

การศึกษาประสิทธิภาพของการจัดเก็บตัวอย่างเซลล์เยื่อบุกระพุงแก้ม
ด้วยก้านสำลีสำหรับการเพิ่มปริมาณพีซีอาร์โดยตรงเพื่อการพิสูจน์เอกลักษณ์
บุคคลโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

วิทยา วงษ์ตรี

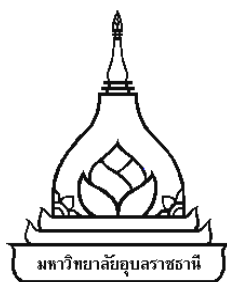
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี



STUDY OF EFFICIENCY BUCCAL CELL SAMPLING USING COTTON
BUD FOR DIRECT PCR AND HUMAN IDENTIFICATION DNA
TESTING

WITTAYA WONGTRI

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
MAJOR IN BIOLOGICAL SCIENCE
FACULTY OF SCIENCE
UBON RATCHATHANI UNIVERSITY
ACADEMIC YEAR 2021
COPYRIGHT OF UBON RATCHATHANI UNIVERSITY



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์

เรื่อง การศึกษาประสิทธิภาพของการจัดเก็บตัวอย่างเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มด้วยก้านสำลีสำหรับการ
เพิ่มปริมาณพีซีอาร์โดยตรงเพื่อการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ผู้วิจัย นายวิทยา วงษ์ตรี

คณะกรรมการสอบ

ดร.วันเพ็ญ กาคำผุย	ประธานกรรมการ
ดร.สุรสิทธิ์ สุทธิคำภา	กรรมการ
ศาสตราจารย์ ดร.พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ	กรรมการ
รองศาสตราจารย์ ดร.ปาริชาติ พุ่มขจร	กรรมการ

อาจารย์ที่ปรึกษา

.....
(ดร.สุรสิทธิ์ สุทธิคำภา)

.....
(ศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร จิ๊งสุทธิวงษ์)
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.อริยาภรณ์ พงษ์รัตน์)
รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ปีการศึกษา 2564

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยเรื่อง “การศึกษาประสิทธิภาพของการจัดเก็บตัวอย่างเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มด้วยก้าน สำหรับการเพิ่มปริมาณพีซีอาร์โดยตรงเพื่อการทดสอบเอกลักษณ์บุคคลโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ” สำเร็จลุล่วงไปด้วยความอนุเคราะห์และความเมตตากรุณาของ ดร.สุรสิทธิ์ สุทธิคำภา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร.วันเพ็ญ กาคำผุย ประธานกรรมการสอบ ศาสตราจารย์ ดร.พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ และ รองศาสตราจารย์ ดร.ปาริชาติ พุ่มขจร กรรมการสอบ ผู้ศึกษาใคร่ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณครอบครัว พี่น้องภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ และตลอดจนผู้มีพระคุณที่มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่าน ที่ไม่สามารถกล่าวได้หมด ผู้ศึกษารู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและกำลังใจอันดีเยี่ยมจากทุกท่าน จึงขอกราบขอบพระคุณ ณ โอกาสนี้

วิทยา วงษ์ตรี

ผู้วิจัย

บทคัดย่อ

เรื่อง : การศึกษาประสิทธิภาพของการจัดเก็บตัวอย่างเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มด้วย
ก้านสำลีสำหรับการเพิ่มปริมาณพีซีอาร์โดยตรงเพื่อการพิสูจน์เอกลักษณ์
บุคคลโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ผู้วิจัย : วิทยา วงษ์ตรี

ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา : วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา: ดร.สุรสิทธิ์ สุทธิคำภา

คำสำคัญ : ดีเอ็นเอ, พีซีอาร์, การทดสอบเอกลักษณ์บุคคล

งานวิจัยชิ้นนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการใช้ก้านสำลี cotton bud ที่วางจำหน่ายทั่วไปตาม
ท้องตลาด ทดแทนการใช้ก้านสำลีสำหรับจัดเก็บวัตถุดิบซึ่งมีราคาสูงในการจัดเก็บดีเอ็นเอจากเซลล์
เยื่อบุกระพุ้งแก้ม การสกัดดีเอ็นเอด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ทดแทนการใช้ชุดน้ำยาสกัด
สำเร็จรูป ให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับการทำพีซีอาร์โดยตรง และศึกษาผลของปริมาณ
ดีเอ็นเอที่ได้เมื่อลดปริมาณน้ำยาสำเร็จรูป ผลการวิจัยชี้ให้เห็นว่า การจัดเก็บเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้ม
ด้วยก้านสำลี cotton bud เพียงหนึ่งรอบ สามารถสกัดดีเอ็นเอด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 50 มิลลิ
โมลาร์ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที มีปริมาณดีเอ็นเอเหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตรง
โดยไม่ต้องเจือจาง และยังสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอจากการลดปริมาตรของชุดน้ำยาได้ ¼ ของ
ปริมาณที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต และให้ผลเทียบเท่ากับดีเอ็นเอที่สกัดโดยวิธีปกติ ดังนั้น จึงเป็น
ทางเลือกสำหรับห้องปฏิบัติการที่มีข้อจำกัดในเรื่องงบประมาณ อุปกรณ์และสารเคมีได้ รวมถึง
สถานการณ์ภัยพิบัติ ที่มีข้อจำกัดด้านอุปกรณ์และสารเคมี

ABSTRACT

TITLE : STUDY OF EFFICIENCY BUCCAL CELL SAMPLING USING
COTTON BUD FOR DIRECT PCR AND HUMAN IDENTIFICATION
DNA TESTING

AUTHOR : WITTAYA WONGTRI

DEGREE : MASTER OF SCIENCE

MAJOR : BIOLOGICAL SCIENCE

ADVISOR : SURASIT SUTTHIKHAMPA, Ph.D.

KEYWORDS : DNA, PCR, HUMAN IDENTIFICATION TESTING

The purpose of this research is to study the use of commercially available inexpensive cotton buds instead of using an expensive cotton swab for collecting evidence from buccal epithelial cells DNA samples by preserving an appropriate amount of DNA directly for PCR. DNA extraction with a sodium hydroxide solution was used instead of using a commercial extraction kit. Direct studies of PCR were undertaken to reduce the processes required for analysis, along with studying the effect of DNA profiles when reducing the quantity of PCR reagents. The results of the research indicate that a collection of buccal epithelial cells with just one round of the cotton bud is sufficient providing a suitable amount of DNA for further enrichment. DNA by PCR was employed without the need for DNA dilution as per normal operation procedures. DNA extraction with sodium hydroxide solution at room temperature was also employed. This replaces DNA extraction with a relatively inexpensive commercial extraction kit, simplifying the process of DNA extraction and quantification. In addition, when the extracted DNA was put through the PCR process, it gave complete DNA results, reducing the amount of solution used to 1/4 of the amount recommended by the manufacturer, while still capable of yielding results comparable to DNA extracted by common methods. This provides an option for laboratories with limited budgets, equipment and chemicals.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	5
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรม	
2.1 ดีเอ็นเอ	6
2.2 จีโนมมนุษย์	7
2.3 ขั้นตอนในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ	9
2.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตรง (Direct PCR)	15
2.5 ระบบฐานข้อมูลดัชนีสารพันธุกรรมรวม (Combined DNA Index System: CODIS)	15
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์สารเคมีและวิธีวิจัย	
3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี	18
3.2 วิธีการศึกษา	19
บทที่ 4 สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	
4.1 การจัดเก็บดีเอ็นเอด้วยก้านสำลี cotton bud เพื่อให้มีปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสม และการสกัดดีเอ็นเอด้วยสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์	23
4.2 การศึกษาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีการ Direct PCR และการลดปริมาณน้ำยา PCR Mastermix	24
4.3 วิจัยและข้อเสนอแนะ	27
เอกสารอ้างอิง	47

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก	51
ประวัติผู้วิจัย	59

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1 ปริมาณ DNA ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจแต่ละชนิด	2
2.1 ตัวอย่างชุดน้ำยาสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปชนิดต่าง	11
3.1 ปริมาณ master mix ของ AmpFLSTR® Identifiler® Plus PCR amplification kit และ DNA template ที่ใช้	22
4.1 ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์	23

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1.2	ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ
2.1	ส่วนประกอบพื้นฐานของกรดนิวคลีอิก: (a) แกนหมู่ฟอสเฟต น้ำตาล และ กรดนิวคลีอิก (b) โครงสร้างทางเคมีของโมเลกุลหมู่ฟอสเฟตและน้ำตาล และ การกำหนดหมายเลข ในอะตอมคาร์บอนของน้ำตาล และลำดับดีเอ็นเอเขียนตาม จาก 5' ไป 3'
2.2	การจับคู่กันของดีเอ็นเอสองสาย เป็นโครงสร้างดีเอ็นเอสายเกลียวคู่ (double - helix structure)
2.3	การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีต่าง ๆ
2.4	ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี polymerase chain reaction
2.5	สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Proflex 7900 thermocycler สำหรับชุดน้ำยา AmpF [®] STR [®] Identifiler [®] Plus PCR Amplification Kit
2.6	การแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Capillary electrophoresis
2.7	artifacts ที่พบได้บ่อยในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี STR typing ได้แก่ stutter และ incomplete adenylation ซึ่งทำให้เกิด split peaks (inset).
2.8	loci และ allele ของชุดน้ำยา AmpFLSTR [®] Identifiler [®] Plus
4.1	การเกิด allele drop out ของตัวอย่างที่ 2 ที่ตำแหน่ง CSF1PO
4.2	การเกิด allele drop out ของตัวอย่างที่ 8 ที่ตำแหน่ง CSF1PO, D2S1338 และ D18S51
4.3	การเกิด pull up ของตัวอย่างที่ 12 ที่ตำแหน่ง FGA
4.4	การเกิด pull up ของตัวอย่างที่ 14 ที่ตำแหน่ง D5S818 และ FGA
4.5	การเกิด allele drop out ของตัวอย่างที่ 16 ที่ตำแหน่ง D2S1338
4.6	Electrophelogram ของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ 1
4.7	Electrophelogram ของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ 2
4.8	Electrophelogram ของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ 3
4.9	Electrophelogram ของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ 4
4.10	Electrophelogram ของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ 5
4.11	Electrophelogram ของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ 6
4.12	Electrophelogram ของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ 7

4.13 Electrophelogram ของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ 8

37

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.14	Electrophelogram ของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ 9	38
4.15	Electrophelogram ของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ 10	39
4.16	Electrophelogram ของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ 11	40
4.17	Electrophelogram ของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ 12	41
4.18	Electrophelogram ของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ 13	42
4.19	Electrophelogram ของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ 14	43
4.20	Electrophelogram ของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ 15	44
4.21	Electrophelogram ของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ 16	45
4.22	Electrophelogram ตัวอย่างดีเอ็นเออ้างอิง	46

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ลายนิ้วมือมนุษย์ มีความแตกต่างเป็นเอกลักษณ์ของแต่ละบุคคล ใช้ประโยชน์ในหลายด้าน เช่น ใช้แทนลายมือเขียน สำหรับผู้ที่ไม่รู้หนังสือ ใช้ตรวจสอบผู้กระทำความผิดที่ระหว่างลายนิ้วมือที่พบในสถานที่เกิดเหตุกับผู้ต้องสงสัย แต่ก็มีข้อจำกัดในการใช้ลายนิ้วมือในการพิสูจน์การกระทำความผิด เช่น ลายนิ้วมือไม่ชัดเจนทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบได้ ความผิดในคดีข่มขืนกระทำชำเรา การพิสูจน์ความเป็นบิดา - มารดา - บุตร ซึ่งเทคโนโลยีทางด้านเทคนิคทางอณูวิทยาซึ่งในปัจจุบันสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) สามารถให้ผลได้อย่างถูกต้องแม่นยำ และยังสามารถประยุกต์ใช้ในงานนิติเวชศาสตร์เพื่อสืบหาตัวผู้กระทำความผิดได้จากหลักฐานต่าง ๆ เช่น เส้นผม คราบเลือด คราบอสุจิ ชี้นิ้ว และเศษผิวหนัง เป็นต้น

การพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสูงในการประยุกต์ใช้ในด้านนิติวิทยาศาสตร์ในการแก้ปัญหาดังกล่าว ดีเอ็นเอหรือสารพันธุกรรม มีหน้าที่ควบคุมกิจกรรมต่าง ๆ ของร่างกายและถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของมนุษย์ โดยในแต่ละบุคคลจะได้รับการถ่ายทอดจากบิดา และมารดาอย่างละครึ่ง ดีเอ็นเอของแต่ละบุคคลมีลักษณะจำเพาะเช่นเดียวกับลายพิมพ์นิ้วมือ ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จึงกลายเป็นเครื่องมือในการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลในหลายๆ ด้าน ได้แก่ ประโยชน์ทางการแพทย์ เช่น การพิสูจน์ความสัมพันธ์ของสมาชิกในครอบครัวแบบบิดา - มารดา - บุตร การพิสูจน์อัตลักษณ์บุคคลจากภัยพิบัติต่าง ๆ ใช้ติดตามความสำเร็จของการปลูกถ่ายไขกระดูกของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว เป็นต้น โดยเฉพาะในกระบวนการยุติธรรม ในหลาย ๆ การกระทำความผิดที่ลายพิมพ์นิ้วมือไม่สามารถตอบคำถามได้ เช่น คดีล่วงละเมิดทางเพศ เราสามารถตรวจหาดีเอ็นเอจากเซลล์อสุจิ หรือเซลล์เยื่อบุผิวหนังที่คนร้ายทิ้งไว้บนวัตถุพยานต่าง ๆ ได้ การล่วงละเมิดทางเพศ หรือ เซลล์ผิวหนังที่อาจตรวจพบในบริเวณที่คนร้ายสัมผัสในคดีลักทรัพย์ คราบโลหิตที่พบในที่เกิดเหตุ เสื้อผ้าของคนร้าย หรือผู้ต้องสงสัยในคดีฆาตกรรม เป็นต้น

ข้อมูลลำดับเบสซ้ำในสายดีเอ็นเอบริเวณ Short Tandem Repeats (STRs) เป็นบริเวณที่มีการเรียงตัวของลำดับเบสซ้ำ ๆ กัน 2 - 6 เบส พบกระจายทั่วไปบนสายดีเอ็นเอ ในแต่ละบุคคลมีความแตกต่างกัน จึงถูกนำมาใช้ในการพิสูจน์ยืนยันตัวบุคคลอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน

ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจดีเอ็นเอ ได้แก่ สิ่งส่งตรวจประเภทโลหิตและคราบโลหิต สิ่งส่งตรวจประเภทน้ำอสุจิ และคราบอสุจิ เส้นผมและเส้นขน เซลล์เนื้อเยื่อต่าง ๆ เซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้ม น้ำลาย เป็นต้น อย่างไรก็ตาม เซลล์แต่ละชนิดของร่างกายมีองค์ประกอบที่แตกต่างกัน ทำให้ขั้นตอนและวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ใช้แตกต่างกันด้วยตามลักษณะของสิ่งส่งตรวจนั้น ๆ (วิชัย แสงบุญ และคณะ, 2547) ในการเก็บตัวอย่างเพื่อส่งตรวจสามารถทำได้หลากหลายวิธี เช่น การเก็บโลหิตสดโดยใช้เข็มฉีดยาทางหลอดเลือดดำ แต่มีข้อเสียคือทำให้ผู้ให้ตัวอย่างได้รับบาดเจ็บ และต้องทำโดยเจ้าหน้าที่ทางการแพทย์ที่มีความชำนาญ ต้องเก็บตัวอย่างโลหิตในภาชนะจำเพาะ ตัวอย่างที่เป็นคราบโลหิตสด ต้องบรรจุในหลอดที่บรรจุ EDTA ป้องกันการแข็งตัวของเลือด และคราบโลหิตยังมีความเสี่ยงจากโรคติดเชื้อ น้ำอสุจิ การเก็บรักษาตัวอย่างต้องเก็บในอุณหภูมิควบคุมเพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งจะส่งผลให้ดีเอ็นเอเสื่อมสภาพได้

ตารางที่ 1.1 ปริมาณ DNA ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจแต่ละชนิด (Butler, 2012)

Type of Sample	Amount of DNA
Liquid blood	20000ng/mL to 40000ng/mL
Blood stain	250ng/cm ² to 500ng/cm ²
Liquid semen	150000ng/mL to 300000ng/mL
Post-coital vaginal swab	10ng/swab to 3000ng/swab
Plucked hair (with root)	1ng/root to 750ng/root
Shed hair (with root)	1ng/root to 10ng/root
Liquid saliva	1000ng/mL to 10000ng/mL
Oral swab	100ng/swab to 1500ng/swab
Urine	1ng/mL to 20ng/mL
Bone	3ng/mg to 10ng/mg
Tissue	50ng/mg to 500ng/mg

การเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอเพื่อส่งตรวจด้วยก้านสำลีเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ทำได้ง่ายด้วยตนเอง โดยไม่ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการจัดเก็บ (John, 2012) ทั้งยังเก็บรักษาเพื่อส่งตรวจได้ง่าย ทำได้โดยใช้ก้านสำลีปลอดเชื้อหมุนเช็ดเก็บภายในกระพุ้งแก้มเป็นเวลาประมาณ 15 - 30 วินาที หรือการเก็บจากคราบโลหิตบนพื้นผิววัตถุต่าง ๆ ทำได้โดยใช้ก้านสำลีชุบน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เช็ดเก็บบริเวณรอยคราบหลังจากนั้นผึ่งให้แห้ง ก่อนเก็บในหีบห่อที่เหมาะสมเพื่อรอตรวจต่อไป

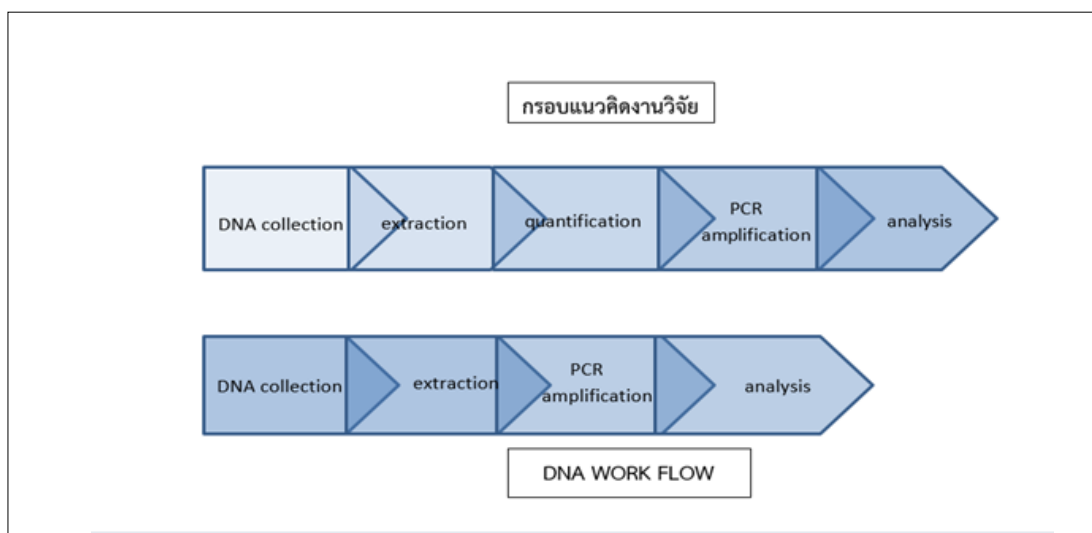
กระบวนการการตรวจดีเอ็นเอ ประกอบไปด้วยหลายขั้นตอน โดยเริ่มตั้งแต่ การเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอจากบุคคลหรือสถานที่เกิดเหตุ การเก็บรักษาตัวอย่างก่อนถึงห้องปฏิบัติการ การสกัดดีเอ็นเอ

การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ การแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ และการแปลผลดีเอ็นเอ ซึ่งในแต่ละขั้นตอน มีการใช้อุปกรณ์เครื่องมือที่ทันสมัยและสารเคมีที่มีราคาสูง ใช้กำลังผู้ปฏิบัติงานมาก นอกเหนือจากนี้ ในแต่ละขั้นตอนยังใช้ระยะเวลาการปฏิบัติการยาวนาน ซึ่งในปัจจุบันมีความต้องการผลการตรวจวิเคราะห์ที่ถูกต้องและรวดเร็ว เพื่อตอบสนองต่อสถานการณ์ได้อย่างทันท่วงที เช่น การใช้ผลตรวจเปรียบเทียบในการสืบสวนจับกุมผู้กระทำความผิดที่กำลังจะหลบหนี เหตุการณ์ที่มีผลกระทบต่อชีวิตและทรัพย์สินของประชาชน หรือ การก่อวินาศกรรม เป็นต้น มีความพยายามที่จะลดขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ผลดีเอ็นเอให้เหลือเวลาน้อยลง เช่น การใช้วิธีการ Direct PCR (John, 2012; Cavanaugh and Abigail S. Brithrich, 2018) ซึ่งเป็นวิธีการนำตัวอย่างมาสกัดและนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ เข้าสู่กระบวนการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์และตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอก่อน ซึ่งช่วยลดขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ จากเดิมที่ใช้ระยะเวลาประมาณ 6 - 8 ชั่วโมง เหลือไม่เกิน 3 - 4 ชั่วโมง เนื่องจากยังต้องผ่านขั้นตอนพีซีอาร์ ในขั้นตอนการปฏิบัติงานจริงผู้วิจัยพบว่าก้านสำลีที่ใช้เก็บตัวอย่างเพื่อส่งตรวจวิเคราะห์ทั้งการใช้ก้านสำลีชนิดพลาสติกที่มีสิ่งห่อหุ้ม หรือเกรดทางการแพทย์ ซึ่งมีราคาสูง และพบว่าการเก็บเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มด้วยก้านสำลีพันปลายไม้สามารถเก็บดีเอ็นเอได้มากน้อยต่างกัน และการทำ Direct PCR นั้นจะไม่ทราบความเข้มข้นของดีเอ็นเอ จึงทำให้เกิดความล้มเหลวในการวิเคราะห์ เช่น มีปริมาณผลผลิตพีซีอาร์มากหรือปริมาณน้อยเกินไป ส่งผลให้การตรวจวิเคราะห์ล้มเหลว ทำให้ต้องมีการทำซ้ำ ทำให้สิ้นเปลืองเวลาและสารเคมีมากขึ้น ซึ่งปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณ STRs ที่วางจำหน่ายโดยทั่วไปคือประมาณ 0.5 - 2.5 นาโนกรัม ต่อไมโครลิตร (Goodvin, 2007) เพื่อจะได้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่มีคุณภาพ และผลผลิต PCR ที่ต้องใช้ในการวิเคราะห์นั้นใช้เพียง 1 ไมโครลิตร ทำให้มีปริมาณสารเคมีเหลือทิ้งเป็นจำนวนมาก ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอหลายแห่งนิยมใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปซึ่งช่วยอำนวยความสะดวกในขั้นตอนการปฏิบัติงาน เช่น ชุดน้ำยาสำหรับการสกัด การวิเคราะห์ปริมาณ และการเพิ่มปริมาณ แต่มีข้อจำกัดคือชุดน้ำยาสำเร็จรูปดังกล่าวมีราคาสูง เครื่องมือสำหรับตรวจวิเคราะห์ในแต่ละขั้นตอนใช้เทคโนโลยีสมัยใหม่ ทำให้มีราคาสูง อุปกรณ์สารเคมีที่เกี่ยวข้องก็มีราคาสูงตามไปด้วยเช่นกัน ทำให้เป็นอุปสรรคสำหรับการปฏิบัติงานเนื่องจากมีงบประมาณจำกัด ยกตัวอย่างค่าบริการการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอในประเทศไทย เช่น ค่าบริการการตรวจดีเอ็นเอของภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งให้บริการตรวจวิเคราะห์ ดังนี้ การตรวจบิดา - มารดา - บุตร คนละ 6,500 บาท ตรวจความสัมพันธ์ระหว่าง พี่ - น้อง เพศชายเท่านั้น (โครโมโซมเพศชาย) เพื่อพิสูจน์สายสัมพันธ์ทางฝ่ายบิดา เช่น ปู่ - หลานชาย อา - หลานชาย ค่าตรวจคนละ 6,500 บาท การตรวจความสัมพันธ์ระหว่าง พี่ - น้อง ที่สืบสายพันธุ์ทางฝ่ายมารดา กรณีมารดาเสียชีวิต (ไมโตคอนเดรีย) ค่าตรวจรายละ 8,500 บาท (โรงพยาบาลรามาธิบดี, 2013) นอกจากนี้ยังมีหลายหน่วยงานที่

