosafety Level 1 for any potentially infectious human serum or blood specimen [3]. SRM 2391d components and derived solutions should be disposed of in accordance with local, state, and federal regulations.

Storage: Store refrigerated at a temperature range of 2 °C to 8 °C (do not freeze).

INSTRUCTIONS FOR USE

Vials for Components A through D should be briefly vortexed and centrifuged prior to opening. After opening the vials, sample aliquots for analysis should be withdrawn immediately and processed without delay for the certified values to be applicable. Component E, cells on FTA paper, should be washed to reduce PCR inhibitors and salts prior to PCR amplification.

SOURCE AND ANALYSIS⁽¹⁾

Source of Material: The human genomic DNA extracts prepared at NIST for Components A through C were derived from buffy coat white blood cells from single source anonymous donors under the approval of the NIST Human Subjects Protection Office. The cell line used for Component E was obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA) under license and material transfer agreements. All source materials have been tested and found negative for HBsAg, HIV, HCV, and HIV-1Ag before use.

Interlaboratory Study: Four laboratories participated in the characterization of the material comprising SRM 2391d including Promega Corporation (Madison, WI), Qiagen (Germantown, MD), Verogen (San Diego, CA), and the Armed Forces DNA Identification Laboratory (AFDIL) (Dover, DE).

Description of Components: Five components are included in each unit. Components A through D each contain 55 µL of extracted genomic DNA in TE⁺ buffer, pH 8.0, and are packaged in perfluoroalkoxy fluoropolymer (PFA) vials. Table 1 lists the DNA concentration and expanded uncertainty for the Components based upon results from droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR). Component E contains two 6 mm punches of FTA paper. Each punch was prepared to hold approximately 7.5×10^4 cells. Component E is packaged in sterile 0.5 mL polypropylene vials. A detailed description of the individual components in SRM 2391d is listed in Table 1. Note that SRM 2391d is modified from SRM 2391c in that Components A through D are different samples with different profiles; however, Component E remains the same.

⁽¹⁾Certain commercial equipment, instruments or materials are identified in this certificate to adequately specify the experimental procedure. Such identification does not imply recommendation or endorsement by the National Institute of Standards and Technology, nor does it imply that the materials or equipment identified are necessarily the best available for the purpose.

Table 4. Certified Genotypes, 35 Autosomal STR Loci and Amelogenin

Locus	Component				
	A	B	C	D	E
AMEL	X,X	X,Y	X,Y	X,Y	X,X
CSF1PO	12,14	12,12	10,11	10,11,12,14	10,11
D1S1656	15.3,18.3	13,15.3	15,16	15,15.3,16,18.3	11,16.3
D1S1677	15,15	14,15	14,14	14,15	14,16
D2S441	11,11	11,11	11,14	11,14	10,10
D2S1338	25,25	17,23	23,24	23,24,25	19,20
D2S1776	10,10	9,11	10,12	10,12	9,11
D3S1358	17,17	15,17	14,18	14,17,18	14,15
D3S4529	13,15	13,14	16,16	13,15,16	13,16
D4S2408	9,9	10,10	8,10	8,9,10	8,8
D5S818	10,11	12,12	13,15	10,11,13,15	11,13
D5S2800	14,17	14,17	14,18	14,17,18	17,17
D6S474 ^(a)	16,18	14,16	14,18	14,16,18	14,16
D6S1043	12,19	13,18	11,18	11,12,18,19	11,11
D7S820	8,10	10,10	9,10	8,9,10	8,10
D8S1179	12,13	12,15	12,15	12,13,15	11,13
D9S1122	11,12	11,13	11,12	11,12	11,11
D10S1248	14,15	12,15	12,16	12,14,15,16	14,14
D12ATA63	13,17	17,18	13,15	13,15,17	12,17
D12S391	21,24	19,20	17,18	17,18,21,24	17,22
D13S317	9,12	11,11	12,14	9,12,14	8,12
D14S1434	11,13	13,14	10,14	10,11,13,14	10,14
D16S539	12,13	9,11	9,12	9,12,13	11,12
D17S1301	11,13	12,13	12,14	11,12,13,14	11,14
D18S51	14,15	17,18	16,18	14,15,16,18	14,17
D19S433	13,15	11,16.2	13,15	13,15	14,14
D20S482	13,14	15,16	14,15	13,14,15	15,15
D21S11	29,30	28,29	29,31	29,30,31	29,30
D22S1045	14,16	12,15	14,15	14,15,16	16,17
FGA	21,24	24,26	22,23	21,22,23,24	20,23
Penta D	8,9	11,13	9,13	8,9,13	14,14
Penta E	13,14	5,7	12,14	12,13,14	13,19
SE33	17,28.2	17 ^(b) ,28.2	17,18	17,18,28.2	22,30.2
TH01	7,9.3	7,7	8,9.3	7,8,9.3	6,9.3
TPOX	8,9	8,12	8,10	8,9,10	8,11
vWA	17,19	15,17	14,17	14,17,19	17,18

^(a) When typing D6S474 with the Investigator HDplex kit from Qiagen the resulting allele calls are reported to be one repeat unit less (i.e. Component A (15,17), Component B (13,15), Component C (13,17), Component D (13,15,17), and Component E (13,15)) due to a difference in the nomenclature as described in [5-7].

^(b) A 17 allele is reported for Component B at SE33 using all commercial CE multiplex kits tested; however, the certified sequence reveals 18 repeats with a 4 base pair (AAAA) deletion 85 base pairs upstream from the repeat.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	ร้อยตำรวจโทรัฐวุฒิ เสาร์แก้ว
วันเดือนปีเกิด	20 ตุลาคม 2536
วุฒิการศึกษา	ปีการศึกษา 2557: วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ตำแหน่ง	นักวิทยาศาสตร์ (สบ 1) กลุ่มงานตรวจชีววิทยาและดีเอ็นเอ ศูนย์พิสูจน์หลักฐาน 7 สำนักงานพิสูจน์หลักฐานตำรวจ
ประสบการณ์ทำงาน (ถ้ามี)	พ.ศ.2562 – ปัจจุบัน: นักวิทยาศาสตร์ (สบ 1) กลุ่มงานตรวจชีววิทยาและดีเอ็นเอ กองพิสูจน์หลักฐานกลาง สำนักงานพิสูจน์หลักฐานตำรวจ