จัดเก็บข้อมูลดีเอ็นเอบุคคลไปใช้ประโยชน์ เช่น โครงการความร่วมมือระหว่างกรมราชทัณฑ์กับสำนักงานตำรวจแห่งชาติ และสถาบันนิติวิทยาศาสตร์ สำนักงานตำรวจแห่งชาติ (พีพีทีวี ออนไลน์, 2561) มีการเก็บข้อมูลดีเอ็นเอของบุคคลพันโทเพื่อประโยชน์ในการป้องกันและปราบปรามอาชญากรรม เนื่องจากพบว่าผู้ต้องหาที่เป็นบุคคลพันโทกลับมาก่อคดีซ้ำหลังจากได้รับการปล่อยตัว

สืบเนื่องจากสถานการณ์โรค COVID 19 ในปัจจุบัน ชี้ชัดให้เห็นถึงปัญหาขั้นตอนการจัดเก็บตัวอย่างที่ต้องระมัดระวังเรื่องความปลอดภัยทางชีวภาพซึ่งความยุ่งยากในการจัดเก็บและความยุ่งยากในการตรวจตัวอย่าง การตรวจวิเคราะห์หาสารพันธุกรรมไวรัสจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยซึ่งได้จากการเก็บเก็บจากสารคัดหลั่งหลังโพรงจมูกมาตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี realtime PCR ซึ่งเป็นวิธีที่เป็นมาตรฐาน และเป็นที่ยอมรับ แต่มีราคาสูง ใช้ทรัพยากรมาก ให้เกิดข้อจำกัด และลดโอกาสในการเข้าถึงการตรวจเพื่อป้องกันของประชาชนที่มีความเสี่ยงสูง จากเหตุผลข้างต้นแสดงให้เห็นว่า การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอมีประโยชน์ในหลายด้าน แต่การตรวจวิเคราะห์นั้นยังมีค่าใช้จ่ายต่อตัวอย่างที่สูงและแนวโน้มในด้านปริมาณการตรวจก็เพิ่มขึ้นมากไปด้วยเช่นกัน ในขณะที่งบประมาณที่หน่วยงานราชการได้รับมีปริมาณเท่าเดิมหรือเพิ่มขึ้นเล็กน้อยซึ่งส่งผลกระทบต่อความสามารถในการตรวจวิเคราะห์ของหน่วยงานได้

จึงเป็นที่มาของการศึกษาในครั้งนี้ ที่ต้องการศึกษาปริมาณดีเอ็นเอของเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มที่จัดเก็บด้วยก้านสำลีที่หาซื้อได้ทั่วไป ทดแทนการใช้ก้านสำลีพันปลายไม้สำหรับจัดเก็บดีเอ็นเอหรือวัตถุพยานชนิดทางการแพทย์ เพื่อให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับการทำ Direct PCR และการลดขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ ด้วยการสกัดดีเอ็นเอด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ทดแทนการใช้ชุดน้ำยาสกัดสำเร็จรูป และตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโปรไฟล์ที่ได้ อันจะส่งผลให้การปฏิบัติงานในการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลในกรณีเร่งด่วน สามารถดำเนินการได้และยังช่วยประหยัดในการลดการใช้ชุดสารเคมีที่มีราคาสูง ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อด้านพิสูจน์ดีเอ็นเอบุคคลต่อไป



ภาพที่ 1.2 ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาวิธีการจัดเก็บเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มโดยใช้ก้านสำลี (cotton bud) เพื่อให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสม

1.2.2 เพื่อศึกษาการสกัดดีเอ็นเอด้วยสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ 50 มิลลิโมลาร์ แทนการใช้ชุดน้ำยาสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป

1.2.3 เพื่อศึกษาคุณภาพของดีเอ็นเอเมื่อลดปริมาณชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus ลง 1/2 1/4 และ 1/8 ของปริมาตรที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต

1.2.4 เพื่อศึกษาคุณภาพของดีเอ็นเอโปรไฟล์ที่ได้จากการทำ Direct PCR

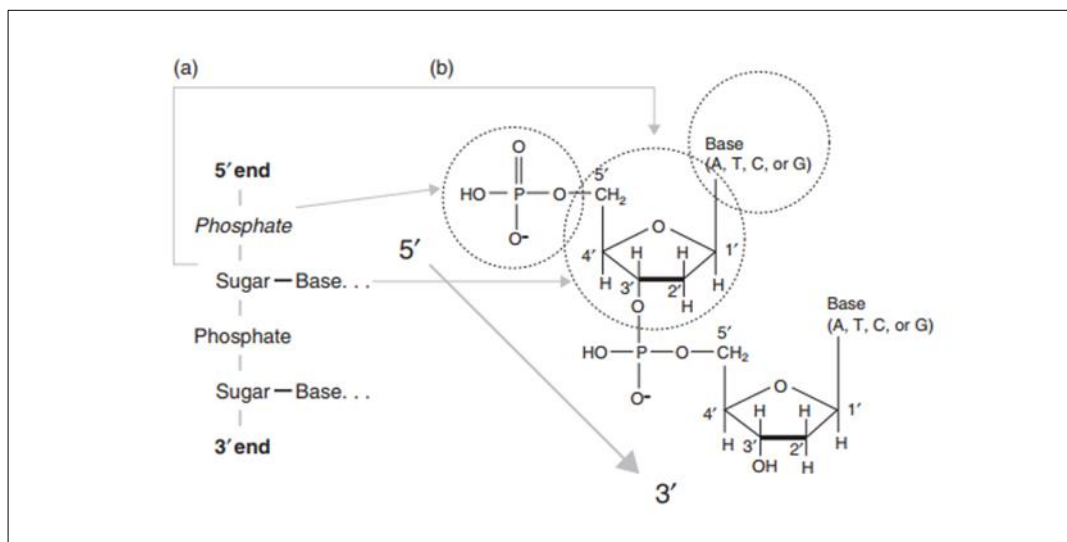
บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรม

2.1 ดีเอ็นเอ

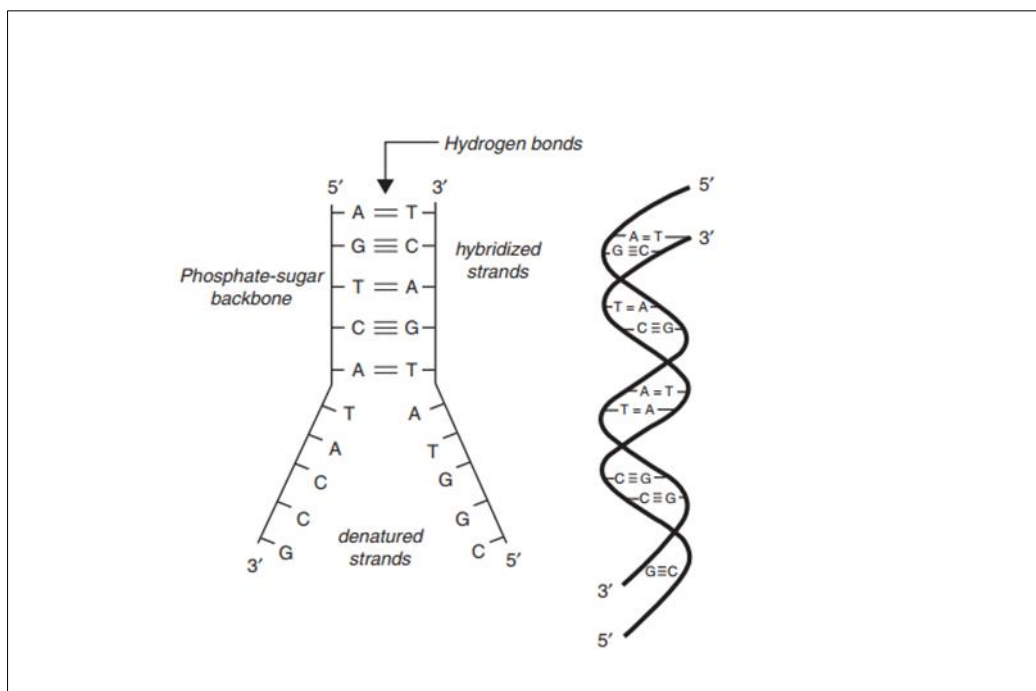
ดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid; DNA) หรือสารพันธุกรรม ประกอบไปด้วยหน่วยย่อยที่เรียกว่า นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ซึ่งเป็นสารประกอบไนโตรจีนัสเบส (nitrogenous base) แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มไพริมิดีน (pyrimidine) ซึ่งมีอนุพันธ์สองตัวคือ ไซโทซีน (cytosine- C) และไทมีน (thymine - T) ส่วนพวกที่สองได้แก่ พิวรีน (purine) มีอนุพันธ์สองตัวคือ อดีนีน (adenine - A) และ กวานีน (guanine - G)

โดยสารประกอบไนโตรจีนัสเบสนี้ จะรวมตัวกับน้ำตาลดีออกซีไรโบส (deoxyribose sugar) และกรดฟอสฟอริก (phosphoric - acid) เป็นนิวคลีโอไทด์อยู่ในดีเอ็นเอ พบได้ในนิวเคลียสของเซลล์ มีหน้าที่สำคัญ 2 ประการ คือ การจำลองตัวเอง (DNA replication) การถ่ายทอดข้อมูลผ่านอาร์เอ็นเอ (transcription)



ภาพที่ 2.1 ส่วนประกอบพื้นฐานของกรดนิวคลีอิก: (a) แกนหมู่ฟอสเฟต น้ำตาล และกรดนิวคลีอิก (b) โครงสร้างทางเคมีของโมเลกุลหมู่ฟอสเฟตและน้ำตาล และการกำหนดหมายเลข ในอะตอมคาร์บอนของน้ำตาล และลำดับดีเอ็นเอเขียนตามจาก 5' ไป 3'

ที่มา: Butler (2012)



ภาพที่ 2.2 การจับคู่กันของดีเอ็นเอสองสาย เป็นโครงสร้างดีเอ็นเอสายเกลียวคู่ (double - helix structure)

ที่มา: Butler (2012)

2.2 จีโนมมนุษย์

จีโนมมนุษย์ หมายถึง ดีเอ็นเอในแฮพพลอยด์เซลล์พบได้ในนิวเคลียส และไมโทคอนเดรียของเซลล์ จีโนมในนิวเคลียสเป็นดีเอ็นเอเกลียวคู่ขนาด 3.1×10^9 คู่เบส กระจายอยู่ในโครโมโซมทั้ง 23 คู่ ส่วนใหญ่เป็นลำดับเบสที่ไม่ได้แปลรหัสไปเป็นลำดับเบสโปรตีน (non - coding sequences) มียีนอยู่เพียง 30,000-35,000 ยีน หรือคิดเป็นร้อยละ 3 ของจีโนมทั้งหมด ยีนมีขนาดแตกต่างกันไป ตั้งแต่ 0.1 กิโลเบส ไปจนถึง 2,000 กิโลเบส แต่โดยเฉลี่ยยีนบนโครโมโซมมนุษย์จะมีขนาด 5 - 10 กิโลเบส ซึ่งจะสร้างโปรตีนและกรดอะมิโนประมาณ 300 โมเลกุล ภายในยีนมีลำดับเบสที่ไม่ใช่รหัสและถูกตัดออก เรียกว่า intron และส่วนที่เป็นรหัสเรียกว่า coding sequences เรียกว่า exon 90% ของจีโนมไม่ใช่รหัสและพบอยู่นอก intron เรียกว่า extragenic ซึ่งบริเวณนี้จะพบลำดับเบสซ้ำ (repetitive sequences) ไม่ทราบหน้าที่ชัดเจน ส่วนจีโนมในไมโทคอนเดรีย เป็นดีเอ็นเอรูปวงแหวนขนาดเล็กเพียง 16,569 คู่เบส ดีเอ็นเอเกือบทั้งหมดในไมโทคอนเดรียทำหน้าที่เป็นยีนถอดรหัสเพื่อสร้าง rRNA tRNA หรือสายพอลิเปปไทด์

2.2.1 ดีเอ็นเอที่เป็นเบสซ้ำ (Repetitive DNA)

ดีเอ็นเอในจีโนมของมนุษย์ประมาณ ร้อยละ 50 ประกอบด้วยส่วนที่มีลำดับเบสซ้ำดีเอ็นเอบางชุดพบว่าการซ้ำมากกว่า 100,000 ครั้ง ดีเอ็นเอเหล่านี้มีความแตกต่างกันทั้งขนาดและจำนวนซ้ำ แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่

เบสซ้ำต่อเนื่อง (Tandem Repeated) เบสซ้ำที่เรียงตัวต่อเนื่องเป็นช่วงยาว ได้แก่ satellite และ minisatellite และ microsatellite แบ่งตามจำนวนซ้ำและความยาวได้ดังนี้

Satellite เป็นเบสซ้ำสั้น ๆ ขนาด 1 - 6 เบสซ้ำกันขนาดหลายร้อยเบสโดยมีจำนวนซ้ำตั้งแต่ 103 - 107 ครั้ง จัดเป็นพวกที่มีความซ้ำของเบสเป็นจำนวนมาก (highly repetitive DNA) ซึ่งจะพบเพียง 1 - 2 ตำแหน่ง ต่อโครโมโซม และมักพบบริเวณเซนโทรเมียร์ ตัวอย่างเช่น satellite III ที่พบบริเวณ เซนโทรเมียร์บนโครโมโซมคู่ที่ 1 และโครโมโซม Y ซึ่งมีเบสซ้ำ 5 เบส และมีลำดับเบสพ้อง (consensus sequence) เป็น TTCCA

Minisatellite คือ เบสซ้ำ 9 - 100 เบส มีจำนวนซ้ำตั้งแต่ 10 แต่ไม่เกิน 1000 ครั้ง จัดอยู่ในกลุ่มการซ้ำกันของเบสระดับปานกลาง (moderately repetitive DNA) วิธีการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยนำลำดับเบสซ้ำมาใช้เป็นดีเอ็นเอตรวจสอบ จากการศึกษพบว่ามินิแซเทลไลต์ส่วนมากมีความคล้ายคลึงกันของลำดับเบส หรือมีลำดับเบสแกน (core sequence) เดียวกัน ดีเอ็นเอในบริเวณนี้มีความหลากหลายเนื่องจากความแตกต่างในจำนวนซ้ำ บางครั้งเรียกว่า variation number of tandem repeats หรือ VNTR

Microsatellite คือเบสซ้ำขนาด 1 - 6 เบส เช่น (A)_n (CA)_n (TAA)_n (GATA)_n เมื่อ n เป็นจำนวนซ้ำ แต่ละซ้ำไม่เกิน 100 ครั้ง บางครั้งเรียก simple sequence repeat (SSR) หรือ Short tandem repeat (STR) พบกระจายทั่วไปบนจีโนม 104 - 105 โลค์ส ความหลากหลายนี้นำมาตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ และเนื่องจากไมโครแซเทลไลต์ พบกระจายทั่วไปในจีโนม จึงนำมาสร้างแผนที่ จีโนม (genome mapping) ได้

เทคนิคที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ ได้แก่

(1) Restriction Fragment Length Polymorphism: PCR - RFLP เป็นเทคนิคในการตรวจสอบความแตกต่างของดีเอ็นเอโดยอาศัยตรวจสอบความแตกต่างของจำนวนเบสซ้ำ (VNTR) โดยมากเป็นการตรวจหลายตำแหน่ง (multilocus) โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ จากนั้นจึงนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ เทคนิคนี้ มีข้อจำกัดคือต้องใช้ดีเอ็นเอปริมาณมาก และมีสภาพสมบูรณ์ ใช้ระยะเวลานาน

(2) Polymerase chain reaction: PCR เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบต่อเนื่อง โดยใช้เอนไซม์ polymerase เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ประกอบไปด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ ไพรเมอร์ เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส และสารต่าง ๆ สำหรับทำปฏิกิริยา เช่น ไดออกซินิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTP) และแมกนีเซียมคลอไรด์ เป็นต้น ประกอบไปด้วย 3 ขั้นตอนซึ่งควบคุมโดยอุณหภูมิต่าง ๆ กัน ได้แก่

(2.1) ดีเอ็นเอที่เป็นเส้นคู่แยกเป็นเส้นเดี่ยว

(2.2) ไพรมเมอร์ซึ่งเป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ขนาด 20 - 30 เบส ที่มีลำดับเบสคู่สมเข้าไปจับกับดีเอ็นเอเส้นเดี่ยว

(2.3) เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรสเร่งปฏิกิริยาเติมเบสที่ปลาย 3' ของไพรมเมอร์ โดยอัตราการเพิ่มของสายดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ เป็นการเพิ่มแบบทวีคูณ $2n$ ดังนั้นเมื่อปฏิกิริยาดำเนินไป 25 รอบ จะได้ดีเอ็นเอชุดใหม่จำนวน 225 หรือ 34 ล้านเท่าของดีเอ็นเอต้นแบบ (วิชัย แสงบุญ และคณะ, 2547)

2.3 ขั้นตอนในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอประกอบไปด้วยหลายขั้นตอนเริ่มตั้งแต่การเก็บตัวอย่าง การสกัดดีเอ็นเอ การหาปริมาณดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ การแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ การวิเคราะห์ผล และการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ต่อไป

2.3.1 การเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอพบได้ในนิวเคลียสของเซลล์ ได้แก่ เนื้อเยื่อต้องจัดเก็บในภาชนะสำหรับจัดเก็บ และต้องรักษาอุณหภูมิเพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพ เซลล์เยื่อบุผนังจัดเก็บโดยการแช่แข็งด้วยเทปใส หรือ การแช่ด้วยก้านสำลี ปลายรากผมจัดเก็บโดยการถอนเส้นผมให้ติดปลายรากผมบรรจุของกระดาด เซลล์เม็ดเลือดขาวจากโลหิตจัดเก็บโดยใช้หลอดสำหรับเก็บสิ่งส่งตรวจ หรือเก็บด้วยกระดาด FTA หรือ แช่แข็งด้วยก้านสำลีแล้วผึ่งให้แห้ง เซลล์อสุจิ เก็บในหลอดสำหรับจัดเก็บ หรือแช่แข็งด้วยก้านสำลีแล้วผึ่งให้แห้งสนิท และ ไชกระดาดซึ่งอาจต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการเก็บ เป็นต้น

การจัดเก็บเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มเพื่อตรวจดีเอ็นเอบุคคลด้วยก้านสำลีนั้น ปัจจุบันเป็นวิธีที่เข้ามาแทนที่การเก็บตัวอย่างจากโลหิต (Goodwin, 2007) เพราะไม่ก่อให้เกิดการบาดเจ็บกับผู้ให้ตัวอย่าง สะดวกรวดเร็ว วิธีการจัดเก็บรักษาและส่งตรวจไม่ยุ่งยาก สามารถทำได้ด้วยตัวเอง ไม่ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการจัดเก็บ

2.3.2 การสกัดดีเอ็นเอ

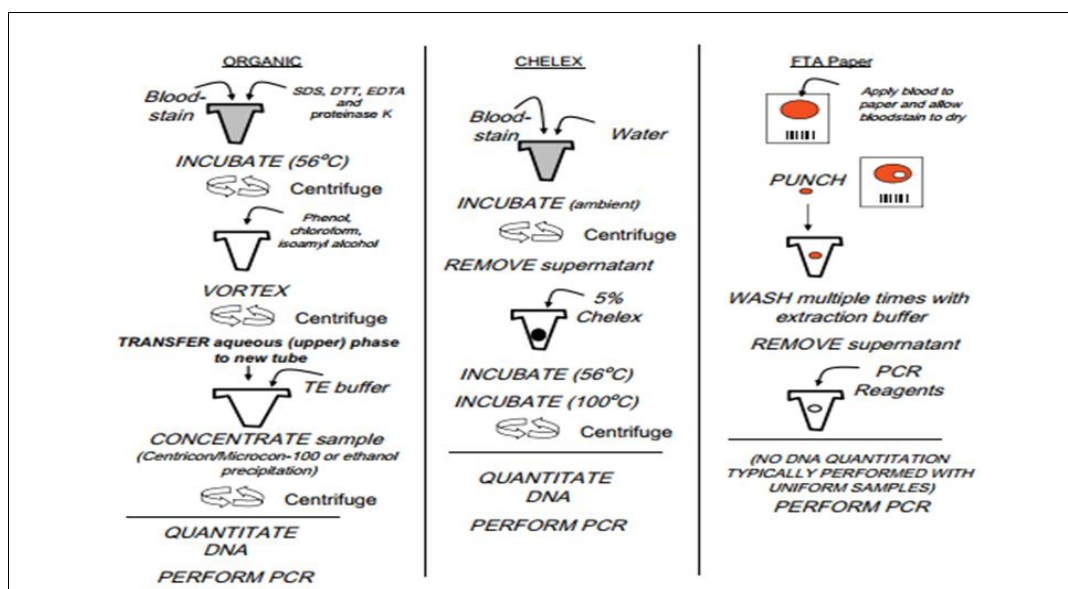
ตัวอย่างทางชีวภาพที่ใช้สำหรับตรวจเปรียบเทียบดีเอ็นเอบุคคล เช่น โลหิต หรือเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้ม ประกอบไปด้วยโปรตีนซึ่งทำหน้าที่ป้องกันดีเอ็นเอถูกทำลายโดยสิ่งแวดล้อม และสารประกอบอื่น ๆ ภายในเซลล์ ซึ่งโปรตีนและสารประกอบต่างเหล่านี้ สามารถเป็นสารที่ยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธีการ Polymerase chain reaction (PCR Inhibitor) ได้

ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอประกอบไปด้วย การย่อยสลายเซลล์เพื่อปลดปล่อยดีเอ็นเอที่บรรจุอยู่ภายในเยื่อหุ้มนิวเคลียสซึ่งจะถูกย่อยสลาย ด้วยกรรมวิธีต่าง ๆ เช่น สารเคมี หรือเอนไซม์ จากนั้นจึงทำการแยกดีเอ็นเอออกจากส่วนประกอบอื่น ๆ ของเซลล์ ล้างดีเอ็นเอเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่มี

ความบริสุทธิ์และการเก็บสารละลายที่มีดีเอ็นเอเพื่อใช้งานต่อไป วิธีการสกัดดีเอ็นเอ (John M. Butler, 2012) โดยทั่วไป ได้แก่ การสกัดด้วยสารอินทรีย์ (Phenol-Chloroform Extraction) การสกัดด้วย Chelex เช่น Chelex 100 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) การใช้ FTA Paper หรือ solid - phase extraction วิธี Differential Extraction เพื่อแยกระหว่างเซลล์สเปิร์มและ เซลล์เยื่อช่องคลอด และวิธีอื่น ๆ เช่น วิธี salting out โดยใช้ sodium acetate การใช้ sodium hydroxide หรือ การย่อย cellular proteins ด้วย thermostable proteinase เป็นต้น

2.3.3 การหาปริมาณดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอที่ผ่านขั้นตอนการสกัดแล้ว จะต้องทราบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ หากดีเอ็นเอตัวอย่างมีความเข้มข้นสูงจะส่งผลให้ PCR product มากเกินไป ทำให้เกิดความยุ่งยากในการแปลผล หรือไม่สามารถแปลผลได้ ในขณะที่ดีเอ็นเอมีปริมาณน้อยเกินไป หรือดีเอ็นเอที่เสื่อมสภาพ ส่งผลให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ หรือล้มเหลวในการวิเคราะห์ผลได้เช่นกัน วิธีการที่นิยมใช้วัดปริมาณดีเอ็นเอ โดยทั่วไป ได้แก่ UV Absorbance and Yield Gels, Slot Blot, PicoGreen Microtiter Plate Assay, AluQuant Human DNA Quantitation System, End-Point PCR Real Time Quantitative PCR (qPCR), Singleplex qPCR Assays, Multiplex qPCR Assays เป็นต้น (Butler, 2012)



ภาพที่ 2.3 การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีต่าง ๆ

ที่มา: Butler (2012)

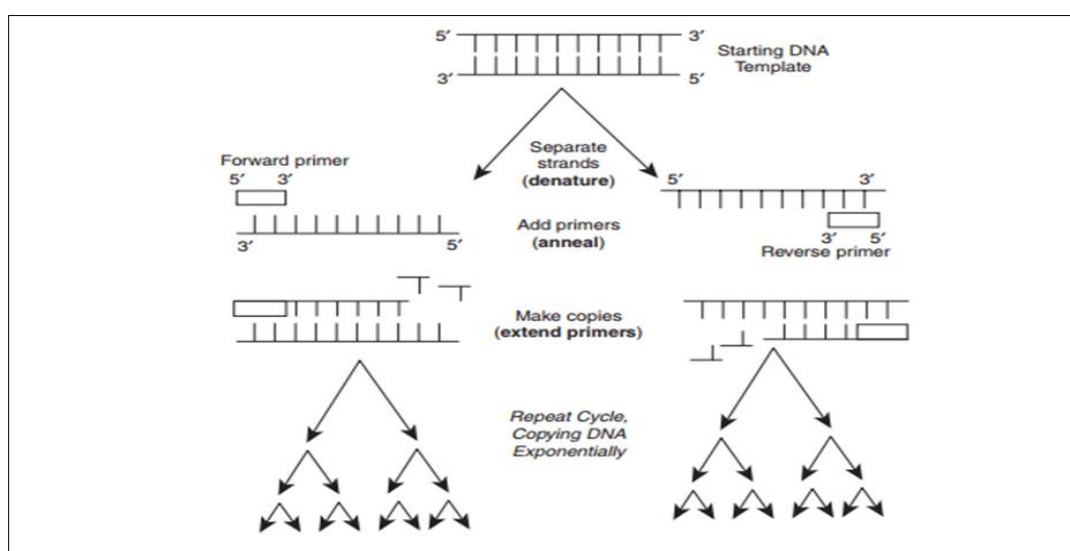
ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างชุดน้ำยาสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปชนิดต่าง

	QIAGEN	Promega	Applied Biosystems
Products	QIAamp	DNA IQ	PrepFilter
Solid-phase	Silica beads	Magnetic silica beads	Magnetic silica beads
Wash performed	Centrifugation or vacuum manifold	Magnet	Magnet
Robotic platform	EZ1, M48, QIAcube	Maxwell 16, Tecan	AutoMate Express, Tecan

ที่มา: Butler (2012)

2.3.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ในยุคแรกของการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอบุคคลใช้เทคนิค restriction fragment length polymorphism (RFLP) ต่อมามีการเปลี่ยนมาใช้เทคนิค polymerase chain reaction ซึ่งมีข้อดีหลายประการ ซึ่งกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในลำดับเบสที่จำเพาะบนสายดีเอ็นเอ โดยอาศัย เอนไซม์ DNA polymerase ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อตำแหน่งดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ dNTP และสารละลายบัฟเฟอร์ ขั้นตอนพื้นฐานของ PCR ได้แก่ (1) การทำให้ดีเอ็นเอเสื่อมสภาพ (denaturation) โดยใช้อุณหภูมิแยก DNA template (2) annealing เป็นขั้นตอนที่ไพรเมอร์ที่จำเพาะเข้าจับกับ specific sequences (3) ขั้นตอน extension เป็นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดย เอนไซม์ DNA polymerase จากดีเอ็นเอต้นแบบโดยการเติม dNTPs ขั้นตอนต่าง ๆ จะดำเนินไปประมาณ 28-30 รอบ ซึ่งจะทำให้ได้ดีเอ็นเอเพิ่มเป็นพันล้านจากดีเอ็นเอตั้งต้น (Butler, 2012)



ภาพที่ 2.4 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี polymerase chain reaction

ที่มา: Butler (2009: 127)



ภาพที่ 2.5 สภาพที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Proflex 7900 thermocycler สำหรับชุดน้ำยา AmpF[®]STR®Identifiler[®] Plus PCR Amplification Kit

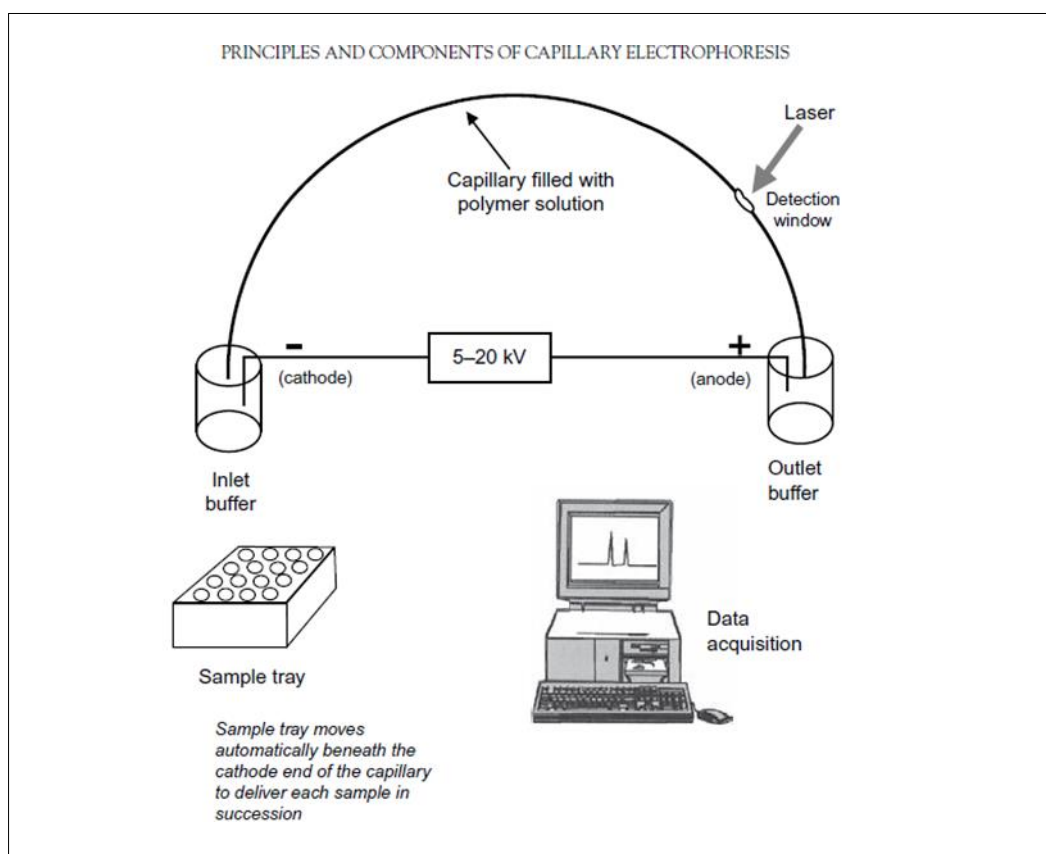
ตารางที่ 2.2 เปรียบเทียบการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี RFLP กับ PCR-based DNA typing

Characteristic	RFLP Methods	PCR Methods
Time required to obtain results	6–8 weeks with radioactive probes; ~1 week with chemiluminescent probes	1–2 days
Amount of DNA needed	50–500 ng	0.1–1 ng
Condition of DNA needed	High molecular weight, intact DNA	May be highly degraded
Capable of handling sample mixtures	Yes (single-locus probes)	Yes
Allele identification	Binning required since a distribution of sizes are observed	Discrete alleles obtained
Form used in analysis	DNA must be double-stranded for restriction enzymes to work	DNA can be either single-stranded or double-stranded
Power of discrimination	~1 in 1 billion with 6 loci	~1 in 1 billion with 8–13 loci (requires more loci)
Automatable and capable of high-volume sample processing	No	Yes
Commonly used DNA markers	D157, D2544, D45139, D55110, D75467, D10528, D17579	DQA1, D1580, STR loci: TH01, VWA, FGA, TPOX, CSF1PO, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11

ที่มา: Butler (2012)

2.3.5 การแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอและการวิเคราะห์ผล

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ผ่านการเพิ่มปริมาณแล้วจะถูกนำมาแยกด้วยวิธีการต่าง ปัจจุบันนิยมใช้วิธี capillary electrophoresis ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจะถูกดูดผ่านปลายเข็มขนาดเล็กและผ่านเข้าสู่หลอดหลอดทองแดงที่บรรจุ polymer buffer เช่น POP4 โดยที่ปลายของทั้งสองด้านเชื่อมต่อในสารละลาย buffer ที่เป็นขั้ว cathode และ anode เมื่อมีการปล่อยกระแสไฟฟ้า ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปขั้วบวกตามขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยที่ชิ้นส่วนเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกกระตุ้นด้วยแถบสี fluorescence ถูกกระตุ้นด้วยแสงเลเซอร์และถูกตรวจจับและอ่านค่าเมื่อเคลื่อนที่ผ่าน Detection window ค่าที่อ่านได้จะถูกส่งออกไปยังเครื่องคอมพิวเตอร์เพื่อแปลงผลเป็นข้อมูลดีเอ็นเอต่อไป



ภาพที่ 2.6 การแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Capillary electrophoresis

ที่มา: Butler (2012)

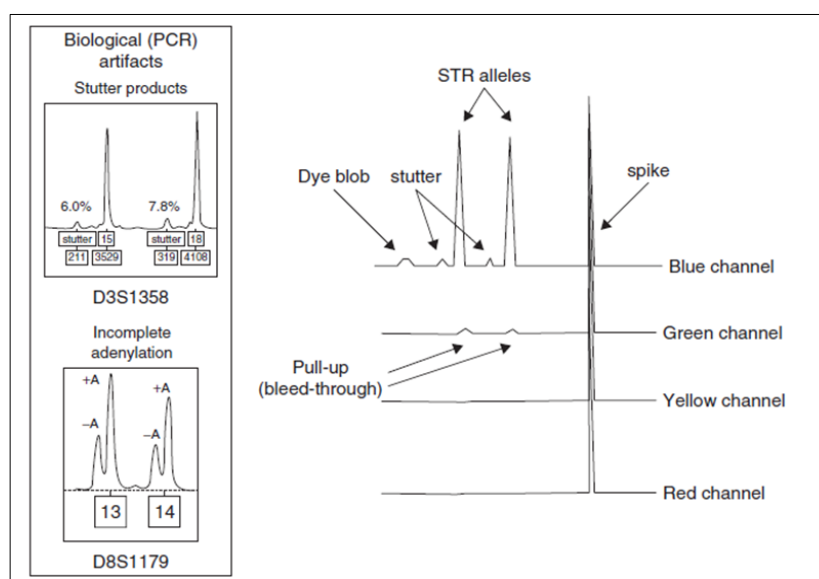
การวิเคราะห์ผลดีเอ็นเอนั้นจะมีโอกาสพบผลบวกปลอม (Artifact) ของพีคบนกราฟแสดงผลที่ปรากฏในอัลลีลต่าง ๆ ของตำแหน่งดีเอ็นเอได้ ซึ่งก่อให้เกิดความยุ่งยากในการแปลผลดีเอ็นเอ เช่น Off - ladder alleles เป็นอัลลีลที่ไม่ตกอยู่ในตำแหน่ง bin ของ Allelic Ladder ทำให้ไม่สามารถอ่านค่าอัลลีลของดีเอ็นเอในตำแหน่งนั้น ๆ ได้

Partial STR profiles หากดีเอ็นเอเสื่อมสภาพ (degraded) หรือ มี PCR inhibitors จะทำให้ได้ผลดีเอ็นเอเพียงบางส่วน (Partial STR profiles) โดยเฉพาะ STR loci ที่มีขนาดใหญ่ เช่น D18S51 และ FGA จะเป็นตำแหน่งแรกที่พบความล้มเหลวในการตรวจสอบ สามารถแก้ไขโดยใช้ชุด miniSTRs ที่มีขนาดเล็กลง

Stutter ปรากฏเป็นพีคขนาดเล็ก ๆ โดยปกติมีขนาด 15 - 20% ของพีคหลักในแต่ละตำแหน่ง ส่วนมากพบเกิดจากดีเอ็นเอต้นแบบมีความเข้มข้นสูง สามารถป้องกันได้โดยเจือจางดีเอ็นเอให้อยู่ในปริมาณที่เหมาะสมสำหรับชุดน้ำยาสำเร็จรูปแต่ละชนิดแนะนำไว้โดยบริษัทผู้ผลิต

Pull up เกิดจาก การที่มีปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบมากเกินไป ทำให้เมื่อวิเคราะห์ผลทำให้เกิดการรบกวนของสีที่ใช้ทำเครื่องหมายในชิ้นส่วนดีเอ็นเอทำให้เกิดการซ้อนทับกัน

allele drop out เป็นปรากฏการณ์ที่เกิดการขาดหายไปของดีเอ็นเอในบางตำแหน่ง พบได้บ่อยในดีเอ็นเอเสื่อมสภาพ เช่น โดยปกติอ่านค่าได้เป็น heterozygous แต่เมื่อวิเคราะห์ผลปรากฏเพียงหนึ่งตำแหน่งทำให้อ่านค่าเป็น homozygous ซึ่งส่งผลให้อ่านค่าผิดพลาดสามารถแก้ไขได้โดยการใช้ยาหลายชนิดประกอบกัน



ภาพที่ 2.7 artifacts ที่พบได้บ่อยในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี STR typing ได้แก่ stutter และ incomplete adenylation ซึ่งทำให้เกิด split peaks (inset).

ที่มา: Butler (2012)

2.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตรง (Direct PCR)

เป็นกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้สารละลายดีเอ็นเอที่ผ่านกระบวนการย่อยสลายเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มนิวเคลียส โดยไม่ต้องการการทำให้บริสุทธิ์ และไม่ต้องทราบปริมาณดีเอ็นเอ นำเข้าสู่ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์ ช่วยลดขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ ความผิดพลาดจากการปฏิบัติงาน ลดการสูญเสียดีเอ็นเอในระหว่างขั้นตอนการสกัด ลดการใช้สารเคมี และลดขั้นตอนการหาปริมาณดีเอ็นเอลง ทำให้ลดระยะเวลาในการปฏิบัติงานและประหยัดค่าใช้จ่ายได้อีกด้วย ตัวอย่างดีเอ็นเอที่นิยมใช้ได้แก่ ตัวอย่างที่เป็นโลหิต เซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้ม และตัวอย่างดีเอ็นเอที่เก็บด้วยกระดาษ FTA (Butler, 2012; Connon CC. et al, 2016; Wang et al, 2012; Romsos and Vallone, 2015)

2.5 ระบบฐานข้อมูลดัชนีสารพันธุกรรมรวม (Combined DNA Index System: CODIS)

เป็นระบบฐานข้อมูลดีเอ็นเอของประเทศสหรัฐอเมริกา ประกอบไปด้วย ฐานข้อมูลระดับท้องถิ่น ระดับรัฐ และระดับชาติ (LDIS, SDIS, และ NDIS) ซึ่งได้กำหนดตำแหน่งมาตรฐาน (CODIS Core STRs) ทั้งสิ้น 13 ตำแหน่ง ประกอบด้วย CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, VWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11 เพื่อใช้เป็นตำแหน่งหลักในการเปรียบเทียบ และเมื่อวันที่ 1 มกราคม 2017 ได้มีการประกาศเพิ่มเติมอีก 7 ตำแหน่ง ประกอบไปด้วย D1S1656, D2S441, D2S1338, D10S1248, D12S391, D19S433 และ D22S1045 (FBI, 2017; Lin et al., 2019)

การเก็บเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้ม (Tredoux et al., 2015; Butler, 2012) โดยใช้ก้านสำลีเช็ดเก็บภายในกระพุ้งแก้มเป็นเวลาประมาณ 30 วินาที เป็นวิธีการเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอเปรียบเทียบ (Reference sample หรือ Known sample) เป็นวิธีที่ใช้เก็บตัวอย่างดีเอ็นเอนิยมใช้เนื่องจากไม่ก่อให้เกิดการบาดเจ็บแก่ผู้ให้ตัวอย่าง การเก็บรักษาและส่งตรวจไม่ยุ่งยากซับซ้อน มีดีเอ็นเอปริมาณมากพอต่อการนำไปใช้งาน ทั้งยังมีราคาถูก

Ruiz et al. (2018) ได้ทำการศึกษาชนิดของก้านสำลีระหว่างเกรดทางการแพทย์ และก้านสำลีที่หาได้ทั่วไปตามท้องตลาดพบว่า ใช้เก็บดีเอ็นเอจากเยื่อบุกระพุ้งแก้มได้ไม่แตกต่างกัน แต่มีราคาถูกกว่า

Rudbeck L and Dissing J. (1998) ได้สกัดเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มที่เก็บด้วยก้านสำลี โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มที่ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยใช้เวลาเพียง 6 นาที จากนั้นยุติปฏิกิริยาโดยใช้ Tris - HCl 0.04 โมลาร์ ปริมาตร 180 ไมโครลิตร, pH 7.5 นำไปเพิ่มปริมาณด้วยวิธีการ PCR

Klintschar. M. and Neuhuber, F. (2000) ได้ศึกษาเปรียบเทียบการสกัดดีเอ็นเอจากโลหิต ทรายโลหิต และอสุจิ ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เทียบกับ chelex100 วิธีปกติ พบว่าช่วยลดระยะเวลาการสกัดลงโดยใช้เวลาเพียง 10 นาที

Connon CC. et al. (2016) ได้ศึกษาการลดระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยการลดปริมาตรน้ำยา PowerPlex® 16 HS System, AmpFLSTR® Identifiler® และ Identifiler® Plus PCR Amplification Kit primer sets ลง ร่วมกับการใช้ primer set ของชุดน้ำยา KAPAG2 และลดระยะเวลาในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลง ทำให้มีค่าใช้จ่ายถูกลง และประหยัดเวลามากขึ้น

Erica L. et al. (2015) และ McMahon et al. (2017) ได้ทำการศึกษาการทำ Direct PCR โดยใช้ตัวอย่างที่เป็นโลหิตและเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มบนกระดาษ FTA ซึ่งช่วยลดระยะเวลาและขั้นตอนการตรวจดีเอ็นเอได้มากยิ่งขึ้น

Hall and Roy. (2014) ได้ศึกษาการทำ Direct PCR จากตัวอย่างโลหิตที่เก็บบนกระดาษ FTA ระยะเวลาตั้งแต่ 1 วัน – 1 ปี ด้วยชุดน้ำยา PCR จำนวน 9 ชนิด พบว่า ชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® และ AmpFLSTR® Identifiler® Plus ให้ผลดีที่สุด

Cavanaugh and Brithrich (2018) ได้ศึกษาการทำ Direct PCR โดยใช้ตัวอย่างที่เป็นทรายโลหิต และ น้ำลาย บนกระดาษ FTA แสดงให้เห็นว่าช่วยลดขั้นตอนการสกัด การทำให้บริสุทธิ์ ลดการปนเปื้อนและลดความผิดพลาดจากการปฏิบัติงานลง และยังประหยัดค่าใช้จ่ายขึ้น

Wang et al. (2012) ศึกษาประสิทธิภาพของชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus โดยดัดแปลง buffer และดัดแปลงจำนวนรอบที่ใช้ในการเพิ่มปฏิกิริยา PCR พบว่า การใช้ primer ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ไม่มีผลต่อคุณภาพพีคทั้ง ความสูง และสมดุลของพีค การเพิ่มจำนวนรอบพบว่า เกิด out of ladder มากขึ้นตามจำนวนรอบที่เพิ่มขึ้น โดยจำนวนรอบ 28 รอบ ตามคู่มือเหมาะสมที่สุด แต่การเพิ่มจำนวนรอบไม่มีผลต่อความสูงและ สมดุลของพีค

Locus designation	Chromosome location	Alleles included in Identifiler™ Plus Allelic Ladder	Dye label	Control DNA 9947A
D8S1179	8	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	6-FAM™	13‡
D21S11	21q11.2-q21	24, 24.2, 25, 26, 27, 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, 37, 38		30§
D7S820	7q11.21-22	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		10, 11
CSF1PO	5q33.3-34	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		10, 12
D3S1358	3p	12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	VIC™	14, 15
TH01	11p15.5	4, 5, 6, 7, 8, 9, 9.3, 10, 11, 13.3		8, 9.3
D13S317	13q22-31	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		11#
D16S539	16q24-qter	5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		11, 12
D2S1338	2q35-37.1	15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28	NED™	19, 23
D19S433	19q12-13.1	9, 10, 11, 12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 17.2		14, 15
vWA	12p12-pter	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24		17, 18
TPOX	2p23-2per	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13		8‡‡
D18S51	18q21.3	7, 9, 10, 10.2, 11, 12, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27	PET™	15, 19
Amelogenin	X: p22.1-22.3 Y: p11.2	X, Y		X
D5S818	5q21-31	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16		11§§
FGA	4q28	17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26.2, 27, 28, 29, 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		23, 24

‡ For CODIS purposes, profile reported as 13, 13.
§ For CODIS purposes, profile reported as 30, 30.
For CODIS purposes, profile reported as 11, 11.
‡‡ For CODIS purposes, profile reported as 8, 8.
§§ For CODIS purposes, profile reported as 11, 11.

ภาพที่ 2.8 loci และ allele ของชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus
ที่มา: Applied Biosystems (2009)

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์สารเคมีและวิธีวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

- 3.1.1 การเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอจากเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้ม
 - 3.1.1.1 ก้านสำลีชนิดพันก้าน 2 ด้านขนาด M
 - 3.1.1.2 กระจกสำหรับบรรจุรายละเอียด
 - 3.1.1.3 ปากกา permanent
 - 3.1.1.4 ซองกระจก
 - 3.1.1.5 ใบบิดผ้าตัดปลอดเชื้อ
- 3.1.2 การสกัดดีเอ็นเอ
 - 3.1.2.1 หลอด microcentrifuge tube 1.5 มิลลิลิตร
 - 3.1.2.2 เครื่องเขย้าสารละลาย
 - 3.1.2.3 เครื่องให้ความร้อนชนิดแห้ง
 - 3.1.2.4 ไมโครปิเปต ขนาด 2, 20, 100, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร พร้อม tip
 - 3.1.2.5 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์
 - 3.1.2.6 สารละลาย Tris - HCL ความเข้มข้น 1 โมลาร์
- 3.1.3 การหาปริมาณดีเอ็นเอ
 - 3.1.3.1 หลอด microcentrifuge ขนาด 0.5 มิลลิลิตร ชนิด 8 แถว พร้อมฝาปิด
 - 3.1.3.2 ไมโครปิเปต ขนาด 2, 20, 100, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร พร้อม tip
 - 3.1.3.3 เครื่องเขย้าสารละลาย
 - 3.1.3.4 เครื่องปั่นเหวี่ยง
 - 3.1.3.5 เครื่อง 7500 Fast Real - Time PCR System
 - 3.1.3.6 ชุดน้ำยา Quantifiler Hp
- 3.1.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ
 - 3.1.4.1 หลอด microcentrifuge ขนาด 0.5 มิลลิลิตร ชนิด 8 แถว พร้อมฝาปิด
 - 3.1.4.2 ไมโครปิเปต ขนาด 2, 20, 100, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร พร้อม tip
 - 3.1.4.3 เครื่องเขย้าสารละลาย
 - 3.1.4.4 เครื่องปั่นเหวี่ยง

3.1.4.5 เครื่อง GeneAmp™ PCR System 9700

3.1.4.6 ชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ AmpF‘STR®Identifiler® Plus PCR

Amplification Kit

3.1.5 การวิเคราะห์ผลดีเอ็นเอ

3.1.5.1 ถาดหลุมชนิด 96 ช่อง

3.1.5.2 ไมโครปิเปต ขนาด 2, 20, 100, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร พร้อม tip

3.1.5.3 เครื่องเขย่าสารละลาย

3.1.5.4 เครื่องปั่นเหวี่ยง

3.1.5.5 เครื่อง Thermal cycle

3.1.5.6 เครื่องวิเคราะห์ดีเอ็นเอ Capillary Electrophoresis ABI 3500 Genetic

Analyzer

3.1.5.7 GeneScan™ 600 LIZ™ Size Standard v2.0 Dx (Applied Biosystems™)

3.1.5.8 Formamide (Applied Biosystems™)

3.1.5.9 AmpFLSTR® Identifiler® Plus Allelic Ladder (Applied Biosystems™)

3.1.5.10 POP - 4™ Polymer for 3500/3500xL Genetic Analyzers (Applied Biosystems™)

3.1.5.11 ชุดคอมพิวเตอร์พร้อมโปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ GeneMapper™ ID -X Software v1.6

3.2 วิธีการศึกษา

3.2.1 การจัดเก็บดีเอ็นเอด้วยก้านสำลี cotton bud เพื่อให้มีปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสม

3.2.1.1 ตัวอย่างที่ใช้ทดลอง

ทำการเก็บเยื่อบุกระพุ้งแก้มจากอาสาสมัครที่มีสุขภาพแข็งแรง โดยใช้อาสาสมัครจำนวนหนึ่งราย โดยใช้ก้านสำลี cotton bud โดยให้อาสาสมัครบ้วนปากด้วยน้ำเปล่า แล้วใช้ก้านสำลีที่ตัดปลายด้านหนึ่งทิ้งใช้ส่วนที่เป็นสำลีเช็ดแล้วหมุนเป็นจำนวนหนึ่งรอบภายในเยื่อบุกระพุ้งแก้ม ทำการเก็บจากบริเวณที่ต่างกันโดยไม่ซ้ำจุดเดิมจากนั้นนำไปฝั่งที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ก้านสำลีแห้งสนิท จากนั้นเก็บใส่ซองกระดาษระบุรายละเอียดเพื่อทำการทดลองต่อไป โดยทำการเก็บตัวอย่าง 11 ก้าน หลีกเลี่ยงการเก็บดีเอ็นเอซ้ำตำแหน่งเดิมเพราะจะทำให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอน้อยลง โดยสามารถเว้นระยะเวลาในการเก็บได้

3.2.1.2 การสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยา DNA IQ™

นำก้อนสำลีตัดใส่หลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด เติมสารละลาย lysis buffer (ประกอบไปด้วย Lysis buffer และ Dithiothreitol (DTT) อัตราส่วน 100:1 ไมโครลิตร) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ต่อหลอด ใช้ไม้จิ้มฟันปลดเชือกผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ถ่ายก้อนสำลีและสารละลายที่เหลือใส่ในหลอด spin basket ใส่หลอดใหม่ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที นำ spin basket และสำลีทิ้งไป เก็บเฉพาะสารละลายไว้ ดูดสารละลาย magnetic bead 15 ไมโครลิตร ก่อนทำการดูดสารละลายควรผสมหรือเขย่าสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันก่อน ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าอัตโนมัติ ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปตั้งที่ magnetic stand ดูดสารละลายทิ้งจนหมด เติม Wash buffer 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าอัตโนมัติ จากนั้นนำไปตั้งที่ magnetic stand ทำซ้ำจำนวน 3 รอบ ดูดสารละลายทิ้งจนหมดให้มากที่สุด หลังจากนั้นปล่อยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม elution buffer 20 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ผสมให้เข้ากันจากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ที่ magnetic stand ดูดเฉพาะสารละลายส่วนใส เก็บในหลอดใหม่

3.2.1.3 การสกัดดีเอ็นเอด้วยสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์

เติมสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีก้อนสำลีตัวอย่าง เขย่าให้เข้ากัน 15 วินาที จากนั้น เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 250 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน 30 วินาที เติม Tris - HCL ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (ทำซ้ำ 3 ตัวอย่าง) แบ่งตัวอย่างออกเป็น 3 กลุ่มโดยกลุ่มที่ 1 บ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส กลุ่มที่ 2 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และกลุ่มที่ 3 บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 นาที

3.2.1.4 การวิเคราะห์หาปริมาณดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอที่สกัดได้ในแต่ละกลุ่มการทดลองจะถูกนำมาวัดปริมาณโดยใช้ชุดน้ำยา Quantifiler Human (Applied Biosystems) โดยใช้เครื่อง Realtime PCR 7500 โดย เตรียมน้ำยา ประกอบด้วย Quantifiler THP PCR reaction mix ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และ Quantifiler THP primermix 5 ไมโครลิตร เตรียมตามจำนวนตัวอย่างดังนี้ ดีเอ็นเอมาตรฐาน ความเข้มข้น 50, 5, 0.5, 0.05 และ 0.005 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรจำนวน 2 ซ้ำ และดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดด้วย สารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่อุณหภูมิห้อง ที่ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และ ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ปิเปตน้ำยา PCR master mix ใส่ในหลอด strip ซึ่งในแต่ละหลอดประกอบไปด้วย น้ำยา PCR master mix ปริมาตร 9 ไมโครลิตร และตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 1 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง 7500 Real - Time PCR

3.2.2 การศึกษาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีการ Direct PCR และการลดปริมาณน้ำยา PCR Mastermix

3.2.2.1 ตัวอย่างที่ใช้ทดลอง

หลังจากทราบปริมาณดีเอ็นเอในแต่ละตัวอย่าง ทำการเลือกชุดตัวอย่างที่มีความเข้มข้นเหมาะสมสำหรับการทำพีซีอาร์ โดยการเก็บเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มด้วยก้านสำลี จำนวน 2 ก้าน หลังจากนั้นตัดใส่หลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และระบายละเอียดเพื่อทำการสกัดดีเอ็นเอต่อไป

3.2.2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

เติมสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน 15 วินาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 250 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน 30 วินาที เติม Tris - HCL ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (ทำซ้ำ 2 ตัวอย่าง)

3.2.2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

เตรียม PCR master mix ชุดน้ำยา AmpFLSTR™ Identifiler™ PCR Amplification Kit (Applied Biosystems) โดยใช้ปริมาณสารละลาย PCR master mix และ DNA template ตามตารางที่ 5 จากนั้นผสมให้เข้ากันแล้วนำไปเพิ่มปริมาณด้วยเครื่อง Gene Amp® PCR System 9700 โดยใช้อุณหภูมิประกอบไปด้วย melting temperature ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 11 นาที จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที annealing step ที่อุณหภูมิ 59 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 นาที (ขั้นตอนนี้ ทำซ้ำจำนวน 28 รอบ) และขั้นตอน final extension steps ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และเก็บ PCR Product ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อรอทำการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

3.2.2.4 การวิเคราะห์ผลดีเอ็นเอ

นำ PCR Product ที่ผ่านขั้นตอนการเพิ่มปริมาณไปแยกโดยวิธี Capillary electrophoresis ด้วยเครื่อง 3500 Genetic Analyzer System (Applied Biosystems) โดยการเตรียม Hi - Di™ Formamide (Applied Biosystems™) 10 ไมโครลิตร และ GeneScan™ 600 LIZ® Size Standard 0.025 ไมโครลิตร และ PCR product 1 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดหลอดสำหรับการวิเคราะห์ จากนั้นนำไป denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที จากนั้นนำไปหลอดอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส 3 นาที นำเข้าเครื่อง จากนั้นวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม Data Collection Software 2 (Applied Biosystems) และวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม Gene Mapper IDX v.1.4 software (Applied Biosystems) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต

ตารางที่ 3.1 ปริมาณ master mix ของ AmpFLSTR® Identifiler® Plus PCR amplification kit และ DNA template ที่ใช้

ตัวอย่าง	ปริมาตรที่ใช้ (ไมโครลิตร)			ปริมาตรรวม (ไมโครลิตร)
	Master mix	Primer set	DNA template	
1	10	5	10	25
2	10	5	10	25
3	5	2.5	5	12.5
4	5	2.5	5	12.5
5	2.5	1.25	2.5	6.25
6	2.5	1.25	2.5	6.25
7	1.25	0.625	1.25	3.125
8	1.25	0.625	1.25	3.125
9	10	5	10	25
10	10	5	10	25
11	5	2.5	5	12.5
12	5	2.5	5	12.5
13	2.5	1.25	2.5	6.25
14	2.5	1.25	2.5	6.25
15	1.25	0.625	1.25	3.125
16	1.25	0.625	1.25	3.125
negative	10	5	10	25

หมายเหตุ: ตัวอย่างที่ 1 - 8 หมายถึงดีเอ็นเอที่สกัดด้วยชุดน้ำยา IQ และ 9 - 16 คือตัวอย่างที่สกัดด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์

บทที่ 4

สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

4.1 การจัดเก็บดีเอ็นเอด้วยก้านสำลี cotton bud เพื่อให้มีปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสม และการสกัดดีเอ็นเอด้วยสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์

การเก็บเยื่อบุกระพุ้งแก้มด้วยก้านสำลีขนาดกลาง (M) โดยการเช็ดเก็บโดยการหมุนก้านสำลีหนึ่งรอบ หลังจากนั้นนำไปสกัดดีเอ็นเอด้วยการชุน้ำยาสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป IQ™ และสกัดด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิห้อง 50 และ 95 องศาเซลเซียส เมื่อนำไปวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี QPCR โดยใช้ชุดน้ำยา Quantifiler Human Plus พบว่ากลุ่มทดลองที่สกัดด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่อุณหภูมิห้อง มีปริมาณดีเอ็นเอ 0.11, 0.02, 0.05 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีปริมาณดีเอ็นเอ 0.04, 0.06, 0.42 (small subunit) นาโนกรัมต่อไมโครลิตร. และกลุ่มทดลองที่ 95 องศาเซลเซียส มีปริมาณดีเอ็นเอ 0.05, 0.49, 1.16 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และปริมาณดีเอ็นเอของชุดที่สกัดด้วยชุดน้ำยา IQ มีปริมาณ 0.99 และ 2.11 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นที่วัดได้ (นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)		
	อุณหภูมิห้อง	50 องศาเซลเซียส	95 องศาเซลเซียส
01	0.11		
02	0.02		
03	0.05		
04		0.04	
05		0.06	
06		0.42 (s)	
07			0.05
08			0.49
09			1.16

ตารางที่ 4.1 ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (ต่อ)

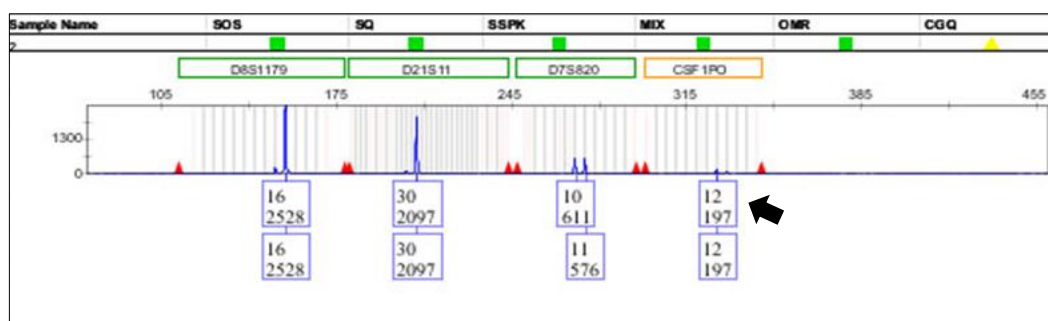
ตัวอย่าง	ความเข้มข้นที่วัดได้ (นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)		
	อุณหภูมิห้อง	50 องศาเซลเซียส	95 องศาเซลเซียส
Ti1			0.99
Ti2			2.11

หมายเหตุ: ตัวอย่างที่ 01 - 09 หมายถึง ตัวอย่างที่สกัดด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ และ

Ti1 - Ti2 หมายถึงดีเอ็นเอที่สกัดด้วยชุดน้ำยา IQ และ S หมายถึง DNA small sub unit

4.2 การศึกษาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีการ Direct PCR และการลดปริมาณน้ำยา PCR Mastermix

กลุ่มตัวอย่างที่สกัดที่อุณหภูมิห้องถูกเลือกมาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus PCR amplification kit โดยการลดปริมาณน้ำยาลง 1/2 และ 1/4 พบว่าทุกตัวอย่างสามารถให้ผลโปรไฟล์ดีเอ็นเอได้ทั้ง 8 ตัวอย่าง เช่นเดียวกับตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดด้วยชุดน้ำยา IQ™ วิธีปกติ โดยกลุ่มตัวอย่างที่สกัดด้วยชุดน้ำยา IQ™ ตัวอย่างที่ 1 - 8 พบการเกิด stutter 9, 1, 3, 10, 5, 11, 10 และ 7 ตำแหน่งตามลำดับ และยังพบการเกิด allele dropout 1 ตำแหน่งที่ CSF1PO ตัวอย่างที่พบ artifact มากที่สุดคือตัวอย่างที่ 6 พบ 11 ตำแหน่งจาก 16 ตำแหน่ง โดยที่ตัวอย่างที่ 2 พบการเกิด artifact น้อยที่สุด ดังรูปที่ 9 เกิด artifact ชนิด stutter ที่ตำแหน่ง D49S433 เพียง 1 ตำแหน่ง ทำให้อ่านค่าได้เป็น homozygous 12 เมื่อเทียบกับดีเอ็นเออ้างอิงซึ่งอ่านค่าได้เป็น heterozygous 12,13

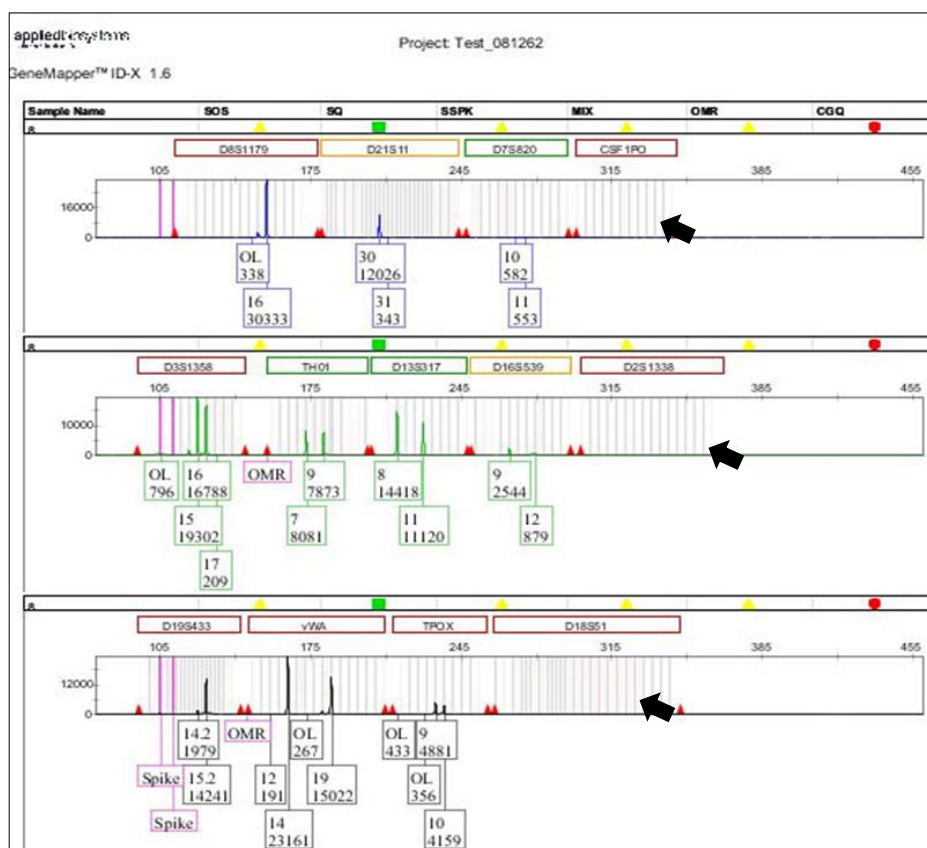


ภาพที่ 4.1 การเกิด allele drop out ของตัวอย่างที่ 2 ที่ตำแหน่ง CSF1PO

ตัวอย่างที่ 8 พบการเกิด Allele drop out จำนวน 3 ตำแหน่ง ได้แก่ CSF1PO, D2S1338 และ D18S51 ทำให้ไม่สามารถอ่านค่าที่ตำแหน่งดังกล่าวได้ โดยอ่านค่าได้ 13 ตำแหน่ง จากทั้งหมด 16 ตำแหน่ง เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

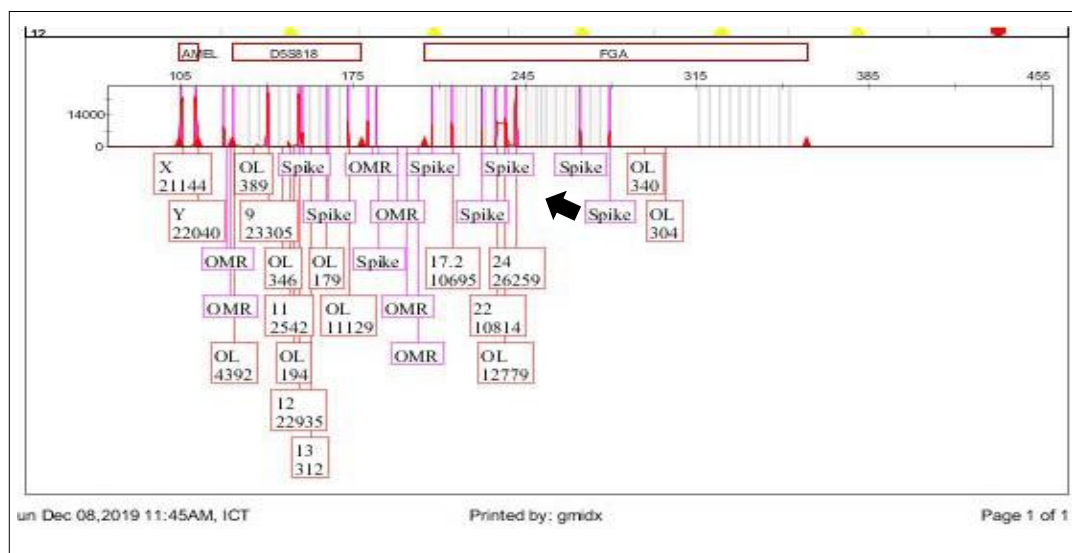
กลุ่มตัวอย่างที่สกัดด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ตัวอย่างที่ 9 - 16 พบ artifact จำนวน 12, 12, 12, 15, 10, 14, 10 และ 5 ตามลำดับ โดยที่ตัวอย่างที่ 16 ที่พบการเกิด artifact น้อยที่สุด เกิด artifact ชนิด stutter จำนวน 6 ตำแหน่งที่ตำแหน่ง D2S1338, D4S433, vWA, Amelogenine, D5S818

และ FGA และยังพบการเกิด allele dropout 1 ตำแหน่งที่ D16S539 ตัวอย่างที่พบ artifact มากที่สุดคือตัวอย่างที่ 12 โดยพบ artifact จำนวน 15 ตำแหน่งจาก 16 ตำแหน่ง ตำแหน่งที่เกิด artifact มากที่สุดคือ D4S433 พบปรากฏในทุกตัวอย่าง vWA พบ 15 ตัวอย่างจากทั้งหมด 16 ตัวอย่าง และ D5S818 พบ 14 ตัวอย่างจากทั้งหมด 16 ตัวอย่าง โดยที่ตัวอย่างที่ 12 เกิด pull up ทำให้ไม่สามารถอ่านค่าตำแหน่ง FGA ได้ และตำแหน่งที่ 14 เกิด pull up ที่ตำแหน่ง D5S818 อ่านค่าได้เป็น partial allele 9,- ซึ่ง DNA อ้างอิงอ่านค่าได้เป็น 9,12 และ FGA อ่านค่าได้เป็น -, 24 ซึ่งดีเอ็นเออ้างอิงอ่านค่าได้เป็น 23, 24

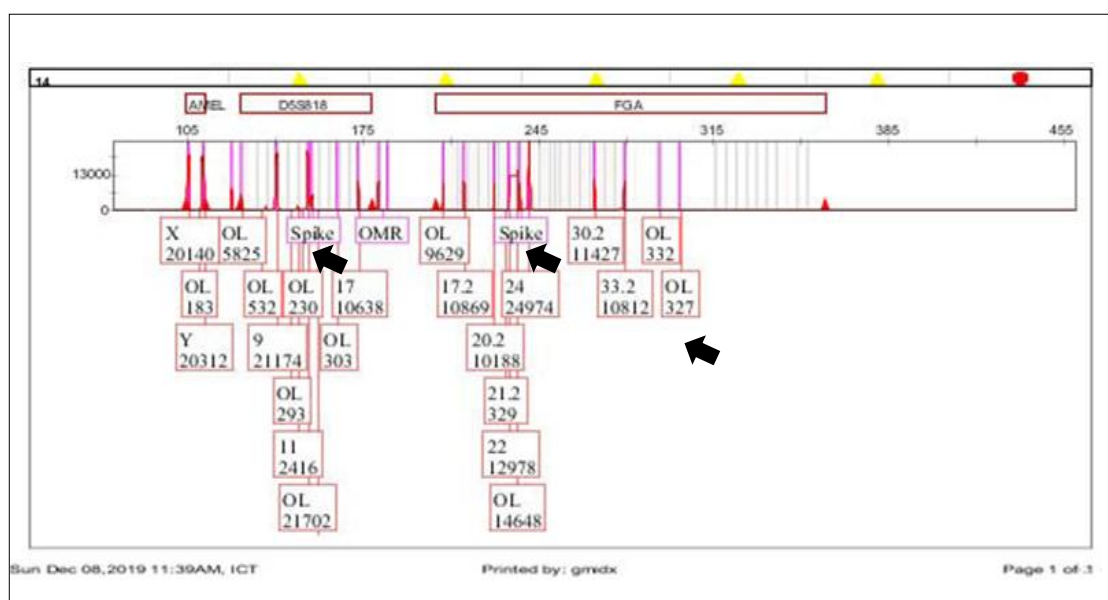


ภาพที่ 4.2 การเกิด allele drop out ของตัวอย่างที่ 8 ที่ตำแหน่ง CSF1PO, D2S1338 และ D18S51

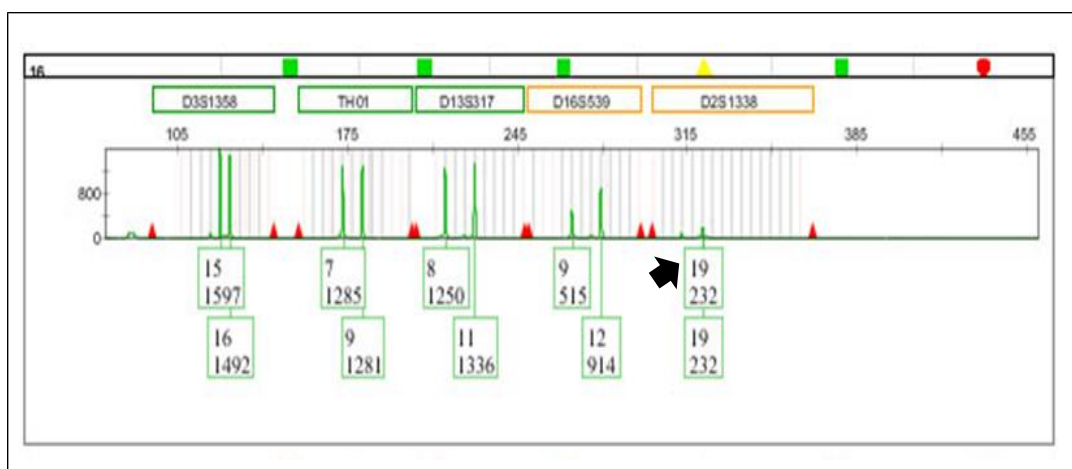
ตัวอย่างที่ 16 ปรากฏ artifact น้อยที่สุดแต่พบ allele drop out ที่ตำแหน่ง D2S1338 ทำให้ไม่สามารถอ่านค่าตำแหน่งดังกล่าวได้ โดยสามารถอ่านค่าได้ เป็น partial คือ -,19 เมื่อเทียบกับ ดีเอ็นเออ้างอิงที่อ่านค่าได้เป็น 17,19 ทำให้อ่านค่าดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 15 ตำแหน่งจากทั้งหมด 16 ตำแหน่ง เมื่อเทียบกับดีเอ็นเออ้างอิง



ภาพที่ 4.3 การเกิด pull up ของตัวอย่างที่ 12 ที่ตำแหน่ง FGA



ภาพที่ 4.4 การเกิด pull up ของตัวอย่างที่ 14 ที่ตำแหน่ง D5S818 และ FGA



ภาพที่ 4.5 การเกิด allele drop out ของตัวอย่างที่ 16 ที่ตำแหน่ง D2S1338

4.3 วิจัยและข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองพบว่าปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ในแต่ละตัวอย่างมีปริมาณดีเอ็นเอแตกต่างกัน และพบว่าการสกัดด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส มีปริมาณดีเอ็นเอสูงสุด คือ 0.05 - 1.16 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ทุกกลุ่มการทดลองที่อุณหภูมิต่าง ๆ สามารถให้ผลดีเอ็นเอได้เช่นเดียวกัน เมื่อศึกษาการเพิ่มปริมาณด้วยวิธี direct PCR ด้วยการสกัดดีเอ็นเอด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่อุณหภูมิห้อง โดยเริ่มตั้งแต่การเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอด้วยก้านสำลี cotton bud จำนวน 1 รอบ สกัดดีเอ็นเอ และ เพิ่มปริมาณด้วยวิธีการ PCR พบว่าสามารถให้ผลดีเอ็นเอในทุกตัวอย่าง แต่ตัวอย่างที่ 8 ซึ่งใช้ PCR master mix 1.875 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอต้นแบบ 1.25 ไมโครลิตร นั้นให้ผลดีเอ็นเอ เพียง 13 ตำแหน่ง ซึ่งเกิด allele drop out ในตำแหน่ง CSFPO D2S1358 และ D18SS1 แต่เมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ 7 ซึ่งให้ผลดีเอ็นเอสมบูรณ์ทั้ง 16 ตำแหน่ง สาเหตุอาจเกิดได้จาก ในขั้นตอนการดูดสารละลายซึ่งสารละลายที่ใช้มีปริมาณน้อยมาก การผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันมากที่สุดโดยการใช้เครื่องเขย่าสารละลายประมาณ 15 วินาที แล้วปั่นเหวี่ยงช่วยลดปัญหาดังกล่าวลงได้ และการดูดสารละลายจะต้องตรวจดูที่ปลายหลอดทุกครั้งว่าสามารถดูดได้ตามปริมาณหรือไม่ เพราะพบว่าที่ปที่ใช้ดูดจ่ายสารละลายที่มีการเคลือบสารบางชนิดเพื่อกันน้ำเกาะส่งผลทำให้ปริมาณสารละลายที่ดูดจ่ายได้ น้อยหรือมากกว่าปริมาตรที่ต้องการ

และในตัวอย่างที่ 10, 12 และ 14 ซึ่งเป็นดีเอ็นเอชุดเดียวกัน แต่ใช้ปริมาณดีเอ็นเอต่างกัน พบว่าเกิด การ pull - up แต่ยังสามารถวิเคราะห์ผลได้ แต่ในตำแหน่ง D5S818 และ FGA เกิดการ Pull - up จนทำให้ไม่สามารถอ่านค่าได้ในตำแหน่งดังกล่าว การเกิด artifact เช่น pull up, split peak, stutter out of ladder เป็นจำนวนมากในกลุ่มตัวอย่างที่ 9 - 16 ซึ่งชี้ให้เห็นว่ามีปริมาณ DNA

template ในปฏิกิริยามากจึงจำเป็นต้องศึกษาปริมาณสารละลายที่ใช้ในการสกัดเพื่อให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมเพื่อลดการเกิด artifact ให้น้อยลง ทำให้แปลผลได้ง่ายขึ้น

การเปรียบเทียบคุณภาพของพีคในทั้งสองกลุ่มตัวอย่างทดลอง พบว่าทุกตัวอย่างมีการเกิด stutter, spike, pull - up การเกิดปรากฏการณ์เหล่านี้ส่งผลทำให้เสียเวลาในการวิเคราะห์ผล หากเจือจางดีเอ็นเอได้เหมาะสมระหว่าง 0.1 - 0.21 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จะลดโอกาสเกิด artifact เหล่านี้ลงไปได้ และ stutter peak จะทำให้เกิดความยุ่งยากในการแปลผลในกรณีที่ดีเอ็นเอมีคุณภาพต่ำ หรือปริมาณน้อย เพราะค่าความสูงของ peak จริงกับ stutter peak ใกล้เคียงกัน ซึ่งสอดคล้อง Godwin (2020:) ที่ได้แสดงให้เห็นว่า การเกิด artifact เช่น stutter ต่าง ๆ นั้นพบได้บ่อยในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ ถึงแม้ว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับ PCR สำหรับชุด STRs ที่วางขายในปัจจุบันคือ 0.05 - 0.2 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร แต่ในการปฏิบัติงานจริงพบว่าการเตรียมดีเอ็นเอให้ได้ปริมาณดังกล่าวเป็นไปได้ยากเนื่องจากหลายปัจจัย (Goodwin, 2007)

ในขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอซึ่งประกอบไปด้วย การเก็บดีเอ็นเอ การสกัดดีเอ็นเอ การวิเคราะห์หาปริมาณดีเอ็นเอ (การเตรียมการเจือจางตัวอย่างดีเอ็นเอเพื่อให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และการวิเคราะห์ผลดีเอ็นเอ ซึ่งใช้ระยะเวลาประมาณ 4 - 5 ชั่วโมง แต่การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยการสกัดด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พบว่าสามารถลดขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ การหาปริมาณดีเอ็นเอ การเตรียมดีเอ็นเอได้ ในด้านงบประมาณ ชุดน้ำยาสกัดในห้องทดลองสำหรับสกัดดีเอ็นเอ มีราคาหลายหมื่นบาทซึ่งสามารถใช้สำหรับการสกัดดีเอ็นเอประมาณ 400 ตัวอย่าง แต่เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมีราคาถูกกว่าเป็นอย่างมาก เตรียมสารละลายและการทำงานไม่ยุ่งยากซับซ้อนและยังเก็บไว้ได้นานในอุณหภูมิห้องปกติ นอกจากนี้ยังช่วยลดระยะเวลาการปฏิบัติเหลือเพียงประมาณ 2.30 ชั่วโมง ซึ่งพบว่า สามารถลดการใช้เครื่องมือและวัสดุสิ้นเปลือง เช่น เครื่องทำอุณหภูมิแบบแห้งหลอด microcentrifuge tube spin basket tips สำหรับเครื่องดูดจ่ายสารละลาย (pipet) ลงไปได้เป็นอย่างมาก ในขั้นตอนการสกัดบางวิธีใช้สารเคมีที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้ปฏิบัติงาน เช่น DTT phenol chloroform มีความระคายเคืองต่อระบบหายใจและเป็นพิษสูง การสกัดด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ยังช่วยลดของเสียและไอระเหยจากสารพิษที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้ปฏิบัติงานได้ (มหาวิทยาลัยสวนดุสิต, 2015)

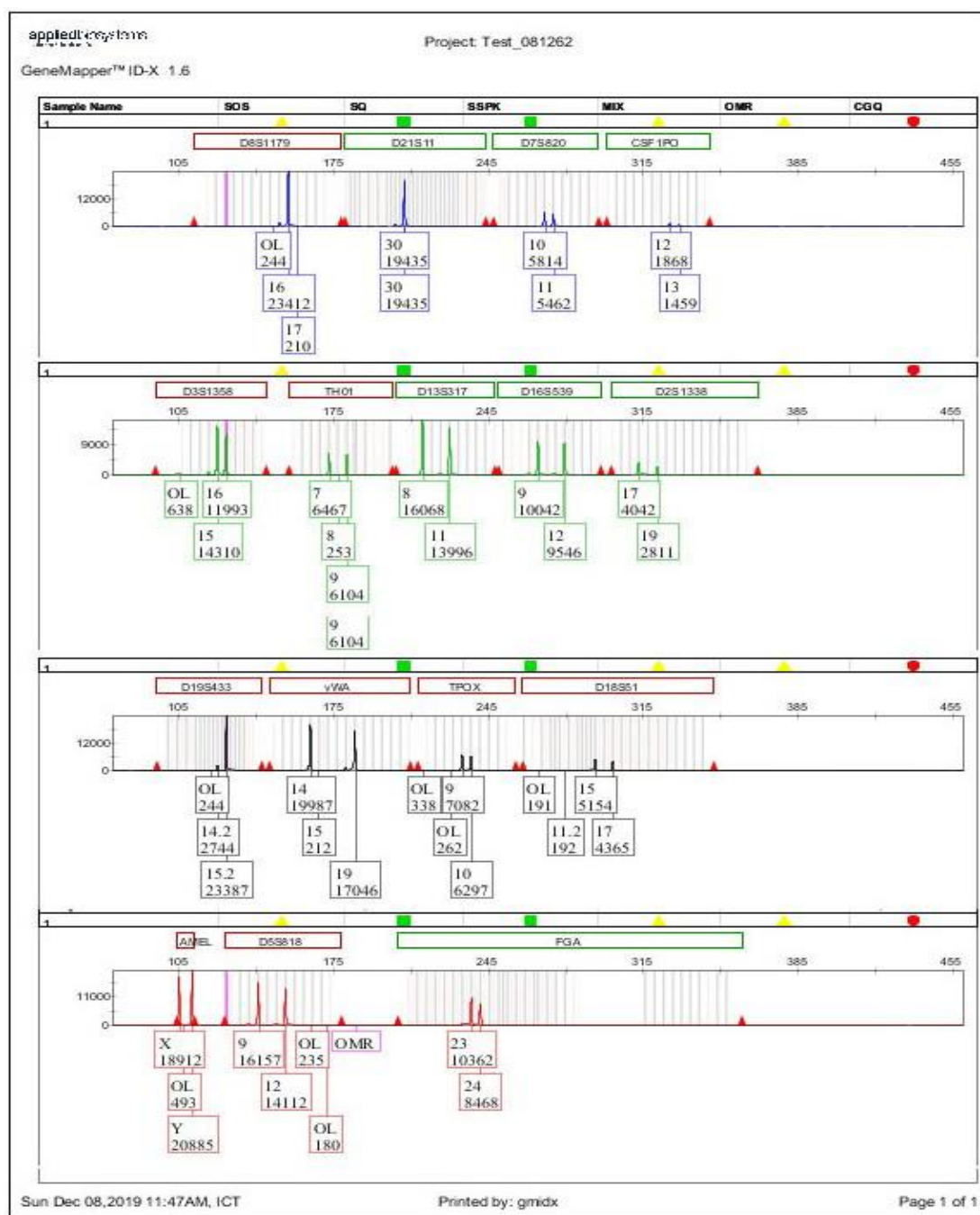
การวิเคราะห์ดีเอ็นเอ นั้น ใช้ดีเอ็นเอที่สังเคราะห์แล้วเพียง 1 ไมโครลิตร จากปริมาตรเต็มสูตรคือ 25 ไมโครลิตร หากการตรวจวิเคราะห์ไม่ได้ผลเช่น มีดีเอ็นเอมากเกินไปจนไม่สามารถอ่านค่าได้ หรือมีดีเอ็นเอน้อยเกินไป เกิดการเสื่อมสภาพของดีเอ็นเอจน allele ขาดหายไปบางตำแหน่ง ทำให้ต้องมีการทำซ้ำใหม่ ซึ่งการลดปริมาณการใช้ PCR mastermix ลงทำให้ลดการสูญเสีย และลดการสิ้นเปลืองการใช้สารเคมีลงสามารถตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างได้มากขึ้น โดยที่ยังให้ผลวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

ใกล้เคียงกับการใช้งานปกติ นอกจากนี้สำหรับห้องปฏิบัติการที่มีงบประมาณจำกัด จะช่วยให้ประหยัดค่าใช้จ่ายและมีงบประมาณเหลือสำหรับซื้ออุปกรณ์อื่น ๆ ได้

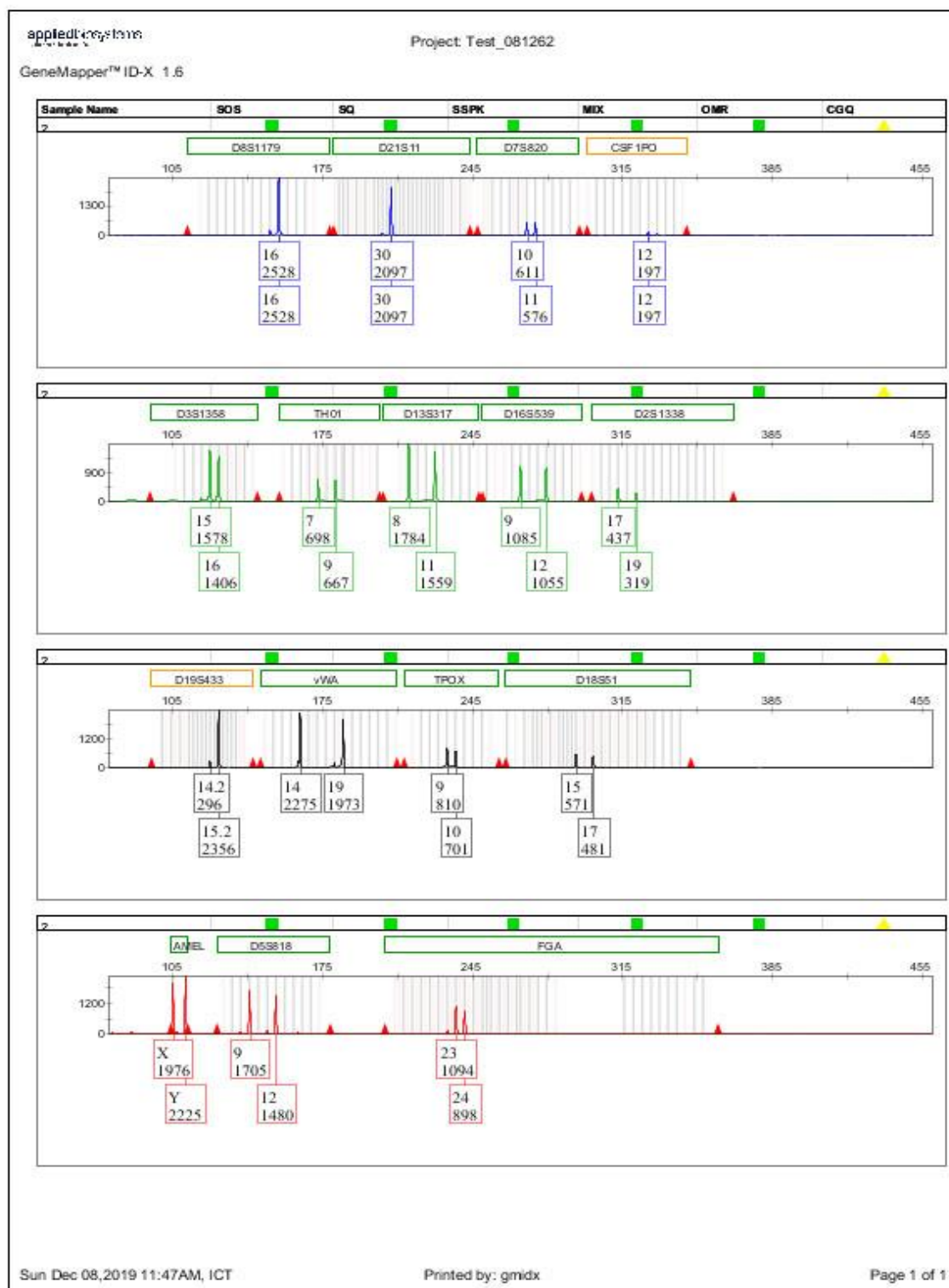
จากสถานการณ์โรคติดเชื้อจากโคโรนาไวรัส หรือ COVID 19 ในปัจจุบัน การตรวจวิเคราะห์หาเชื้อไวรัสโดยใช้ ก้านสำลี swab จากหลังโพรงจมูก และทำการตรวจวิเคราะห์โดยใช้วิธี realtime PCR ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานและได้รับการยอมรับมีความถูกต้องแม่นยำ แต่มีข้อจำกัดที่สำคัญหลายประการคือการจัดเก็บตัวอย่างโดยเจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงานต้องใช้ชุด Personal Protective Equipment (PPE) จึงได้มีการเสนอวิธีการดั้งเดิมคือการเก็บเสมหะจากผู้ที่ต้องการตรวจ ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายไม่สิ้นเปลืองและลดความเสี่ยงของเจ้าหน้าที่

การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี realtime PCR มีข้อจำกัดคือ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ขาดแคลน เมื่อทั่วโลกมีความต้องการใช้งานจึงทำให้มีราคาสูงและขาดตลาด ทำให้การตรวจวิเคราะห์ไม่ทันท่วงที ราคาค่าตรวจที่สูงทำให้ประชาชนทั่วไปไม่สามารถเข้าถึงบริการได้ ซึ่งอาจส่งผลเสียในแง่การป้องกันและควบคุมโรคได้ ดังนั้นการลดขั้นตอนหรือวิธีการปฏิบัติ การประยุกต์ใช้สารเคมีเครื่องมือที่มีอยู่ภายในห้องปฏิบัติการอยู่แล้วหรือมีราคาถูกกว่าแต่ให้ผลได้เทียบเท่าและช่วยลดระยะเวลา ประหยัดทรัพยากร งบประมาณได้ ค่าใช้จ่ายที่ถูกลง วิธีการที่สะดวกขึ้นทำให้ประชาชนมีโอกาสเข้าถึงได้

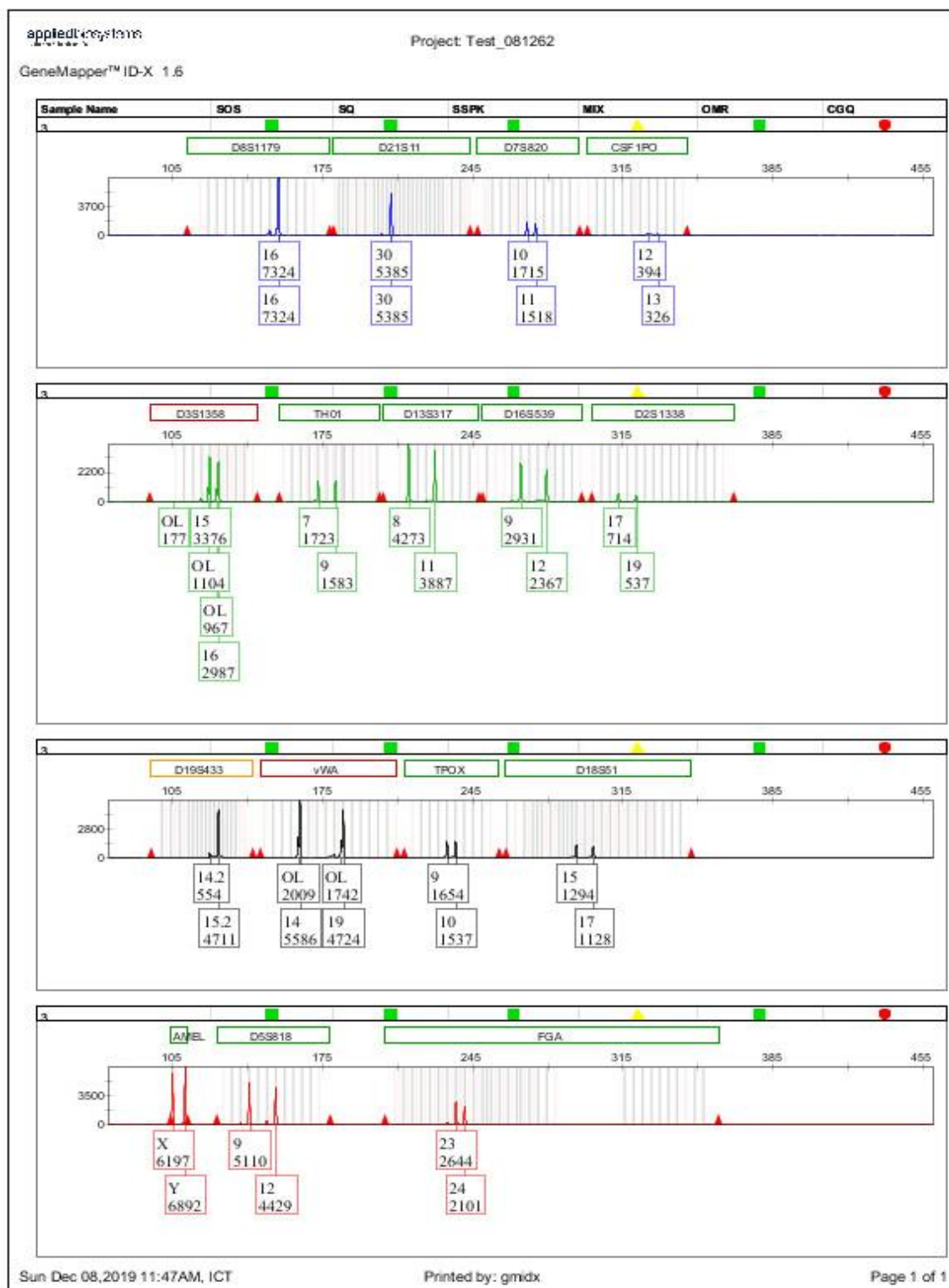
การศึกษานี้ จะต้องทำการมีการศึกษาในจำนวนตัวอย่างที่มากขึ้น ศึกษาการเสื่อมสภาพเมื่อเก็บรักษาในระยะเวลาสั้น และทำการศึกษาตัวอย่างดีเอ็นเอที่เป็นชนิดอื่น เช่น โลหิต เนื้อเยื่อ หรือปลาสมาต่อไป



ภาพที่ 4.6 Electropherogram ของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ 1

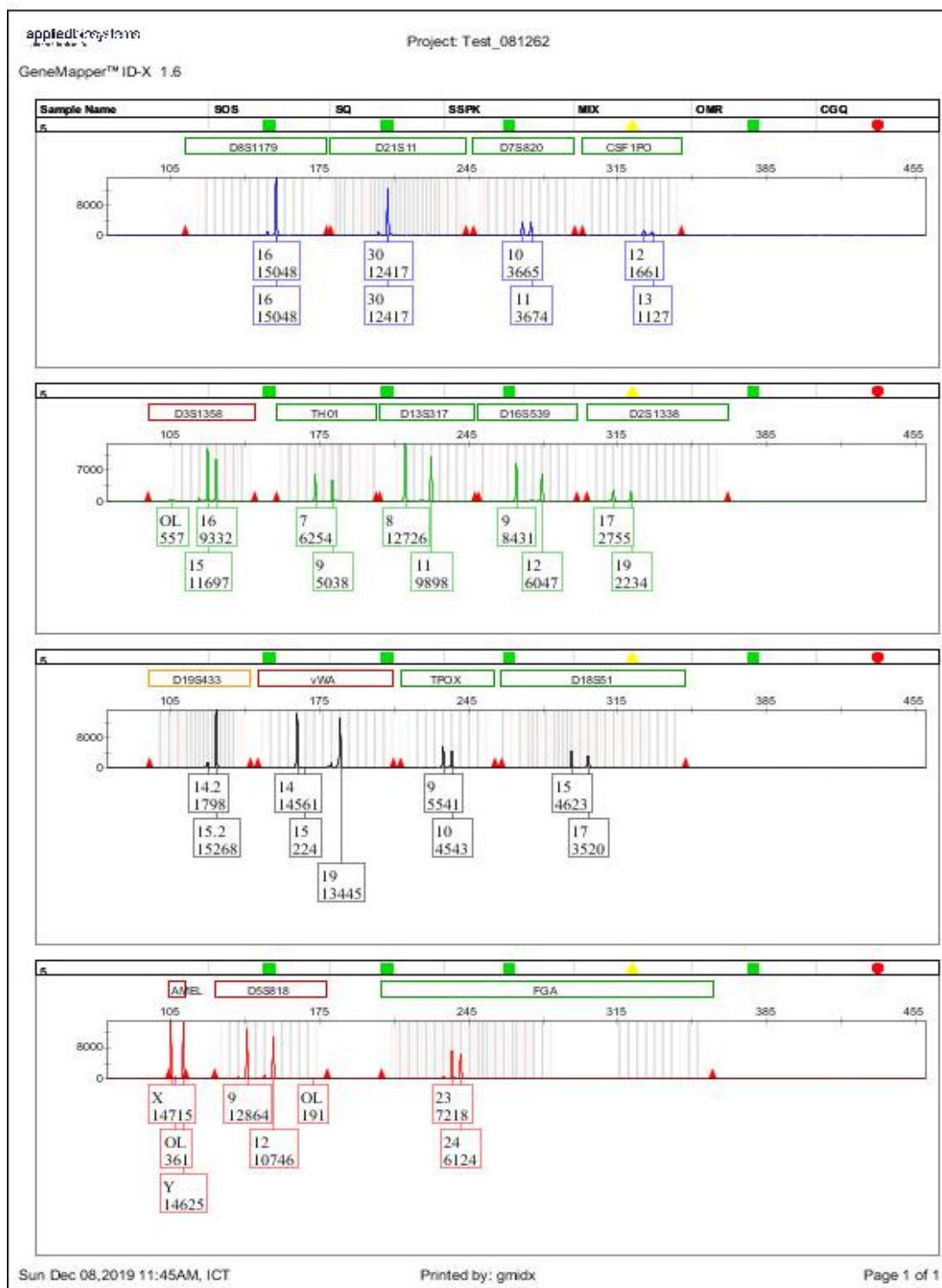


ภาพที่ 4.7 Electropherogram ของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ 2

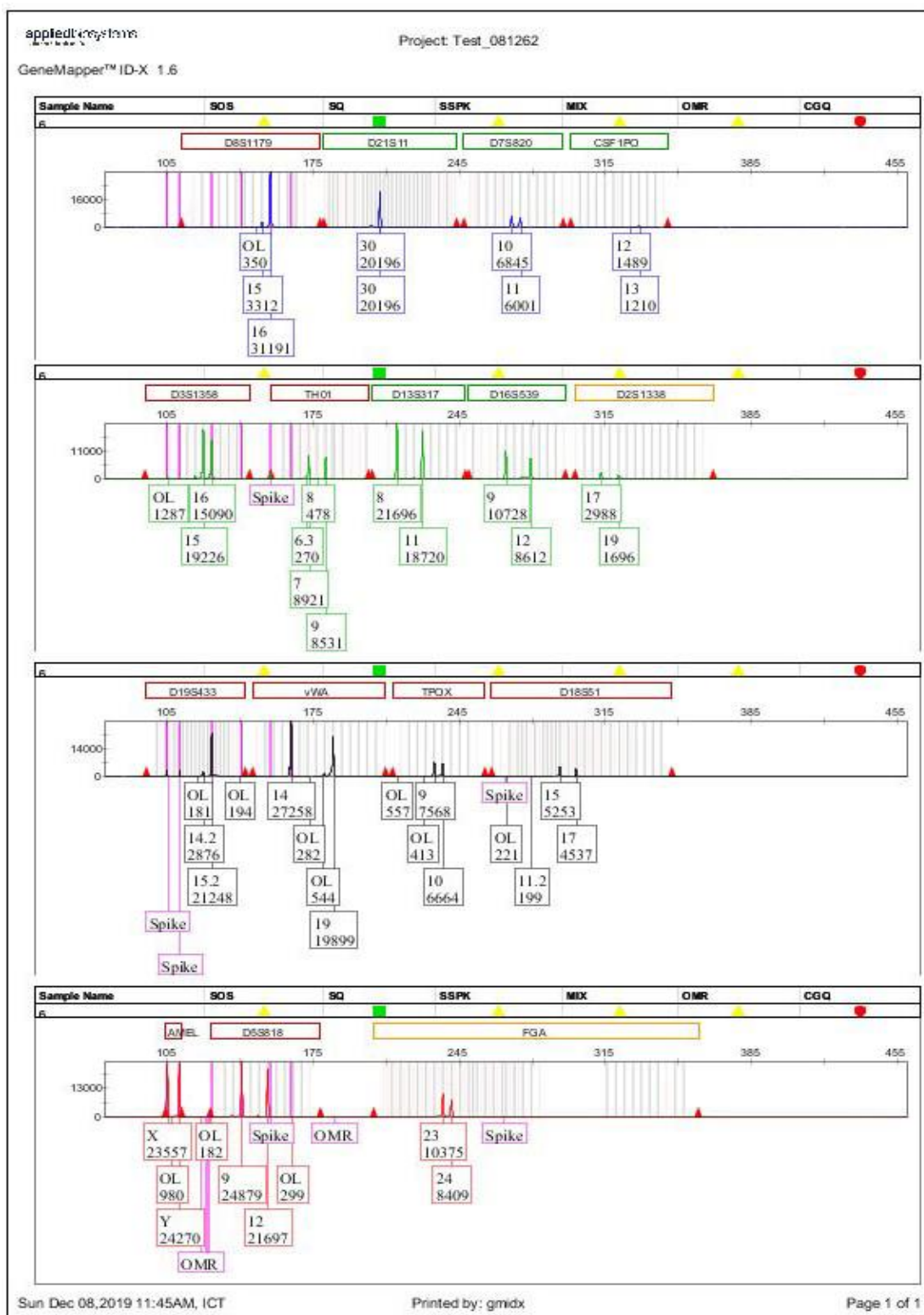


ภาพที่ 4.8 Electropherogram ของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ 3

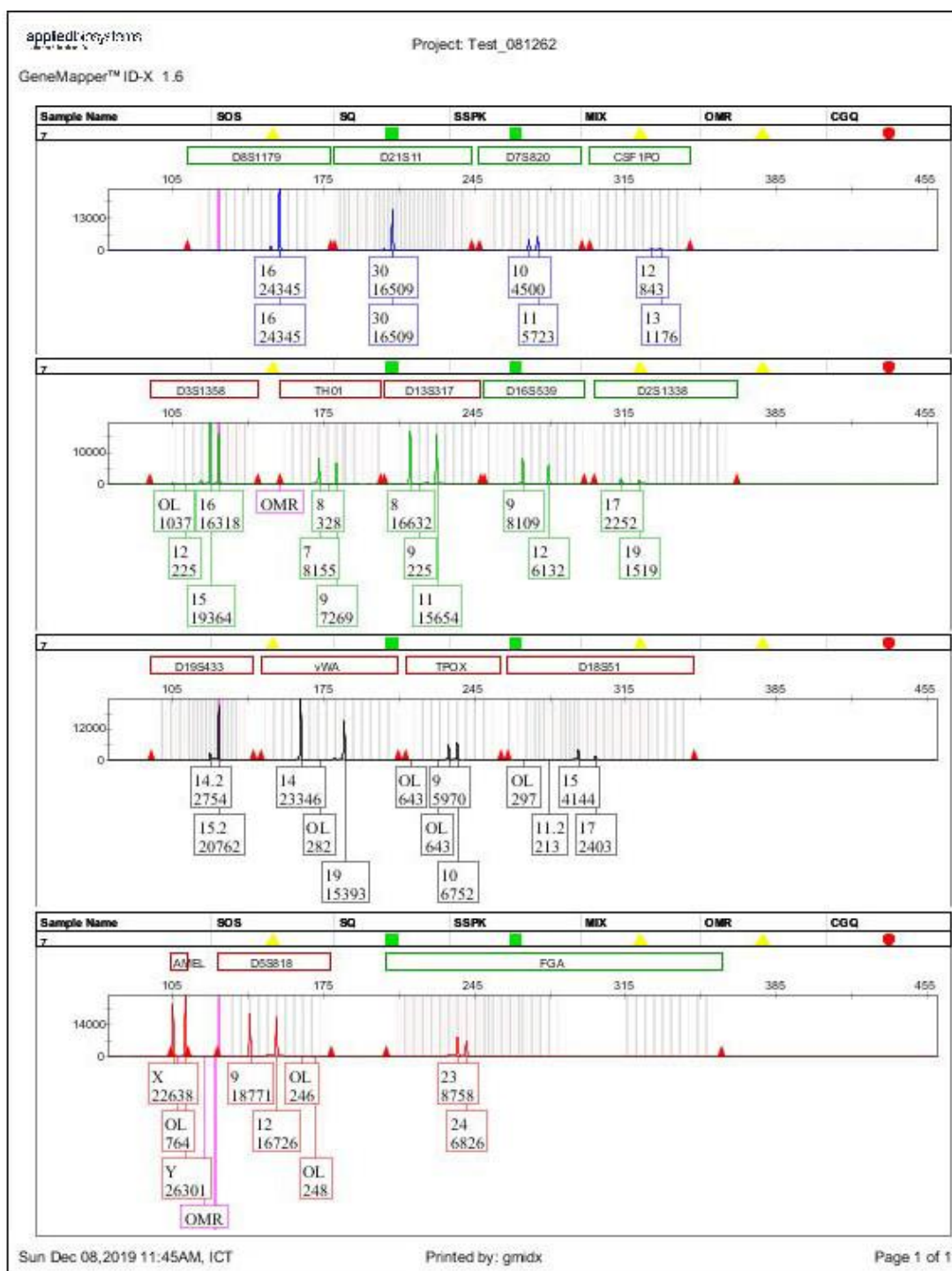
ภาพที่ 4.9 Electrophelogram ของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ 4



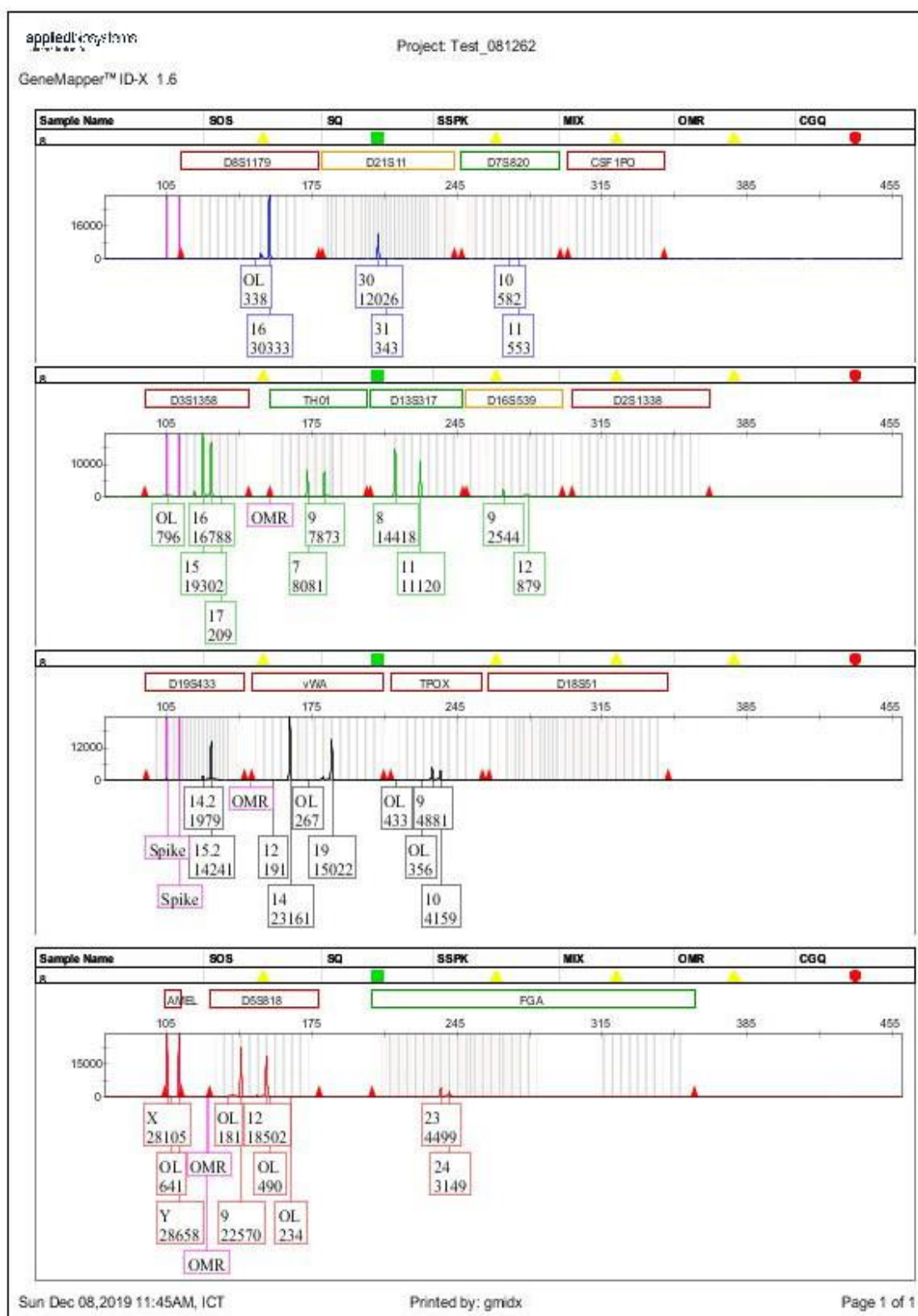
ภาพที่ 4.10 Electropherogram ของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ 5



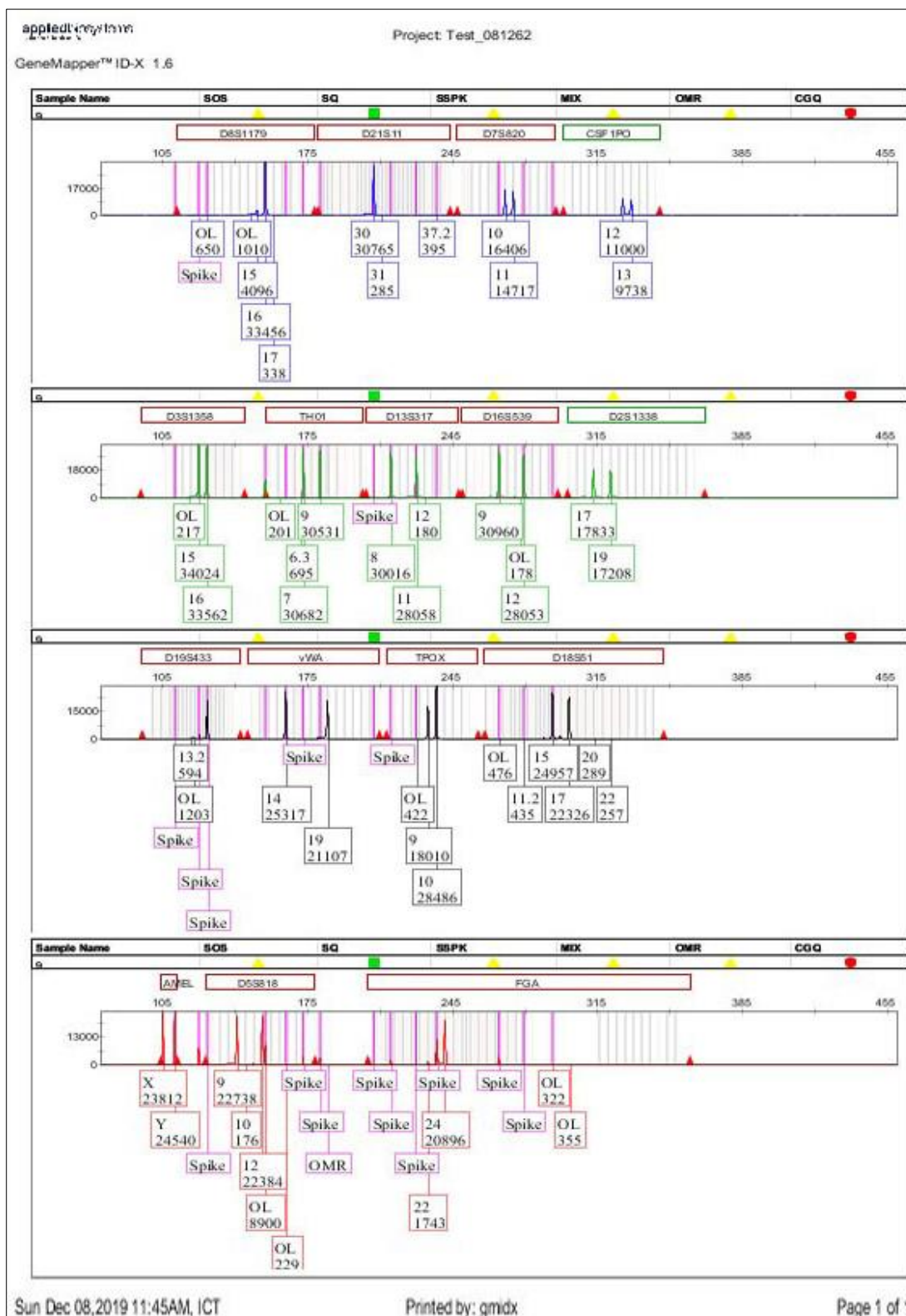
ภาพที่ 4.11 Electrophelogram ของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ 6



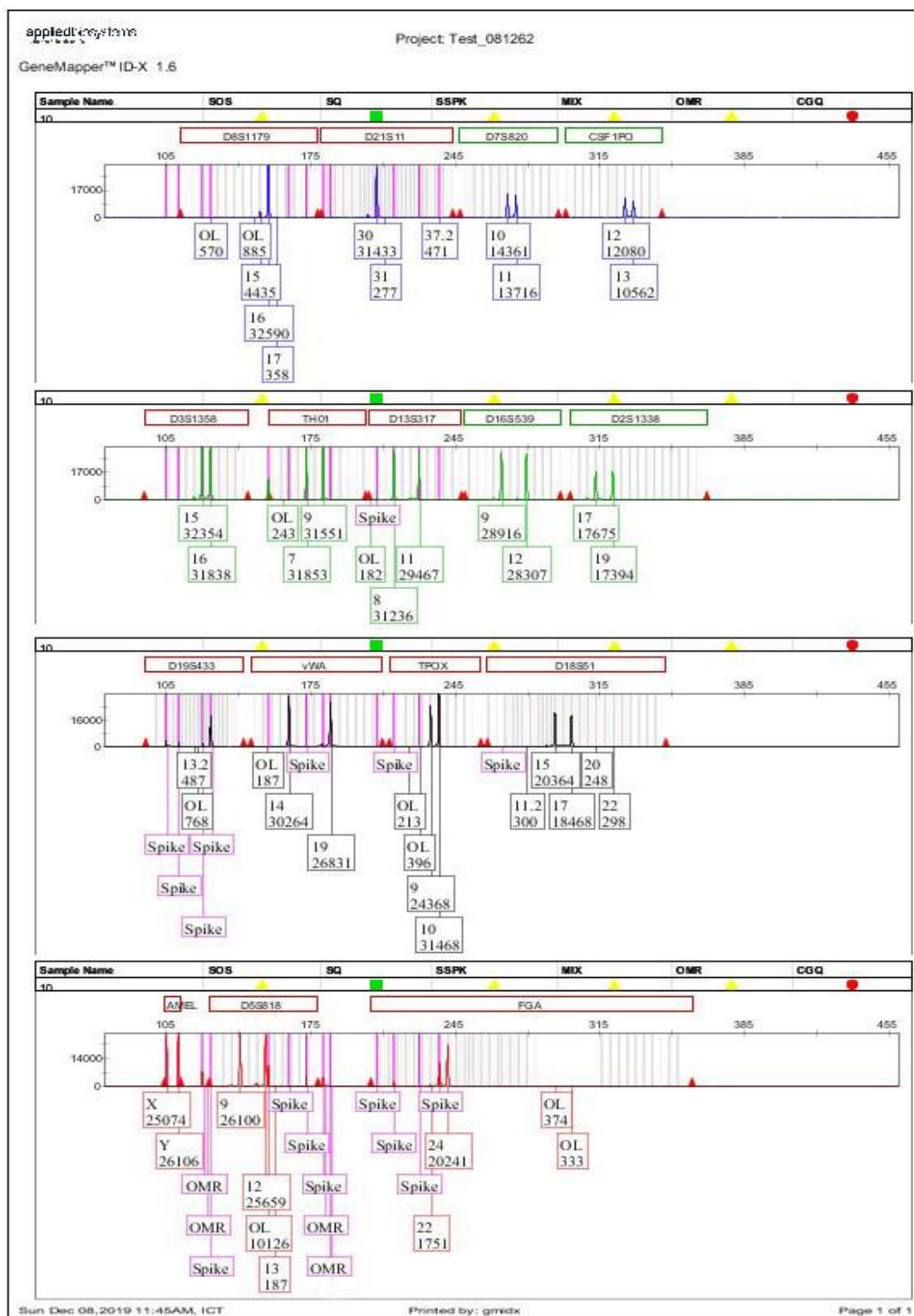
ภาพที่ 4.12 Electropherogram ของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ 7



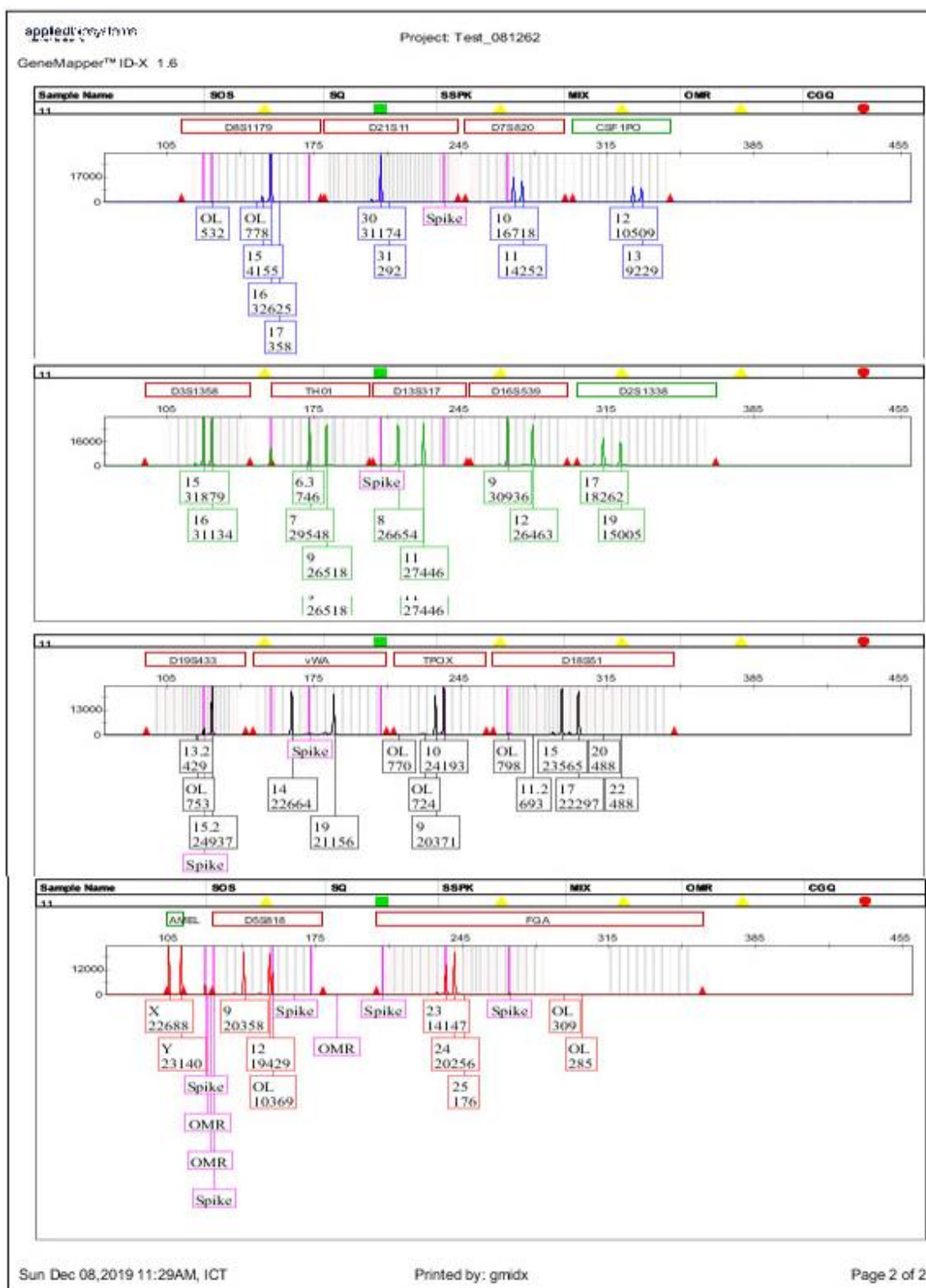
ภาพที่ 4.13 Electropherogram ของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ 8



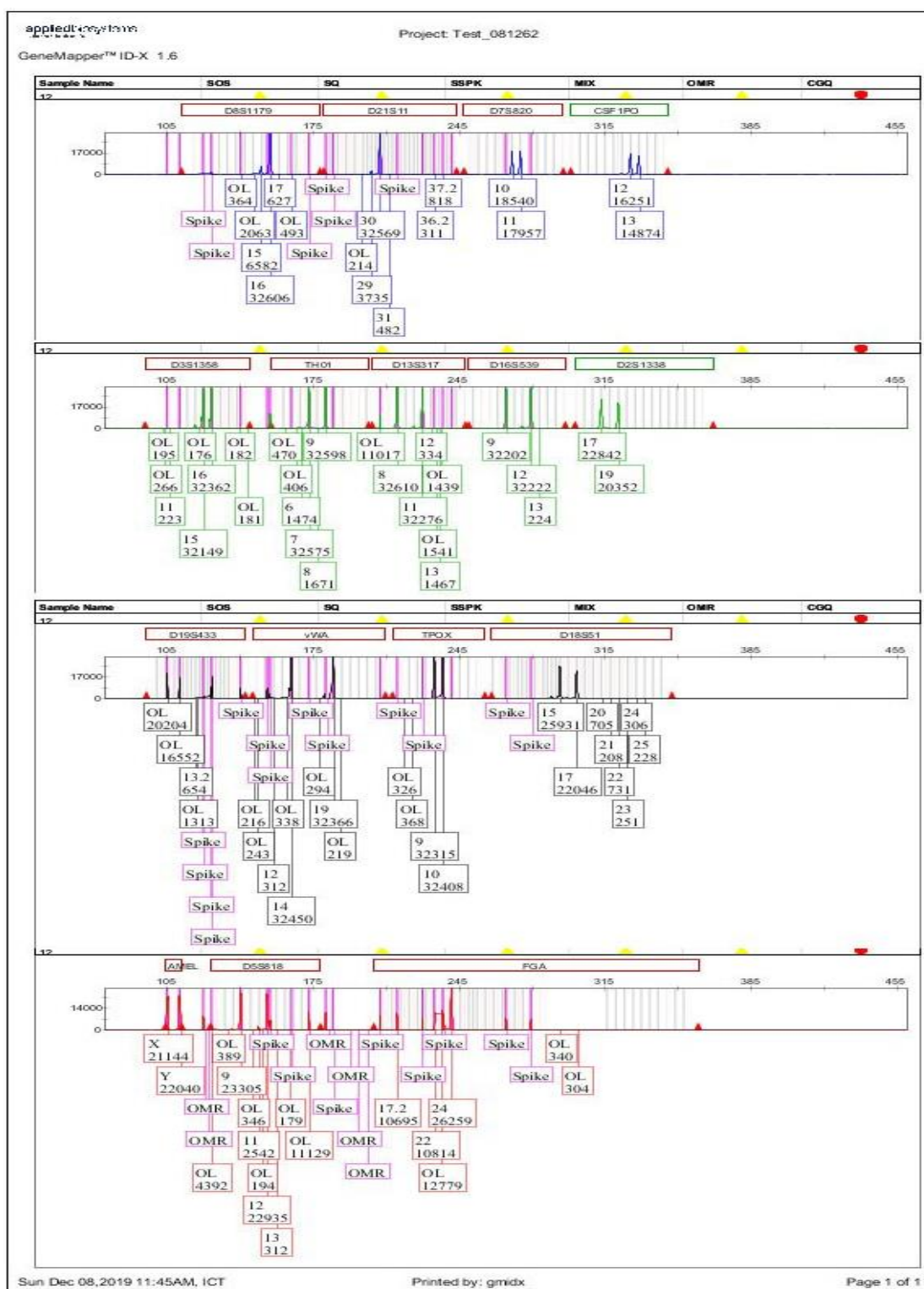
ภาพที่ 4.14 Electropherogram ของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ 9



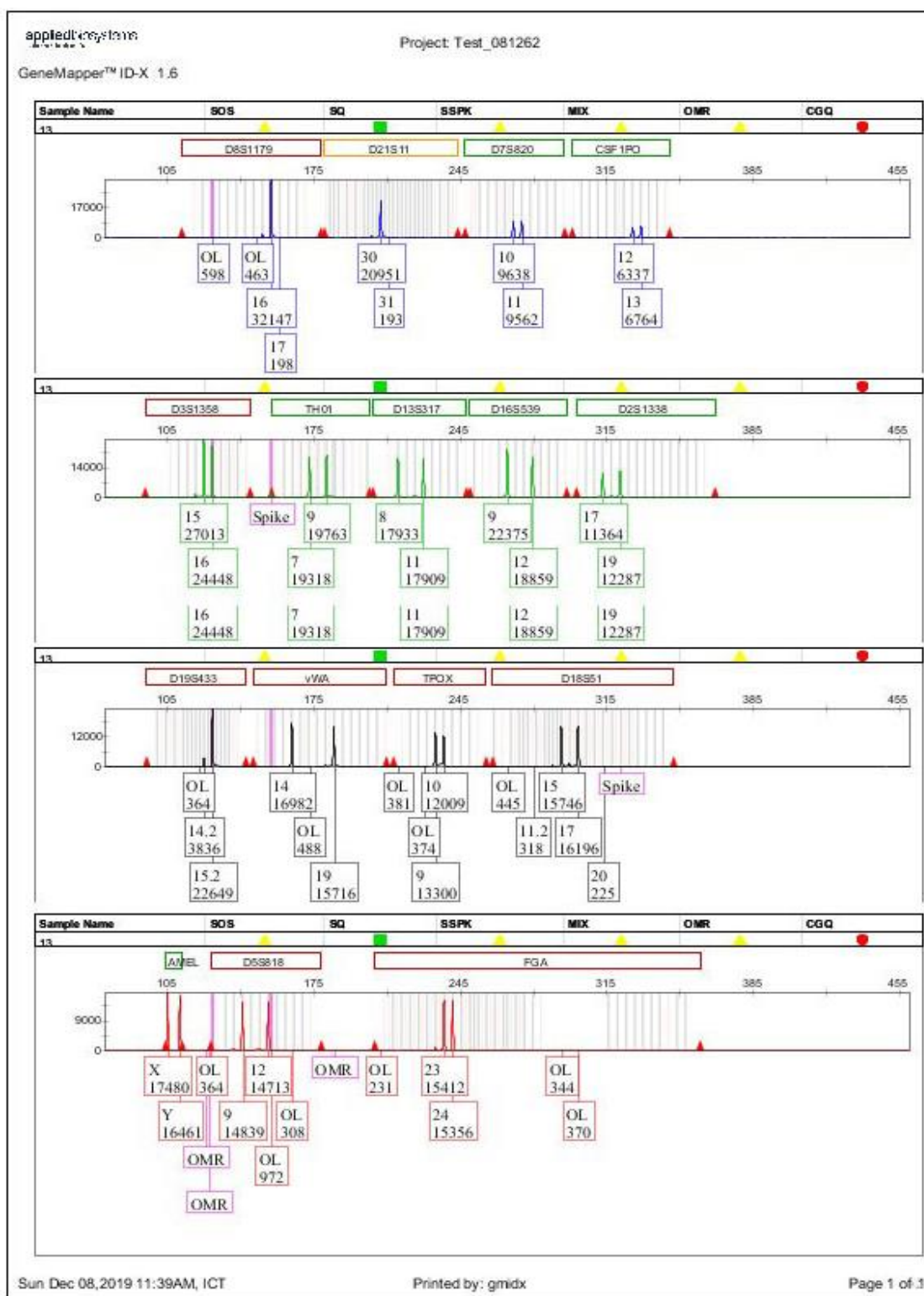
ภาพที่ 4.15 Electropherogram ของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ 10



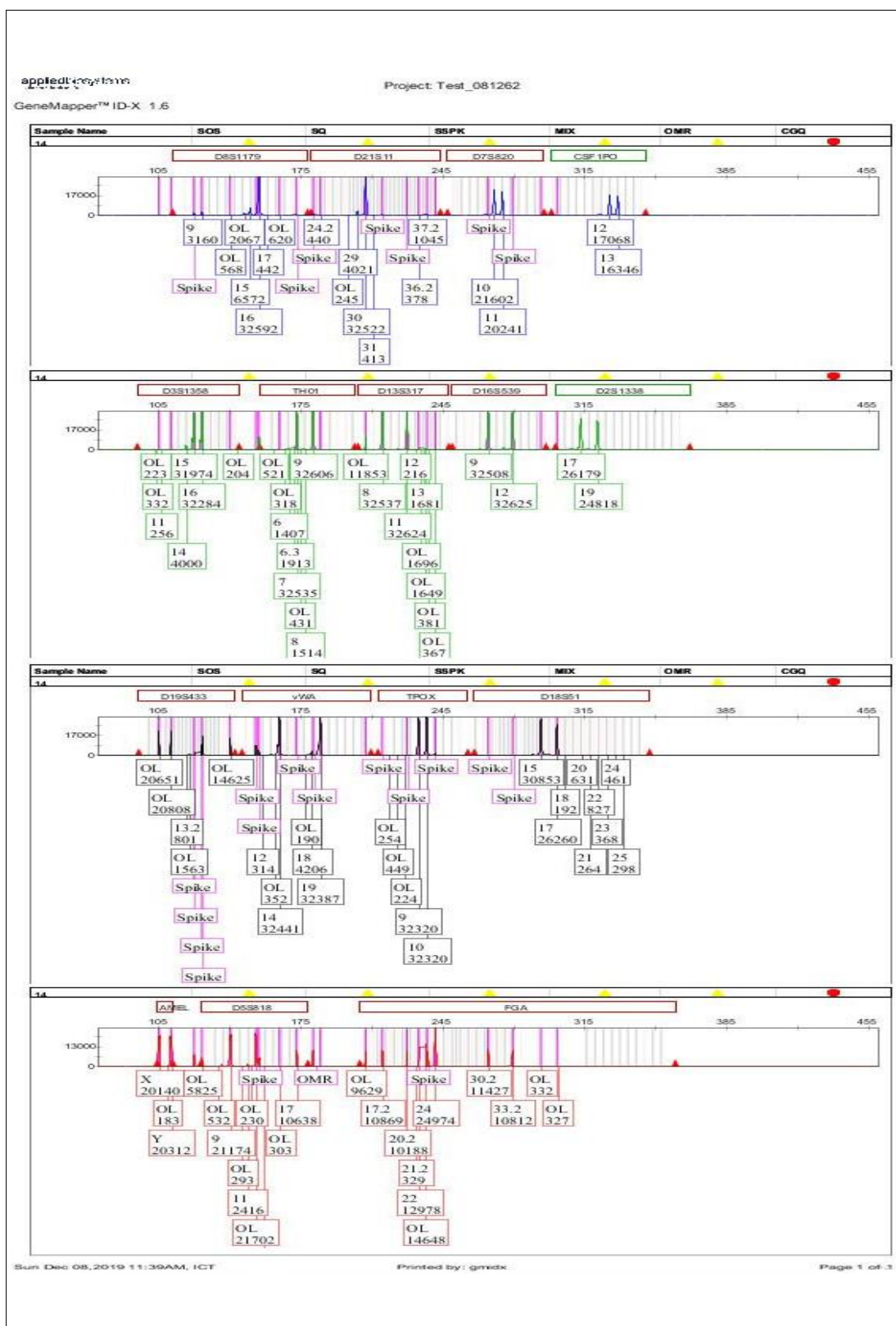
ภาพที่ 4.16 Electrophelogram ของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ 11



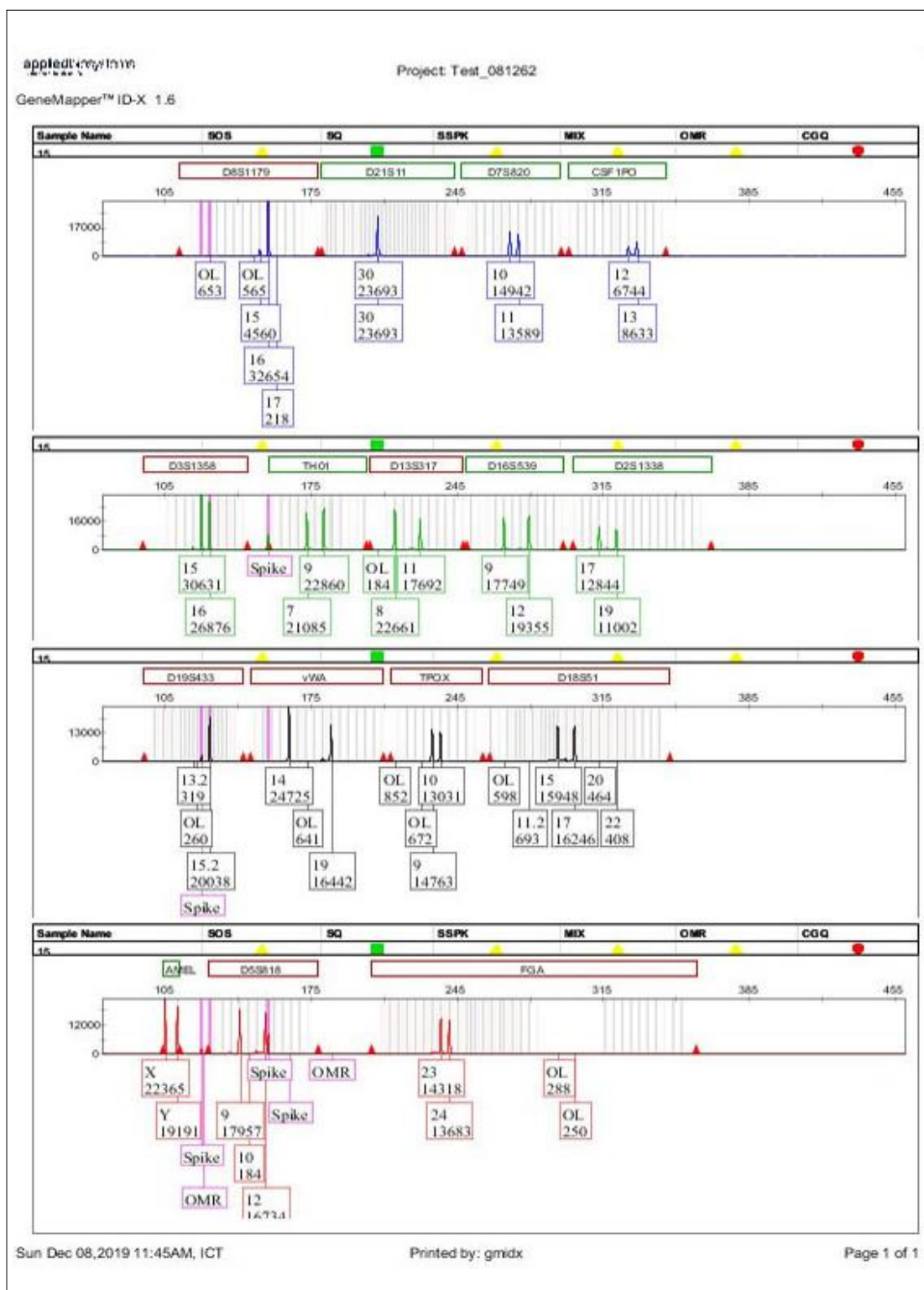
ภาพที่ 4.17 Electropherogram ของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ 12



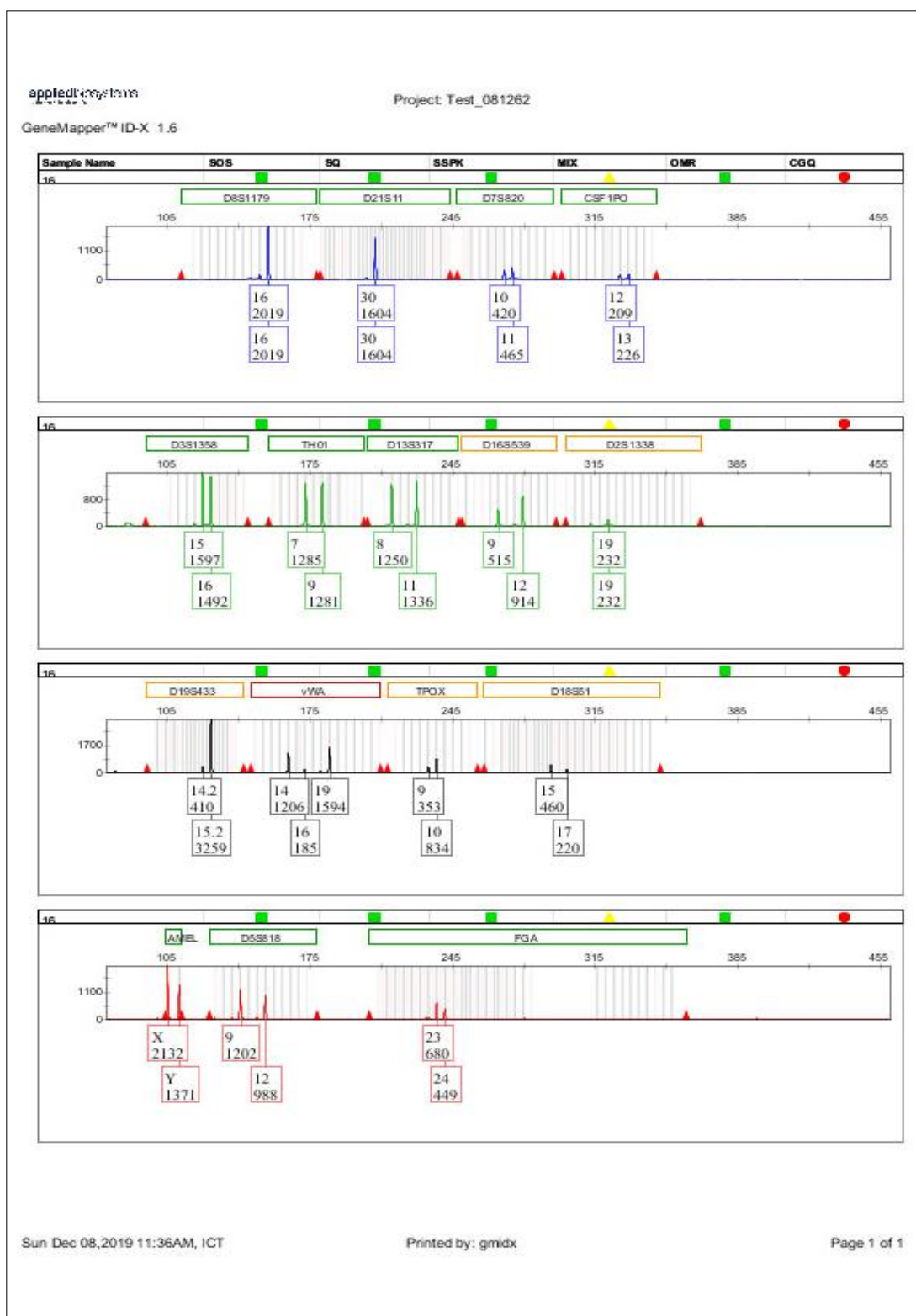
ภาพที่ 4.18 Electropherogram ของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ 13



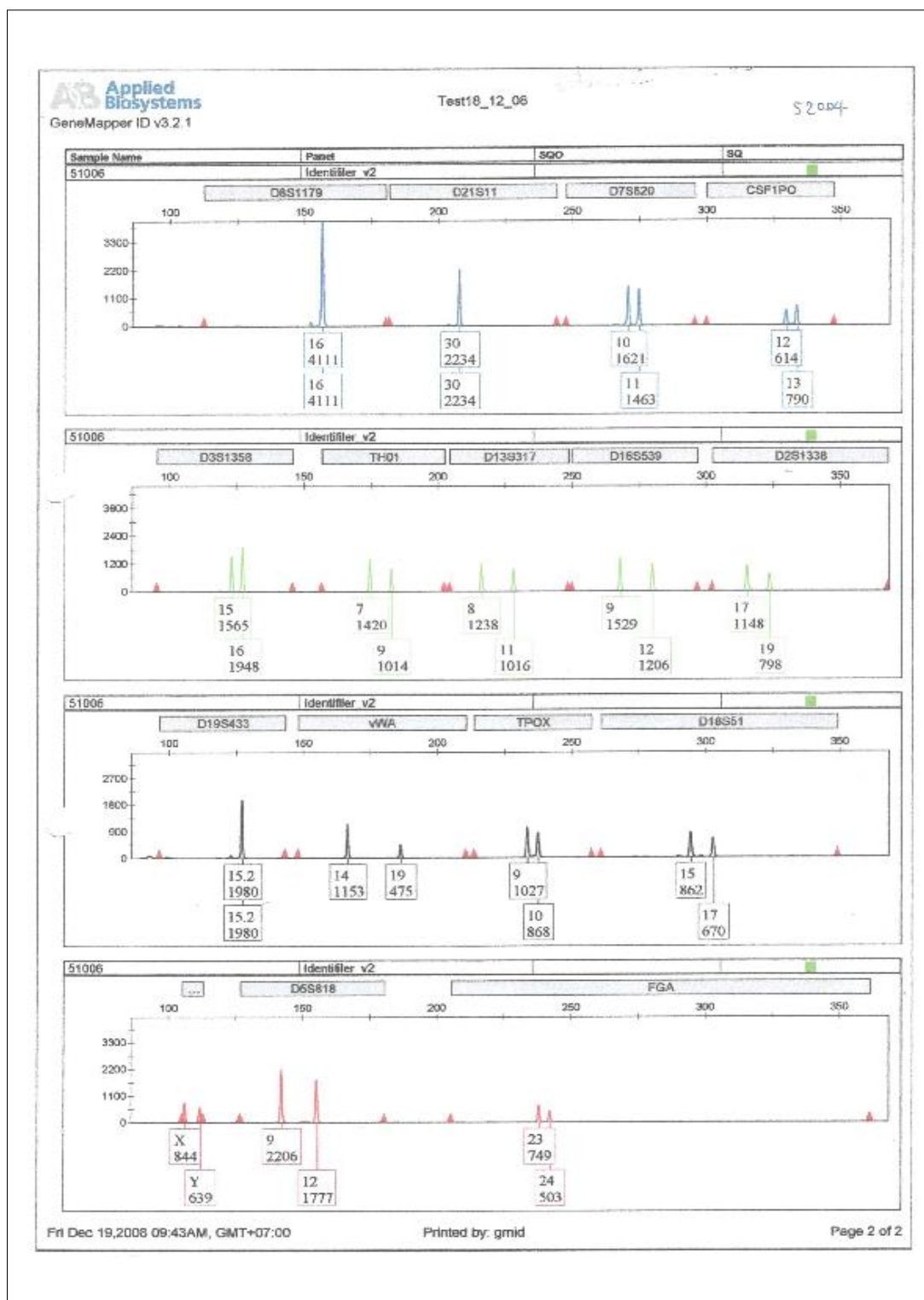
ภาพที่ 4.19 Electropherogram ของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ 14



ภาพที่ 4.20 Electropherogram ของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ 15



ภาพที่ 4.21 Electropherogram ของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ 16



ภาพที่ 4.22 Electropherogram ตัวอย่างดีเอ็นเออ้างอิง

เอกสารอ้างอิง

เอกสารอ้างอิง

- คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสวนดุสิต. (2015). “ฐานข้อมูลความปลอดภัยสารเคมี”, **ข้อเสนอแนะการใช้งาน**. <http://ohs.sci.dusit.ac.th/wp> 2015. เมษายน, 2563.
- ไทยพีบีเอส. (2020). "สถาบันนิติฯ - ราชทัณฑ์ เก็บข้อมูล DNA นักโทษ ป้องกันทำผิดซ้ำ", **เก็บ DNA นักโทษ**. <https://news.thaipbs.or.th/content> 2020. กุมภาพันธ์, 2563.
- พีพีทีวีออนไลน์. (2561). “กรมราชทัณฑ์เตรียมเก็บ DNA นักโทษ ป้องกันการกระทำผิดซ้ำ”, **ประเด็นร้อน**. <https://www.pptvhd36.com/news>. กุมภาพันธ์, 2563.
- โรงพยาบาลรามาริบัติ. (2013). “ขั้นตอนและค่าบริการตรวจ DNA”, **ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์**. <https://med.mahidol.ac.th/patho/th/announcement>. กุมภาพันธ์, 2563.
- มติชน. (2020). “สธ.คิดค้นวิธีหาเชื้อ โควิด-19 ง่าย - รู้ผลเร็ว ชากเสมหะ นำตรวจ RT – pcr ไม่ต้องล้างคอ”, **มติชนออนไลน์**. <https://www.matichon.co.th/local/qualitylife/news>. เมษายน, 2563.
- วิชัย บุญแสง และคณะ. **ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จากสารพันธุกรรมสู่เทคโนโลยีพิสูจน์บุคคล**. กรุงเทพมหานคร: สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2547.
- Allison Holt and et al. “Developmental validation of the Quantifiler® HP and Trio Kits for human DNA quantification in forensic samples”, **Forensic Science International**. 21(8): 453-465; March 2016.
- Applied Biosystems. **AmpF®STR®Identifiler® Plus PCR Amplification Kit User Guide**. Foster City, California: Applied Biosystems, 2009.
- Butler J.M. **Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology**. Academic. Academic Press London: United Kingdom, 2012.
- Butler J.M. (2009). “Fundamentals of Forensic DNA typing”, **Science Direct**. <https://www.elsevier.com/books/fundamentals-of-forensic-dna-typing/butler>. February 2018.
- Cody A. Ruiz et al. “Medical-grade buccal swabs versus drugstore cotton swabs: No difference in DNA yield”, **MethodX**. 5(3): 39-42; January 2018.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Connon CC. and et al. “Validation of Low Volume Fast PCR Amplification of STR Loci for DNA Reference Samples”, **Forensic Leg Investig Sci.** 6(1): DOI:10.24966/FLIS-733X/100008; April, 2016.
- Cavanaugh and Abigail S. Brithrich, “Constructive Ambiguity' or Internal Self-Determinatinon? Self-Determination, Group Accommodation and the Belfast Agreement”, **Fordham International Law Journal.** 2(4): 1345-1371; December, 2018
- Dennis Y.W. and et al. “Direct amplification of STRs from blood or buccal cell Samples”, **Forensic Science International.** 2(10): 113-114; August, 2009.
- Erica L. R. and Peter M. V. “Rapid PCR of STR markers: Applications to human Identification”, **Forensic Science International.** 18(5): 90-99; September 2015.
- FBI. (2017). “Combined DNA Index System (CODIS)”, **Biometric - Analysis** .[https://www.fbi.gov/services/laboratory/biometric - analysis/codis](https://www.fbi.gov/services/laboratory/biometric-analysis/codis). February, 2020.
- Hall and Roy. (2014). “Roy Hall (musician)”, **Wikipedia, the free encyclopedia.** [https://en.wikipedia.org/wiki/Roy_Hall_\(musician\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Roy_Hall_(musician)). March, 2020.
- Lin S.W and et al. “Population data of 23 autosomal STR loci in Hong Kong Chinese”, **Forensic Science International.** 39: 24-25; March, 2019.
- Klitschar M. and Neuhuber, F. “Evaluation of an alkaline lysis method for the extraction of DNA from whole blood and forensic stains for STR analysis”, **Journal of Forensic Sciences.** 3(9): 73-669; January, 2000.
- McKiernan H.E. and Danielson P.B. “Molecular Diagnostic Applications”, **Forensic Science.** 20(1): 371-394; November, 2017.
- Nathan D. Meeker et al. “Method for isolation of PCR-ready genomic DNA from zebrafish tissues”, **BioTechniques.** 5: 610-614; November 2007.
- Promega Corporation. (2019). “DNA IQ™ System - Small Sample Casework Protocol”, [https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical bulletins/101/dna-iq-system-database-protocol.pdf](https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical_bulletins/101/dna-iq-system-database-protocol.pdf). February, 2021.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Romsos and Vallone. “Rapid PCR of STR markers: Applications to human identification”, **Forensic Science International GENETICS**. 18(1): 90-99; September, 2015.
- Rudbeck L and Dissing J. Rapid. “simple alkaline extraction of human genomic DNA from whole blood, buccal epithelial cells, semen and forensic stains for PCR”, **Biotechniques**. 4(12): 90-102; October, 1998.
- Tredoux S, Mfolozi S et al. “Efficiency of Buccal DNA Sampling Device in the Mortuary”, **Forensic Investigation**. 39(5): 150-159; August, 2015.
- Wang and et al. “Convergent estimates of marine nitrogen Fixation”, **Journal Nature**. 5(6): 205–211; February, 2012.
- William Goodwin and el al. **An Introduction to Forensic Genetics**. 2nd ed. Singapore: WILEY, 2007.

ภาคผนวก

Experiment Results Report

Test_051062T

Experiment Summary

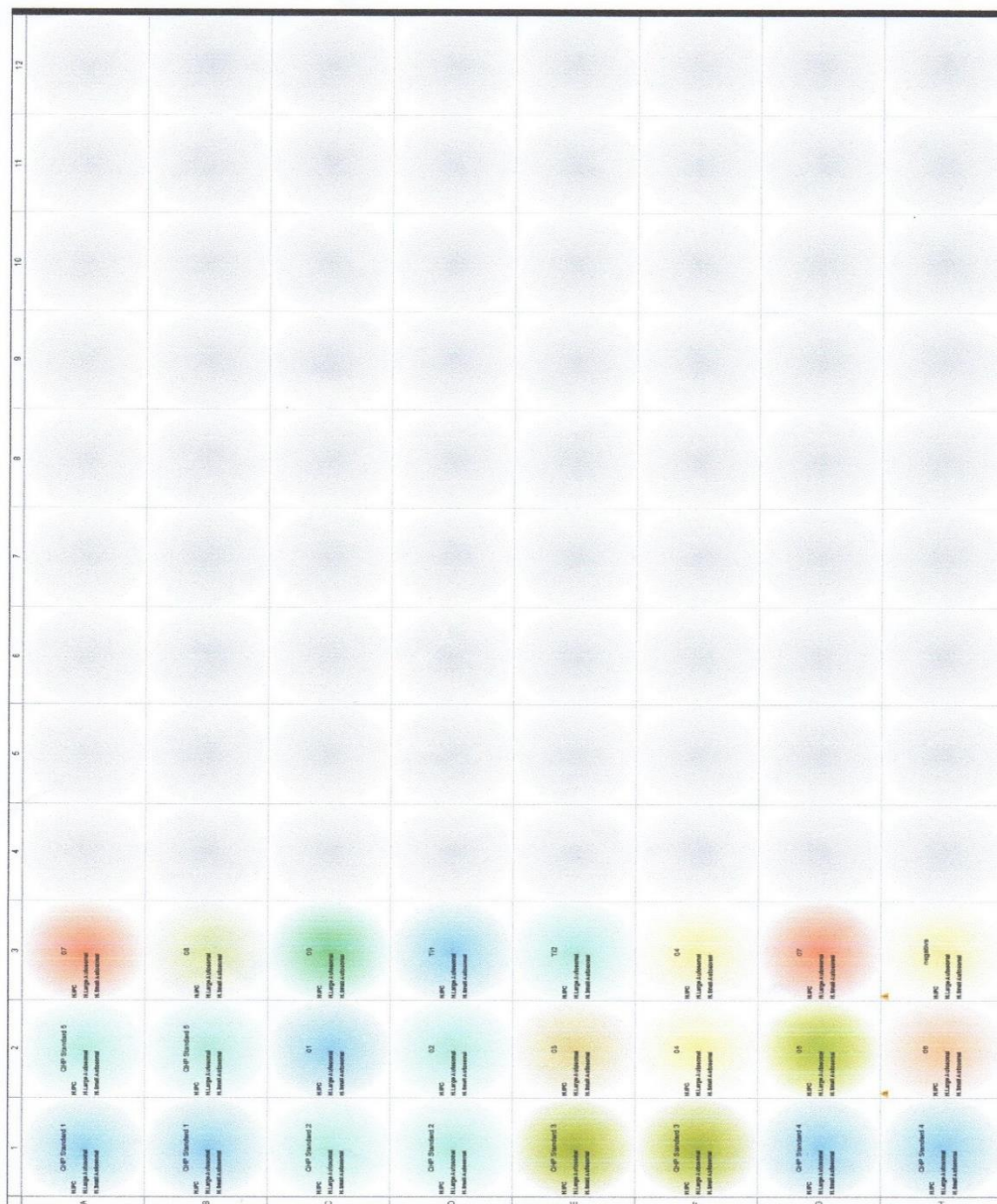
Experiment Name	:Test_051062T
Experiment Type	:Quantitation - HID Standard Curve
Kit Name	:Quantifiler Human Plus
File Name	:Test_051062T.eds
Run Started	:2019 Oct 06 12:37:10 PM
Run Finished	:2019 Oct 06 1:37:34 PM
Run Duration	:60 minutes 23 seconds
Date Modified	:2019 Oct 06 12:37:09 PM
User	:
Number of wells used	:24
Number of wells with results	:24
Instrument Name	:7500
Instrument Type	:Applied Biosystems 7500 Instrument
Comments	:

Experiment: Test_051062T

Experiment Results Report

Applied Biosystems 7500
Instrument

Plate Layout



User:7500

2

Printed:2019 Oct 06 2:07:31 PM

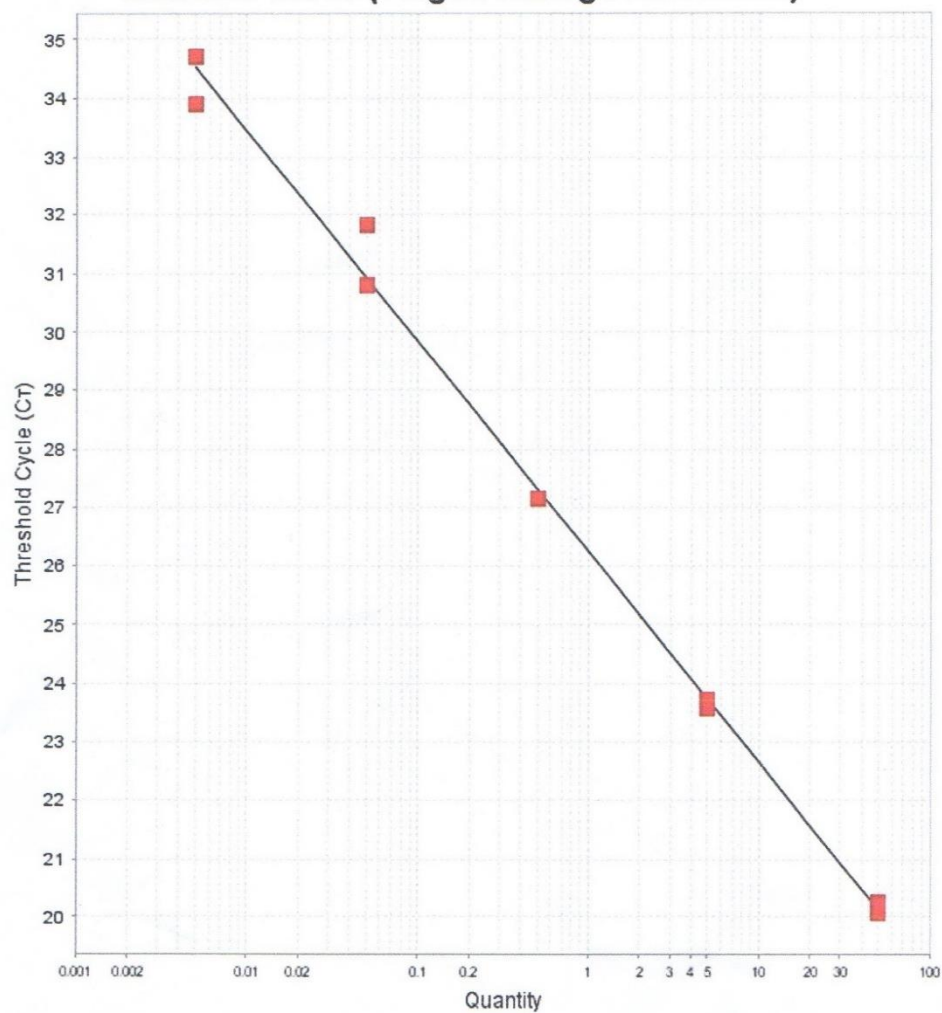
Experiment: Test_051062T

Experiment Results Report

Applied Biosystems 7500
Instrument

Standard Curve

Standard Curve (Target: H.Large Autosomal)



Legend

Standard

slope: -3.595

Y-Intercept: 26.242

 $R^2: 0.995$

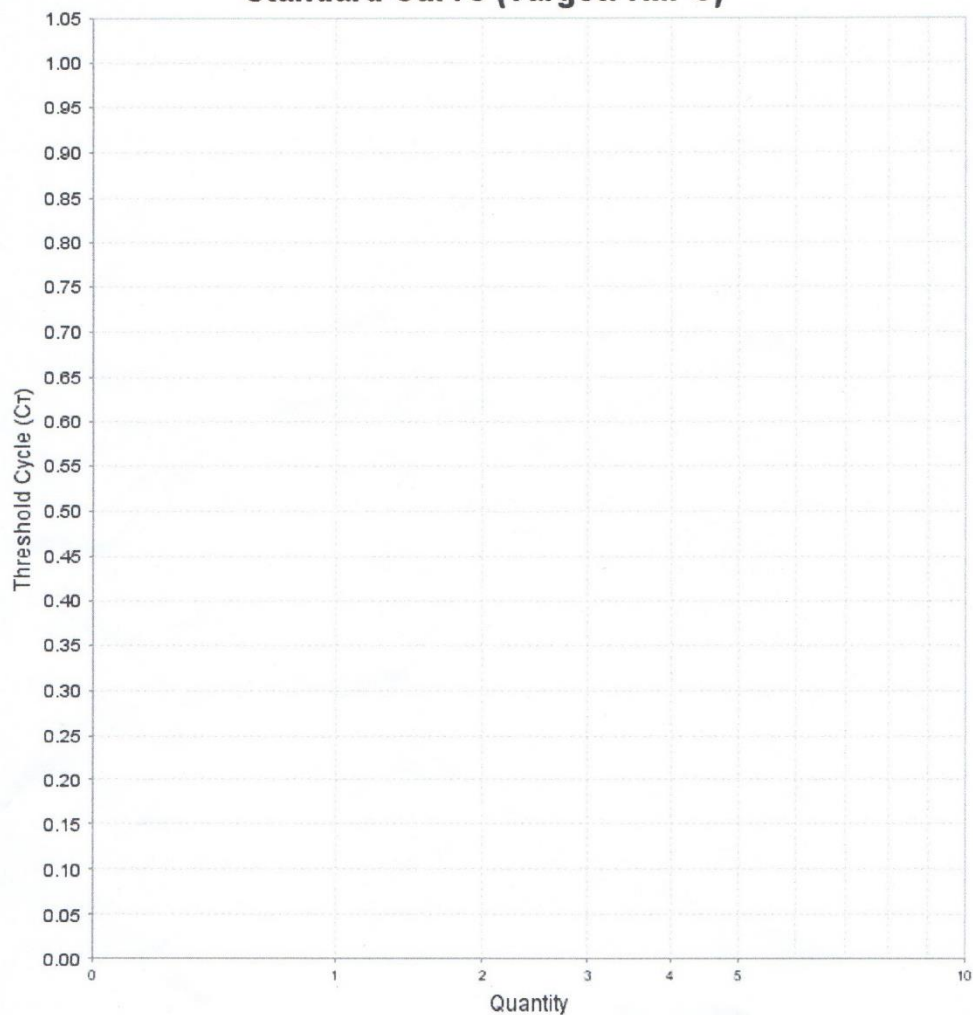
User: 7500

3

Printed: 2019 Oct 06 2:07:31 PM

Experiment: Test_051062T

Experiment Results Report

Applied Biosystems 7500
Instrument**Standard Curve (Target: H.IPC)**

Legend

 Standard

slope:

Y-Intercept:

R²:

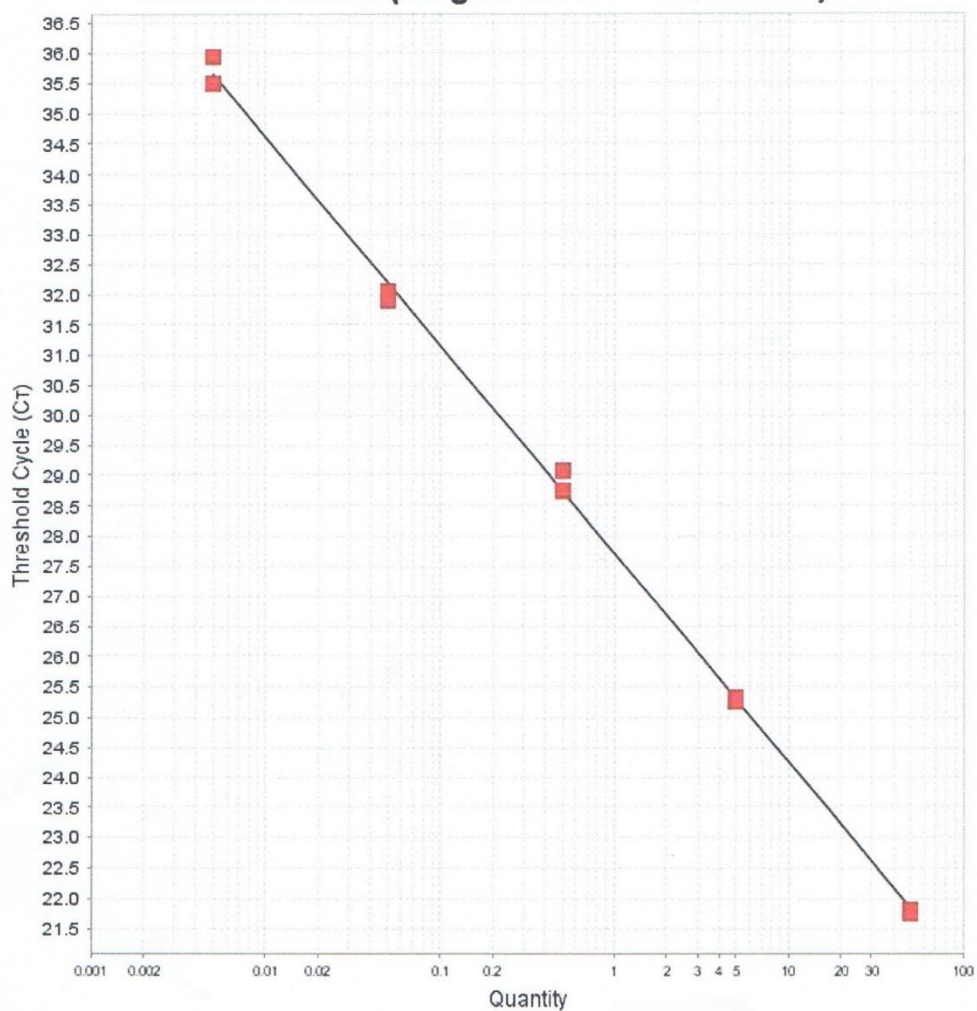
User: 7500

4

Printed: 2019 Oct 06 2:07:31 PM

Experiment: Test_051062T

Experiment Results Report

Applied Biosystems 7500
Instrument**Standard Curve (Target: H.Small Autosomal)**

slope:-3.453

Y-Intercept:27.698

R²:0.998

Experiment: Test_051062T

Experiment Results Report

Applied Biosystems 7500
Instrument

Well	Sample	Target	Task	Quantity	Quantity (Mean)	Quantity (Std Dev)	C _T	C _T (Mean)	C _T (Std Dev)
C3	09	H.Large Autosomal	Unk	1.1638	1.16	□	26.005	26.00	□
C3	09	H.Small Autosomal	Unk	0.9253	0.93	□	27.8146	27.81	□
D1	QHP Standard 2	H.IPC	Unk				28.0996	28.07	0.05
D1	QHP Standard 2	H.Large Autosomal	Std	5	□	□	23.5729	23.65	0.11
D1	QHP Standard 2	H.Small Autosomal	Std	5	□	□	25.2578	25.30	0.06
D2	02	H.IPC	Unk				28.579	28.58	□
D2	02	H.Large Autosomal	Unk	0.0277	0.03	□	31.8408	31.84	□
D2	02	H.Small Autosomal	Unk	0.0341	0.03	□	32.762	32.76	□
D3	Ti1	H.IPC	Unk				27.8945	27.89	□
D3	Ti1	H.Large Autosomal	Unk	0.987	0.99	□	26.2623	26.26	□
D3	Ti1	H.Small Autosomal	Unk	0.7847	0.78	□	28.0618	28.06	□
E1	QHP Standard 3	H.IPC	Unk				28.142	28.17	0.04
E1	QHP Standard 3	H.Large Autosomal	Std	0.5	□	□	27.1711	27.17	0.00
E1	QHP Standard 3	H.Small Autosomal	Std	0.5	□	□	29.0843	28.92	0.24
E2	03	H.IPC	Unk				28.5243	28.52	□
E2	03	H.Large Autosomal	Unk	0.0541	0.05	□	30.7955	30.80	□
E2	03	H.Small Autosomal	Unk	0.0407	0.04	□	32.5	32.50	□
E3	Ti2	H.IPC	Unk				26.6293	26.63	□
E3	Ti2	H.Large Autosomal	Unk	2.1588	2.16	□	25.0403	25.04	□
E3	Ti2	H.Small Autosomal	Unk	2.5564	2.56	□	26.2908	26.29	□
F1	QHP Standard 3	H.IPC	Unk				28.1962	28.17	0.04
F1	QHP Standard 3	H.Large Autosomal	Std	0.5	□	□	27.1654	27.17	0.00
F1	QHP Standard 3	H.Small Autosomal	Std	0.5	□	□	28.7518	28.92	0.24
F2	04	H.IPC	Unk				28.586	28.20	0.55
F2	04	H.Large Autosomal	Unk	0.0608	0.04	0.02	30.6127	31.24	0.89
F2	04	H.Small Autosomal	Unk	0.0529	0.04	0.02	32.1049	32.55	0.62

User:7500

7

Printed:2019 Oct 06 2:07:31 PM



มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
หนังสือฉบับนี้ให้ไว้เพื่อแสดงว่า

ชื่อข้อเสนอการวิจัย ภาษาไทย	การศึกษาประสิทธิภาพของการจัดเก็บตัวอย่างเซลล์เยื่อบุ กระพุ้งแก้มด้วยก้านสำลีสำหรับการเพิ่มปริมาณพีซีอาร์โดยตรง เพื่อการทดสอบเอกลักษณ์บุคคลโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ
ชื่อข้อเสนอการวิจัย ภาษาอังกฤษ	STUDY OF EFFICIENCY EPITHELIAL CELL SAMPLING USING COTTON SWAB FOR DIRECT PCR AND HUMAN IDENTIFICATION DNA TESTING.
รหัสข้อเสนอการวิจัย	UBU – REC – 30 / 2562
สังกัด	คณะวิทยาศาสตร์
ผู้วิจัยหลัก	นายวิทยา วงษ์ตรี
หมายเลขใบรับรอง	UBU – REC – 30 / 2562
วันที่ให้ใบรับรอง	11 กันยายน 2562
วันหมดอายุใบรับรอง	12 กันยายน 2563

ข้อเสนอการวิจัยดังกล่าวนี้ ได้รับการพิจารณาจากคณะกรรมการ
จริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีแล้ว คณะกรรมการฯ มีความเห็นว่า ข้อเสนอการ
วิจัยที่จะดำเนินการ มีความสอดคล้องกับหลักจริยธรรมสากล ตลอดจนกฎหมาย ข้อบังคับและข้อกำหนด
ภายในประเทศ จึงเห็นสมควรให้ดำเนินการวิจัยตามข้อเสนอการวิจัยนี้ได้

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์รองเล็ก คุณวรดิษฐ์)
ประธานคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

11 ก.ย. 2562

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ	นายวิทยา วงษ์ตรี
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2544-2547, มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา
ประวัติการทำงาน	พ.ศ. 2549-ปัจจุบัน กลุ่มงานตรวจชีววิทยา และดีเอ็นเอ ศูนย์พิสูจน์หลักฐาน 3
ตำแหน่ง	นักวิทยาศาสตร์ (สบ 2)
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	กลุ่มงานตรวจชีววิทยา และดีเอ็นเอ ศูนย์พิสูจน์หลักฐาน 3 อำเภอเมืองนครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา