



การศึกษาเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter จากผลการตรวจดีเอ็นเอ
ของวัตถุพยานทางชีววิทยาที่เก็บจากตัวบุคคล

โดย

ร้อยตำรวจโทหญิงศิรินทิพย์ พลชา

การค้นคว้าอิสระนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2551
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การศึกษาเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter จากผลการตรวจดีเอ็นเอ
ของวัตถุพยานทางชีววิทยาที่เก็บจากตัวบุคคล

โดย

ร้อยตำรวจโทหญิงศิรินทิพย์ พลชา

การค้นคว้าอิสระนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2551
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

STUTTER HEIGHT PERCENTAGE STUDIES ON DNA PROFILE FROM BIOLOGICAL
EVIDENCE OF ONE CONTRIBUTOR

By
Sirinthip Ponsa

An Independent Study Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree
MASTER OF SCIENCE
Program of Forensic Science
Graduate School
SILPAKORN UNIVERSITY
2008

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร อนุมัติให้การค้นคว้าอิสระเรื่อง “ การศึกษา
เปอร์เซ็นต์ความสูง stutter จากผลการตรวจดีเอ็นเอของวัตถุพยานทางชีววิทยาที่เก็บจากตัว
บุคคล ” เสนอโดย ร้อยตำรวจโทหญิงศิรินทิพย์ พลซา เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริชัย ชินะตั้งกูร)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่.....เดือน..... พ.ศ.....

อาจารย์ที่ปรึกษาการค้นคว้าอิสระ

รองศาสตราจารย์พันตำรวจเอกหญิง ดร.พัชรา สิ้นลอยมา

คณะกรรมการตรวจสอบการค้นคว้าอิสระ

..... ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์พันตำรวจเอกนายแพทย์อุทัย ตีระวินท)

...../...../.....

..... กรรมการ

(พันตำรวจโทหญิง ดร.สมวดี ไชยเวช)

...../...../.....

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์พันตำรวจเอกหญิง ดร.พัชรา สิ้นลอยมา)

...../...../.....

50312329 : สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

คำสำคัญ : ดีเอ็นเอ/stutter/ โลกัส/อัลลีล

ศิรินทิพย์ พลซา : การศึกษาเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter จากผลการตรวจดีเอ็นเอของ วัตถุพยานทางชีววิทยาที่เก็บจากตัวบุคคล. อาจารย์ที่ปรึกษาการค้นคว้าอิสระ : รศ.พ.ต.อ.หญิง ดร.พัชรา สิ้นลอยมา. 93 หน้า.

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ 1) เพื่อศึกษาเปอร์เซ็นต์ความสูงของ stutter จากผลการตรวจดีเอ็นเอของวัตถุพยานที่เก็บจากตัวบุคคล และเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ในคู่มือเครื่อง Applied Biosystem 2) เพื่อศึกษาค่า peak height ของเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter สูงสุดของแต่ละโลกัสที่ทำการตรวจพิสูจน์ โดยใช้วิธีดำเนินการวิจัยจากการศึกษา stutter ของบุคคลที่มีจำนวนเบสซ้ำน้อยกว่าอัลลีลจริง 1 ซ้ำ จำนวน 100 profile ใน 48 คดีที่ส่งให้กองพิสูจน์หลักฐาน สำนักงานตำรวจแห่งชาติ ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2551 ถึงเดือนมกราคม 2552 และวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องตรวจดีเอ็นเออัตโนมัติ ยี่ห้อ Applied Biosystem รุ่น 3130XL

ผลการวิจัยพบว่าใน 100 profile มี stutter มากที่สุดที่โลกัส D19S433 จำนวน 127 อัลลีล พบเปอร์เซ็นต์ความสูงstutter สูงสุดในโลกัส D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, TPOX และ D18S51 มีค่าไม่เกิน 15 เปอร์เซ็นต์ของพีคหลัก และพบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter สูงสุดในตำแหน่ง D2S1338, D5S818, vWA และ FGA มีค่าเกิน 15 เปอร์เซ็นต์ของพีคหลัก ซึ่งเป็นผลมาจากการขาดหายไปของลำดับเบสอันเนื่องมาจากการโค้งงอในขั้นตอน extension ของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ พีคหลักมีความยาวของลำดับเบสมาก เมื่อพิจารณาค่า peak height ของเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter สูงสุดของแต่ละโลกัสส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 50-200 RFU

สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ปีการศึกษา 2551

ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาการค้นคว้าอิสระ

50312329 : MAJOR : FORENSIC SCIENCE

KEY WORD : DNA/ stutter/ Locus/ Allele

SIRINTHIP PONSA : AN EXAMINATION OF THE PERCENTAGE OF STUTTER HEIGHT BASED ON DNA ANALYSIS OF BIOLOGICAL EVIDENCE FROM ONE CONTRIBUTOR. INDEPENDENT STUDY ADVISOR : ASSOC. PROF. POL. COI. PATCHARA SINLOYMA (Ph.D.). 93 pp.

The purposes of this research are 1) to compare percentage of stutter height based on DNA analysis of biological evidence from one contributor with that found in Applied Biosystems studies. 2) to examine the peak height of the percentage of stutter height at each locus. The research focuses on stutter peaks with one repeat unit less than the actual allele base on DNA profiles of 100 people from 48 forensic cases submitted to Scientific Crime Detection Division between October 2008 to January 2009. All analyses were performed by using the Applied Biosystem Genetic Analyzer 3130XL.

The result indicates that there are 127 alleles at the D19S433 locus which yields the highest number of stutters. All stutter heights found at D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, TPOX and D18S51 loci are 15 percent less than the height of their corresponding main peak. On the contrary, the stutter heights observed at D2S1338, D5S818, vWA and FGA loci are 15 percent higher than the height of their respective main peak. The latter result may be due to the loss of base sequence resulting from strand slippage during the extension of nascent DNA strand in PCR amplification process when main alleles have long fragments. Peak heights of the highest observed stutter rang from 50 RFU to 200 RFU

Program of Forensic Science Graduate School, Silpakorn University Academic Year 2008

Student's signature

Independent Study Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter จากผลการตรวจดีเอ็นเอของวัตฤพยานทางชีววิทยาที่เก็บจากตัวบุคคล จะสำเร็จได้อันดับแรกสุดผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ พันตำรวจเอกนายแพทย์อุทัย ตีระวินนทร ประธานกรรมการ การตรวจสอบการค้นคว้าอิสระ เป็นอย่างสูงที่ท่านได้เสียสละเวลา และให้คำแนะนำในการทำวิจัยพร้อมทั้งได้เสนอแนะแนวทางแก้ไขการวิจัยในครั้งนี้ ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษารองศาสตราจารย์ พันตำรวจเอกหญิง ดร.พัชรา สีนลอยมา เป็นอย่างสูงสำหรับความรู้ คำแนะนำ กำลังใจ และแนวทางในการแก้ไขปัญหาที่ท่านมีให้แก่ผู้วิจัยตลอดมาจนกระทั่งสิ้นสุดโครงการ ขอกราบขอบพระคุณพันตำรวจโทหญิง ดร.สมวดี ไชยเวช กรรมการการตรวจสอบการค้นคว้าอิสระ ที่เป็นกำลังใจและเป็นแรงสนับสนุนคอยให้คำปรึกษาแก่ผู้วิจัยในการทำวิจัยในครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณพันตำรวจโทหญิง แววกาญจน์ ดวงชาทม นักวิทยาศาสตร์(สบ 3) กลุ่มงานตรวจทางเคมี ฟิสิกส์ และชีววิทยา เป็นอย่างสูงที่เป็นที่ปรึกษาในการทำวิจัย ให้คำปรึกษา และช่วยเหลือในการหาข้อมูลประกอบงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร อีกทั้งขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ประจำภาควิชาสาขานิติวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่กรุณาให้ความรู้ที่เป็นประโยชน์ และขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชานิติวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่ได้อำนวยความสะดวกตลอดเวลาที่ศึกษา

ท้ายที่สุดคุณค่าสารนิพนธ์นี้ ผู้วิจัยขอมอบแต่บิดา มารดา ซึ่งมีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งต่อผู้วิจัย หากมีข้อบกพร่องประการใดผู้วิจัยขอน้อมรับไว้เพื่อเป็นประโยชน์ในการศึกษาต่อไป

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญภาพ	ณ
บทที่	
1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
สมมติฐานของการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	2
กรอบแนวคิดของการวิจัย	3
นิยามศัพท์ที่ใช้ในการวิจัย	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	4
2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	5
แนวคิดและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	5
องค์ประกอบและโครงสร้างของดีเอ็นเอ	5
กองพิสูจน์หลักฐาน	28
ประวัติความเป็นมาของกองพิสูจน์หลักฐาน	28
ประวัติการพิสูจน์หลักฐานในประเทศไทย	29
กลุ่มงานที่ทำหน้าที่ในการตรวจพิสูจน์ในกองพิสูจน์หลักฐาน	31
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	37
3 วิธีดำเนินการวิจัย	44
ประชากรเป้าหมายและกลุ่มตัวอย่าง	44
วิธีการสุ่มตัวอย่าง	44
เครื่องมือและสารเคมีในการวิจัย	44
การเก็บรวบรวมข้อมูล	45

	หน้า
4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	50
ผลการทดลอง	50
5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	69
สรุป	69
อภิปรายผล	70
ข้อเสนอแนะ	73
บรรณานุกรม	74
ภาคผนวก	76
ภาคผนวก ก	77
ภาคผนวก ข	82
ภาคผนวก ค	85
ภาคผนวก ง	90
ประวัติผู้วิจัย	93

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การทดลองของ Griffith โดยใช้ <i>Streptococcus pneumoniae</i> เพื่อพิสูจน์ว่าปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง capsule ในสายพันธุ์ S สามารถถูกถ่ายทอดไปยังสายพันธุ์ R ได้	6
2	การทดลองเพื่อพิสูจน์ว่าสารที่ถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมคือ ดีเอ็นเอ โดยใช้แบคทีเรียเทอร์ริโอเฟจเข้าไปขยายพันธุ์ในแบคทีเรีย	7
3	สายพอลินิวคลีโอไทด์เชื่อมกันด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ทิศทางจากปลาย 5' ไปหา 3'	8
4	แสดงลักษณะเป็นเกลียวเส้นคู่ของโมเลกุลดีเอ็นเอ ตามรูปแบบที่สันนิษฐานโดย Watson และ Crick	9
5	แสดงพันธะไฮโดรเจนระหว่างคู่เบสที่มีความยาวเหมาะสมกันคือ A กับ T (ยึดกัน 2 แรง) และ G กับ C (ยึดกัน 3 แรง) ที่เส้นดีเอ็นเอ.....	9
6	โครงสร้างเบสพิริมีดีน และเบสพิวรีนที่พบบนสายดีเอ็นเอ	11
7	การจัดตัวของยีนในมนุษย์ซึ่งประกอบด้วยส่วนของยีนที่อยู่ในนิวเคลียสและส่วนที่อยู่ในไมโทคอนเดรีย	14
8	แคริโอไทป์ของเพศหญิงแสดงลักษณะ รูปร่าง และจำนวนโครโมโซมซึ่งประกอบด้วยออโทโซม 22 คู่ และโครโมโซมเพศ 1 คู่คือโครโมโซม X และ Y	15
9	การตรวจดีเอ็นเอโดยใช้ดีเอ็นเอตรวจตามตำแหน่งเดียว (single locus probe)	22
10	ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส ช่วงอุณหภูมิ 90-95 °C ในการแยกสายดีเอ็นเอจากเส้นคู่เป็นเส้นเดี่ยว ช่วงอุณหภูมิ 50-60 °C ในการจับคู่กันระหว่างดีเอ็นเอเส้นเดียวกับไพรเมอร์ ช่วงอุณหภูมิ 70-72 °C ในการเติมเบสทางปลาย 3' ของดีเอ็นเอเส้นใหม่	24

ภาพที่	หน้า
11	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยกราฟอิลิกโทรฟีโรแกรมของบุคคลหนึ่งๆ จากชุดตรวจสอบ AmpF [®] STR Identifiler ที่มีการใช้ระบบสีฟลูออเรสเซนต์ (5-dye system) ในการแยกความแตกต่างระหว่างผลผลิตพีซีอาร์ที่มีขนาดใกล้เคียงกัน 27
12	ส่วนประกอบของโลหิต 33
13	ตัวอสุจิ 34
14	Epithelial Cells 35
15	วงจรชีวิตของเส้นผม 36
16	กลไกการเกิด stutter 37
17	กลไกการเลื่อนลำดับเบสในการเกิด stutter 39
18	ตำแหน่งไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 16 โลกัสบนโครโมโซม 23 คู่ของมนุษย์ที่ใช้ทำการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องตรวจดีเอ็นเออัตโนมัติ ยี่ห้อ Applied Biosystem รุ่น 3130XL 41
19	เปอร์เซ็นต์ stutter ในไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 16 โลกัสเมื่อตรวจวัดเครื่องตรวจดีเอ็นเออัตโนมัติ ยี่ห้อ Applied Biosystem 42
20	แสดง minor peak และ major peak 48
21	จำนวนเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ที่ตำแหน่ง D8S1179 ใน Allele 8 -19 50
22	จำนวนเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ที่ตำแหน่ง D21S11 ใน Allele 25 – 35 51
23	จำนวนเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ที่ตำแหน่ง D7S820 ใน Allele 9 – 14 52
24	จำนวนเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ที่ตำแหน่ง CSF1PO ใน Allele 8 – 14 53
25	จำนวนเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ที่ตำแหน่ง D3S1358 ใน Allele 12 – 20 54
26	จำนวนเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ที่ตำแหน่ง TH01 ใน Allele 6 – 12 55
27	จำนวนเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ที่ตำแหน่ง D13S317 ใน Allele 8 -15 56
28	จำนวนเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ที่ตำแหน่ง D16S539 ใน Allele 5 -15 57
29	จำนวนเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ที่ตำแหน่ง D2S1338 ใน Allele 15 -28 58
30	จำนวนเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ที่ตำแหน่ง D19S433 ใน Allele 9 – 17.2 59
31	จำนวนเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ที่ตำแหน่ง vWA ใน Allele 11 – 24 60
32	จำนวนเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ที่ตำแหน่ง TPOX ใน Allele 6 – 13 61

ภาพที่	หน้า
33	จำนวนเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ที่ตำแหน่ง D18S51 ใน Allele 7 – 27 62
34	จำนวนเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ที่ตำแหน่ง D5S818 ใน Allele 7– 16 63
35	จำนวนเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ที่ตำแหน่ง FGA ใน Allele 17 – 51.2 64
36	ค่า peak height ของเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter สูงสุดของแต่ละโลกัส 72
37	ไมโครปิเปตขนาด 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl และ 1000 µl 77
38	เครื่องปั่นเหวี่ยง 77
39	เครื่องตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอ 78
40	เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 78
41	เครื่องตรวจดีเอ็นเออัตโนมัติ ยี่ห้อ Applied Biosystem รุ่น 3130XL 79
42	ชุดน้ำยาสกัดสำเร็จรูป ยี่ห้อ Promega 79
43	ชุดน้ำยาสกัดสำเร็จรูปสำหรับสกัดดีเอ็นเอ ยี่ห้อ QIAamp DNA Mini Kit 80
44	ชุดน้ำยาวัดปริมาณดีเอ็นเอ 80
45	ชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 81
46	ชุดน้ำยาสำหรับตรวจวิเคราะห์ DNA 81
47	เส้นผมเส้นขนที่ได้จากตัวบุคคล 82
48	คุณลักษณะสัณฐานวิทยาของเส้นผมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 82
49	การตัดรากเส้นผมลงหลอดทดลอง 82
50	วัตถุพยานประเภทคราบเลือดจากตัวบุคคล 83
51	การทดสอบคราบโลหิต 83
52	การทดสอบโลหิตมนุษย์ 83
53	ตัดรอยคราบใส่ micro tube 84
54	ตัดสำลีที่ใช้เก็บเยื่อข้างแก้ม 84
55	บรรจุสำลีใส่ micro tube 84
56	การ spin down 85
57	เตรียม master mix 85
58	แบ่ง master mix ใส่ reaction plate 85
59	นำ plate ใส่เครื่อง Real-Time PCR ABI PRISM [®] 7500 system 86
60	การแสดงผล sample sheet 86

ภาพที่		หน้า
61	การแสดงผลกราฟมาตรฐาน	86
62	ผลของปริมาณ DNA ที่เพิ่มขึ้นในแต่ละรอบ	87
63	แสดงปริมาณ DNA ในตัวอย่าง	87
64	ผสม master mix เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	88
65	ปิเปต master mix ใส่หลอด PCR	88
66	ปิเปต DNA 10 ไมโครลิตร ใส่หลอด PCR	88
67	นำหลอดใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	89
68	เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	89
69	การ vortex	90
70	แบ่ง master mix ใส่ใน 96-well	90
71	การปิดด้วย plate septa	90
72	ครอบด้านบนของ plate ด้วย plate retainer	91
73	การทำ sample sheet ในเครื่อง ABI	91
74	นำ plate ใส่เข้าไปในเครื่องวิเคราะห์ 3130XL Genetic Analyzer	91
75	DNA profiles ขณะที่เครื่องกำลังทำงาน	92
76	DNA profiles แสดงผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ	92

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ดีเอ็นเอ (Deoxyribonucleic acid) เป็นหน่วยพื้นฐานของยีนซึ่งเปรียบเหมือนสารพันธุกรรมที่ทำหน้าที่เก็บและถ่ายทอดข้อมูลในสิ่งมีชีวิตทั้งมวลไม่ว่าจะเป็นสัตว์ พืช แบคทีเรีย และสิ่งมีชีวิตเล็กๆ ในมนุษย์เซลล์ทุกเซลล์ที่มีนิวเคลียส ได้แก่ เม็ดเลือดขาว ตัวอสุจิ เซลล์รากผม เซลล์เยื่อข้างแก้ม เซลล์เหล่านี้เป็นเซลล์ที่มีความสำคัญในทางนิติวิทยาศาสตร์ทั้งสิ้นเพราะในปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) มาใช้ตรวจพิสูจน์เพื่อสืบหาผู้กระทำความผิดในคดีอาญา หรือใช้ตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดในทางการแพทย์ เนื่องจากดีเอ็นเอของมนุษย์ทุกคนจะมีเอกลักษณ์เฉพาะตัวมีความแตกต่างกัน (ยกเว้นฝาแฝดแท้) ความแตกต่างกันของดีเอ็นเอในแต่ละบุคคลจึงกลายมาเป็นอาวุธลับที่ทรงประสิทธิภาพสูงสุดในทางนิติวิทยาศาสตร์

การตรวจดีเอ็นเอถูกนำมาใช้จริงครั้งแรกในปี พ.ศ. 2528 ที่ประเทศอังกฤษจากนั้นก็มีการนำมาใช้ในประเทศต่างๆ มากมาย สำหรับประเทศไทย ได้มีการพัฒนาการตรวจดีเอ็นเอมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2534 (ธานินทร์ ภูพัฒน์ 2538 : 10) จนกระทั่งเมื่อปี พ.ศ. 2547 ปัจจุบันการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ได้เข้ามามีบทบาทในการสืบสวนสอบสวนหาตัวผู้กระทำความผิดในคดีอาญาโดยถือเป็นหน้าที่และความรับผิดชอบของกองพิสูจน์หลักฐาน สำนักงานตำรวจแห่งชาติ ซึ่งการตรวจดีเอ็นเอในระยะแรกจะใช้วิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ต่อมาได้มีการพัฒนาการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องตรวจดีเอ็นเออัตโนมัติที่ทันสมัยมากขึ้นโดยการตรวจความแตกต่างจำนวนซ้ำของลำดับเบสชนิดไมโครแซทเทลไลท์หรือ short tandem repeats (STR) บนสายดีเอ็นเอ ซึ่งมีลำดับเบสแกนสั้นๆ จำนวน 1-6 เบส และมีจำนวนซ้ำไม่เกิน 100 ครั้ง นอกจากนี้ยังได้นำเทคนิคพอลิเมอร์เชนรีแอคชัน (Polymerase chain reaction) หรือปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส มาใช้ช่วยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองให้มากขึ้น เนื่องจากดีเอ็นเอที่ได้จากสถานที่เกิดเหตุมีปริมาณน้อยและอยู่ในสภาพที่ไม่สมบูรณ์ แต่ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพอลิเมอร์เรสนี้ อาจเกิด Stutter peak ซึ่งเป็นผลผลิตที่สั้นหรือยาวกว่า allele จริง (main peak) 1-2 ซ้ำ การเกิด stutter นี้ถือว่าเป็นสิ่งรบกวนการแปลผลการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ ทำให้เกิดความลังเลในการตัดสินใจว่าพีค (peak) ที่ปรากฏในกราฟ

อิเล็กทรอนิกส์โพลีแกรมซึ่งเป็นผลการตรวจดีเอ็นเอ นั้นเป็นอัลลีลที่แท้จริง(พีคหลัก)หรือไม่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่สูงสัณฐานว่ามีดีเอ็นเอมากกว่าหนึ่งคน (mixprofile) โดยทั่วไปแล้วเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter เมื่อเทียบกับความสูงของอัลลีลจริง (พีคหลัก) มีค่าไม่เกิน 15 เปอร์เซ็นต์ (Goodwin, Linacre and Hadi 2007 : 65) กลุ่มงานตรวจทางเคมี ฟิสิกส์ ชีววิทยา กองพิสูจน์หลักฐานได้ใช้ค่านี้ในการตัดสินใจในการแปลผลการตรวจดีเอ็นเอในปัจจุบัน แม้ว่าจะทำการตรวจดีเอ็นเอมากกว่า 5,000 คดีมาแล้ว แต่ยังไม่เคยมีการเก็บข้อมูลของเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ที่เกิดขึ้นจริงจากผลการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอของกลุ่มงานตรวจทางเคมี ฟิสิกส์ และชีววิทยามาก่อน ความต้องการทราบค่าเปอร์เซ็นต์ความสูงของ stutter ว่ามีความสอดคล้องกับที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน และเพื่อใช้ประกอบการตัดสินใจในการแปลผลการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอของวัตถุพยานทางชีววิทยาที่เก็บจากตัวบุคคล จึงเป็นที่มาของการศึกษาโครงการการค้นคว้าอิสระในครั้งนี้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาเปอร์เซ็นต์ความสูงของ stutter จากผลการตรวจดีเอ็นเอของวัตถุพยานที่เก็บจากตัวบุคคลและเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ในคู่มือเครื่อง Applied Biosystem

1.2.2 เพื่อศึกษาค่า peak height ของเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter สูงสุดของแต่ละโลกัส ที่ทำการตรวจพิสูจน์

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

เปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ใน STR locus เทียบกับความสูงของอัลลีลจริง (พีคหลัก) มีค่าไม่เกิน 15 เปอร์เซ็นต์

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาหาเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ที่มีจำนวนน้อยกว่าอัลลีลจริง 1 ซ้ำ จากผลการตรวจดีเอ็นเอของวัตถุพยานที่เก็บจากตัวบุคคลของกลุ่มงานตรวจทางเคมี ฟิสิกส์ และชีววิทยา กองพิสูจน์หลักฐาน จำนวน 100 คน ในระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2551 ถึงเดือนมกราคม 2552 โดยใช้ AmpF ℓ STR Identifiler Kit ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องตรวจดีเอ็นเออัตโนมัติ ยี่ห้อ Applied Biosystem รุ่น 3130XL

1.5 กรอบแนวคิดในการวิจัย

การศึกษาวิจัยเพื่อศึกษาเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ในวัตถุพยานทางชีววิทยาที่เก็บจากตัวบุคคลและเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ในคู่มือเครื่อง Applied Biosystem



1.6 นิยามศัพท์ที่ใช้ในการวิจัย

Stutter หมายถึง peak ที่เกิดขึ้นเนื่องมาจากในขั้นตอน Replication ของ DNA polymerase ซึ่งเกิดการเลื่อนของเบส (slippage base) ของสาย STR ที่เป็น Template ทำให้ได้สาย DNA ที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่มีลำดับเบสซ้ำกันน้อยกว่าหรือมากกว่าของ Template DNA 1 ชุด

DNA (ดีเอ็นเอ) หมายถึง สารพันธุกรรมที่สามารถบ่งชี้ตัวบุคคลแต่ละคน

Locus (โลกัส) หมายถึง ตำแหน่งใดๆบนโครโมโซมของมนุษย์

allele (อัลลีล) หมายถึง ลักษณะของดีเอ็นเอบนแต่ละโลกัส

genotype(ยีโนไทป์) หมายถึง ลักษณะอัลลีลของแต่ละโลกัส มีอยู่ 2 รูปแบบ ได้แก่ ยีโนไทป์แบบ heterozygous เช่น AB และ ยีโนไทป์แบบ homozygous เช่น AA, BB

STR locus หมายถึง โลกัสที่มีจำนวนเบสซ้ำ 1-6 คู่เบส

Template หมายถึง ดีเอ็นเอสายต้นแบบ

Cut off หมายถึง ค่าความสูงที่กำหนดในโปรแกรมคอมพิวเตอร์เพื่อให้คอมพิวเตอร์ประมวลผลและแสดงจำนวนซ้ำของอัลลีล เมื่ออัลลีลนั้นมีความสูงมากกว่าค่าที่กำหนดนี้

Relative fluorescence unit (RFU) หมายถึง หน่วยความสูงของอัลลีล

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

1.7.1 เพื่อให้ได้ค่าเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter จากผลการตรวจดีเอ็นเอของกลุ่มงานตรวจทางเคมี พิสิกส์ และชีววิทยา กองพิสูจน์หลักฐาน สำหรับนำไปใช้ประกอบการตัดสินใจ ลงความเห็นผลการตรวจดีเอ็นเอว่าผลการตรวจดีเอ็นเอที่พบเป็นดีเอ็นเอของบุคคลเพียงคนเดียว หรือเกิดการปนเปื้อนของดีเอ็นเอมากกว่า 1 คนขึ้นไป

1.7.2 ค่า peak height ของเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter สูงสุด สามารถนำมาใช้กำหนดค่า cut off ภายในห้องปฏิบัติการทางชีววิทยาของกองพิสูจน์หลักฐาน สำนักงานตำรวจแห่งชาติ เพื่อใช้เป็นค่าต่ำสุดที่เครื่องมือการตรวจดีเอ็นเออัตโนมัติ ยี่ห้อ Applied Biosystem รุ่น 3130XL จะแสดงผลการตรวจดีเอ็นเอเมื่ออัลลีลมีความสูงมากกว่าค่า cut off ที่กำหนดไว้ จึงเป็นการคัดแยกพีคที่ไม่ใช่อัลลีลของบุคคลออกจากผลการตรวจดีเอ็นเอได้

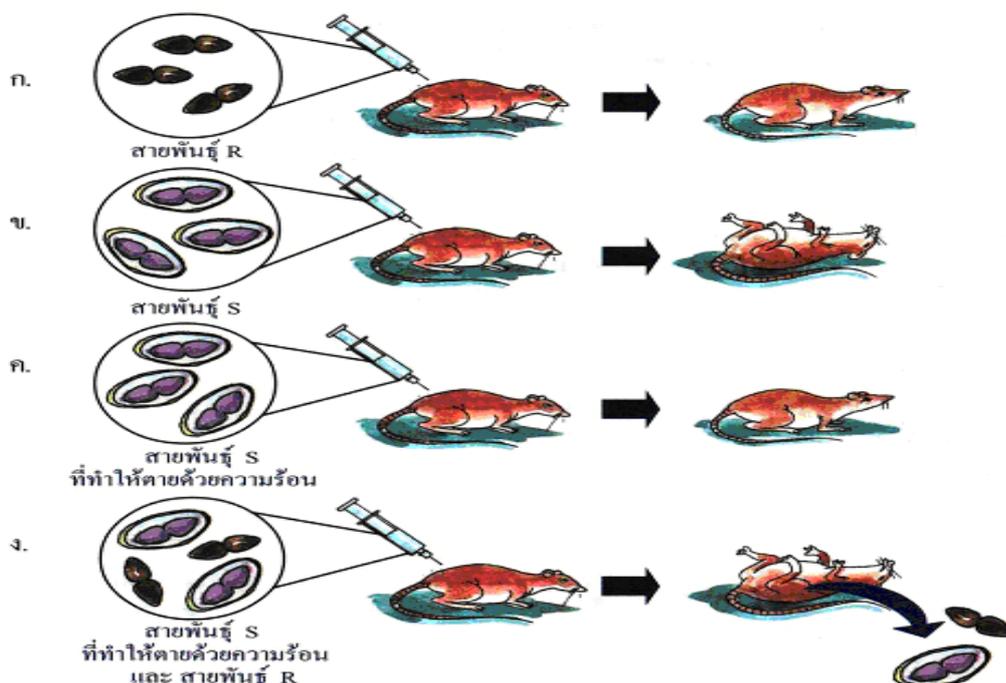
1.7.3 เพื่อใช้เป็นค่าอ้างอิงในการเข้าสู่มาตรฐานสากลของห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานตรวจทางชีววิทยา กองพิสูจน์หลักฐาน สำนักงานตำรวจแห่งชาติ

บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1. แนวคิดและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1.1 องค์ประกอบและโครงสร้างของดีเอ็นเอ

ก่อนปี พ.ศ. 1471 นักวิทยาศาสตร์เชื่อกันว่าโปรตีนเป็นสารพันธุกรรมเพราะเป็นสารโมเลกุลใหญ่ชนิดเดียว ที่มีความซับซ้อนเพียงพอที่จะสร้างผลผลิตซึ่งเป็นโปรตีนที่มีความหลากหลายเช่นเดียวกันได้ ส่วนความคิดที่ว่าสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอนั้นเริ่มจากผลงานของนักจุลชีววิทยาชาวอังกฤษชื่อ Fred Griffith ในปี พ.ศ. 2471 เขาได้ศึกษาเกี่ยวกับความสามารถที่ทำให้เกิดโรคปอดบวมของเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus pneumoniae* ซึ่ง Griffith พบโดยบังเอิญว่าถ้าเอาเซลล์ของแบคทีเรียชนิดร้ายแรงที่ถูกทำให้ตายด้วยความร้อนไปผสมกับแบคทีเรียมีชีวิตธรรมดา (ชนิดไม่ก่อโรค) ปรากฏว่าแบคทีเรียพันธุ์ธรรมดาบางส่วนได้กลายพันธุ์เป็นพันธุ์ร้ายแรง ซึ่งการที่แบคทีเรียกลายมาเป็นชนิดก่อโรคได้ก็เพราะมันสามารถสร้างเปลือกหุ้ม (capsule) ซึ่งเป็นสารโพลีแซคคาไรด์ จากการค้นพบครั้งนี้ทำให้มีการสงสัยว่าน่าจะมีสารพันธุกรรมบางอย่างของแบคทีเรียพันธุ์รุนแรงที่ทนต่อความร้อน และถูกแบคทีเรียพันธุ์ไม่รุนแรงนำเข้าไปทำให้มันสามารถสร้างเปลือกหุ้มได้ (อภิวดี ปิลาตันธนาภักย์, บรรยาย) อย่างไรก็ตาม Griffith ก็ได้ใส่ใจที่จะค้นหาว่าสารที่ทำให้แบคทีเรียกลายพันธุ์นั้นคืออะไร จนกระทั่งนักวิทยาศาสตร์ชาวอเมริกันชื่อ Oswald Avery ซึ่งในขณะนั้นได้ค้นคว้าองค์ประกอบทางเคมีของเปลือกหุ้มแบคทีเรียเกี่ยวกับสารก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (transforming Factor) นี้ ตอนแรก Avery คิดว่าสารโพลีแซคคาไรด์เชิงซ้อน (complex polysaccharides) บางอย่างในเปลือกหุ้ม เป็นตัวเริ่มให้มีการเพิ่มจำนวนของโพลีแซคคาไรด์ชนิดเดียวกัน ต่อมาอีกนานเป็นสิบปีกว่าเขาจึงได้ข้อสรุปร่วมกับผู้ร่วมงานของเขาอีกสองคน คือ Maclyn McCarty และ Colin MacLeod ว่าปัจจัยที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์คือโมเลกุลของดีเอ็นเอ ด้วยเหตุผลที่ว่าในปัจจัยที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์จะมีโมเลกุลของดีเอ็นเอเป็นส่วนใหญ่ และเมื่อย่อยสลายปัจจัยการกลายพันธุ์ด้วยเอนไซม์ที่ย่อยดีเอ็นเอ (DNase) ฤทธิ์ของมันจะถูกทำลาย แต่ฤทธิ์ของมันจะไม่สูญเสียด้วยเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนหรืออาร์เอ็นเอ (RNA) (Avery, MacLeod and McCarty 1944 : 137-158) ดังภาพที่ 1

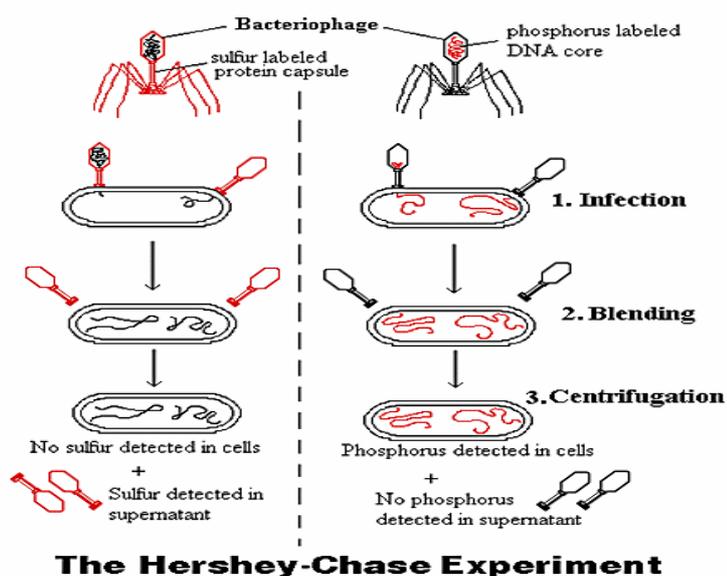


ภาพที่ 1 การทดลองของ Griffith โดยใช้ *Streptococcus pneumoniae* เพื่อพิสูจน์ว่าปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง capsule ในสายพันธุ์ S สามารถถูกถ่ายทอดไปยังสายพันธุ์ R ได้

ที่มา : [The Chemical Basis of Heredity](http://www.chk.ac.th/web/biology/ch1.html) [online], accessed 20 April 2009. Available from <http://www.chk.ac.th/web/biology/ch1.html>

เมื่อตีเอ็นเอเป็นสารที่ควบคุมการกลายพันธุ์ทำให้เกิดข้อสงสัยถึงการทำงานของมันว่าทำได้อย่างไร แต่เนื่องจากดีเอ็นเอของสัตว์ชั้นสูงเป็นโมเลกุลที่ซับซ้อนมาก นักวิทยาศาสตร์จึงเริ่มศึกษาดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตที่เล็กมาก เช่น ไวรัส ซึ่งในขณะนั้นได้มีการเตรียมไวรัสบริสุทธิ์ได้หลายชนิด และมีการศึกษาการดำรงชีวิตของมัน นอกจากนั้นนักวิทยาศาสตร์ บางกลุ่มก็ให้ความสนใจกับไวรัสที่ขยายพันธุ์ในแบคทีเรียที่เรียกว่า แบคทีริโอเฟจ (bacteriophage) โดยเฉพาะเฟจชื่อ T1, T2, T3 และแลมดา ซึ่งแบ่งตัวในแบคทีเรีย *E. coli* การศึกษาเริ่มต้นจากสังเกตการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นในเฟจขณะที่มันเพิ่มจำนวนลูกหลาน โดยปกติแล้วแบคทีริโอเฟจ 1 ตัว จะเพิ่มจำนวนเป็นหลายล้านตัวในเวลาประมาณ 20 นาทีเท่านั้น ดังนั้นการกลายพันธุ์จึงเกิดขึ้นได้ในช่วงเวลาไม่นานนัก จากการศึกษาพบว่าเมื่อเฟจ กลายพันธุ์แต่ละชนิดหลายชนิดเข้าไปเพิ่มจำนวนในแบคทีเรียตัวเดียวกัน จะพบลูกหลานเฟจ (progeny phage) บางตัวมีลักษณะเป็นปกติได้ แสดงว่ายีนที่ผิดปกติของเฟจชนิดหนึ่งถูกทดแทนด้วยยีนที่ปกติจาก เฟจอีกชนิดหนึ่ง การทดลองต่อๆมาก็แสดงให้เห็นว่าเฟจกลายพันธุ์แต่ละชนิดจะมียีนกลายพันธุ์ต่างตำแหน่งกัน แต่เมื่อมันไป

เพิ่มจำนวนในแบคทีเรียตัวเดียวกัน ยีนปกติที่ยังเหลืออยู่ในเฟจกลายพันธุ์แต่ละชนิด จะยังคงสามารถใช้เป็นรหัสในการสร้างเป็นโปรตีนองค์ประกอบส่วนต่างๆของไวรัสปกติได้ ความคิดที่ว่า ดีเอ็นเอเป็นสารกำหนดพันธุกรรมได้รับการพิสูจน์โดยปราศจากข้อสงสัยในปี พ.ศ. 2495 โดย Alfred Hershey และ Martha Chase ได้พิสูจน์ว่า ในขณะที่เฟจเข้าไปขยายพันธุ์ในแบคทีเรีย นั้นมีเพียงดีเอ็นเอของมันเท่านั้นที่เข้าไปภายในตัวแบคทีเรีย

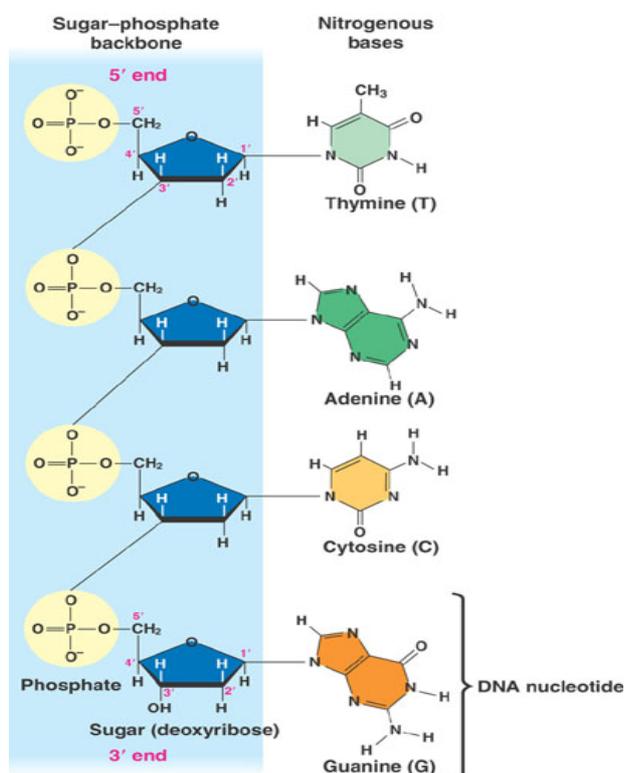


ภาพที่ 2 แสดงการทดลองเพื่อพิสูจน์ว่าสารที่ถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม คือ ดีเอ็นเอ โดยใช้แบคทีเรียเทอริโอเฟจเข้าไปขยายพันธุ์ในแบคทีเรีย พบว่ามีเพียงดีเอ็นเอเท่านั้นที่เข้าไปในเซลล์แบคทีเรีย

ที่มา : [The Chemical Basis of Heredity](http://www.chk.ac.th/web/biology/ch1.html) [online], accessed 20 April 2009. Available from <http://www.chk.ac.th/web/biology/ch1.html>

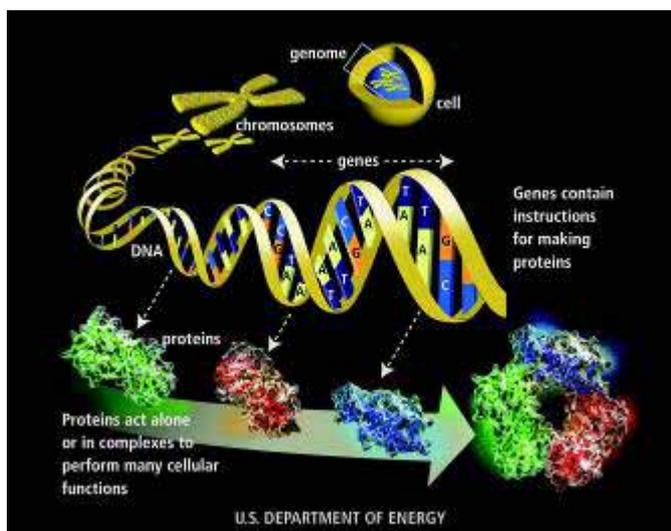
การออกแบบลักษณะโครงสร้างจึงมีขึ้น เมื่อนักเคมีฟิสิกส์ชาวสวีเดนพบหลักฐานว่า ดีเอ็นเอในรูปแบบของสารละลายจะอยู่ในลักษณะไม่สมดุลง (asymmetrical) แต่สามารถวัดขนาดของดีเอ็นเอได้ภายหลังที่มีการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนในกิจกรรมต่างๆ และพบว่าโมเลกุลของดีเอ็นเอมีลักษณะเป็นเส้นยาวหลายแองสตรอม (angstrom, $A^\circ = 10^{-10}$ เมตร) และหนาประมาณ $20 A^\circ$ โมเลกุลเป็นเส้นยาวไม่มีกิ่งก้านหรือแยกเป็นแฉก ต่อมาพบว่านิวคลีโอไทด์ที่เชื่อมต่อกันเป็นเส้นดีเอ็นเอ นั้น เชื่อมต่อกันด้วยพันธะฟอสเฟตเอสเทอร์ (phosphate-ester linkage) โดยหมู่ฟอสเฟตที่ติดอยู่กับอะตอมคาร์บอนตัวที่ 5 (5' carbon atom) จะไปทำปฏิกิริยา

เอสเทอร์ที่อะตอมคาร์บอนที่ 3 ของน้ำตาลดีออกซีไรโบสของนิวคลีโอไทด์หนึ่ง เกิดเป็นพันธะที่เรียกว่า 5' - 3' phosphodiester) (ดังภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 สายพอลินิวคลีโอไทด์เชื่อมกันด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ที่ศทางจากปลาย 5' ไปหา 3'
ที่มา : เรื่องกรดนิวคลีอิก [online], accessed 9 May 2009. Available from
<http://learners.in.th/file/dawood/singleStrand.jpg>

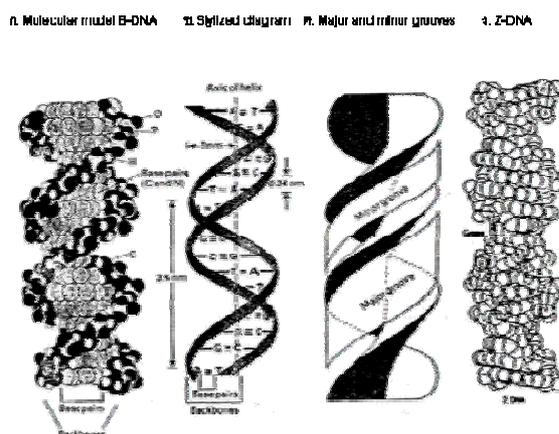
ในปี พ.ศ. 2494 Edwin Chargaff แห่งมหาวิทยาลัยโคลอมเบียพบว่าปริมาณเบสแต่ละชนิดในโมเลกุลดีเอ็นเอมีไม่เท่ากัน และจะแตกต่างกันมากขึ้น ถ้าดีเอ็นเอนั้นมาจากสิ่งมีชีวิตที่มีระดับต่างกันมาก อย่างไรก็ตามมีข้อสังเกตว่าปริมาณของอะดีนีน (adenine, A) จะใกล้เคียงกับปริมาณของไทมีน (thymine, T) และปริมาณของกัวนีน (guanine, G) จะใกล้เคียงกับไซโตซีน (cytosine, C) เช่นกัน ในที่สุดในปี พ.ศ. 2496 James Watson และ Francis Crick ก็สรุปได้ว่าโมเลกุลของดีเอ็นเอมีลักษณะเป็นเส้นคู่บิดกันเป็นเกลียว(double helix) (ดังภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 แสดงลักษณะเป็นเกลียวเส้นคู่ของโมเลกุลดีเอ็นเอ ตามรูปแบบที่สันนิษฐานโดย Watson และ Crick

ที่มา : [โครงสร้างดีเอ็นเอ](http://learners.in.th/file/tpanrat/dna2.jpg) [online], accessed 20 April 2009. Available from <http://learners.in.th/file/tpanrat/dna2.jpg>

ไฮโดรเจน (hydrogen bonds) ระหว่างคู่เบส โดยอะดีนีน (A) จะจับกับไทมีน (T) และกวานีน (G) จะจับกับไซโตซีน (C) เท่านั้น A จับกับ T ด้วย 2 พันธะ (bonds) (A=T หรือ T=A) ส่วน G จับกับ C ด้วย 3 พันธะ (bonds) (G≡C หรือ C≡G) (ดังรูปที่ 5)



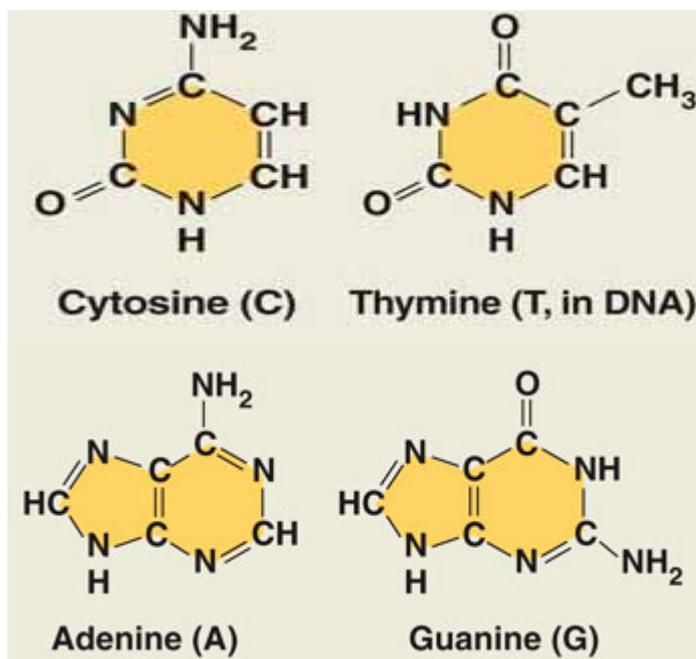
ภาพที่ 5 แสดงพันธะที่เส้นดีเอ็นเอทั้งสองไว้ด้วยกัน จากพันธะไฮโดรเจนระหว่างคู่เบสที่มีความยาวเหมาะสมกัน คือ A กับ T (ยึดกัน 2 แรง) และ G กับ C (ยึดกัน 3 แรง)

ที่มา : [The Chemical Basis of Heredity](http://www.chk.ac.th/web/biology/ch1.html) [online], accessed 20 April 2009. Available from <http://www.chk.ac.th/web/biology/ch1.html>

ด้วยความจำเพาะเจาะจงของคู่เบสเช่นนี้ ทำให้สามารถกำหนดลำดับเบสของเส้นดีเอ็นเอสายที่จะไปจับกับมันได้ หากรู้ลำดับเบสของเส้นดีเอ็นเอที่จะศึกษาอยู่ก่อนแล้ว แม้ว่าพันธะไฮโดรเจนจะค่อนข้างอ่อน แต่เนื่องจากโมเลกุลของดีเอ็นเอประกอบด้วยหลายๆ คู่เบส ทำให้มีพันธะเหล่านี้จำนวนมากสามารถสร้างความเสถียรให้แก่ดีเอ็นเออย่างยิ่ง ในภาวะปกติแล้วสายดีเอ็นเอไม่ค่อยแยกจากกัน แต่ถ้าดีเอ็นเออยู่ในที่ที่มีอุณหภูมิสูงใกล้จุดเดือด จะพบว่าสายดีเอ็นเอแยกจากกันเป็น 2 เส้นที่มีเบสเป็นคู่สมกัน (complementary) เรียกขบวนการนี้ว่า denaturation การค้นพบว่าดีเอ็นเอมีลักษณะเป็นเส้นคู่ ทำให้ได้ข้อสรุปของการเพิ่มจำนวนของมัน โดยมันแยกสายดีเอ็นเอเส้นคู่ออกเป็นเส้นเดี่ยวสองเส้น แล้วใช้ดีเอ็นเอแต่ละเส้นนั้นเป็นแม่แบบ (templates) ของการสร้างดีเอ็นเอเส้นใหม่ต่อไปทำให้ได้ดีเอ็นเอเส้นคู่ใหม่ (double strands) 2 คู่ ที่มีลำดับเบสเช่นเดียวกับดีเอ็นเอแม่แบบทุกประการ ในภาวะปกติ ดีเอ็นเอเส้นคู่จะไม่แยกออกจากกัน แต่เมื่ออุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมสูงขึ้นใกล้จุดเดือด เช่น 94-95 °C หรือในตัวกลางที่เป็นกรดหรือด่างอย่างรุนแรง เช่น pH<3 หรือ pH>10 มันจะแยกจากกันเป็นเส้นเดี่ยวอย่างรวดเร็ว และเมื่ออุณหภูมิลดลง เช่นที่ 65 °C มันจะค่อยๆ กลับเข้ามาจับกันเป็นเส้นคู่ใหม่ได้อีก ขั้นตอนนี้เรียกว่า annealing หรือ renaturation ในอุณหภูมิขนาดนี้เฉพาะดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเหมาะสมกันพอดีเท่านั้นจึงกลับมาเป็นเส้นเกลียวที่สมบูรณ์ (perfect double helices) ได้อย่างเดิม ถ้าดีเอ็นเอ 2 เส้นมีลำดับเบสไม่เหมาะสมกันทั้งหมด แต่อุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมลดต่ำลงมากๆ มันก็อาจจะมาจับกันเป็นเกลียวเส้นคู่แต่ผิดรูปหรือบิดเบี้ยวไปบ้าง (imperfect double helices)

ความเหนียวแน่นระหว่างพันธะ G กับ C จะมากกว่า A กับ T ดังนั้นการแยกเป็นสองเส้นของดีเอ็นเอจะยากกว่าเท่าใด ขึ้นอยู่กับสัดส่วนของเบส G-C ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ นั้น ถ้ามีเบส G-C มากเส้นดีเอ็นเอจะแยกจากกันได้ง่าย คือถ้าแยกมันด้วยความร้อนก็ต้องใช้อุณหภูมิสูงขึ้นนั่นเอง

โดยสรุปแล้วดีเอ็นเอเป็นพอลิเมอร์ของนิวคลีโอไทด์ซึ่งแต่ละหน่วยย่อยนิวคลีโอไทด์ประกอบด้วยหน่วยน้ำตาล เบส และหมู่ฟอสเฟต เบสที่พบทั่วไปในดีเอ็นเอมี 4 ชนิดและสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม แต่ละกลุ่มมีความแตกต่างในองค์ประกอบ และโครงสร้าง ดังนี้ เบสพิริมิดีนมีโครงสร้างหลักประกอบด้วยวงแหวน 1 วง เบสในกลุ่มนี้ได้แก่ ไซโทซีน (cytosine หรือ C) และ ไทมีน (thymine หรือ T) เบสพิวรีน มีโครงสร้างหลักประกอบด้วยวงแหวน 2 วง คือวงแหวนพิริมิดีนเชื่อมกับวงแหวนอิมิดาโซล (imidazole) เบสในกลุ่มนี้ได้แก่ อะดีนีน (adenine หรือ A) และ กัวนีน (guanine หรือ G)



ภาพที่ 6 โครงสร้างเบสพิริมิดีนและเบสพิวรีนที่พบบนสายดีเอ็นเอ

ที่มา : Nucleic acid [online], accessed 9 May 2009. Available from

<http://www.bio.miami.edu/~cmallery/150/chemistry/c8.5x27b.bases.jpg>

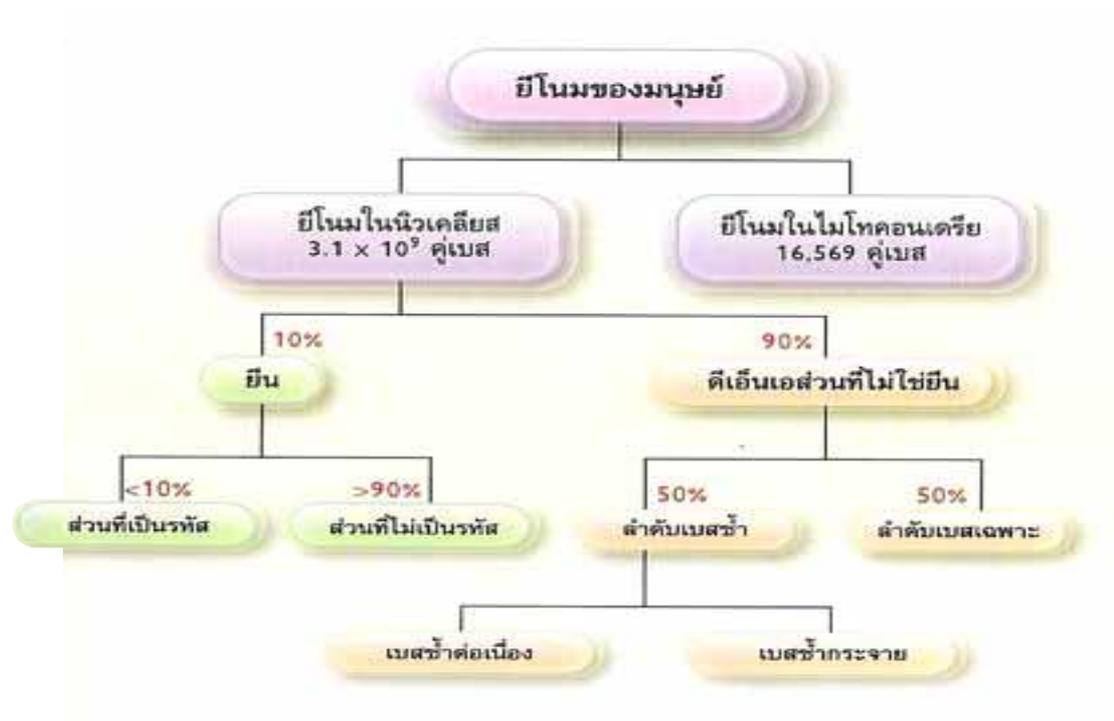
เบสบนดีเอ็นเอจะต่ออยู่กับน้ำตาลดีออกซีไรโบส ซึ่งมีคาร์บอน 5 อะตอมที่ตำแหน่ง C - 1' โดยมีหมู่ฟอสเฟตเป็นตัวเชื่อมระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 3' ของน้ำตาลโมเลกุลหนึ่งกับคาร์บอนตำแหน่งที่ 5' ของน้ำตาลโมเลกุลที่อยู่ถัดไปด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ ทำให้สายพอลินิวคลีโอไทด์ที่เกิดขึ้นมีทิศทางคือ ปลายข้างหนึ่งเป็นปลาย 5' และอีกข้างหนึ่งเป็นปลาย 3' หมู่ฟอสเฟตทำให้ดีเอ็นเอมีประจุลบ และมีคุณสมบัติเป็นกรด ดีเอ็นเอมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 10^6 - 10^{12} ดาลตัน ความยาวของสายดีเอ็นเอเกิดจากการเรียงตัวกันของเบส 4 ชนิด ในรูปแบบต่าง ๆ กันซึ่งทำให้ดีเอ็นเอเป็นแหล่งเก็บข้อมูลที่แตกต่างกันได้เป็นจำนวนมาก ข้อมูลที่แตกต่างกันที่บรรจุอยู่ในโมเลกุลดีเอ็นเอเป็นตัวกำหนดคุณสมบัติที่สำคัญของสิ่งมีชีวิตในการควบคุมกิจกรรมต่างๆ ของเซลล์ และควบคุมลักษณะของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ

Watson และ Crick จากมหาวิทยาลัยเคมบริดจ์ ได้เสนอโครงสร้างสามมิติของดีเอ็นเอ ขึ้นมาโดยอาศัยข้อมูลจากภาพเอกซเรย์ดิฟแฟรกชัน (X-ray diffraction pattern) ของผลึกดีเอ็นเอ และจากข้อมูลองค์ประกอบทางเคมีของดีเอ็นเอ โดยเสนอว่าดีเอ็นเอมีโครงสร้างเป็นเกลียวค้ำย ขดลวดสปริง และเกลียวของดีเอ็นเอมีลักษณะเป็นเกลียวคู่เวียนขวา (righthanded double helix) การพันเกลียวของดีเอ็นเอทำให้เกิดเป็นร่องขึ้น 2 ขนาด คือ ร่องขนาดใหญ่ และร่องขนาดเล็ก เกลียวคู่นี้ คือ สายพอลินิวคลีโอไทด์สองสายที่มีทิศสวนทางกัน โดยมีน้ำตาลและหมู่ฟอสเฟตเป็น แกนของเกลียวมีเบสอยู่ภายในเกลียว โดยมีระนาบของเบสตั้งฉากกับแกนของเกลียวในลักษณะ เหมือนราวบันไดวนกับขั้นบันได เส้นผ่าศูนย์กลางของเกลียวมีขนาด 20 อังสตรอม (Å) แต่จะรอบ เกลียวจะประกอบด้วย เบส 10 คู่ ยาว 34 อังสตรอม (ระยะห่างระหว่าง 1 คู่เบสเท่ากับ 3.4 Å) เกลียวคู่ของดีเอ็นเอถูกยึดด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบสที่อยู่บนสายตรงข้ามกัน โดยมี A จับคู่ กับ T ด้วยพันธะไฮโดรเจน 2 พันธะและ C จับกับ G ด้วยพันธะไฮโดรเจน 3 พันธะ นอกจากนี้ยังมี แรงไฮโดรโฟบิกที่เกิดขึ้นระหว่างเบสที่ซ้อนอยู่ในสายเดียวกัน ช่วยยึดโครงสร้างเกลียวคู่ให้สาย มีความเสถียร การจับคู่กันของเบสบนสายของดีเอ็นเอเป็นกระบวนการที่จำเพาะและเกิดได้อย่าง สมบูรณ์ เมื่อเบสบนสายดีเอ็นเอเป็นเบสคู่สมกัน (complementary bases)

ดีเอ็นเอในเซลล์มีจำนวนโครโมโซมหนึ่งชุดหรือแฮพลอยด์เซลล์ (haploid cell, n) เรียกว่า ยีนอม (genome) โดยทั่วไปสิ่งมีชีวิตจำนวนมากจะมีโครโมโซมเรียงตัวกันเป็นคู่หรือ ดิพลอยด์ (diploid cell, 2n) ขนาดของยีนอมนิยมบอกค่าเป็นกิโลเบส หรือ kb ซึ่งหมายถึง จำนวน เบสบนเกลียวคู่ของดีเอ็นเอคูณด้วย 10^3 ดีเอ็นเอของไวรัสและแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นวงแหวน เกลียวคู่ ส่วนดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตชั้นสูงหรือยูแคริโอต จะเป็นเส้นยาวเกลียวคู่ ภายในเซลล์ของ ยูแคริโอต ดีเอ็นเอจะอยู่ในนิวเคลียสและกระจายอยู่บนโครงสร้างที่เรียกว่า โครโมโซม (chromosome) โครโมโซมของยูแคริโอตประกอบด้วยดีเอ็นเอรวมตัวกับโปรตีนอย่างมีแบบแผน โครงสร้างหน่วยพื้นฐานของโครโมโซมเรียกว่า นิวคลีโอโซม (nucleosome) ประกอบด้วยดีเอ็นเอ ขนาด 146 เบส จับกับโปรตีนฮิสโตน 4 ชนิดคือ H2A H2B H3 และ H4 อย่างละ 2 โมเลกุล และมีฮิสโตน H1 จับกับดีเอ็นเอขนาด 60 เบสที่เชื่อมระหว่างแต่ละหน่วยนิวคลีโอโซม นิวคลีโอโซม จะมีการพันเกลียวต่อไปอีกทีละ 6 หน่วยย่อยเรียกว่า โซเลนอยด์ (solenoid) ซึ่งจะม้วนตัวเป็น เกลียวซ้อนขึ้นอีก ทำให้โครโมโซมมีโครงสร้างที่แน่นมากยิ่งขึ้น การขดตัวหลายชั้นทำให้ดีเอ็นเอ สายยาวเข้าไปอยู่ในนิวเคลียสที่มีขนาดเล็กได้

อีโนมของมนุษย์

อีโนม คือ ดีเอ็นเอในแฮพลอยด์เซลล์ อีโนมของคนประกอบด้วยส่วนที่อยู่ในนิวเคลียส และในไมโทคอนเดรีย อีโนมในนิวเคลียสเป็นดีเอ็นเอเส้นยาวเกลียวคู่ มีขนาด 3.1×10^9 คู่เบส กระจายอยู่ในโครโมโซม 23 แท่ง อีโนมในไมโทคอนเดรียเป็นดีเอ็นเอรูปวงขนาดเล็กเพียง 16,569 คู่เบส ดีเอ็นเอเกือบทั้งหมดในไมโทคอนเดรียทำหน้าที่เป็นยีนซึ่งจะถูกถอดรหัสเพื่อสร้างอาร์เอ็นเอของไรโบโซม (rRNA) ทีอาร์เอ็นเอ (tRNA) หรือแปลรหัสเป็นสายพอลิเปปไทด์ แต่ดีเอ็นเอในนิวเคลียสส่วนใหญ่เป็นลำดับเบสที่ไม่ใช่รหัส (non-coding sequences) ซึ่งมียีนอยู่เพียง 30,000 – 35,000 ยีน คิดเป็น 3% ของอีโนมทั้งหมด ขนาดของยีนแต่ละยีนจะแตกต่างกันมาก ตั้งแต่ขนาดเล็กเพียง 0.1 กิโลเบส ได้แก่ ยีนของอาร์เอ็นเอขนาดเล็กที่พบในนิวเคลียส (small nuclear RNA) ไปจนถึงยีนขนาด 2,000 กิโลเบส ที่พบอยู่บนโครโมโซม X โดยเฉลี่ยยีนของมนุษย์จะมีขนาดประมาณ 5 – 10 กิโลเบส ซึ่งจะสร้างโปรตีนที่มีกรดอะมิโนโดยเฉลี่ยประมาณ 300 ตัว ภายในยีนจะมีลำดับเบสบางส่วนที่ไม่ใช่รหัสและถูกตัดออก เรียกว่า อินทรอน (intron) และส่วนที่เป็นรหัส (coding sequences) เรียกว่า เอ็กซอน (exon) ส่วนของอีโนมเกือบ 90% ไม่ใช่รหัส และพบอยู่นอกยีน เรียกว่า ส่วนที่ไม่ใช่ยีน (extragenic) ซึ่งในบริเวณนี้จะพบลำดับเบสซ้ำ (repetitive sequences) ที่ยังไม่ทราบหน้าที่ชัดเจนดังภาพที่ 7 (วิชัย บุญแสงและคณะ 2547: 14)



ภาพที่ 7 การจัดตัวของยีนมนุษย์ซึ่งประกอบด้วยส่วนของยีนที่อยู่ในนิวเคลียสและส่วนที่อยู่ในไมโทคอนเดรีย

ที่มา : วิชัย บุญแสง และคนอื่นๆ, ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากสารพันธุกรรมสู่เทคโนโลยีพิสูจน์บุคคล (ปทุมธานี:สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2547):15

จำนวนโครโมโซมในคนจะมีโครโมโซม 46 แท่ง ซึ่งนับได้ 23 คู่ แบ่งออกเป็นออโทโซม(autosome) ได้แก่ โครโมโซมคู่ที่ 1-22 ซึ่งออโทโซมจะเป็นโครโมโซมคู่เหมือนทั้งในเพศชาย และเพศหญิง โครโมโซมคู่ที่ 1 จะมีขนาดใหญ่ที่สุดและเล็กไปตามลำดับ ส่วนโครโมโซมเพศ (sex chromosome) เป็นโครโมโซมคู่ที่กำหนดเพศ ในเพศหญิงโครโมโซมเพศจะมีรูปร่างเหมือนกัน คือ XX ในเพศชายโครโมโซมเพศจะมีรูปร่างต่างกัน คือ XY



ภาพที่ 8 แคริโอไทป์ของเพศชายแสดงลักษณะ รูปร่าง และจำนวนโครโมโซมซึ่งประกอบด้วย ออโทโซม 22 คู่ และโครโมโซมเพศ 1 คู่ คือโครโมโซม X และ X

ที่มา : โครโมโซมและสารพันธุกรรม [online], accessed 9 May 2009. Available from <http://www.sarinp.com/unit3/chromosome1.htm>

การตรวจลักษณะความแตกต่างจากวัตถุพยานทางชีวภาพ เพื่อจุดมุ่งหมายทางอาชญาวิทยาได้มีการกล่าวถึงมานานกว่า 50 ปีแล้ว นับตั้งแต่มีการตรวจพิสูจน์บุคคลจากตัวอย่างเลือดโดยวิธีต่างๆ ซึ่งในช่วงก่อนมักจะอาศัยการตรวจแยกลักษณะของโปรตีนต่างๆ ที่ถูกกำหนดโดยยีน ได้แก่ สารหมู่เลือดชนิดต่างๆ บนเม็ดเลือดแดง หมู่ HLA บนเม็ดเลือดขาว เอ็นไซม์ในเม็ดเลือดแดง และโปรตีนในน้ำเหลือง จะเห็นว่าเป็นการตรวจผลผลิตของยีน (gene product) ทั้งสิ้น ความก้าวหน้าทางพันธุกรรมโมเลกุล (Molecular Genetics) ทำให้สามารถตรวจแยกความแตกต่างของคนหนึ่งไปจากอีกคนหนึ่งได้ โดยดูจากดีเอ็นเอในส่วนที่ไม่ถูกใช้เพื่อรหัส (non-coding for protein) ความแตกต่างของดีเอ็นเอในส่วนที่ถูกปกปิดนี้ กลายมาเป็นอาวุธลับที่ทรงประสิทธิภาพสูงสุดในทางนิติวิทยาศาสตร์ การตรวจลักษณะดีเอ็นเอถูกนำมาใช้จริงครั้งแรกในปี พ.ศ. 2528 ที่ประเทศอังกฤษ จากนั้นก็มีการนำมาใช้ในประเทศต่างๆ มากมาย สำหรับในประเทศไทย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้พัฒนาการตรวจลักษณะดีเอ็นเอขึ้นมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2534

ดีเอ็นเอเปรียบเหมือนรหัสพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตทั้งหมดไม่ว่าจะเป็นสัตว์ พืช แบคทีเรีย และสิ่งมีชีวิตเล็กๆ อย่างอื่น ในมนุษย์เซลล์ทุกเซลล์ที่มีนิวเคลียส ได้แก่ เม็ดเลือดขาว ตัวอสุจิ เซลล์รากผม เซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มในน้ำลาย เซลล์เหล่านี้ล้วนเป็นเซลล์ที่มีความสำคัญในทางนิติวิทยาศาสตร์ทั้งสิ้น แผลงยีนมนุษย์จะอยู่ในโครโมโซมของคนที่ 23 คู่ เรียกว่า diploid genome หากเอาโครโมโซมอันที่ 1-23 มาคลี่สายดีเอ็นเอออกเป็นเส้นและเรียงต่อกันจะได้ haploid genome ล้วนคู่เบส 90 -95% ของลำดับเบสเหล่านี้จะไม่ถูกถอดรหัส แต่มันจะเป็นเพียงเส้นดีเอ็นเอที่วางอยู่ระหว่างส่วนที่เป็นยีน แยกยีนต่างๆ ออกจากกัน ยีนหนึ่งๆ ของคนอาจมีลำดับเบสที่เหมือนกัน แต่เมื่อเกิดการผ่าเหล่าขึ้นลำดับเบสก็จะแตกต่างกันไปบ้าง สิ่งเหล่านี้สะท้อนออกมาเป็นโปรตีนที่ผิดปกติออกไป ซึ่งบางครั้งทำให้เกิดโรคทางพันธุกรรมชนิดต่างๆ ความแตกต่างระหว่างบุคคลของดีเอ็นเอในบริเวณที่ไม่ได้ถูกถอดรหัส ไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่สิ่งมีชีวิตสร้างขึ้น จึงไม่ยุ่งเกี่ยวกับโรคทางพันธุกรรมต่างๆ แต่กลับมีประโยชน์มากในทางนิติวิทยาศาสตร์

ตามทฤษฎีแล้วถ้าไม่ใช่ฝาแฝดไข่ใบเดียวกัน (identical twins) ดีเอ็นเอของแต่ละคนจะมีลักษณะเป็นเอกลักษณ์ของตัวเอง โดยเหตุที่ว่าโครโมโซมของคนที่มีอยู่ 46 อัน ครึ่งหนึ่ง (23 อัน) มาจากพ่อ และอีกครึ่งหนึ่ง (23 อัน) มาจากแม่ สมมติว่าการถ่ายทอดโครโมโซมแต่ละอันจากพ่อและแม่เป็นในลักษณะที่อิสระต่อกัน จะสามารถคำนวณรูปแบบต่างๆ ของโครโมโซมที่ถ่ายทอดไปยังลูกหลานได้ถึง 2^{23} ลักษณะ และในกรณีของลูกก็อาจมีรูปแบบโครโมโซมที่ได้จาก

พอลิเมอร์เป็นแบบต่างๆ ได้ถึง 2⁴⁶ ลักษณะ ในปี พ.ศ. 2518 Edwin Southern ได้พัฒนาเทคนิคที่เป็นประโยชน์ในการวิเคราะห์ ดีเอ็นเออย่างยิ่งโดยภายหลังจากการตัดเส้นดีเอ็นเอ restriction enzyme ได้ดีเอ็นเอเป็นเส้นสั้นๆ หลายเส้น นำเส้นดีเอ็นเอเหล่านั้นไปแยกออกจากกันด้วยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสในตัวกึ่งกลางของแข็ง (semi solid media) แล้วย้ายเส้นดีเอ็นเอเหล่านั้นลงบนแผ่น nylon membrane ตรวจสอบเส้นดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยดีเอ็นเอตรวจตาม (DNA probe) ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี ดีเอ็นเอตรวจตามจะเป็นดีเอ็นเอเส้นเดี่ยวสั้นๆ ที่มีอะตอมซึ่งเป็นสารกัมมันตภาพรังสีประกอบอยู่ และสามารถจับ (hybridize) ได้กับเส้นดีเอ็นเอที่เราสนใจ เนื่องจากมันมีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกัน (A เข้าคู่กับ T และ C เข้าคู่กับ G) เส้นดีเอ็นเอที่ถูกแยกด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสจะเป็นเหมือนตัวแทนของยีนต่างๆ โนแวงยีนซึ่งยีนหนึ่งจะให้เส้นดีเอ็นเอตัวแทนไม่เกิน 2 เส้น โดยแต่ละเส้นจะแทนยีนบนโครโมโซมแต่ละอันในคู่ของมัน

ปัจจุบันถ้ามีการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์สามารถตรวจสอบได้ สมมติว่าในเส้นดีเอ็นเอเส้นหนึ่งมีการเปลี่ยนแปลงของเบสจาก T เป็น C การเปลี่ยนแปลงอันนี้ทำให้เอ็นไซม์ที่ตัดเส้นดีเอ็นเอเฉพาะลำดับเบสที่เรียกว่า restriction enzyme จดจำและตัดมันได้ (จากเดิมจดจำไม่ได้) หรือเดิมจดจำได้เปลี่ยนเป็นจดจำไม่ได้ ตัวอย่าง เช่น เอนไซม์ *Hae* I ซึ่งจะตัดเส้นดีเอ็นเอตรงตำแหน่งที่มีลำดับเบส AGGCCA ในทุกๆ ตำแหน่งของเส้นดีเอ็นเอที่ลำดับเบสดังกล่าว ดังนั้นเอนไซม์จะตัดดีเอ็นเอเส้นนั้นออกเป็นดีเอ็นเอเส้นสั้นๆ ก็เส้น และแต่ละเส้นยาวเท่าไรก็ขึ้นอยู่กับจำนวนและตำแหน่งของลำดับเบส AGGCCA ที่ปรากฏอยู่ในเส้นดีเอ็นเออันนั้น การที่ได้ดีเอ็นเอเส้นสั้นจำนวนมากมายที่มีความยาวต่างๆ กันไป เรียกลักษณะนี้ว่า restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) ต่อมาวิธีการนี้ถูกใช้เป็นเทคนิค RFLP นักวิทยาศาสตร์จึงได้นำเทคนิคดังกล่าวมาตรวจสอบความแตกต่างของลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอ เมื่อได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันแล้วจึงนำมาทำการตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอเหล่านั้นด้วยดีเอ็นเอตรวจตาม (DNA probe) ที่สามารถแสดงให้เห็นความแตกต่างกันของแต่ละบุคคล ดีเอ็นเอตรวจตามจะเป็นดีเอ็นเอที่มีลำดับคู่เบสสมกับดีเอ็นเอของมนุษย์ กระบวนการจับคู่ดีเอ็นเอนี้เรียกว่า ไฮบริไดเซชัน (hybridization) หลังจากนำชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมาเปรียบเทียบกับจะได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน มนุษย์มีโครโมโซมเป็น 2 ชุด ดังนั้นแต่ละโลกัส (locus) หรือตำแหน่งใดๆ บนโครโมโซมจะมีลักษณะดีเอ็นเอที่แตกต่างกันได้ 2 แบบ หรือ 2 อัลลีล (allele) ลักษณะอัลลีลของแต่ละโลกัสเรียกว่ายีนไทป์ (genotype) ซึ่งมีอยู่ 2 รูปแบบ ได้แก่ ยีนไทป์แบบเฮเทอโรไซกัส (heterozygous) และยีนไทป์แบบโฮโมไซกัส (homozygous) ยีนไทป์แบบเฮเทอโรไซกัส คือ ยีนไทป์ที่ประกอบด้วยแถบดีเอ็นเอ 2 แถบที่มีขนาดแตกต่างกัน (2 อัลลีลที่มี

ขนาดแตกต่างกัน) ส่วนยีนโพรบแบบไฮโมไซกัส คือ ยีนโพรบที่ประกอบด้วยแถบดีเอ็นเอ 2 แถบที่มีขนาดเท่ากัน (2 อัลลีลที่มีขนาดเท่ากัน) ตัวอย่างเช่นมีคน 3 คน ที่มียีนโพรบต่างกัน โดยที่ 2 คนแรกมียีนโพรบเป็นไฮโมไซกัสที่มีอัลลีลเป็น AA และ BB ส่วนคนที่สามเป็นเฮเทอโรไซกัสมีอัลลีลเป็น AB ผลจากการตรวจสอบ RFLP ของบุคคลทั้งสาม พบว่าได้มีแถบดีเอ็นเอ 3 แบบตามลักษณะของยีนโพรบ กล่าวคือ ยีนโพรบ AA มีขนาด 4.2 กิโลเบส ยีนโพรบ BB มีขนาด 1.8 กิโลเบส และยีนโพรบ AB จะมีชิ้นส่วนผสมระหว่าง A และ B คือมีขนาด 4.2 และ 1.8 กิโลเบส ซึ่งขนาดของแถบดีเอ็นเอนี้จะแตกต่างกันไปตามลักษณะของยีนโพรบ

เทคนิค RFLP สามารถนำมาใช้แยกหรือศึกษาความแตกต่างของยีนในคนได้ นักวิทยาศาสตร์จึงนำเทคนิคนี้ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรมต่างๆ นำไปใช้ทำแผนที่ยีนบนโครโมโซม และนำไปศึกษาความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดได้อย่างกว้างขวาง ซึ่งในระบบ RFLP ที่ความแตกต่างของอัลลีลเกิดจากการมีเบสเปลี่ยนไป ณ จุดจดจำของเอนไซม์เมื่อนำดีเอ็นเอมาย่อยด้วยเอนไซม์ จะทำให้เกิดดีเอ็นเอเส้นสั้นขนาดต่างๆ อันเป็นผลจากจุดตัดของเอนไซม์นั้นเปลี่ยนตำแหน่ง จะเรียกระบบนี้เป็น diallelic เนื่องจากอัลลีลที่พบมากในระบบนี้จะมีแค่สองแบบเท่านั้น ตัวอย่างเช่น ตำแหน่ง A บนโครโมโซมคู่หนึ่ง มีลำดับเบสบนโครโมโซมอันที่หนึ่งดังนี้ AT[CCGG]ATGCATGC[CCGG]ATGCATGC[CCGG]TT ส่วนลำดับเบสบนโครโมโซมคู่เหมือนของมัน พบว่าเบส C ในตำแหน่งที่ 16 ถูกเปลี่ยนเป็น T จะได้ลำดับเบสที่ต่างกันเล็กน้อยดังนี้ AT[CCGG]ATGCATGC[CIGG]ATGCATGC[CCGG]TT

เมื่อดีเอ็นเอตรงตำแหน่งนี้ ถูกนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ Hpa II ซึ่งมีจุดจดจำเป็น C/CGG ตำแหน่ง A บนโครโมโซมอันแรกจะถูกตัดได้ 3 ตำแหน่ง ในขณะที่บนอีกโครโมโซมจะถูกตัดได้ 2 ตำแหน่งเท่านั้นได้เส้นดีเอ็นเอเป็น 2 รูปแบบ (อัลลีล) ด้วยลักษณะเช่นนี้จะกำหนดลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) ได้ 3 แบบ โดยเป็นพันธุ์แท้ 2 แบบ และพันธุ์ทาง 1 แบบ

อีกรูปแบบหนึ่งของการตรวจแบบ RFLP คือการใช้เอนไซม์ตัดที่ตำแหน่งหัวและท้ายของเส้นดีเอ็นเอที่เป็น VNTR (variable number of tandem repeat) หรือ STR (short tandem repeat) ทั้ง VNTR และ STR จะประกอบด้วยลำดับเบส (base sequence หรือเรียกอีกอย่างว่า tandem) ที่เรียงซ้ำๆ กันต่อกันไปเรื่อยๆ โดยลำดับเบสนั้นอาจจะสั้นและเล็กมากประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกันเพียงหนึ่งหรือสองตัว เช่น A กับ T (เป็น ATATATA___) ไปเรื่อยๆหรืออาจมีลำดับเบสที่ประกอบด้วยเบสที่มากกว่า 30 ตัว ถ้าลำดับเบสที่เรียงซ้ำๆ กันนั้นประกอบด้วยเบส 1-6 ตัว จะเรียกตำแหน่งนั้นเป็น STR ถูกตัดที่หัวท้ายด้วยเอนไซม์ก็จะได้เส้นดีเอ็นเอที่มีความยาวต่างๆ กันไป ขึ้นอยู่กับจำนวน tandem ที่ปรากฏอยู่ใน VNTR หรือ STR นั้น

Alec Jeffreys ได้ใช้ดีเอ็นเอตรวจตาม (DNA probe) ที่สามารถตรวจจับกับ VNTR ได้หลายตำแหน่งพร้อมกันเรียกว่า multilocus probe ทำให้ได้แถบดีเอ็นเอหลายแถบในที่เดียว และตั้งชื่อการตรวจนี้ว่า ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ในประเทศสหรัฐอเมริกา นิยมใช้ดีเอ็นเอตรวจตามแบบตำแหน่งเดียวเรียกว่า single locus probe โดย probe ชนิดนี้จะไปจับที่ตำแหน่งหนึ่งใดบนโครโมโซมคู่เดียวกันเท่านั้น ทำให้แปรผลง่ายและสะดวกในการจัดทำข้อมูลทางสถิติ หากต้องการให้ได้กำลังการแยกแยะ (discriminating power) ระหว่างบุคคลแต่ละคนมากขึ้น ก็ทำได้โดยตรวจตำแหน่งที่เป็น VNTR เพิ่มขึ้น โดยปกติแล้วการตรวจประมาณ 4 ตำแหน่งมักจะเพียงพอในการแยกคนแต่ละคนออกจากกัน การตรวจดีเอ็นเอโดยใช้ดีเอ็นเอตรวจตามตำแหน่งเดียวนี้จะไม่เรียกเป็น DNA fingerprinting แต่เรียกว่า DNA typing หรือ DNA profiling ซึ่งอย่างที่กล่าวไว้ข้างต้น DNA profile ของแต่ละคนอาจทำเก็บไว้เป็นแบบผังดีเอ็นเอเฉพาะตัวซึ่งเท่ากับเป็นรหัสชีวิตเฉพาะบุคคลก็ย่อมได้

นักอาชีววิทยาได้คาดการณ์ไว้ว่า หากในอนาคตมีการจัดทำข้อมูลรหัสชีวิตของคนทุกคน หรือกลุ่มคนเป้าหมายบางกลุ่มที่มีโอกาสสูงในการก่ออาชญากรรม เก็บรวบรวมไว้ในโปรแกรมคอมพิวเตอร์เปรียบเสมือนเป็นธนาคารข้อมูลดีเอ็นเอ (DNA data bank) ข้อมูลนี้จะเป็นประโยชน์มากในการระบุตัวผู้กระทำผิดในคดีต่างๆ จากวัตถุพยานที่พบในสถานที่เกิดเหตุหรือในตัวผู้เสียหาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในคดีข่มขืนกระทำชำเรา นอกจากนั้นอาจช่วยพิสูจน์บุคคลของศพไม่ทราบชื่อ ผู้เสียหายต่างๆ อีกด้วย (ธารนรินทร์ ภูพัฒน์ 2538 : 14)

DNA fingerprint และ DNA profile

ปัจจุบันความเจริญทางชีวโมเลกุลช่วยในการตรวจสอบดีเอ็นเอและนำมาประยุกต์ใช้ทางนิติวิทยาศาสตร์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เทคนิค DNA fingerprinting เป็นการตรวจอย่างหนึ่งในหลายๆ อย่างที่ใช้ในการพิสูจน์บุคคลและพิสูจน์บุตรได้ DNA fingerprinting ถูกพัฒนาโดยนักวิทยาศาสตร์ชาวอังกฤษ ชื่อ Alec J. Jeffreys เมื่อประมาณ 10 ปีที่แล้ว ต่อมาได้มีการพัฒนาให้ดีขึ้นจนทราบถึงจุดเด่นและจุดด้อยของมันเพียงพอที่จะนำมาใช้ในกรณีจริงได้ การที่แมงยีนของมนุษย์ (human genome) ซึ่งประมาณกันว่ามีลำดับเบสมากถึง 3000 ล้านคู่เบส เมื่อใช้เอ็นไซม์ที่ตัดสายดีเอ็นเอตรงตำแหน่งจำเพาะตามลำดับเบส (sequence specific) เช่น เอนไซม์ *Hae III* จะย่อยลำดับเบสที่เป็น GG/CC ให้ขาดจากกันในทุกตำแหน่งของสายดีเอ็นเอที่ปรากฏมีลำดับเบสดังกล่าว ทำให้ได้สายดีเอ็นเอสั้นๆ จำนวนมากเป็นแสนเป็นล้านชิ้นซึ่งสามารถถูกจัดเรียงตามลำดับความยาวของมันด้วยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสในตัวกลางที่เป็นวุ้น เมื่อเสร็จสิ้นการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส เส้นที่สั้นไม่หนักวังไวก็จะอยู่ห่างจากจุดเริ่มมากกว่าเส้นที่ยาวและหนัก ในกลุ่ม

สายดีเอ็นเอสั้นเล็ก ๆ เหล่านี้จะมีจำนวนหนึ่งที่มีลักษณะเป็น tandem repeats ซึ่งประกอบด้วย base sequence สั้นๆ ขนาดเท่าๆ กันเรียงซ้ำกันไป แต่ละ sequence ที่ว่านี้เรียกว่า tandem จำนวน tandem ใน โลกัสนั้นๆ อาจมีจำนวนต่างกันไปในแต่ละคนทำให้ใช้แยกความแตกต่างระหว่างบุคคลได้ นอกจากนั้นจำนวนคู่เบสใน tandem อาจยาวได้ตั้งแต่ 1-2 คู่เบส เช่น $(TG)_n$ ไปจนถึงขนาดใหญ่ คือ มากกว่า 30 คู่เบส ในกรณีที่เป็นโลกัสนี้ซึ่งประกอบด้วย tandem ที่สั้นมาก (แต่ละ tandem มี 1-6 คู่เบส) จะเรียกว่า short tandem repeat (STR) แต่โลกัสนี้ที่มี tandem ยาวเรียกว่า variable number of tandem repeat (VNTR) เนื่องจาก STR หรือ VNTR ประกอบด้วย tandem ในจำนวนมากน้อยต่างกัน ดังนั้นเมื่อเอา DNA fragments ที่เป็น VNTR หรือ STR ที่ตำแหน่งต่างๆ ในแมงยีน (genome) ของแต่ละคนมาทำอิเล็กโตรโฟรีซิสผ่านตัวกลางที่เป็นสารกึ่งของแข็ง (semisolid) เช่น agarose หรือ polyacrylamide gel DNA fragments ดังกล่าวจะวางตัวอยู่ในตำแหน่งต่างๆ กันแล้วแต่ว่า fragments นั้นมีความยาวมากน้อยเท่าไร ซึ่งในกรณีนี้จะขึ้นอยู่กับจำนวนและความยาวของ tandem repeat ใน VNTR locus

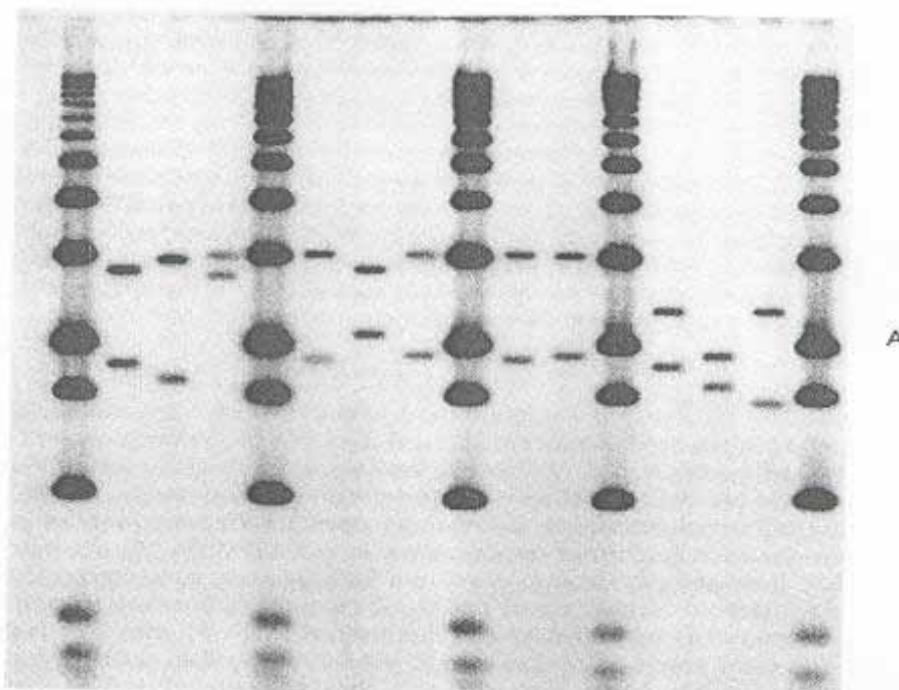
ปัจจุบันพบว่ามียีนที่มีลักษณะเป็น VNTR จำนวนร้อยๆ แห่ง และที่เป็น STR มากกว่า 1300 แห่ง ดังนั้นหากมีวิธีการใดที่สามารถตรวจสอบลักษณะของ VNTR เหล่านี้ สามารถถ่ายทอดไปยังลูกหลานได้ ตามทฤษฎีแล้วอัลลีลของ VNTR ในลูกครึ่งหนึ่งต้องมาจากพ่อ และอีกครึ่งหนึ่งมาจากแม่ ดังนั้นลักษณะของ VNTR ของลูกในแต่ละตำแหน่งถ้าไม่เหมือนของพ่อ ก็ต้องเหมือนของแม่นั่นเอง

วิธีการตรวจสอบ VNTR ที่หลายๆ ตำแหน่งทำโดยอาศัยดีเอ็นเอตรวจตาม (DNA probe) ที่มีลำดับเบสเหมาะสมหรือใกล้เคียงกับลำดับเบสของแกนร่วม (common core) ของ tandem ใน VNTR หลายแห่ง มันก็จะไปจับกับ VNTR เหล่านี้ได้ ดีเอ็นเอตรวจตามอาจปรับปรุงมาจากส่วนของยีนมนุษย์ (human genome) เช่น probe ของ Jeffreys พัฒนามาจาก intron ของ myoglobin gene บนโครโมโซมที่ 22 หรือจากแบคทีริโอเฟจ (bacteriophage) เช่น M-13 phage หรือแม้แต่เป็นเพียงนิวคลีโอไทด์สั้นสั้นที่มีลำดับเบสสั้นมากเรียงตัวซ้ำๆ กัน เช่น $(GAGA)_4$ หรือ $(CAC)_5$ ดีเอ็นเอตรวจตามเหล่านี้สามารถไปจับกับแกนร่วมของ VNTR ได้ที่หลายๆ ตำแหน่ง หากติดฉลาดดีเอ็นเอตรวจตามด้วยสารกัมมันตภาพรังสีหรือเอนไซม์ เมื่อมันไปจับ VNTR ณ ตำแหน่งใดก็ตาม มันจะเปล่งรังสีออกมาจากตำแหน่งนั้นด้วย ถ้ามีฟิล์มเอกซเรย์ไปวางไว้ใกล้ๆ รังสีที่ออกมาจะทำปฏิกิริยากับแผ่นฟิล์ม เกิดเป็นแถบสีดำบนฟิล์ม ในกรณีที่ติดฉลาดดีเอ็นเอตรวจตามด้วยเอนไซม์ ก็สามารถทำให้เกิดสัญญาณสีขึ้นได้โดยใส่สารกำเนิดสีลงไป ตำแหน่งที่ดีเอ็นเอตรวจตามไปจับก็จะเกิดสีขึ้น

การที่จะเอาดีเอ็นเอตรวจตามไปจับ DNA fragment ที่อยู่ในวุ้นโดยตรงอาจทำได้ยาก เพราะวุ้นมักอ่อนนุ่มฉีกขาดได้ง่าย เช่น polyacrylamide gel หรือหนาเกินไป เช่น agarose gel ดังนั้นมักนิยมย้าย DNA fragments เหล่านั้นจากวุ้นลงสู่ nitrocellulose membrane เสียก่อนโดยวิธี southern blot จากนั้นค่อย hybridize DNA fragment บนแผ่นเมมเบรนด้วยดีเอ็นเอตรวจตามที่ติดฉลากดังกล่าวข้างต้น DNA fragment ใดที่มีลำดับเบสในส่วนหนึ่งใดของมันใกล้เคียงหรือจำเพาะกับลำดับเบสของดีเอ็นเอตรวจตาม จะถูกจับในทุกๆ ตำแหน่งที่มันอยู่ เมื่อเอาฟิล์มเอกซเรย์ทาบบกับเมมเบรน รั้งสีที่เปล่งออกมาจากดีเอ็นเอตรวจตาม ณ ตำแหน่งต่างๆ ก็จะทำปฏิกิริยากับฟิล์มเกิดเป็นแถบสีดำขึ้น ซึ่งมีรูปแบบเป็นเอกลักษณ์ของแต่ละคนไป โดยโอกาสที่คนสองคนซึ่งไม่ได้เกี่ยวข้องกันทางสายเลือดแล้วมีรูปแบบแถบดีเอ็นเอเหมือนกันทุกอย่างสามารถคำนวณได้จากจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏออกมาให้ตรวจสอบ โดย Jeffreys ได้คำนวณโอกาสเฉลี่ยของแถบดีเอ็นเอหนึ่งใด ณ ตำแหน่งหนึ่งบนแผ่นเมมเบรนของคนคนหนึ่งจะไปตรงกับอีกคนหนึ่งเท่ากับ $0.25^{(2)}$ ดังนั้นโอกาสที่คนสองคนจะมีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอเหมือนกัน หรือตรงกันในทุกตำแหน่งจะเท่ากับ 0.25^n โดยปกติแล้วการทำ DNA fingerprint ปรากฏมีแถบดีเอ็นเอให้ตรวจสอบได้ 10 โอกาสที่คนสองคนซึ่งไม่ได้มีความสัมพันธ์ทางสายเลือด จะมี DNA fingerprint เหมือนกันเท่ากับ $(0.25)^{10}$ หรือ $1/1,048,576$ หรือประมาณ 1 ในล้านนั่นเอง

การตรวจ DNA fingerprint ขั้นแรกต้องเริ่มด้วยการสกัดดีเอ็นเอออกจากตัวอย่างส่งตรวจ ซึ่งดีเอ็นเอที่ได้ต้องเป็นดีเอ็นเอที่อยู่ในสภาพดี และยังคงเป็นเส้นยาวมีน้ำหนักโมเลกุลสูงอย่างน้อย 1 ไมโครกรัม หากคำนวณว่าเซลล์ของมนุษย์หนึ่งเซลล์มีดีเอ็นเอประมาณ 6 พิโคกรัม การที่จะทำ DNA fingerprint จำเป็นต้องมีเซลล์ที่มีนิวเคลียสอย่างน้อย 160,000 เซลล์ แต่ถ้าเป็นเซลล์ที่มีปริมาณดีเอ็นเอเพียงครึ่งเดียวของเซลล์ปกติ เช่น ตัวอสุจิ จำเป็นต้องมีตัวอสุจิอย่างน้อย 320,000 ตัว จะเห็นว่าในตัวอย่างส่งตรวจต้องมีปริมาณมากพอสมควร หากสภาพของดีเอ็นเอในตัวอย่างอาจเสื่อมสลายตัวไปบางส่วน ในกรณีเช่นนี้จำเป็นต้องมีตัวอย่างส่งตรวจจำนวนมากขึ้น ซึ่งในคดีจริงโอกาสเช่นนี้เป็นไปได้้น้อยมาก นอกจากนั้นการที่จะตรวจทุกครั้งจำเป็นต้องทำเปรียบเทียบกับบนวุ้นเดียวกันทุกครั้ง และไม่สามารถหาค่าความถี่ของแถบดีเอ็นเอซึ่งเป็นตัวแทนของ VNTR แต่ละตำแหน่งในแฝงยีนในประเทศสหรัฐอเมริกาได้พัฒนาดีเอ็นเอตรวจตามตำแหน่งเดี่ยว (single locus probe) ดีเอ็นเอตรวจตามชนิดนี้จะจับที่ลำดับเบสจำเพาะบนส่วนของ VNTR เฉพาะตำแหน่งหนึ่งใดเท่านั้น ดังนั้นการใช้ดีเอ็นเอตรวจตามชนิดนี้เมื่อสิ้นสุดวิธีการตรวจจะได้แถบดีเอ็นเอบนแผ่นฟิล์มเอกซเรย์เพียงหนึ่งแถบหรือสองแถบ การตรวจด้วยดีเอ็นเอตรวจตาม

ตำแหน่งเดียว จะได้รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ไม่ซับซ้อนและแปลผลง่ายเรียกว่า DNA typing หรือ DNA profile เนื่องจากปรากฏมีเพียง 1-2 แถบ เมื่อทำอิเล็กโตรโฟรีซิสเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน กำหนดขนาด จะสามารถบอกขนาดของดีเอ็นเอที่เป็นอัลลีลของ VNTR ที่กำลังตรวจสอบได้ ดังภาพที่ 9 และสามารถจัดทำค่าความถี่ของแต่ละอัลลีล



ภาพที่ 9 การตรวจดีเอ็นเอโดยใช้ดีเอ็นเอตรวจตามตำแหน่งเดียว(single locus probe)

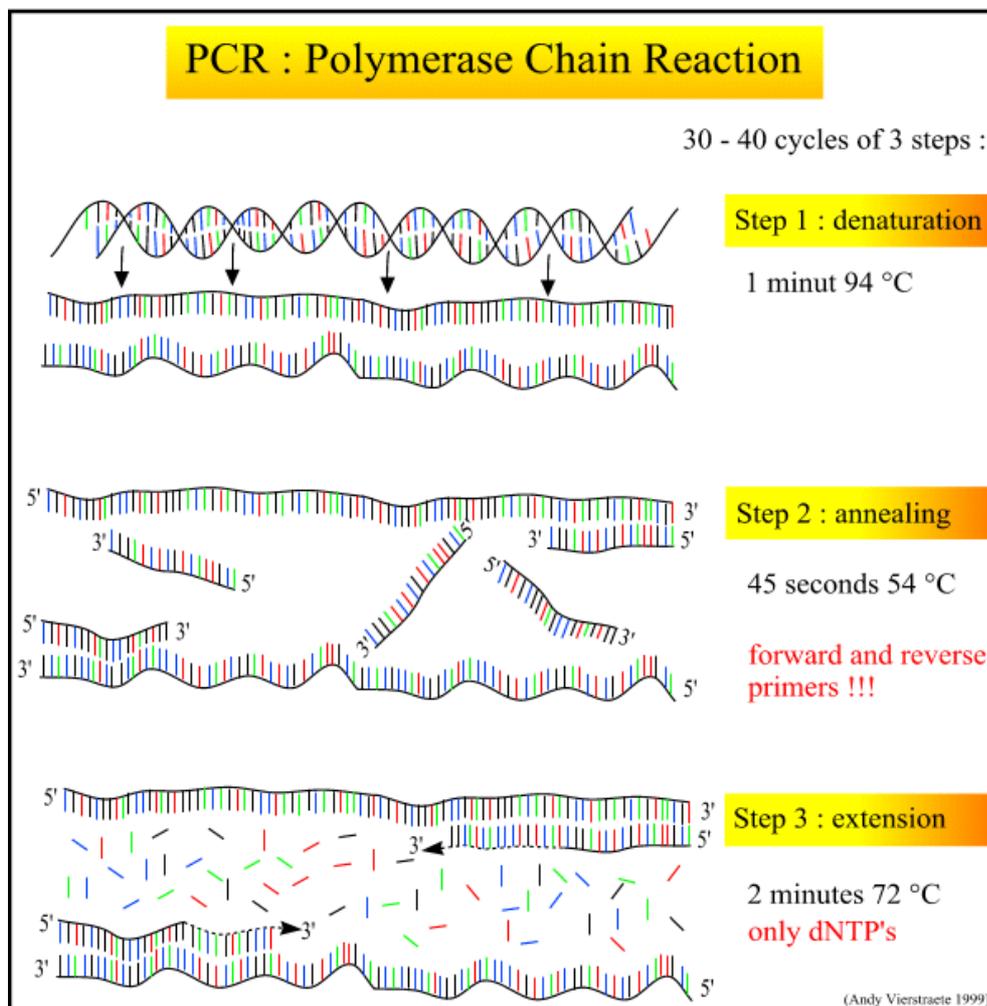
ที่มา : [DNA Forensics Problem Set](http://www.biology.arizona.edu/human_bio/problem_sets/DNA_forensics_2/graphics/) [online], accessed 9 May 2009. Available from

http://www.biology.arizona.edu/human_bio/problem_sets/DNA_forensics_2/graphics/

10a.gif

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยเอ็นไซม์โพลีเมอเรส

ปัญหาสำคัญของการตรวจพิสูจน์บุคคลจากวัตถุพยานทางชีววิทยา คือ ตัวอย่างที่ได้มามักจะอยู่ในสภาพที่กำหนดไม่ได้ บางครั้งอาจมีปริมาณเพียงเล็กน้อย บางครั้งอาจมีสิ่งเจือปนหรือมาจากคนหลายคนปนกันอยู่ บางครั้งอยู่ในสภาพที่เสื่อมสลายอย่างมาก สิ่งต่างๆเหล่านี้เป็นอุปสรรคในการตรวจ DNA profile โดยวิธี RFLP ซึ่งต้องการดีเอ็นเอคงสภาพที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (intact high molecular weight DNA) ปริมาณ 1 นาโนกรัมสำหรับดีเอ็นเอตรวจตามหลายตำแหน่ง (multilocus probe) และ 50 นาโนกรัมสำหรับดีเอ็นเอตรวจตามตำแหน่งเดียว (single locus probe) ดังนั้นหากมีสิ่งส่งตรวจจำนวนน้อยหรืออยู่ในสภาพเสื่อมสลายไป อาจทำให้ไม่มีดีเอ็นเอน้ำหนักโมเลกุลสูงมากพอ การตรวจสอบโดยวิธี RFLP ย่อมทำไม่ได้ ปัญหาอันนี้มีหนทางที่จะขจัดออกไปได้เมื่อนำเทคนิคการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) มาช่วยในการตรวจ DNA profile เทคนิคการทำ polymerase chain reaction (PCR) ค้นพบครั้งแรกโดย Kary Mullis และคณะในปี 1983 โดยใช้หลักการเลียนแบบธรรมชาติที่ว่าโดยอาศัยดีเอ็นเอต้นแบบเป็นจุดเริ่มต้น และมีเอ็นไซม์พวก DNA polymerase ช่วยทำให้สายดีเอ็นเอยาวออกไปโดยเลือกจับเอานิวคลีโอไทด์ตัวใดตัวหนึ่งใน 4 ชนิด dATP, dGTP, dCTP, dTTP เข้ามาต่อกับเบสคู่สมกับดีเอ็นเอสายต้นแบบ ส่วนประกอบต่างๆในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมีดังนี้ คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ, thermostable DNA polymerase, deoxynucleotide triphosphate (dNTPs) ทั้ง 4 ชนิด, Oligonucleotide primer อย่างน้อย 1 คู่ และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ปริมาณดีเอ็นเอจะเพิ่มมากขึ้นได้ต้องอาศัยปฏิกิริยาที่ต่อเนื่องหลายๆ รอบ ซึ่งแต่ละรอบจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอน denaturation เป็นขั้นตอนการทำให้ DNA สายคู่แยกเป็นสายเดี่ยว โดยอาศัยความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส ขั้นตอน primer annealing เป็นขั้นตอนที่มีการลดอุณหภูมิลงที่ประมาณ 45-60 องศาเซลเซียส เพื่อให้ primer สามารถเกาะติดกับดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับเบสคู่สม ขั้นตอน primer extension เป็นขั้นตอนการขยายสายดีเอ็นเอสายใหม่จากทิศทาง 5' ไป 3' โดยอาศัยเอ็นไซม์ Thermostable DNA polymerase เช่น Taq polymerase ซึ่งปกติใช้อุณหภูมิอยู่ในช่วง 70-75 องศาเซลเซียส ดังภาพที่ 10 (Gibthai Training Center : บรรยาย)



ภาพที่ 10 ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ช่วงอุณหภูมิ 90-95 °C ในการแยกสาย ดีเอ็นเอจากเส้นคู่เป็นเส้นเดี่ยว ช่วงอุณหภูมิ 50-60 °C ในการจับคู่กันระหว่างดีเอ็นเอเส้นเดี่ยว กับไพรเมอร์ ช่วงอุณหภูมิ 70-72 °C ในการเติมเบสทางปลาย 3' ของดีเอ็นเอเส้นใหม่

ที่มา : วิกิพัฒนาการของ PCR Technology [online], accessed 9 May 2009. Available from <http://images.google.co.th/imgres?imgurl=http://ku->

การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องอัตโนมัติ

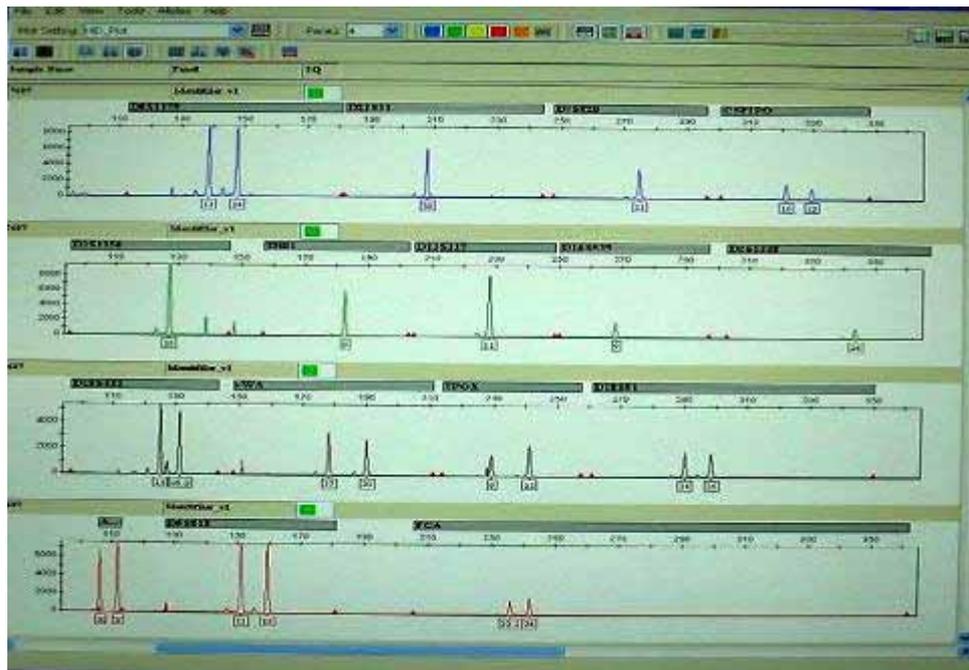
การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องอัตโนมัติได้มีการพัฒนาการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้สารฟลูออเรสเซนต์ติดฉลากที่ไพโรเมอร์ ซึ่งการติดฉลากนี้ทำให้สามารถเพิ่มจำนวนโลกัสแบบไมโครแซทเทลไลต์ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพียงหนึ่งครั้ง และทำการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องอัตโนมัติได้ทันทีโดยที่หลักการยังคงประกอบด้วยขั้นตอน 3 ขั้นตอนเหมือนเดิม คือ การสกัดจากสิ่งส่งตรวจ การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสและการแยกผลผลิต และเพื่อให้การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอในยุคนี้มีความถูกต้องในระดับสากล สถาบันเอฟบีไอ ประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งเป็นหน่วยงานใหญ่ที่รับผิดชอบงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ ได้มีการกำหนดโลกัสมาตรฐานจำนวน 13 โลกัส เรียกว่า ระบบ CODIS (Combined DNA Index System) ซึ่งเป็นระบบฐานข้อมูลทางดีเอ็นเอของประชากรที่ถูกรวบรวมไว้โดยสถาบันเอฟบีไอ ทั้งนี้เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการคัดเลือกโลกัสใดๆมาใช้เป็นโลกัสมาตรฐาน ข้อมูลของระบบ CODIS (Combined DNA Index System) ซึ่งเป็นระบบข้อมูลทางดีเอ็นเอของประชากรที่ถูกรวบรวมไว้โดยสถาบันเอฟบีไอ ทั้งนี้เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการคัดเลือกโลกัสใดๆ มาใช้เป็นโลกัสมาตรฐาน ข้อมูลของระบบ CODIS ได้แสดงอยู่ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ข้อมูลไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 13 โลกั๊ส ตามมาตรฐานของระบบ CODIS

โลกั๊ส	ตำแหน่งบนโครโมโซม	ลำดับเบสแกน	จำนวนซ้ำของลำดับเบสแกน	จำนวนอัลลีล	ขนาด (คู่เบส)
CSF1PO	5q33.3-34	(AGAT) _n	6-16	15	300-340
FGA	4q28	(TTTC) ₃ TTTT TTCT (CTTT) _n CTCC (TTCC) ₂	15-51.2	69	210-360
TH01	11q15.5	(AATG) _n	3-14	20	160-200
TPOX	2q23-2qter	(AATG) _n	6-13	10	220-260
vWA	12q12-pter	TCTA(TCTG) ₃₋₄ (TCTA) _n	10-24	28	150-210
D3S1358	3p	TCTA (TCTG) ₁₋₃ (TCTA) _n	9-20	20	100-160
D5S818	5q21-q31	(AGAT) _n	7-16	10	130-180
D7S820	7q11.21-22	(GATA) _n	6-15	22	260-300
D8S1179	8	(TCTR) _n	8-19	13	110-180
D13S317	13q22-q31	(GATA) _n	5-15	14	210-250
D16S539	16q24-qter	(AGAT) _n	5-15	10	250-300
D18S51	18q21.3	(AGAA) _n	7-27	43	265-350
D21S11	21q11.2-q21	(TCTA) _n (TCTG) _n [(TCTA) ₃ TA (TCTA) ₃ TCA (TCTA) ₂ TCCA TA] (TCTA) _n	24-38	70	180-250

ที่มา :วิชชัย บุญแสง และคนอื่นๆ, ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากสารพันธุกรรมสู่เทคโนโลยีพิสูจน์บุคคล (ปทุมธานี:สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2547) : 62

หลักการในการใช้ชุดตรวจสอบเหล่านี้การใช้ระบบสีฟลูออเรสเซนต์ (5-dye system) ในการติดฉลากที่ปลาย 5' ของเส้นไพรเมอร์ เพื่อใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่างผลผลิตที่มีขนาดใกล้เคียงกันของแต่ละโลทส์จากการทำปฏิกิริยาแบบมัลติเพล็กซ์เพียงครั้งเดียว ระบบสีฟลูออเรสเซนต์ที่ใช้อยู่ในขณะนี้ทั้งหมด 5 สี โดยที่ 4 จาก 5 สี ได้แก่ 6-FAM (สีน้ำเงิน), VIC (สีเขียว), NED (สีเหลือง) และ PET (สีแดง) ใช้ในการติดฉลากไพรเมอร์เพื่อให้ได้ผลผลิตพีซีอาร์ ที่มีสีแตกต่างกัน และ สี LIZ (สีส้ม) สำหรับการติดฉลากตัวควบคุมขนาดมาตรฐาน หลังจากเสร็จสิ้นขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์แล้วเครื่องอัตโนมัติจะส่งผลผลิตพีซีอาร์ไปยังเครื่องตรวจจับสารฟลูออเรสเซนต์ ผลการอ่านจะถูกส่งเข้าเครื่องคอมพิวเตอร์ที่มีโปรแกรมแปลงผลการอ่านให้ออกมาในรูปแบบกราฟอิลเล็กโทรฟีโรแกรม (electropherogram)(ภาพที่ 11) ที่ขึ้นอยู่กับขนาดและสีฟลูออเรสเซนต์ที่ติดอยู่กับผลผลิตพีซีอาร์นั้นๆ



ภาพที่ 11 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยกราฟอิลเล็กโทรฟีโรแกรมของบุคคลหนึ่งๆ จากชุดตรวจสอบ AmpF_{STR} Identifiler ที่มีการใช้ระบบสีฟลูออเรสเซนต์ (5-dye system) ในการแยกความแตกต่างระหว่างผลผลิตพีซีอาร์ที่มีขนาดใกล้เคียงกัน

ข้อดีของชุดตรวจสอบนี้อีกประการหนึ่งคือ สามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์มัลติเพล็กซ์เพียงครั้งเดียวจากไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 16 โลกัสม์ ซึ่งแตกต่างจากการทำมัลติเพล็กซ์แบบไม่ใช้เครื่องอัตโนมัติ ข้อสำคัญอีกประการหนึ่ง คือ การวิเคราะห์โดยใช้สารละลายซิลเวอร์ในเตรทไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างผลผลิตพีซีอาร์ที่มีขนาดใกล้เคียงกันระหว่าง 2 โลกัสม์ได้ แต่การติดฉลากไพรเมอร์ด้วยดีฟลูออโรเรสเซนซ์ ทำให้สามารถบอกความแตกต่างระหว่างผลผลิตพีซีอาร์ที่มีช่วงของผลผลิตใกล้เคียงกันระหว่างโลกัสม์ เช่น โลกัสม์ D8S1179, D3S1358, D19S433 และ D5S818 ต่างก็ให้ผลผลิตพีซีอาร์ในช่วง 100-180 คู่เบส ซึ่งถ้านำผลผลิตพีซีอาร์ทั้ง 4 โลกัสม์มารวมกัน แยกบนแผ่นวุ้น และวิเคราะห์ด้วยสารละลายซิลเวอร์ในเตรท จะไม่สามารถบอกได้ว่าผลผลิตพีซีอาร์นั้นได้มาจากไพรเมอร์คู่ไหน ซึ่งการใช้เครื่องอัตโนมัติทำให้สามารถวิเคราะห์ และแปลผลได้ถูกต้องและแม่นยำกว่า

2.2 กองพิสูจน์หลักฐาน

2.2.1 ประวัติความเป็นมาของการพิสูจน์หลักฐาน (พจน์ บุญยะจินดา 2537 : 1-6)

กำเนิดของการพิสูจน์หลักฐาน เริ่มมาตั้งแต่กลางศตวรรษที่ 19 โดยความริเริ่มของบุคคลหลายท่านด้วยกัน โดยบุคคลที่น่ากล่าวถึง ได้แก่

- Alphonse Bertillon เป็นผู้วางรากฐานของการ “Identification” วางหลักการชี้ตัวบุคคลซึ่งมีชื่อเรียกว่า “Anthropometry” ซึ่งมีหลักว่า “บุคคลสองคนไม่มีโอกาสที่จะมีขนาดของร่างกายตรงกันทุกประการ” เขาได้จัดทำระบบการวัดขนาดของอวัยวะส่วนต่างๆของร่างกายไว้เพื่อเป็นหลักฐานการชี้ตัวบุคคลจนเป็นที่ยอมรับ

- Sir.Robert Henry ได้นำวิธีชี้ตัวบุคคลโดยลายพิมพ์นิ้วมือ ซึ่งเรียกว่า “Dactylography” มาใช้แทน “Anthropometry” ซึ่งการเปรียบเทียบลายพิมพ์นิ้วมือ การจำแนกลายพิมพ์นิ้วมือ ใช้ได้ผลดีมากกว่า เป็นที่ยอมรับมากกว่า และนำมาใช้เป็นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2425 โดยมีผู้นำเอาวิธีการชี้ตัวบุคคลโดยลายพิมพ์นิ้วมือมาใช้ โดยหน่วยงานต่างๆที่มีมาตรฐานในเกือบทุกประเทศจนถึงปัจจุบัน

ในปี พ.ศ. 2403 ได้เริ่มมีการถ่ายภาพ เพื่อประโยชน์ในทางนิติวิทยาศาสตร์เป็นครั้งแรก และในช่วงปลาย พ.ศ. 2423-2433 นั้น นักวิทยาศาสตร์ชื่อ Pual Uhlenhuth ค้นพบว่า เซรุ่มในเลือดนั้น สามารถแยกเลือดของมนุษย์ให้แตกต่างจากเลือดสัตว์ชนิดต่างๆ ได้โดยวิธีที่เรียกว่า “Precipitin test”

ในปัจจุบันได้มีการปรับปรุงเครื่องมือเครื่องใช้ต่างๆ ในการสืบสวนหาตัวคนร้าย และพิสูจน์ความผิด ให้ก้าวหน้าและทันสมัยขึ้นกว่าเดิมเป็นอย่างมาก ทางด้านการพิสูจน์หลักฐาน ก็เช่นเดียวกันได้มีการศึกษาค้นคว้านำเทคนิคทางวิทยาศาสตร์ใหม่ๆ ตลอดจนเครื่องมือการตรวจวิเคราะห์ต่างๆ มาใช้ประโยชน์ในการตรวจพิสูจน์อย่างมากมาย เช่น การใช้รังสีต่างๆ การใช้เลเซอร์ เครื่องตรวจกระสุนปืนอัตโนมัติ เป็นต้น

2.2.2 ประวัติการพิสูจน์หลักฐานในประเทศไทย

พ.ศ. 2475 ได้มีพระบรมราชโองการในพระบาทสมเด็จพระปกเกล้าอยู่หัวให้จัดวางโครงการตำรวจขึ้นใหม่ โดยเปลี่ยนชื่อกรมตำรวจภูธรเป็นกรมตำรวจ และให้เสนาบดีกระทรวงมหาดไทยจัดแบ่งแผนกงานรายย่อยออกไปตามสมควรแก่รูปการ ในปีเดียวกันนี้พระยาจำเริญยศเสนาบดีศรีบริบาลรัฐมนตรีกระทรวงมหาดไทยได้จัดแบ่งงานในกรมตำรวจสำหรับตำรวจสันติบาลนั้นได้ประกาศ ดังนี้ กองที่หนึ่ง กองที่สอง กองที่สามและกองตำรวจแผนกสรรพากร โดยกองที่สาม แบ่งออกเป็นสี่แผนก มีอยู่แผนกหนึ่งในกองที่สามเป็นจุดกำเนิดของกองพิสูจน์หลักฐาน คือ แผนกวิทยาการ

พ.ศ. 2476 ได้มีพระราชกฤษฎีกาจัดวางระเบียบราชการกรมต่างๆ ในกระทรวงมหาดไทยกำหนดงานของกรมตำรวจขึ้นใหม่ สำหรับกองตำรวจสันติบาล ได้กำหนดไว้ดังนี้

กองกำกับการ 1 สืบสวนปราบปรามโจรผู้ร้าย

กองกำกับการ 2 สืบสวนราชการพิเศษ

กองกำกับการ 3 เทคนิคของตำรวจแบ่งออกเป็น 5 แผนก คือ

1.แผนกทะเบียนพิมพ์ลายนิ้วมือ

2.แผนกบันทึกแผนประทุษกรรม

3.แผนกพิสูจน์หลักฐาน

4.แผนกบัญชีโจรผู้ร้าย

5.แผนกเนรเทศ

พ.ศ. 2483 ได้มีการปรับปรุงและขยายงานของกรมตำรวจ ได้จัดตั้งกองบังคับการตำรวจสอบสวนกลางขึ้นใหม่โดยแยกงานทางด้านวิทยาการซึ่งเดิมสังกัดอยู่กับกองบังคับการตำรวจสันติบาล มาขึ้นตรงกับกองบังคับการตำรวจสอบสวนกลาง

พ.ศ. 2493 กิจการของกองตำรวจสอบสวนกลางได้เจริญรุดหน้าไป จึงยกฐานะขึ้นเป็นกองบัญชาการตำรวจสอบสวนกลาง โดยได้เริ่มยกฐานะกองกำกับการวิทยาการขึ้นเป็น “ กองพิเศษ ” (กองพิเศษที่จัดตั้งขึ้นใหม่นี้เป็นรากฐานของ “ กองพิสูจน์หลักฐาน ” และ “ กองทะเบียนประวัติอาชญากร ”)

พ.ศ. 2497 กองบัญชาการตำรวจสอบสวนกลาง ได้มีการปรับปรุงหน่วยงานให้กว้างขวางยิ่งขึ้นโดยเพิ่มกองบังคับการขึ้นใหม่อีก 4 กอง และมีอยู่กองหนึ่งที่เป็นส่วนหนึ่งของกองพิสูจน์หลักฐาน คือ กองวิทยาการ ในการยุบกองพิเศษไปรวมกับกองวิทยาการที่ตั้งขึ้นใหม่เพื่อต้องการให้ดำเนินการพิสูจน์วัตถุพยาน และการตรวจพิสูจน์ค้นคว้าตัวบุคคลรวมอยู่ในหน่วยงานเดียวกัน

พ.ศ. 2503 กองบัญชาการตำรวจสอบสวนกลางได้มีการปรับปรุงหน่วยงานต่างๆ ใหม่ โดยยุบ “ กองวิทยาการ “ ออกจากสารระบบทำเนียบราชการตำรวจ โดยแยกงานของกองนี้ออกเป็น 2 กอง คือ

- 1.กองพิสูจน์หลักฐาน
- 2.กองทะเบียนประวัติอาชญากร

โดยแยกงานด้านการตรวจพิสูจน์วัตถุพยานและงานการตรวจพิสูจน์ค้นคว้าในด้านตัวบุคคลออกจากกันและได้มีการปรับปรุงหน่วยงานทั้งสองให้กว้างขวางยิ่งขึ้น

ดังนั้น กองพิสูจน์หลักฐาน จึงได้ถือกำเนิดและเป็นหน่วยงานระดับกองบังคับการขึ้นตรงต่อกองบังคับการตำรวจสอบสวนกลาง ตามพระราชกฤษฎีกาแบ่งส่วนราชการกรมตำรวจ ตั้งแต่วันที่ 13 กันยายน 2503

พ.ศ. 2535 ได้มีพระราชกฤษฎีกาการแบ่งส่วนราชการกรมตำรวจกระทรวงมหาดไทย (ฉบับที่ 8) พ.ศ. 2535 จัดตั้งสำนักงานวิทยาการตำรวจ ให้กองพิสูจน์หลักฐาน มีสายบังคับบัญชาขึ้นตรงต่อ “ สำนักงานวิทยาการตำรวจ “

ความหมายของกองพิสูจน์หลักฐาน

การพิสูจน์หลักฐานมีคำจำกัดความคือ “ เป็นกฎเกณฑ์ทั้งทางวิชาชีพและทางวิทยาศาสตร์ ซึ่งมุ่งในการให้การยอมรับ การชี้เฉพาะ การจำแนก และการตีความหมายของวัตถุพยานโดยนำวิทยาศาสตร์บริสุทธิ์มาประยุกต์ใช้ ในกรณีที่เกี่ยวข้องระหว่างกฎหมายกับวิทยาศาสตร์ “ ซึ่งถอดความมาจากภาษาอังกฤษว่า “ (Criminalistics is that profession and scientific discipline directed to the recognition, identification and evaluation of physical evidence by application of the natural sciences to law – science matters “ ขยายความให้

ชัดเจนจะกล่าวได้ว่า เป็นศาสตร์แขนงหนึ่ง ซึ่งอาศัยกฎเกณฑ์ทฤษฎีต่างๆ ของวิทยาศาสตร์หลายสาขา เช่น สาขาเคมี, สาขาฟิสิกส์, สาขาชีววิทยา, มารวมกัน แล้วนำมาประยุกต์ใช้เป็นวิธีการตรวจพิสูจน์วัตถุพยาน เพื่อให้บรรลุถึงจุดประสงค์ในการตรวจพิสูจน์การกระทำผิด หรือความบริสุทธิ์ของผู้ถูกกล่าวหา ภายใต้กฎเกณฑ์แห่งกฎหมาย

การตรวจพิสูจน์หลักฐาน จะดำเนินการได้ดังนี้

1. การตรวจเพื่อชี้เฉพาะ เป็นการตรวจพิสูจน์วัตถุพยานด้วยวิธีการทางวิทยาศาสตร์ แล้วแสดงผลการตรวจว่าใช่หรือไม่ใช่ เช่น การตรวจพิสูจน์คราบโลหิต, คราบอสุจิ, เขม่าป็น, ยาเสพติดให้โทษ เป็นต้น

2. การตรวจพิสูจน์เปรียบเทียบ เป็นการตรวจเปรียบเทียบวัตถุพยาน แล้วให้ความเห็นทางวิชาการ เช่น การตรวจพยานเอกสารต่างๆ ได้แก่ การตรวจเปรียบเทียบลายนิ้วมือ, ลายเซ็นต์, ตัวอักษรพิมพ์ดีด, ตรวจเปรียบเทียบเส้นใย

3. การให้ความเห็นทางด้านวิชาการ เป็นการตรวจสถานที่เกิดเหตุในคดีต่างๆ โดยปกติพยานหลักฐานจะถูกทำลายไปเป็นส่วนมาก แต่ร่องรอยและวิธีการที่คนร้ายกระทำ อาจจะชี้บอกถึงสาเหตุของการกระทำ หรือ ชี้แนวทางการกระทำของคนร้ายได้ โดยอาศัยความรู้ ความชำนาญ ทางด้านการตรวจพิสูจน์หลักฐาน นอกจากนั้น วัตถุพยานบางอย่าง แม้จะมีน้อยหรือขนาดเล็กมากที่พบในที่เกิดเหตุ เมื่อทำการตรวจวิเคราะห์จะสามารถบอกแนวทางที่จะช่วยการสืบสวนหาตัวผู้กระทำผิดไปในทางที่ถูกต้องและมีความรวดเร็วได้

2.2.3 กลุ่มงานที่ทำหน้าที่ในการตรวจพิสูจน์ในกองพิสูจน์หลักฐาน

กลุ่มงานตรวจสถานที่เกิดเหตุ

สถานที่เกิดเหตุ คือ สถานที่ที่มีเหตุการณ์ไม่ปกติที่เกี่ยวข้องกับทางคดีเกิดขึ้น ความสำคัญของสถานที่เกิดเหตุอยู่ที่วัตถุพยานที่อยู่ในสถานที่เกิดเหตุ นั้น ดังนั้น การพูดถึงความสำคัญของสถานที่เกิดเหตุก็หมายถึงรวมถึงความสำคัญของวัตถุพยานนั่นเอง ความสำเร็จของการสอบสวนคดีอาญาที่เกี่ยวข้องกับสถานที่เกิดเหตุ นอกจากจะขึ้นอยู่กับความรอบคอบของพนักงานสอบสวนแล้ว เจ้าหน้าที่ตำรวจผู้พบเหตุหรือมีหน้าที่รับผิดชอบในการตรวจสถานที่เกิดเหตุขั้นต้น คือ ตำรวจคนแรกที่มาถึงสถานที่เกิดเหตุ หากกระทำการสิ่งใดไปโดยรู้เท่าไม่ถึงการณ์ หรือขาดความระมัดระวัง อาจเป็นเหตุให้พยานหลักฐานในที่เกิดเหตุเปลี่ยนแปลงเสียหายได้ ซึ่งจะส่งผลให้การสอบสวนประสบผลสำเร็จยากขึ้น

การตรวจสอบสถานที่เกิดเหตุ นอกจากเพื่อยืนยันถึงเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นแล้ว มีจุดมุ่งหมายเพื่อเป็นประโยชน์ในการสืบสวน โดยนำเอาวัตถุพยานไปตรวจวิเคราะห์เพื่อให้ทราบถึงมูลคดี การตรวจหาหลักฐานโดยความละเอียดรอบคอบ ก็จะทำให้ทราบถึงเหตุของการกระทำผิดได้ เพื่อทำการตรวจเก็บวัตถุพยานหลักฐานต่างๆ

กลุ่มงานตรวจเอกสาร

หน้าที่และความรับผิดชอบการตรวจเอกสารต่างๆ เช่น ลายเซ็น, ลายมือเขียน, ระบบการพิมพ์ที่พิมพ์ในเอกสาร, ธนบัตร, หนังสือสำคัญที่มีระบบพิมพ์ และตราประทับต่างๆ เป็นต้น เป็นลักษณะของการตรวจเปรียบเทียบระหว่างของจริงและของปลอมที่เป็นคดีความทั้งในทางแพ่งและทางอาญา อีกทั้งเป็นการตรวจยืนยันว่าวัตถุพยานหรือหนังสือสำคัญนั้นถูกพิมพ์ออกมาจากเครื่องพิมพ์ที่สงสัยหรือไม่ก็ได้

กลุ่มงานตรวจอาวุธและเครื่องกระสุนปืน

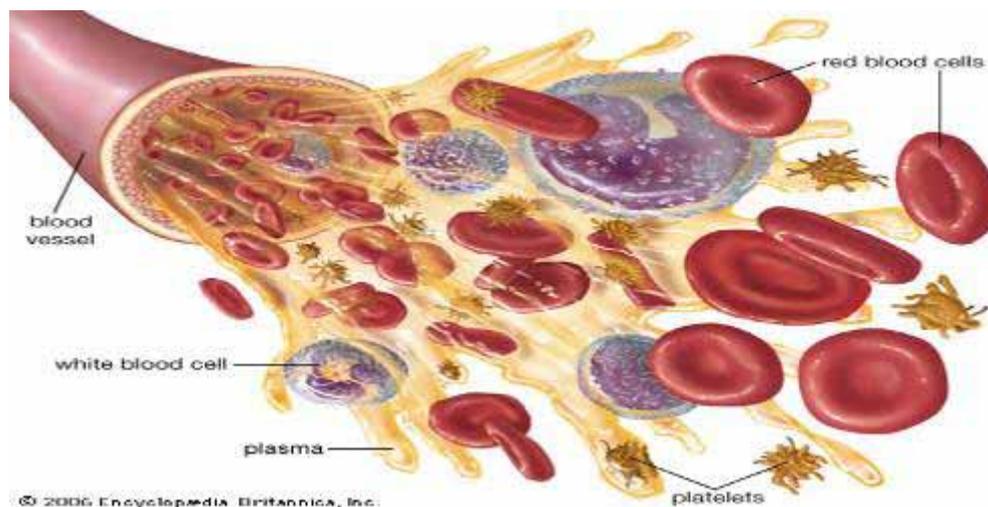
กลุ่มงานตรวจอาวุธและเครื่องกระสุนปืนทำหน้าที่ในการตรวจพิสูจน์เปรียบเทียบและยืนยันว่าปลอกกระสุน และหัวกระสุนนั้นถูกยิงออกมาจากปืนกระบอกใด ปลอกกระสุนและหัวกระสุนที่เก็บได้ในที่เกิดเหตุเป็นชนิดและขนาดใด ถูกยิงออกมาจากปืนชนิดใด ตรวจหาวิถีของการยิงว่าถูกยิงมาจากทิศทางใด ตรวจร่องรอย tool marks

กลุ่มงานตรวจทางเคมี ฟิสิกส์ และชีววิทยา

แยกออกเป็น 3 หน่วยงานที่มีหน้าที่ในการตรวจวัตถุพยานที่มีความแตกต่างกันดังนี้ ทางด้านเคมีตรวจพิสูจน์วัตถุพยานที่เกี่ยวข้องกับเคมี เช่น สารเคมีที่ใช้ในการก่อคดี, สีในคดีเฉี่ยวชน, ทองคำ, รถ เรือ หรือวัตถุที่มีเลขหมายประจำ, เปรียบเทียบดิน, สารเคมีที่ใช้ในคดีระเบิด, และน้ำมันเชื้อเพลิงในคดีเพลิงไหม้ เป็นต้น ทางด้านฟิสิกส์ตรวจพิสูจน์เกี่ยวกับการลัดวงจรไฟฟ้า, มิเตอร์ไฟฟ้า, ร่องรอยคดีเฉี่ยวชน, และคอมพิวเตอร์ และทางด้านชีววิทยาตรวจดีเอ็นเอของวัตถุพยานทางชีววิทยา ดังนี้

โลหิต

โลหิตของมนุษย์นั้นจะมีประมาณ 80% ของน้ำหนักตัว ในจำนวนนี้ประกอบด้วยส่วนที่เป็นเม็ดเลือด 45% และส่วนที่เป็นน้ำเลือด 55% ดังภาพที่ 12



ภาพที่ 12 ส่วนประกอบของโลหิต

ที่มา : [It's Crowded in Your Blood](http://www.cache.eb.com) [online], accessed 10 July 2008. Available from <http://www.cache.eb.com>

เม็ดเลือด คือ เซลล์หรือส่วนของเซลล์ที่แช่อยู่ในน้ำเลือด เม็ดเลือดที่อยู่ในร่างกายแบ่งออกได้เป็น 3 พวก คือ เม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว (ภายในมีนิวเคลียส) และเกล็ดเลือด

ในคดีอาญาประเภทประทุษร้ายต่อร่างกายและชีวิต เช่น คดีฆาตกรรม ช่มชู้ กระทำชำเรา และคดีอื่นๆ ที่คล้ายคลึงกับคดีเหล่านี้ รอยคราบโลหิตจะเป็นหลักฐานสำคัญอันหนึ่งเสมอ ในคดีจำพวกนี้จะพบคราบโลหิตจากบริเวณดังกล่าว คือ จากตัวของผู้ถูกประทุษร้าย สถานที่เกิดเหตุอาวุธที่ใช้และอาวุธที่ใช้ก่อเหตุ และตัวของผู้ร้าย

ประโยชน์ของโลหิตในการสืบสวนนั้นมีหลายประการ เช่น

1. ใช้ชี้บ่งบอกว่าที่ใดเป็นสถานที่เกิดเหตุ การที่ตรวจพบโลหิตของมนุษย์ และเป็นดีเอ็นเอแบบเดียวกันกับบาดเจ็บหรือผู้ตายตรง ณ บริเวณใด บริเวณนั้นก็ควรถือเป็นสถานที่เกิดเหตุได้ กรณีที่พบบ้อย คือ ผู้ตายถูกฆ่าตายในที่แห่งหนึ่ง และศพถูกนำไปทิ้งอีกที่หนึ่ง เป็นต้น

2. ใช้บ่งบอกว่าได้มีการกระทำผิดเกิดขึ้น เช่น การตรวจพบโลหิตมนุษย์ตามสถานที่ที่ไม่น่าพบ เป็นต้นว่าตามชิ้นส่วนของรถยนต์ เช่น กันชน ฝากระโปรง ย่อมเป็นเครื่องบ่งชี้ได้ว่ารถคันนี้น่าจะถูกใช้ในการกระทำผิดมาก่อน

3. ใช้ชี้ระบุว่าอาวุธใดเป็นอาวุธที่ใช้ในการกระทำผิด

4. ใช้พิสูจน์คำให้การของผู้ต้องสงสัย ได้แก่ การที่ผู้ต้องสงสัยให้การว่า โลหิตที่พบตามตัวหรือเสื้อผ้าของตนเป็นโลหิตของสัตว์ หากจากการพิสูจน์สามารถยืนยันได้ว่าโลหิตดังกล่าวเป็นโลหิตของมนุษย์ ย่อมใช้เป็นข้อหักล้างคำให้การของผู้ต้องสงสัยได้

5. ใช้ในการแยกผู้บริสุทธิ์ออกจากผู้กระทำผิด เช่น ในกรณีที่มีผู้ต้องสงสัยว่าจะมีส่วนในการทำความผิดคดีเดียวกันจำนวนหลายคน

คราบอสุจิ

น้ำอสุจิเป็นน้ำหลังจากต่อมสืบพันธุ์ในอวัยวะเพศชายจากการร่วมประเวณีหรือถูกกระตุ้นให้เคลื่อนออกมา มีลักษณะเป็นน้ำเหนียวสีขาวขุ่น หลังออกมาครั้งละ 1.5 มิลลิลิตร ประกอบด้วยตัวอสุจิ (ดังภาพที่ 13) และส่วนที่เป็นน้ำ คราบอสุจิเป็นหลักฐานสำคัญในคดีข่มขืนกระทำชำเรา พบได้ในช่องคลอดของหญิงที่ถูกร่วมเพศ นอกจากนี้ ยังพบคราบอสุจิเปื้อนบริเวณเสื้อผ้า

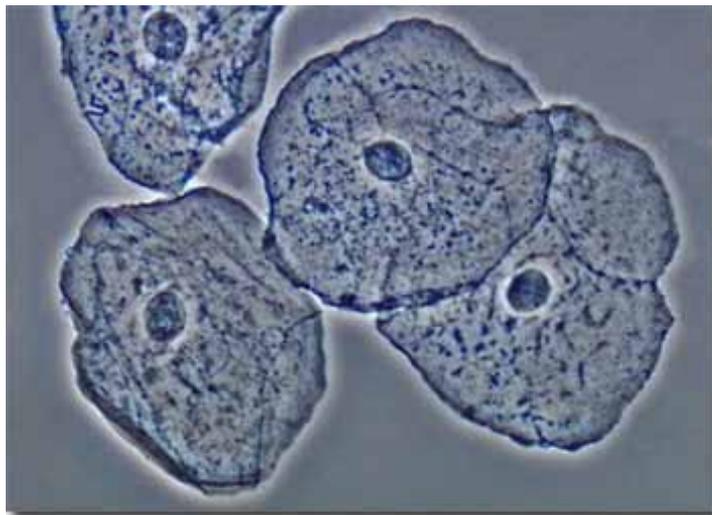


ภาพที่ 13 ตัวอสุจิ

ที่มา : [DNA \[online\]](http://www.ifm.go.th/images/sperm01.jpg), accessed 11 July 2008. Available from www.ifm.go.th/images/sperm01.jpg

เยื่อข้างแก้มและน้ำลาย

น้ำลายเป็นสารคัดหลั่งออกมาในปาก สร้างจากต่อมน้ำลายในบริเวณปากลักษณะเป็นของเหลวประกอบด้วยน้ำ น้ำย่อย โปรตีน ไขมัน และสารอื่นๆ น้ำลายและคราบน้ำลายเป็นพยานวัตถุทางชีววิทยาชนิดหนึ่ง ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการตรวจเป็นพยานหลักฐานเนื่องจากมี Epithelial Cells ดังภาพที่ 14 วัตถุพยานที่อาจพบได้ในรูปน้ำลาย เช่น น้ำลายมีผู้บ้วนทิ้งไว้ ก้นบุหรี่ที่น้ำลายติด จากผ้าที่ใช้อุดปาก ซองจดหมายและร่องรอยบาดแผลที่ใช้ปากกัด



ภาพที่ 14 Epithelial Cells

ที่มา :เซลล์ของสิ่งมีชีวิต [online], accessed 11 July 2008. Available from www.microscopyu.com/galleries/dicphasecontrast/cheekcellsmall.html

เส้นผมและเส้นขน

เส้นผม หมายถึง เส้นผมบนศีรษะเท่านั้นในส่วนอื่นของร่างกายเรียกเป็นเส้นขน ทั้งสิ้น เช่น เส้นขนบริเวณอวัยวะเพศ เส้นขนหน้าอก หรือเส้นขนหน้าแข้ง เป็นต้น ในคดีต่างๆ หลักฐานทางเส้นผม เส้นขน และเส้นขนบริเวณอวัยวะเพศ ที่มีรากเส้นผมและเส้นขน สามารถเป็น ประโยชน์ช่วยในการสืบสวน และเป็นพยานหลักฐานที่สำคัญอีกอย่างหนึ่ง เช่น คดีข่มขืนกระทำชำเรา คดีข่มขืนแล้วฆ่า และคดีฆาตกรรม เส้นผมจากศีรษะที่มีรากเส้นผมหรือเส้นขนจากส่วนต่างๆ ของร่างกายของผู้บาดเจ็บหรือผู้ตายอาจหลุด หรือขาดติดอยู่กับอาวุธ ติดอยู่กับรถ หรือตกหล่นอยู่ ณ สถานที่เกิดเหตุที่มีราก จากหลักฐานนี้ สามารถนำมาเป็นเครื่องพิสูจน์ยืนยันว่า เป็นเส้นผมหรือเส้นขนของคนร้าย ผู้ตาย หรือผู้เสียหายได้

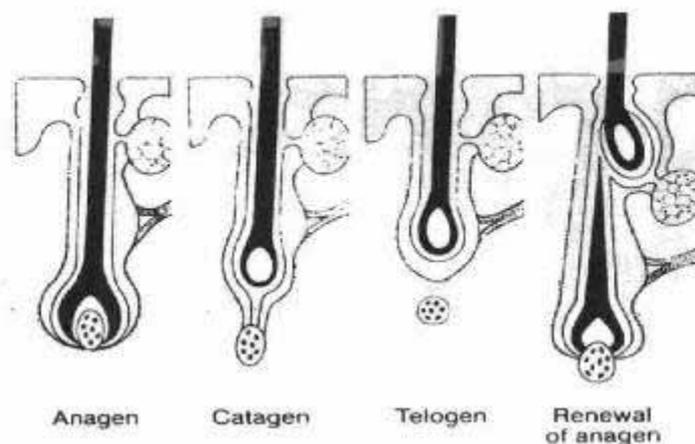
ลักษณะของเส้นผมมนุษย์

เส้นผมเป็นส่วนหนึ่งของระบบผิวหนังเจริญจาก Hair Follicle ที่ฝังในผิวหนัง เมื่อเจริญงอกออกมาพ้นผิวหนังมีอัตราการงอกวันละ 0.2-0.5 มม. วงจรชีวิตของเส้นผมสามารถจัดแบ่งได้ออกเป็น 3 ระยะ ดังต่อไปนี้ (ดังภาพที่ 15)

1. Anagen phase ระยะที่มีการเจริญเติบโตของเส้นผม โดยปกติแล้วเส้นผมในช่วงเวลานี้จะมีช่วงอายุประมาณ 2-3 ปี
2. Catagen phase ระยะหยุดการเจริญเติบโตของเส้นผม โดยทั่วไปเส้นผมจะอยู่

ในช่วงระยะเวลานี้ประมาณ 2-3 เดือน

3. Telogen phase ระยะวัยชราของเส้นผม เส้นผมที่อยู่ในระยะเวลานี้จะทยอยหลุดร่วงไปตามธรรมชาติขณะเดียวกัน เซลล์รากผมก็จะเริ่มสร้างเส้นผมเส้นใหม่ขึ้นมาทดแทนเส้นผมเดิมที่จะหลุดร่วงไประยะเวลานี้ประมาณ 3-7 วัน



ภาพที่ 15 วงจรชีวิตของเส้นผม

ที่มา: เส้นผมมนุษย์ [online], accessed 11 July 2008.

Available from www.geocities.co

กลุ่มงานตรวจยาเสพติด

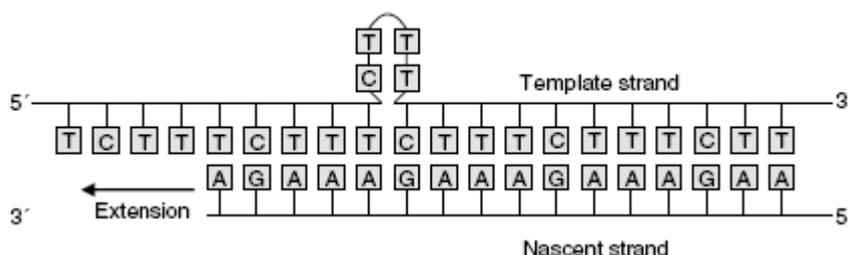
หน้าที่และความรับผิดชอบในการตรวจหาสารเสพติดจากวัตถุของกลางในคดี เพื่อใช้ในการระบุโทษของผู้กระทำผิดโดยคิดจากปริมาณของสารบริสุทธิ์

กลุ่มงานตรวจลายนิ้วมือแฝง

หน้าที่และความรับผิดชอบ ตรวจเปรียบเทียบลายนิ้วมือแฝงกับลายนิ้วมือแฝง, ตรวจเปรียบเทียบลายนิ้วมือแฝงกับลายนิ้วมือผู้ต้องสงสัย, ตรวจเปรียบเทียบลายนิ้วมือแฝงกับระบบฐานข้อมูล AFIS และตรวจเปรียบเทียบลายนิ้วมือผู้ต้องหาที่ระบบฐานข้อมูล AFIS

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Goodwin และคณะได้อธิบายไว้ว่า ในกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมักจะมี stutter peak เกิดขึ้นได้ทั่วไป ซึ่ง stutter peak นี้เป็นผลผลิตที่สั้นหรือยาวกว่าอัลลีลจริง (true allele) 1 ซ้ำ ซึ่งโดยส่วนใหญ่แล้วมักเกิดผลผลิตที่สั้นกว่าอัลลีลจริง stutter peak เกิดขึ้นจากการเลื่อนลำดับเบส (slippage) ดังภาพที่ 16 ในระหว่างกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในขั้นตอน extension



ภาพที่ 16 กลไกการเกิด stutter

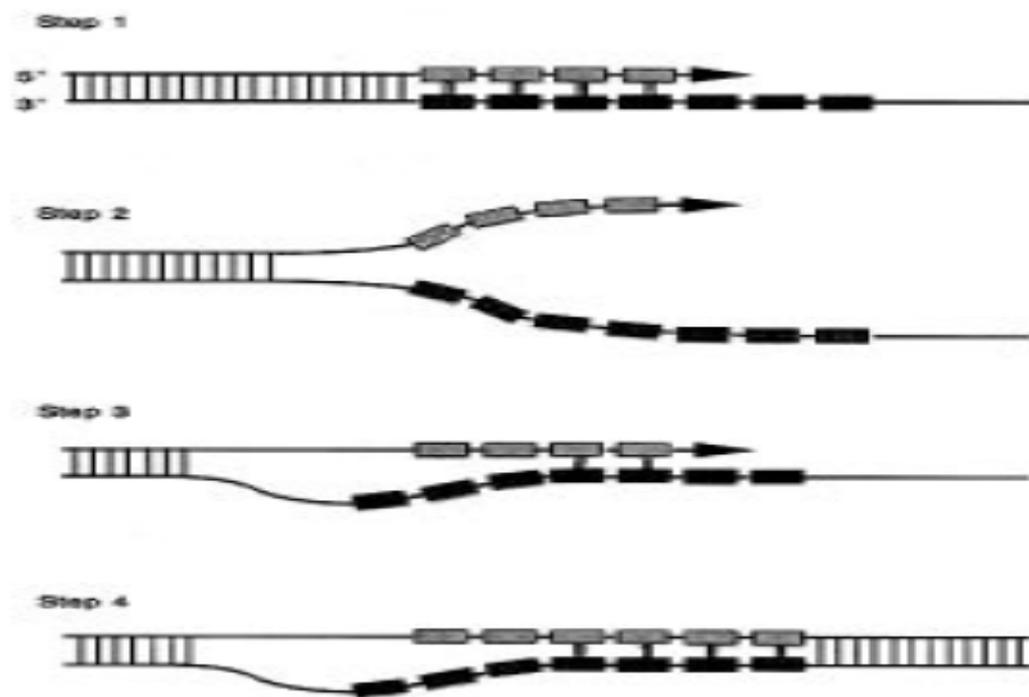
ที่มา: William Goodwin, Adrian Linacre, Sibte Hadi, An Introduction to Forensic Genetics (England:John Wiley& Sons Ltd., 2007):65

John และคณะ ได้อธิบายว่า Stutter peak เป็น peak ที่เกิดขึ้นเนื่องมาจากในขั้นตอน amplification ของ DNA polymerase ซึ่งเกิดการเลื่อนของเบส (slippage base) ของสาย STR ที่เป็น Template ทำให้ได้สาย DNA ที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่มีลำดับเบสสั้นกว่าของ Template DNA 1 ชุด ซึ่ง Stutter peak คือ peak ของ PCR product ที่มีลำดับเบสสั้นกว่าของ Template 1 ชุด โดยที่ Template DNA ที่มีลำดับเบสสั้นกว่า 2 ตัว (dinucleotide) หรือ 3 ตัว (trinucleotide) มักจะเกิดการเลื่อนของเบสในขั้นตอน amplification มากกว่า Template DNA ที่มีลำดับเบสสั้นกว่า 4 ตัว โดยเปอร์เซ็นต์ความสูงของ stutter ไม่เกินร้อยละ 15 ของพีคหลัก

สรุปได้ว่า การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมักเกิดการเลื่อนของเบสบนสาย STR ที่เป็นดีเอ็นเอต้นแบบทำให้เกิดการหายไปของชุดลำดับเบส สายดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่จึงมีลำดับเบสสั้นกว่าสายดีเอ็นเอต้นแบบ ซึ่งเรียกผลผลิตนี้ว่า stutter ซึ่งการศึกษา stutter โดยทั่วไปจะพบเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ไม่เกิน 15 เปอร์เซ็นต์ของพีคหลัก

การศึกษาและรายงานโดย Walsh และคณะ พบว่า Stutter product เป็นผลผลิตในการเพิ่มปริมาณ DNA ของตำแหน่งที่มีชุดซ้ำกัน 4 เบส ลำดับเบสซ้ำใน main allele ที่ตำแหน่ง vWA และแถบ stutter พบว่าแถบ stutter จะมีลำดับเบสซ้ำหายไป 1 ชุด เมื่อเทียบกับ main allele คล้ายกับการทดลองในห้องปฏิบัติการที่อื่นที่พบว่าเกิดการหายไปของชุดลำดับเบส เช่น ACTBP2 มีลำดับเบสแกนซ้ำแบบ AAAG พบว่า stutter bands ก็เกิดการหายไป 1 ชุดของลำดับเบสแกนซ้ำ ความผิดพลาดของชุดการซ้ำนี้ไม่มีความจำเป็นนักในลำดับเบสแกนซ้ำ ชุดการซ้ำกันอาจจะถูกตัดออกจากทุกตำแหน่งเท่าๆกัน ผลสรุปจากห้องปฏิบัติการได้รายงานการทดลองว่า stutter band ของตำแหน่งที่มีชุดซ้ำกัน 2 เบส จาก main allele ดังนั้น stutter bands ของ STR loci จึงมีชุดลำดับเบสน้อยกว่า main allele band กลไกของการเลื่อนดีเอ็นเอที่ผิดพลาดมีข้อเสนอแนะว่าเกิดขึ้นเนื่องมาจากในขั้นตอน Replication ของ DNA polymerase ซึ่งเกิดการเลื่อนของเบส (slippage base) ของสาย STR ที่เป็นดีเอ็นเอต้นแบบทำให้ได้สาย DNA ที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่มีลำดับเบสซ้ำกันน้อยกว่าของดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ชุด (ภาพที่ 17) และเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งเมื่อพบว่าการโดยใช้ stofful fragment ทำให้เกิดการสังเคราะห์ DNA ขึ้นใหม่ที่ละ 5-10 base ในขณะที่ Taq เกิดการสังเคราะห์ที่ 50-60 base การวิจัยอื่นๆได้คาดคะเนว่า DNA polymerase ที่มีเสถียรภาพมีกิจกรรมสูงจะสามารถลดการเกิด stutter band ความเป็นไปได้ของความผิดพลาดในการเลื่อนของสายดีเอ็นเอ เป็นที่มาของการเกิด loop ดังนั้น ข้อเสนอแนะใหม่ที่ได้ จึงควรมีการเติมแต่งชุดลำดับเบสให้สัมพันธ์กับดีเอ็นเอต้นแบบ นอกจากนี้ยังพบว่า การเกิด stutter band ที่ยาวกว่า main allele เคยมีการศึกษาในตำแหน่งที่มีชุดลำดับเบสซ้ำกัน 2 เบส แม้ว่า stutter band ที่เด่น คือ stutter band ที่สั้นกว่า main allele ซึ่งอธิบายความสัมพันธ์การขาดของ stutter band ได้ว่า DNA polymerase อาจจะเข้าร่วมการยัดดีเอ็นเอบริเวณปลาย 3' ของสายที่ยึดออกเมื่อสายไม่เข้าคู่กัน รายงานนี้เป็นข้อมูลที่มีประโยชน์ต่อการหาลักษณะเด่นและเปอร์เซ็นต์ความสูงของ stutter band ที่โลกัส vWA ลำดับเบสที่ซ้ำของตำแหน่งที่มีชุดลำดับเบสซ้ำกัน 4 เบส 1 ชุด และกล่าวถึงลำดับเบสของ stutter band ซึ่งมีจำนวนลำดับเบสแกนซ้ำน้อยกว่า main band 1 ชุด การเกิด stutter band ในตำแหน่งที่มีชุดลำดับเบสซ้ำกัน 2 เบส ความผิดพลาดในการเลื่อนเบสในสายดีเอ็นเอบางครั้งได้พบสิ่งที่น่าสนใจว่า stutter เกิดได้ตำแหน่ง vWA allele ในตัวอย่างเมื่อมีลำดับเบสแกนซ้ำแบบ TCTA แทรกอยู่ ซึ่งแตกต่างจากอัลลีลในโลกัส vWA และในตัวอย่างอื่นๆ รายงานได้กล่าวไว้ว่าอัตราส่วน stutter จะเพิ่มมากขึ้น เมื่อบริเวณของลำดับเบสแกนซ้ำมีการขยายเพิ่มมากขึ้น วิธีที่ทำการศึกษา เป็นการขจัดรูปแบบ stutter band ในขั้นตอนการทำ PCR ได้และการแปรผลในการทดลองในตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีบุคคลมากกว่า 2 คน สามารถนำมาประยุกต์

ในการจำแนก stutter ของอัลลีลทั้งหมดที่ตำแหน่ง STR ที่สนใจได้ ความสัมพันธ์นี้อาจจะเป็นเหตุผลที่ช่วยยับยั้งการเกิด loop ในสาย extending strand และในการศึกษา stutter ที่โดกัส vWA และการซ้ำของเบสใน tetranucleotide พบว่ายังไม่พบ stutter band ที่ยาวกว่า main allele



ภาพที่ 17 กลไกการเลื่อนลำดับเบสในการเกิด stutter

ที่มา: P. Sean Walsh, Nicola J. Fildes, Rebecca Reynolds, Sequence analysis and Characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA, (Nucleic Acids Research 24, 14 February 1996): 2807-2812

การก่อรูป stutter band มีมากขึ้นเมื่อตัวอย่างมีโครงสร้างของลำดับเบสแกนซ้ำยาวขึ้น การศึกษาลำดับเบสในโดกัส vWA ในรายงานนี้ พบว่าอัลลีลที่มีลำดับเบสแกนซ้ำแบบ TCTA ถูกขัดขวางทำให้เกิด stutter band ที่ต่ำเมื่อเทียบกับอัลลีลที่ประกอบด้วยลำดับเบสแกนซ้ำ 10 ชุด เมื่อพิจารณาโมเดลที่เกิดความผิดพลาดในการเลื่อนลำดับเบสของสายดีเอ็นเอต้นแบบ มีโอกาสเกิด loop เพราะมีลำดับเบสแกนซ้ำขยายยาว ดังนั้น เมื่อมีการเกิด loop จะทำให้เอนไซม์ polymerase ทำงานไม่สมบูรณ์ทำให้ได้ดีเอ็นเอสายที่สั้นกว่าที่ควรจะเป็น เรียกว่า stutter band

ถึงแม้ว่าที่ตำแหน่ง vWA ในการศึกษานี้จะมีเปอร์เซ็นต์ความสูงของ stutter peak ที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับอัลลีลที่มีขนาดสั้นกว่า ความน่าสนใจของความต่อเนื่องต่อเปอร์เซ็นต์ในห้องปฏิบัติการโดยทั่วไปที่โลกส์มีเบสเดี่ยวคอยเป็นตัวขัดขวางใน core triplet repeat sequence ด้วยเหตุนี้อัลลีลที่ยืดออกให้ยาวจะมีความเสถียรต่ำ และมักจะเปลี่ยนขนาดไป ดังนั้นห้องปฏิบัติการจึงกล่าวว่า อัลลีลที่มีจำนวนซ้ำเป็นจำนวนมากก็จะเป็นความเสถียร การสรุปถึงโลกส์ของอัลลีลที่บรรจบซ้ำจำนวนน้อยๆ หรือการขัดขวางการขยายการซ้ำซึ่งเป็นเป้าหมายหรือจุดประสงค์ในการเลือกโลกส์ที่มี stutter ต่ำๆ และไม่มีการทดลองใดที่จะขจัด stutter band ใน tetranucleotide ได้ในขณะนี้ อย่างไรก็ตาม stutter band เกิดได้อย่างอิสระในแต่ละอัลลีล ความสำคัญของความยากในการอธิบาย stutter band ในตัวอย่างที่มากกว่า 2 คน (mix sample) ว่าแบนจางที่มีขนาดสั้นกว่าแบนที่เข้ม จะเป็น stutter band หรือเป็นอัลลีลที่แท้จริง จากอีกบุคคลหนึ่ง ยิ่งไปกว่านั้นหาก PCR product ถูกตรวจจับด้วยสี silver เมื่อไม่ทราบปริมาณ จึงมีการปรับปรุงที่มีศักยภาพตรวจจับ PCR product เช่น เครื่อง 373A DNA Sequencer ใช้ fluorescent สามารถตรวจจำนวน stutter band ในแต่ละอัลลีล ซึ่งสามารถตัดสินใจในตัวอย่างที่ไม่ปนเปื้อน ตัวอย่างที่ถูกผสมมติในคดี ที่โลกส์ vWA พบ stutter band มากกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ของพีคหลัก โดยมีข้อตกลงว่า stutter จะมีความสูงไม่เกิน 15 เปอร์เซ็นต์ของพีคหลัก

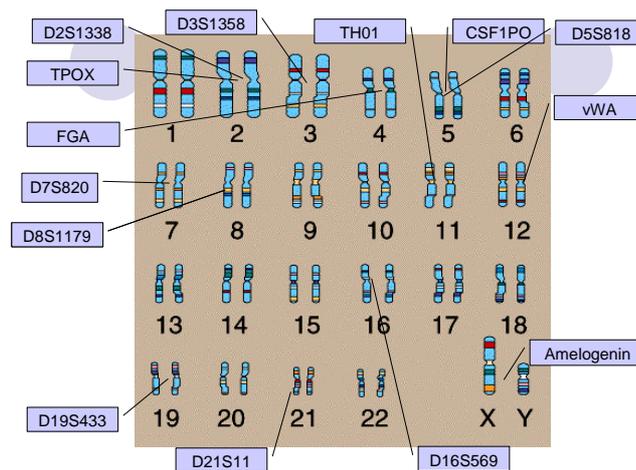
สรุปได้ว่า การเกิด loop จะทำให้เอ็นไซม์ polymerase ทำงานไม่สมบูรณ์ ทำให้ได้ผลผลิตเป็นสายดีเอ็นเอที่สั้นกว่าดีเอ็นเอต้นแบบ เรียกว่า stutter peak และในโลกส์ vWA จะพบ stutter peak เป็นจำนวนมากโดยพบเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter มีมากกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่เกิน 15 เปอร์เซ็นต์ของพีคหลัก นอกจากนี้ยังพบว่าเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter จะเพิ่มขึ้นเมื่อบริเวณของลำดับเบสแกนซ้ำมีการขยายเพิ่มมากขึ้น

จากการศึกษาของ Nor aidora saedon ได้ทำการศึกษาเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter จากคราบโลหิตในคดี เนื่องจากการสรุป DNA profile จะต้องมีการลงผลสรุปว่า DNA profile เป็นของบุคคลใดบุคคลหนึ่งหรือเป็นลักษณะดีเอ็นเอปนเปื้อน ซึ่งกระบวนการทางห้องปฏิบัติการเพื่อให้ได้ผลสรุปจะเป็นเรื่องที่ยุ่งยากซับซ้อน เช่นการพบพีคแปลกปลอมจากตัวอย่าง เช่น stutter ที่ปรากฏบน DNA profile การระบุว่าพีคแปลกปลอมนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างมากในการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอทางนิติวิทยาศาสตร์ ซึ่งบางครั้งพีคแปลกปลอมนั้นอาจมีที่มาจาการปนเปื้อนของดีเอ็นเอมากกว่า 2 คน ในคดีก็ได้ การทดลองได้ใช้เครื่องตรวจวัดดีเอ็นเออัตโนมัติ ABI 3100 Genetic Analyzer ในการตรวจสอบ DNA fragment จะศึกษาเฉพาะ stutter peak บน DNA profile ของคราบโลหิตในคดี เปรียบเทียบกับการตรวจวิเคราะห์โดยเครื่องตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

อัลติเมตริว ABI 377 DNA sequence การทดลองพบว่า stutter peak จาก 200 DNA profile สอดคล้องกับการเกิด stutter ในการทดลองอื่นๆ โดยการเกิด stutter จะไม่เกิน 15 เปอร์เซ็นต์ของพีคหลัก นอกจากนี้ยังพบว่าเครื่องตรวจวัดอัลติเมตริว ABI 3100 Genetic Analyzer ให้ผลผลิตเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter มากกว่า เครื่องตรวจวัดอัลติเมตริว ABI 377 DNA sequence

สรุปได้ว่า จากผลการตรวจดีเอ็นเอของคราบโลหิต จำนวน 200 profile เมื่อตรวจวัดดีเอ็นเอด้วยเครื่องตรวจวัดดีเอ็นเออัลติเมตริว ABI 3100 Genetic Analyzer พบเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ไม่เกิน 15 เปอร์เซ็นต์ของพีคหลัก

จากคู่มือการใช้เครื่องตรวจดีเอ็นเออัลติเมตริว ยี่ห้อ Applied Biosystem ได้ทำการตรวจวิเคราะห์ไมโครแซทเทลไลต์ จำนวน 16 โลกั บนโครโมโซม 23 คู่ของมนุษย์ ดังนี้ โลกั D8S1179 อยู่ในโครโมโซมคู่ที่ 8 โลกั D21S11 อยู่ในโครโมโซมคู่ที่ 21 โลกั D7S820 อยู่ในโครโมโซมคู่ที่ 7 โลกั CSF1PO อยู่ในโครโมโซมคู่ที่ 5 โลกั D3S1358 อยู่ในโครโมโซมคู่ที่ 8 โลกั TH01 อยู่ในโครโมโซมคู่ที่ 11 โลกั D13S317 อยู่ในโครโมโซมคู่ที่ 13 โลกั D16S539 อยู่ในโครโมโซมคู่ที่ 16 โลกั D2S1338 อยู่ในโครโมโซมคู่ที่ 2 โลกั D19S433 อยู่ในโครโมโซมคู่ที่ 19 โลกั vWA อยู่ในโครโมโซมคู่ที่ 12 โลกั TPOX อยู่ในโครโมโซมคู่ที่ 2 โลกั D18S51 อยู่ในโครโมโซมคู่ที่ 18 โลกั Amelogenin อยู่บนโครโมโซมเพศ โลกั D5S818 อยู่ในโครโมโซมคู่ที่ 5 และโลกั FGA อยู่ในโครโมโซมคู่ที่ 4 ดังภาพที่ 18

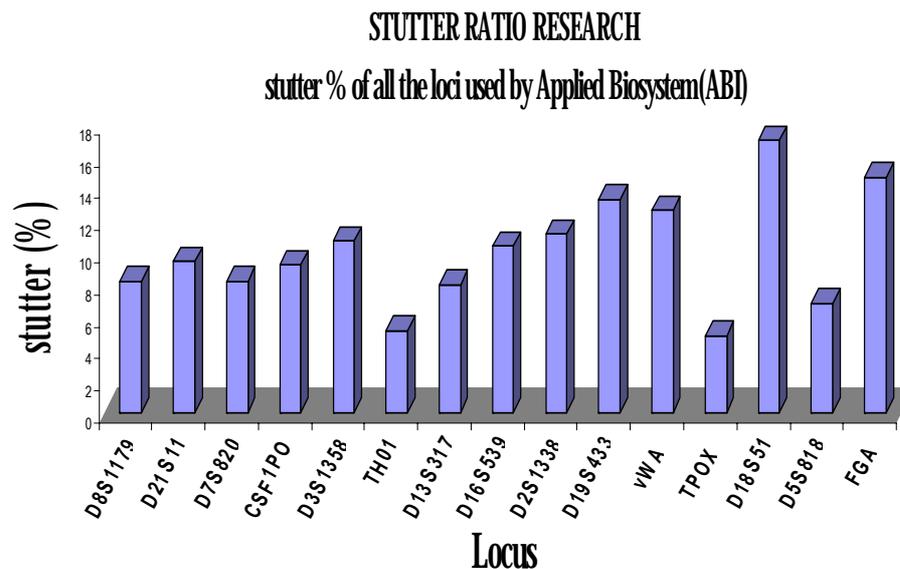


ภาพที่ 18

ตำแหน่งไมโครแซทเทลไลต์

จำนวน 16 โลกับนโครโมโซม 23 คู่ของมนุษย์ที่ใช้ทำการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องตรวจดีเอ็นเออัลติเมตริว ยี่ห้อ Applied Biosystem

คู่มือการใช้เครื่องตรวจดีเอ็นเออัตโนมัติ ยี่ห้อ Applied Biosystem ได้อ้างอิงการพบเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ในแต่ละโลกัส ดังนี้ โลกัส D8S1179 มีเปอร์เซ็นต์ความสูงstutter 8.2 เปอร์เซ็นต์ โลกัส D21S11 มีเปอร์เซ็นต์ความสูงstutter 9.4 เปอร์เซ็นต์ โลกัส D7S820 มีเปอร์เซ็นต์ความสูงstutter 8.2 เปอร์เซ็นต์ โลกัส CSF1PO มีเปอร์เซ็นต์ความสูงstutter 9.2 เปอร์เซ็นต์ โลกัส D3S1358 มีเปอร์เซ็นต์ความสูงstutter 10.7 เปอร์เซ็นต์ โลกัส TH01 มีเปอร์เซ็นต์ความสูงstutter 5.1 เปอร์เซ็นต์ โลกัส D13S317 มีเปอร์เซ็นต์ความสูงstutter 8 เปอร์เซ็นต์ โลกัส D16S539 มีเปอร์เซ็นต์ความสูงstutter 10.4 เปอร์เซ็นต์ โลกัส D2S1338 มีเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter 11.1 เปอร์เซ็นต์ โลกัส D19S433 มีเปอร์เซ็นต์ความสูงstutter 13.3 เปอร์เซ็นต์ โลกัส vWA มีเปอร์เซ็นต์ความสูงstutter 12.6 เปอร์เซ็นต์ โลกัส TPOX มีเปอร์เซ็นต์ความสูงstutter 4.8 เปอร์เซ็นต์ โลกัส D18S51มีเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter 17 เปอร์เซ็นต์ โลกัส Amelogenin ไม่พบstutter โลกัส D5S818 มีเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter 6.8 เปอร์เซ็นต์ และโลกัส FGAมีเปอร์เซ็นต์ความสูงstutter 14.7 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพที่ 19



ภาพที่ 19 เปอร์เซ็นต์ stutter ในไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 16 โลกัสเมื่อตรวจวัดเครื่องตรวจดีเอ็นเออัตโนมัติ ยี่ห้อ Applied Biosystem

สรุปได้ว่า เครื่องตรวจดีเอ็นเออัตโนมัติยี่ห้อ Applied Biosystem ตรวจวิเคราะห์ไมโครแซทเทลไลต์ จำนวน 16 โลกัส พบเปอร์เซ็นต์ความสูงstutter สูงสุดที่โลกัส D18S51, FGA และ D19S433 ตามลำดับ

ดังนั้นจากการทบทวนวรรณกรรม การตรวจดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิลีคโตโฟลิซิสและเครื่องตรวจดีเอ็นเออัตโนมัติ มักจะประสบปัญหาการพบ stutter เหมือนกัน ซึ่งเป็นเรื่องที่ยากต่อการอธิบายผลดีเอ็นเอที่มีมากกว่า 1 คน (mix profile) ว่าพีคเล็กๆที่ปรากฏในผลการตรวจดีเอ็นเอในแต่ละโลทส์จะเป็น stutter peak หรือเป็นอัลลีลที่แท้จริงจากดีเอ็นเอของบุคคลอีกบุคคลหนึ่ง นอกจากนี้ยังพบว่า การเกิด stutter สามารถเกิดขึ้นได้อย่างอิสระและยังไม่พบว่ามีการทดลองใดที่จะกำจัด stutter ได้ในขณะนี้

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ประชากรเป้าหมายและกลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มเป้าหมาย คือ วัตถุพยานทางชีววิทยาจากตัวบุคคล เช่น เยื่อบุกระพุ้งแก้ม เส้นผม ตัวอย่างเลือด คราบเลือด ที่พนักงานสอบสวนนำส่งตรวจพิสูจน์ที่กลุ่มงานตรวจทางเคมี ฟิสิกส์และชีววิทยา กองพิสูจน์หลักฐาน สำนักงานตำรวจแห่งชาติ เพื่อตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ ในระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2551 ถึง เดือนมกราคม พ.ศ. 2552

กลุ่มตัวอย่าง คือ Stutter DNA ที่ปรากฏบนตำแหน่งการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ (STR locus) จำนวน 16 โลกัส ใน DNA profile ของวัตถุพยานที่เก็บจากตัวบุคคล จำนวน 100 profile หรือ 100 คน

3.2 วิธีการสุ่มตัวอย่าง

การวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยทำการเก็บข้อมูลจากกลุ่มตัวอย่างโดยใช้วิธีสุ่มตัวอย่างแบบเจาะจง (Purposive Sampling) โดยเฉพาะบุคคลที่ทราบชื่อในคดีอาญาที่พนักงานสอบสวนนำส่งตรวจพิสูจน์ที่กลุ่มงานตรวจทางเคมี ฟิสิกส์และชีววิทยา กองพิสูจน์หลักฐาน สำนักงานตำรวจแห่งชาติ เพื่อให้แน่ใจว่าตัวอย่างแต่ละตัวอย่างที่นำมาวิจัยได้มาจากบุคคลเพียงคนเดียว ซึ่งจะไม่ทำให้ DNA profile ที่ได้มีลักษณะการปนเปื้อน (mixprofile) ของบุคคลตั้งแต่สองคนขึ้นไปได้

3.3 เครื่องมือและสารเคมีในการวิจัย

3.3.1 ไมโครปิเปตขนาด 10 μ l, 20 μ l, 100 μ l, 200 μ l และ 1000 μ l

3.3.2 เครื่องปั่นเหวี่ยง

3.3.3 เครื่องตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอ

3.3.4 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

3.3.5 เครื่องตรวจดีเอ็นเออัตโนมัติ ยี่ห้อ Applied Biosystem รุ่น 3130XL

3.3.6 ชุดน้ำยาสกัดสำเร็จรูป ยี่ห้อ Promega

3.3.7 ชุดน้ำยาสกัดสำเร็จรูปสำหรับสกัดดีเอ็นเอ ยี่ห้อ Q&A DNA Mini Kit

3.3.9 ชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

3.3.8 ชุดน้ำยาล้างปริมาณดีเอ็นเอ

3.3.10 ชุดน้ำยาสำหรับตรวจวัดDNA

3.4 การเก็บรวบรวมข้อมูล

3.4.1 ตรวจรับวัตถุทางชีววิทยาที่พนักงานสอบสวนนำส่ง โดยตรวจสอบหนังสือนำส่ง และของกลางว่าตรงกับที่หนังสือนำส่งระบุหรือไม่ พร้อมลงลายมือชื่อผู้นำส่ง วันเดือนปีที่นำส่ง

3.4.2 นำวัตถุพยานที่พนักงานสอบสวนนำส่งเพื่อตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอมาบันทึก รายละเอียด ถ่ายภาพของของกลาง และตัดบรรจุใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml.

3.4.3 นำของกลางที่บรรจุในหลอด microcentrifuge มาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดน้ำยา สกัดสำเร็จรูป โดยพิจารณาจากชนิดของวัตถุพยานทางชีววิทยาแต่ละชนิด

3.4.3.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเส้นผม โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป ยี่ห้อ Promega

3.4.3.1.1 เติม Incubation bufferDTTPK ปริมาณ 25-100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง เขย่า และนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.4.3.1.2 เติม Lysis bufferDTT ปริมาณ 2 เท่าของ incubation buffer :
DTT :PK ลงในหลอดทดลอง

3.4.3.1.3 เติม Resin 7 ไมโครลิตร เขย่า และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

3.4.3.1.4 เขย่าหลอดทดลอง แล้วนำไปตั้งบน magnetic strand

3.4.3.1.5 ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายทั้งหมดในหลอดทิ้ง

3.4.3.1.6 เติม Lysis bufferDTT ปริมาณ100 ไมโครลิตร เขย่าแล้วนำไป ตั้งบน magnetic strand ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายทั้งหมดในหลอดทิ้ง

3.4.3.1.7 เติม wash buffer ปริมาณ100 ไมโครลิตร เขย่า แล้วนำไปตั้งบน Magnetic strand ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายทั้งหมดในหลอดทิ้ง ทำขั้นตอนนี้ 3 ครั้ง

3.4.3.1.8 เปิดฝาหลอดทดลองทิ้งไว้ให้แห้ง 5 นาที

3.4.3.1.9 เติม Elution buffer ปริมาณ 25 - 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองเขย่าแล้วนำไปปั่นที่ 65 องศาเซลเซียส 5 นาที

3.4.3.1.10 นำไปตั้งบน magnetic strand ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลาย ดีเอ็นเอใส่หลอด microcentrifuge หลอดใหม่

3.4.3.2 การสกัดดีเอ็นเอจากเยื่อข้างแก้ม โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป ยี่ห้อ Promega

3.4.3.2.1 เติม Lysis buffer DTT ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง เขย่า และบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 นาที

3.4.3.2.2 นำสำลีมาใส่ใน spin basket แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

3.4.3.2.3 เติม Resin 7 ไมโครลิตร เขย่า และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

3.4.3.2.4 เขย่าหลอดทดลอง แล้วนำไปตั้งบน magnetic strand

3.4.3.2.5 ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายทั้งหมดในหลอดทิ้ง

3.4.3.2.6 เติม Lysis buffer DTT ปริมาณ 100 ไมโครลิตร เขย่า แล้วนำไปตั้งบน magnetic strand ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายทั้งหมดในหลอดทิ้ง

3.4.3.2.7 เติม wash buffer ปริมาณ 100 ไมโครลิตร เขย่า แล้วนำไปตั้งบน magnetic strand ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายทั้งหมดในหลอดทิ้ง ทำ 3 ครั้ง

3.4.3.2.8 เปิดฝาหลอดทดลองทิ้งไว้ให้แห้ง 5 นาที

3.4.3.2.9 เติม Elution buffer ปริมาณ 25 - 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง เขย่า แล้วนำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส 5 นาที

3.4.3.2.10 เขย่าและนำไปตั้งบน magnetic strand ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายดีเอ็นเอใส่หลอด microcentrifuge หลอดใหม่

3.4.3.3 การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดสด โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป ยี่ห้อ Q&Aamp DNA Mini Kit

3.4.3.3.1 ใช้ปิเปตดูดเลือดสดใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาณ 200 ไมโครลิตร

3.4.3.3.2 เติม Protease K ปริมาณ 20 ไมโครลิตร และ AL ปริมาณ 200 ไมโครลิตร เขย่าจนสารละลายและเลือดเป็นเนื้อเดียวกัน บ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส 10 นาที

3.4.3.3.3 เติมแอลกอฮอล์ ปริมาณ 200 ไมโครลิตร

3.4.3.3.4 ใช้ปิเปตดูดสารละลายทั้งหมดใส่ใน column

3.4.3.3.5 นำ column ที่บรรจุสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

3.4.3.3.6 เติม AW1 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดึงสารละลายที่กั้น column ออกแล้วเปลี่ยนใหม่

3.4.3.3.7 เติม AW2 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ดึงสารละลายที่กั้น column ออกแล้วเปลี่ยนใช้หลอด microcentrifuge ใส่แทน

3.4.3.3.8 เติม AE ปริมาณ 25 - 100 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเก็บสารละลายดีเอ็นเอในหลอด microcentrifuge

3.4.3.4 การสกัดดีเอ็นเอจากคราบเลือด โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป ยี่ห้อ Qamp DNA Mini Kit

3.4.3.4.1 เติม ATL ปริมาณ 180 ไมโครลิตร เขย่าและบ่มที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส 10 นาที

3.4.3.4.2 นำเศษผ้ามาใส่ใน spin basket แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

3.4.3.4.2 เติม Protease K ปริมาณ 20 ไมโครลิตร เขย่าและบ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง

3.4.3.4.3 เติม AL (ysis buffer) ปริมาณ 200 ไมโครลิตร เขย่าและบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที

3.4.3.4.4 เติมแอลกอฮอล์ ปริมาณ 200 ไมโครลิตร

3.4.3.4.5 ใช้ปิเปตดูดสารละลายทั้งหมดใส่ใน column

3.4.3.4.6 นำ column ที่บรรจุสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

3.4.3.4.7 เติม AW1 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดึงสารละลายที่กั้น column ออกแล้วเปลี่ยนใหม่

3.4.3.4.8 เติม AW2 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ดึงสารละลายที่กั้น column ออกแล้วเปลี่ยนใช้หลอด microcentrifuge ใส่แทน

3.4.3.4.9 เติม AE ปริมาณ 25- 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเก็บสารละลายดีเอ็นเอในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่

3.4.4 นำสารละลายดีเอ็นเอ (DNA template) ที่ได้จากการสกัดมาวัดปริมาณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ หน่วยเป็นนาโนกรัมต่อไมโครลิตร โดยใช้ชุด Quantifiler kit ซึ่ง 1 reaction จะประกอบด้วย PCR reaction ปริมาณ 12.5 ไมโครลิตร Primer mix ปริมาณ 10.5 ไมโครลิตร น้ำกลั่นปราศจากไอออน 1 ไมโครลิตร และ DNA template 1 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง ABI PRISM 7000/7500 system

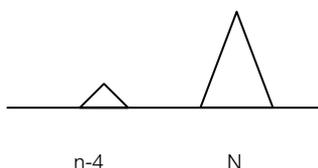
3.4.5 นำสารละลายดีเอ็นเอ (DNA template) ที่วัดปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง ABI PRISM 7000/7500 system แล้วมาเจือจางความเข้มข้นให้อยู่ในช่วง 0.05 – 0.125 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน ซึ่งการวิจัยครั้งนี้ได้กำหนดให้สารละลายดีเอ็นเอมีความเข้มข้นเท่ากันทุกตัวอย่าง คือเท่ากับ 0.1 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

3.4.6 นำสารละลายดีเอ็นเอ (DNA template) ที่ได้ทำการเจือจางความเข้มข้นจากข้อ 3.4.5 มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ชุด Identifiter kit ซึ่ง 1 reaction จะประกอบด้วย Reaction mix 10.5 ไมโครลิตร Primer 5.5 ไมโครลิตร TaqGold 0.5 ไมโครลิตร และ DNA template 10 ไมโครลิตร แล้วนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง PCR

3.4.7 นำสารละลายดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้วตามข้อ 3.4.6 มาตรวจวัดดีเอ็นเอด้วยเครื่องตรวจดีเอ็นเออัตโนมัติ ยี่ห้อ Applied Biosystem รุ่น 3130XL

3.4.8 นำกราฟอิเล็กทรอนิกส์โพลีแกรมมาคำนวณหาค่าทางสถิติ ดังนี้

3.4.8.1 คำนวณเปอร์เซ็นต์ stutter ใน STR locus จำนวน 16 locus ในแต่ละ DNA profile โดยใช้สูตร $n-4N \times 100$ เมื่อ N คือ ความสูงของ major peak และ n-4 คือ ความสูงของ minor peak ที่มีเบสสั้นน้อยกว่า major peak อยู่ 4bp



ภาพที่ 20 แสดง minor peak และ major peak

3.4.8.2 คำนวณหาค่ามัธยฐาน (Median)

ค่ามัธยฐาน หมายถึง ค่าของข้อมูลที่อยู่ตรงกลางกลุ่ม เมื่อข้อมูลนั้นเรียงไว้ตามลำดับซึ่งตำแหน่งนั้นจะมี 50% ของจำนวนข้อมูลทั้งหมดมีค่าสูงกว่าและอีก 50% มีค่าต่ำกว่า

3.4.8.3 คำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเป็นค่าที่บ่งบอกถึงการกระจายของข้อมูล

โดยใช้สูตร

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(X - \bar{X})^2}{N}}$$

เมื่อ \bar{X}	คือ	ข้อมูลหรือจุดกึ่งกลางของชั้นข้อมูล
\sum	คือ	ค่าเฉลี่ยของข้อมูล
N	คือ	จำนวนข้อมูล
F	คือ	ความถี่ของแต่ละชั้นข้อมูล

3.4.8.4 คำนวณหาค่าเฉลี่ย (Average)

ค่าเฉลี่ยหาได้จากการนำคะแนนทุกค่ามารวมกันแล้วหารด้วยจำนวนข้อมูล

โดยใช้สูตร

เมื่อ \bar{X}	คือ	ค่าเฉลี่ย
$\sum fx$	คือ	ผลรวมของข้อมูลรวมทั้งหมด
N	คือ	จำนวนข้อมูล

3.4.8.5 หาค่า Min ของเปอร์เซ็นต์ stutter

3.4.8.6 หาค่า Max ของเปอร์เซ็นต์ stutter

3.4.9 บันทึกผลข้อมูล

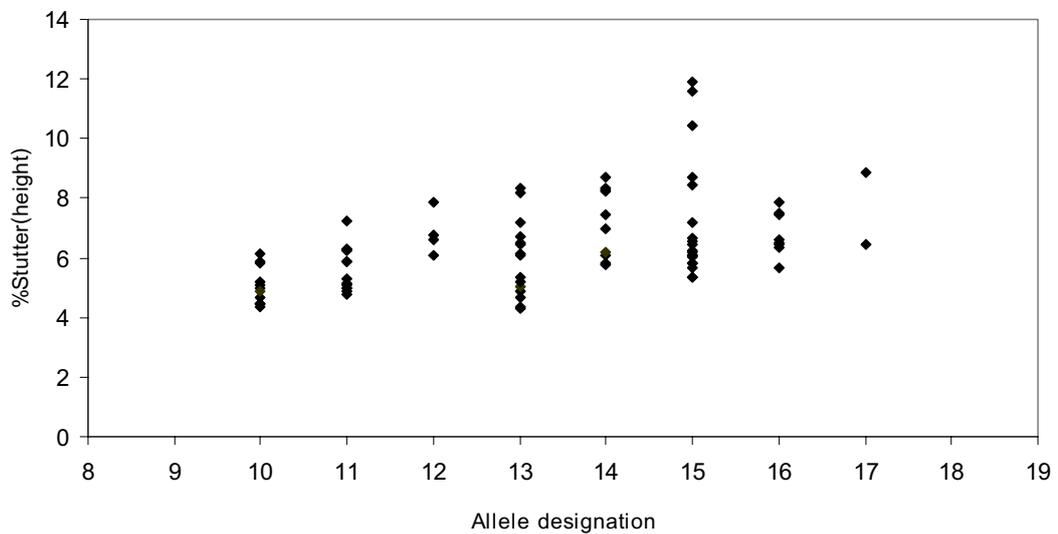
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

หลังจากเสร็จสิ้นขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์แล้วจะส่งผลผลิตพีซีอาร์ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ไปยังเครื่องตรวจวัดดีเอ็นเออัตโนมัติซึ่งเครื่องจะตรวจจับสารฟลูออเรสเซนต์ ผลการอ่านจะถูกส่งเข้าเครื่องคอมพิวเตอร์ที่มีโปรแกรมแปลงผลการอ่านให้ออกมาในรูปแบบกราฟอเล็กโทรฟีโรแกรมและนำไปศึกษา stutter

ผลการทดลอง

4.1 การศึกษา Stutter จากผลการตรวจดีเอ็นเอของวัตถุพยานทางชีววิทยาที่เก็บจากตัวบุคคลจำนวน 100 profile ใน 48 คดี พบว่าในแต่ละโลกัสมีเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ดังนี้

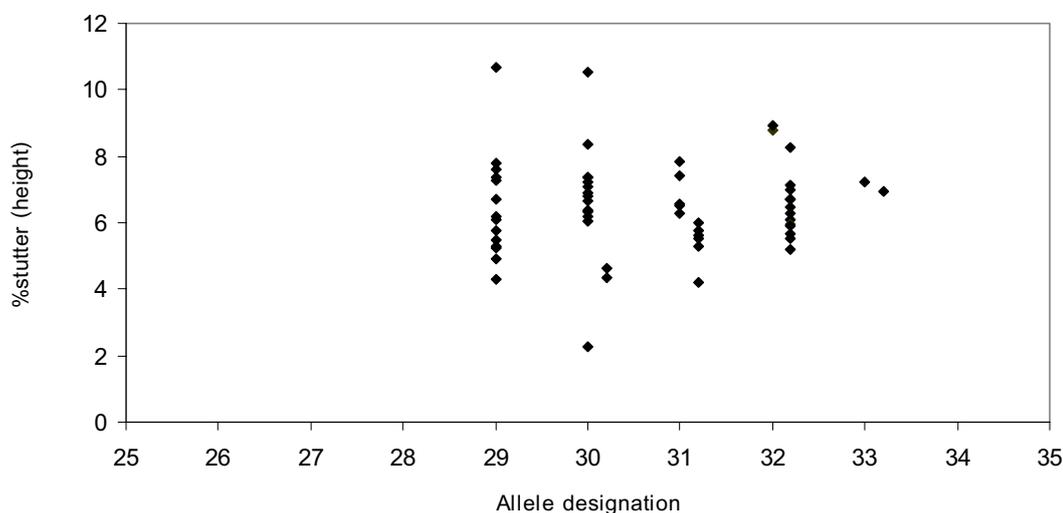
4.1.1 เปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ที่ตำแหน่ง D8S1179



ภาพที่ 21 จำนวนเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ที่ตำแหน่ง D8S1179 ใน Allele 8 -19

จากภาพที่ 21 ไมโครแซทเทลไลท์โลกัส D8S1179 อยู่ในโครโมโซมคู่ที่ 8 ประกอบด้วยอัลลีลมาตรฐาน 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 และ 19 เมื่อติดฉลากด้วยสารฟลูออเรสเซนต์จะทำให้ผลผลิตพีซีอาร์มีสีน้ำเงินของ 6-FAM จากการศึกษาดู DNA profile จากวัตถุพยานทางชีววิทยาที่เก็บจากตัวบุคคลจำนวน 100 profile ใน 48 คดี จะพบ stutter ในอัลลีลมาตรฐาน 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, และ 17 ทั้งที่เป็นแบบโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัส รวมทั้งสิ้น 85 อัลลีล เมื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ต่ำสุดเท่ากับ 3.33 ในอัลลีลมาตรฐาน 10 และมีเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter สูงสุดเท่ากับ 11.91 ในอัลลีล มาตรฐาน 15

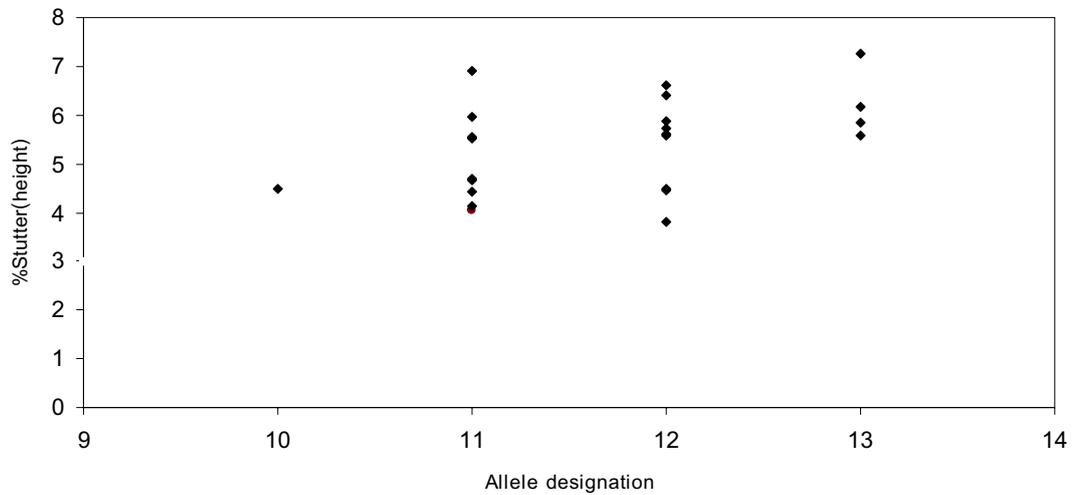
4.1.2 เปอร์เซนต์ความสูง stutter ที่ตำแหน่ง D21S11



ภาพที่ 22 จำนวนเปอร์เซนต์ความสูง stutter ที่ตำแหน่ง D21S11 ใน Allele 25 – 35

จากภาพที่ 22 ไมโครแซทเทลไลท์โลกัส D21S11 อยู่ในโครโมโซมคู่ที่ 21 ประกอบด้วยอัลลีลมาตรฐาน 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 และ 38 เมื่อติดฉลากด้วยสารฟลูออเรสเซนต์จะทำให้ผลผลิตพีซีอาร์มีสีน้ำเงินของ 6-FAM จากการศึกษาดู DNA profile จากวัตถุพยานทางชีววิทยาที่เก็บจากตัวบุคคลจำนวน 100 profile ใน 48 คดี จะพบ stutter ในอัลลีลมาตรฐาน 29, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33 และ 33.2 ทั้งที่เป็นแบบโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัส รวมทั้งสิ้น 58 อัลลีล เมื่อคำนวณเปอร์เซนต์ความสูง stutter ต่ำสุดเท่ากับ 2.26 ในอัลลีลมาตรฐาน 30 และมีเปอร์เซนต์ความสูง stutter สูงสุดเท่ากับ 10.7 ในอัลลีลมาตรฐาน 30

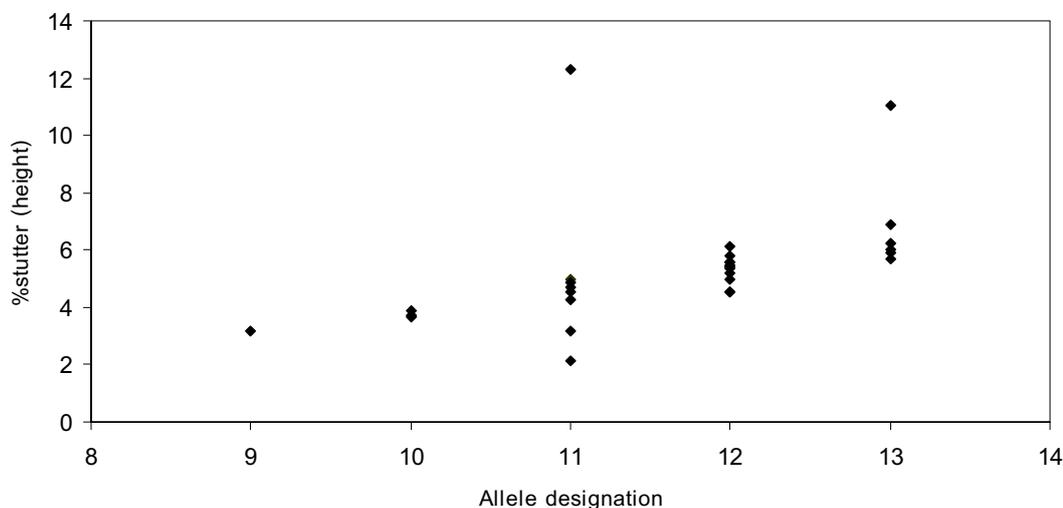
4.1.3 เปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ที่ตำแหน่ง D7S820



ภาพที่ 23 จำนวนเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ที่ตำแหน่ง D7S820 ใน Allele 9 – 14

จากภาพที่ 23 ไมโครแซทเทลไลท์โลกัส D7S820 อยู่ในโครโมโซมคู่ที่ 7 ประกอบด้วยอัลลีลมาตรฐาน 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 และ 15 เมื่อติดฉลากด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ จะทำให้ผลผลิตพีซีอาร์มีสีน้ำเงินของ 6-FAM จากการศึกษาดู DNA profile จากวัตถุพยานทางชีววิทยาที่เก็บจากตัวบุคคลจำนวน 100 profile ใน 48 คดี จะพบ stutter ในอัลลีลมาตรฐาน 10, 11, 12 และ 13 ทั้งที่เป็นแบบโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัส รวมทั้งสิ้น 25 อัลลีล เมื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ต่ำสุดเท่ากับ 2.99 ในอัลลีลมาตรฐาน 12 และมีเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter สูงสุดเท่ากับ 7.26 ในอัลลีลมาตรฐาน 13

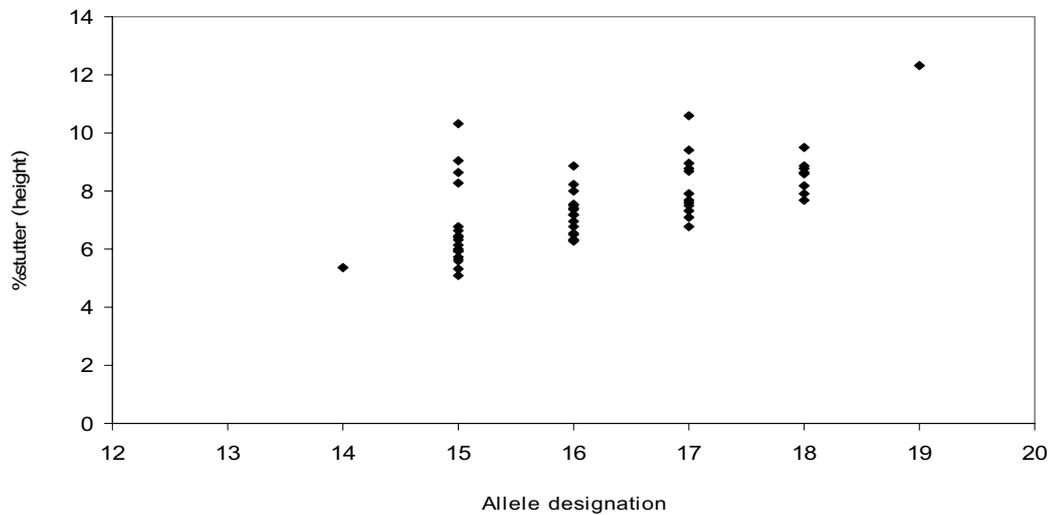
4.1.4 เปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ที่ตำแหน่ง CSF1PO



ภาพที่ 24 จำนวนเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ที่ตำแหน่ง CSF1PO ใน Allele 8 – 14

จากภาพที่ 24 ไมโครแซทเทลไลท์โลกัส CSF1PO อยู่ในโครโมโซมคู่ที่ 5 ประกอบด้วยอัลลีลมาตรฐาน 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 และ 15 เมื่อติดฉลากด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ จะทำให้ผลผลิตพีซีอาร์มีสีน้ำเงินของ 6-FAM จากการศึกษา DNA profile จากวัตถุพยานทางชีววิทยาที่เก็บจากตัวบุคคลจำนวน 100 profile ใน 48 คดี จะพบ stutter ในอัลลีลมาตรฐาน 9, 10, 11, 12 และ 13 ทั้งที่เป็นแบบโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัส รวมทั้งสิ้น 30 อัลลีล เมื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ต่ำสุด เท่ากับ 2.11 ในอัลลีลมาตรฐาน 11 และมีเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter สูงสุดเท่ากับ 12.3 ในอัลลีลมาตรฐาน 11

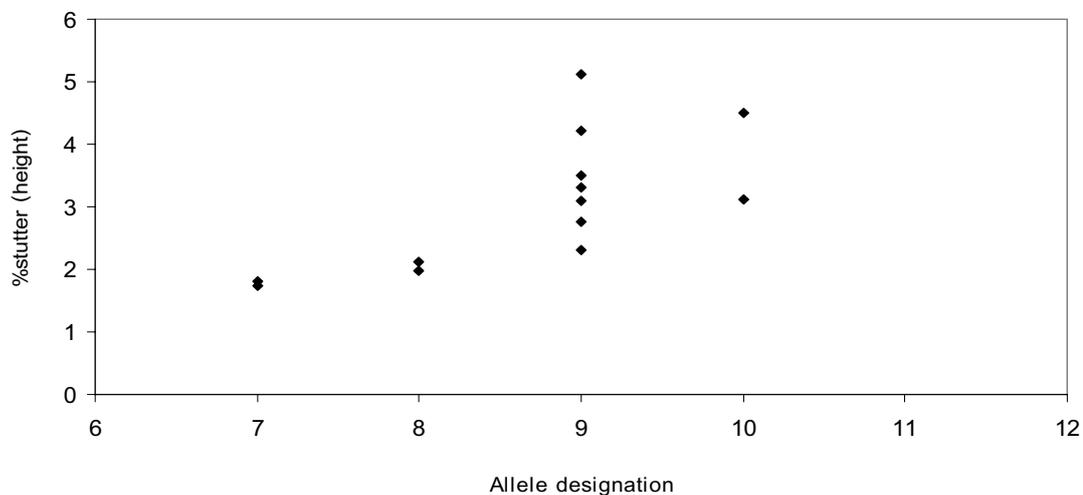
4.1.5 เปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ที่ตำแหน่ง D3S1358



ภาพที่ 25 จำนวนเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ที่ตำแหน่ง D3S1358 ใน Allele 12 – 20

จากภาพที่ 25 ไมโครแซทเทลไลท์โลกัส D3S1358 อยู่ในโครโมโซมคู่ที่ 8 ประกอบด้วยอัลลีลมาตรฐาน 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 และ 19 เมื่อติดฉลากด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ จะทำให้ผลผลิตพีซีอาร์มีสีน้ำเงินของ 6-FAM จากการศึกษาดู DNA profile จากวัตถุพยานทางชีววิทยาที่เก็บจากตัวบุคคลจำนวน 100 profile ใน 48 คดี จะพบ stutter ในอัลลีลมาตรฐาน 14, 15, 16, 17, 18 และ 19 ทั้งที่เป็นแบบโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัส รวมทั้งสิ้น 58 อัลลีล เมื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ต่ำสุดเท่ากับ 5.07 ในอัลลีลมาตรฐาน 15 และมีเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter สูงสุดเท่ากับ 12.32 ในอัลลีลมาตรฐาน 19

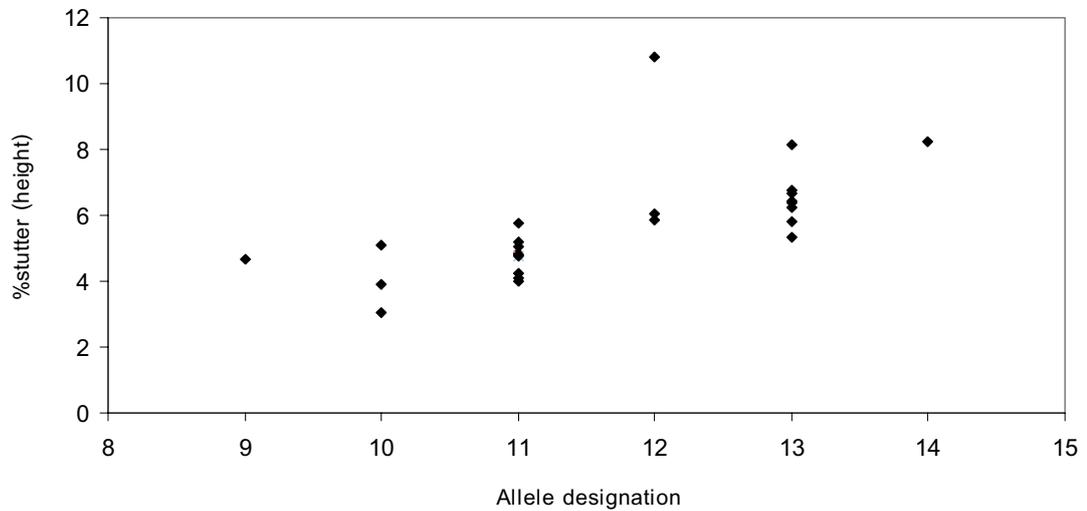
4.1.6 เปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ที่ตำแหน่ง TH01



ภาพที่ 26 จำนวนเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ที่ตำแหน่ง TH01 ใน Allele 6 – 12

จากภาพที่ 26 ไมโครแซทเทลไลท์โลกัส TH01 อยู่ในโครโมโซมคู่ที่ 11 ประกอบด้วยอัลลีลมาตรฐาน 4, 5, 6, 7, 8, 9, 9.3, 10, 11 และ 13.3 เมื่อติดฉลากด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ จะทำให้ผลผลิตพีซีอาร์มีสีเขียวของ VIC จากการศึกษาดู DNA profile จากวัตถุพยานทางชีววิทยาที่เก็บจากตัวบุคคลจำนวน 100 profile ใน 48 คดี จะพบ stutter ในอัลลีลมาตรฐาน 7, 8, 9 และ 10 ทั้งที่เป็นแบบโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัส รวมทั้งสิ้น 13 อัลลีล เมื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ต่ำสุดเท่ากับ 1.75 ในอัลลีลมาตรฐาน 7 และมีเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter สูงสุดเท่ากับ 5.12 ในอัลลีลมาตรฐาน 9

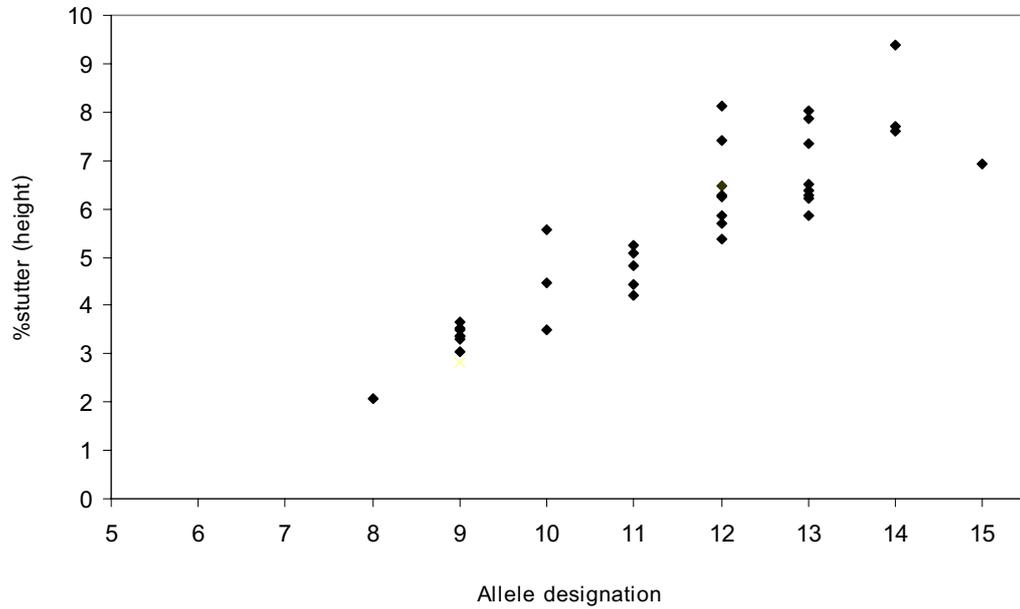
4.1.7 เปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ที่ตำแหน่ง D13S317



ภาพที่ 27 จำนวนเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ที่ตำแหน่ง D13S317 ใน Allele 8 -15

จากภาพที่ 27 ไมโครแซทเทลไลท์โดกัส D13S317 อยู่ในโครโมโซมคู่ที่ 13 ประกอบด้วยอัลลีลมาตรฐาน 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 และ 15 เมื่อติดฉลากด้วยสารฟลูออเรสเซนต์จะทำให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มีสีเขียวของ VIC จากการศึกษา DNA profile จากวัตถุพยานทางชีววิทยาที่เก็บจากตัวบุคคลจำนวน 100 profile ใน 48 คดี จะพบ stutter ในอัลลีลมาตรฐาน 9, 10, 11, 12, 13 และ 14 ทั้งที่เป็นแบบโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัส รวมทั้งสิ้น 26 อัลลีล เมื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ต่ำสุดเท่ากับ 3.07 ในอัลลีลมาตรฐาน 10 และมีเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter สูงสุดเท่ากับ 10.8 ในอัลลีลมาตรฐาน 12

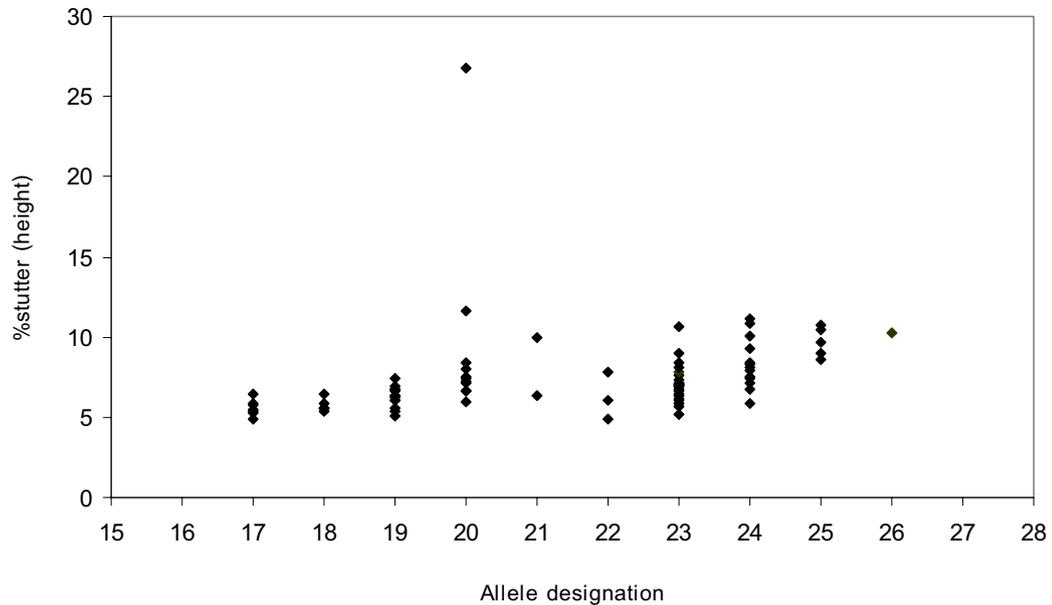
4.1.8 เปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ที่ตำแหน่ง D16S539



ภาพที่ 28 จำนวนเปอร์เซ็นต์ stutter ที่ตำแหน่ง D16S539 ใน Allele 5 -15

จากภาพที่ 28 ไมโครแซทเทลไลท์โลกัส D16S539 อยู่ในโครโมโซมคู่ที่ 16 ประกอบด้วยอัลลีลมาตรฐาน 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 และ 15 เมื่อติดฉลากด้วยสารฟลูออเรสเซนต์จะทำให้ผลผลิตพีซีอาร์มีสีเขียวของ VIC จากการศึกษาด้าน DNA profile จากวัตถุพยานทางชีววิทยาที่เก็บจากตัวบุคคลจำนวน 100 profile ใน 48 คดี จะพบ stutter ในอัลลีลมาตรฐาน 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 และ 15 ทั้งที่เป็นแบบโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัส รวมทั้งสิ้น 37 อัลลีล เมื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ต่ำสุดเท่ากับ 2.08 ในอัลลีลมาตรฐาน 8 และมีเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter สูงสุดเท่ากับ 9.38 ในอัลลีลมาตรฐาน 14

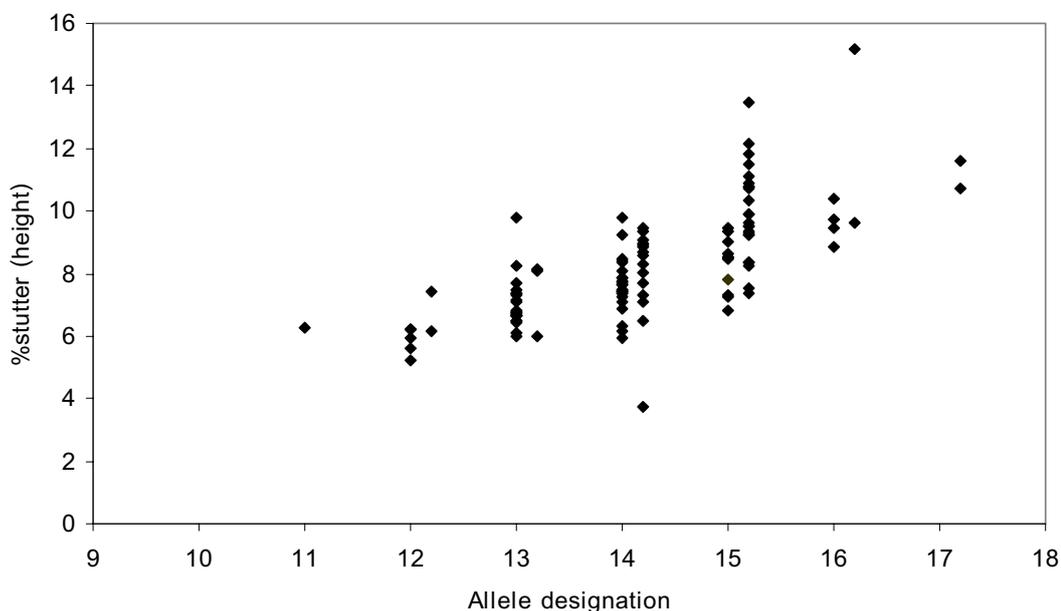
4.1.9 เปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ที่ตำแหน่ง D2S1338



ภาพที่ 29 จำนวนเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ที่ตำแหน่ง D2S1338 ใน Allele 15 -28

จากภาพที่ 29 ไมโครแซทเทลไลท์โลกัส D2S1338 อยู่ในโครโมโซมคู่ที่ 2 ประกอบด้วยอัลลีลมาตรฐาน 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 และ 28 เมื่อติดฉลากด้วยสารฟลูออเรสเซนต์จะทำให้ผลผลิตพีซีอาร์มีสีเหลืองของ NED จากการศึกษา DNA profile จากวัตถุดิบทางชีววิทยาที่เก็บจากตัวบุคคลจำนวน 100 profile ใน 48 คดี จะพบ stutter ในอัลลีลมาตรฐาน 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 และ 26 ทั้งที่เป็นแบบ โฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัส รวมทั้งสิ้น 82 อัลลีล เมื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ต่ำสุดเท่ากับ 4.88 ในอัลลีลมาตรฐาน 17 และมีเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter สูงสุดเท่ากับ 26.75 ในอัลลีลมาตรฐาน 20

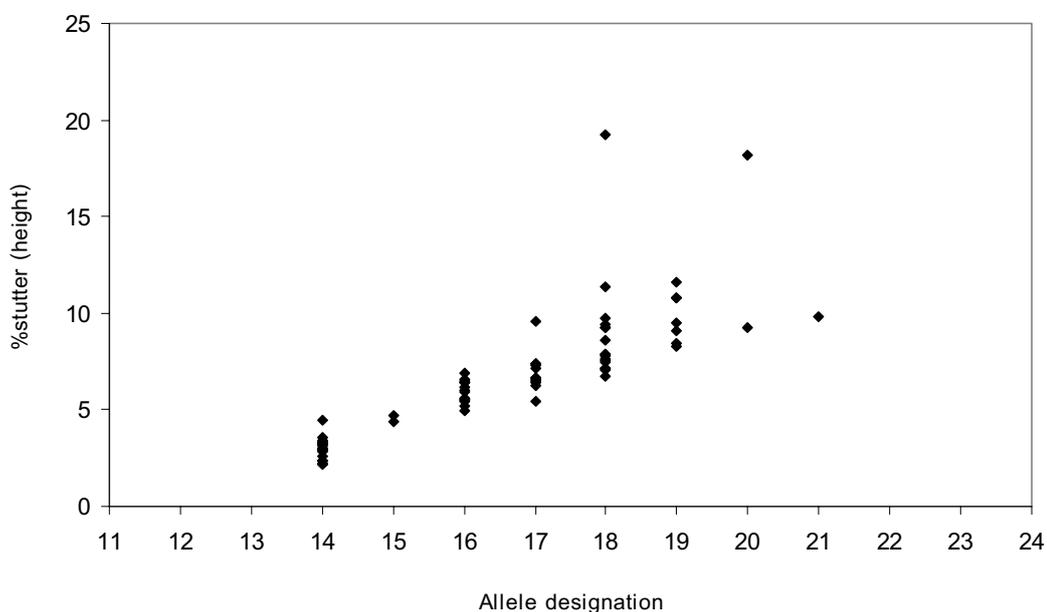
4.1.10 เปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ที่ตำแหน่ง D19S433



ภาพที่ 30 จำนวนเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ที่ตำแหน่ง D19S433 ใน Allele 9 – 17.2

จากภาพที่ 30 ไมโครแซทเทลไลท์โลกัส D19S433 อยู่ในโครโมโซมคู่ที่ 19 ประกอบด้วยอัลลีลมาตรฐาน 9, 10, 11, 12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 16.2, 17 และ 17.2 เมื่อติดฉลากด้วยสารฟลูออเรสเซนต์จะทำให้ผลผลิตพีซีอาร์มีสีเหลืองของ NED จากการศึกษาดู DNA profile จากวัตถุดิบทางชีววิทยาที่เก็บจากตัวบุคคลจำนวน 100 profile ใน 48 คดี จะพบ stutter ในอัลลีลมาตรฐาน 11, 12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 16.2 และ 17 ทั้งที่เป็นแบบโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัส รวมทั้งสิ้น 127 อัลลีล เมื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ต่ำสุดเท่ากับ 5.23 ในอัลลีลมาตรฐาน 14.2 และมีเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter สูงสุดเท่ากับ 15.17 ในอัลลีลมาตรฐาน 16.2

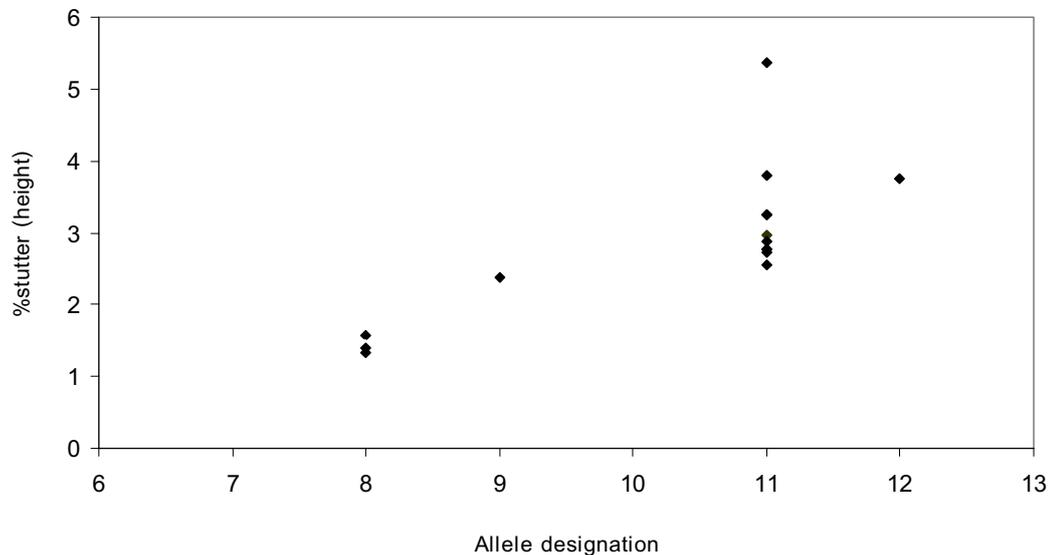
4.1.11 เปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ที่ตำแหน่ง vWA



ภาพที่ 31 จำนวนเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ที่ตำแหน่ง vWA ใน Allele 11 – 24

จากภาพที่ 31 ไมโครแซทเทลไลท์โลกัส vWA อยู่ในโครโมโซมคู่ที่ 12 ประกอบด้วยอัลลีลมาตรฐาน 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 และ 24 เมื่อติดฉลากด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ จะทำให้ผลผลิตพีซีอาร์มีสีเหลืองของ NED จากการศึกษาดู DNA profile จากวัตถุพยานทางชีววิทยาที่เก็บจากตัวบุคคลจำนวน 100 profile ใน 48 คดี จะพบ stutter ในอัลลีลมาตรฐาน 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 และ 21 ทั้งที่เป็นแบบโฮโมไซกัส และเฮเทอโรไซกัส รวมทั้งสิ้น 78 อัลลีล เมื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ต่ำสุดเท่ากับ 2.18 ในอัลลีลมาตรฐาน 14 และมีเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter สูงสุดเท่ากับ 19.21 ในอัลลีลมาตรฐาน 18

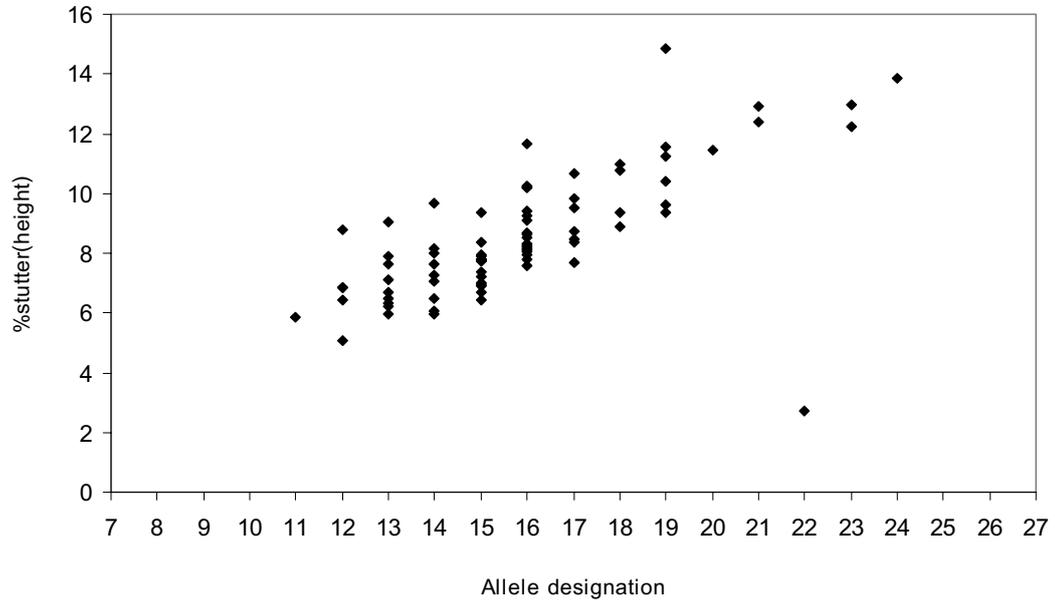
4.1.12 เปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ที่ตำแหน่ง TPOX



ภาพที่ 32 จำนวนเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ที่ตำแหน่ง TPOX ใน Allele 6 – 13

จากภาพที่ 32 ไมโครแซทเทลไลท์โดกัส TPOX อยู่ในโครโมโซมคู่ที่ 2 ประกอบด้วยอัลลีลมาตรฐาน 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 และ 13 เมื่อติดฉลากด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ จะทำให้ผลผลิตพีซีอาร์มีสีเหลืองของ NED จากการศึกษาด้าน DNA profile จากวัตถุพยานทางชีววิทยาที่เก็บจากตัวบุคคลจำนวน 100 profile ใน 48 คดี จะพบ stutter ในอัลลีลมาตรฐาน 8, 9, 10, 11 และ 12 ทั้งที่เป็นแบบโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัส รวมทั้งสิ้น 23 อัลลีล เมื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ต่ำสุดเท่ากับ 1.2 ในอัลลีลมาตรฐาน 8 และมีเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter สูงสุดเท่ากับ 5.42 ในอัลลีลมาตรฐาน 11

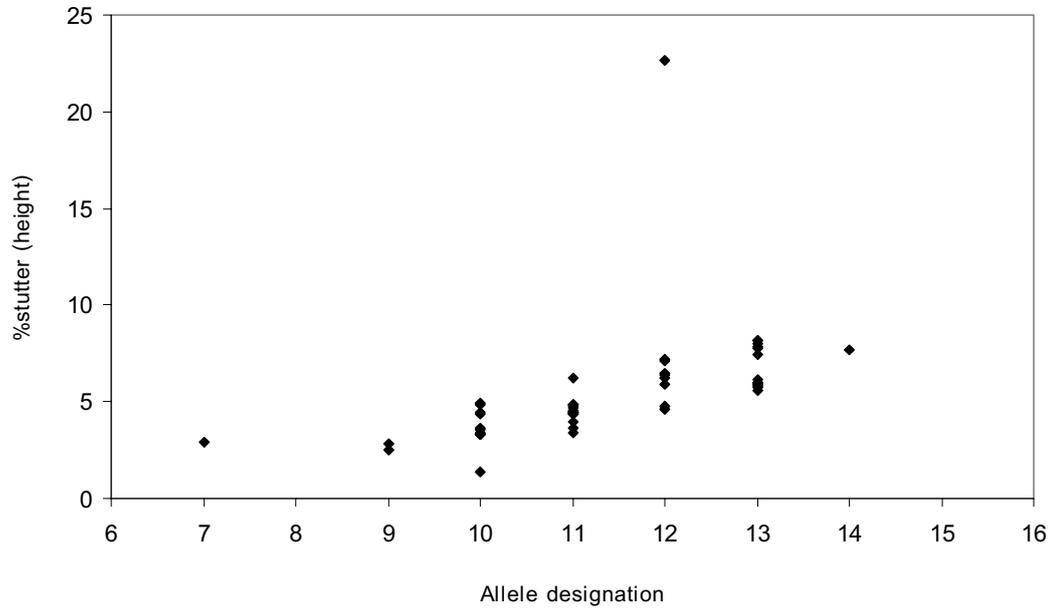
4.1.13 เปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ที่ตำแหน่ง D18S51



ภาพที่ 33 จำนวนเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ที่ตำแหน่ง D18S51 ใน Allele 7 – 27

จากภาพที่ 33 ไมโครแซทเทลไลท์โลกัส D18S51 อยู่ในโครโมโซมคู่ที่ 18 ประกอบด้วยอัลลีลมาตรฐาน 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 และ 27 เมื่อติดฉลากด้วยสารฟลูออเรสเซนต์จะทำให้ผลผลิตพีซีอาร์ มีสีเหลืองของ NED จากการศึกษา DNA profile จากวัตถุพยานทางชีววิทยาที่เก็บจากตัวบุคคล จำนวน 100 profile ใน 48 คดี จะพบ stutter ในอัลลีลมาตรฐาน 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 และ 24 ทั้งที่เป็นแบบโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัส รวมทั้งสิ้น 84 อัลลีล เมื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ต่ำสุดเท่ากับ 2.71 ในอัลลีลมาตรฐาน 12 และมีเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter สูงสุดเท่ากับ 14.87 ในอัลลีลมาตรฐาน 19

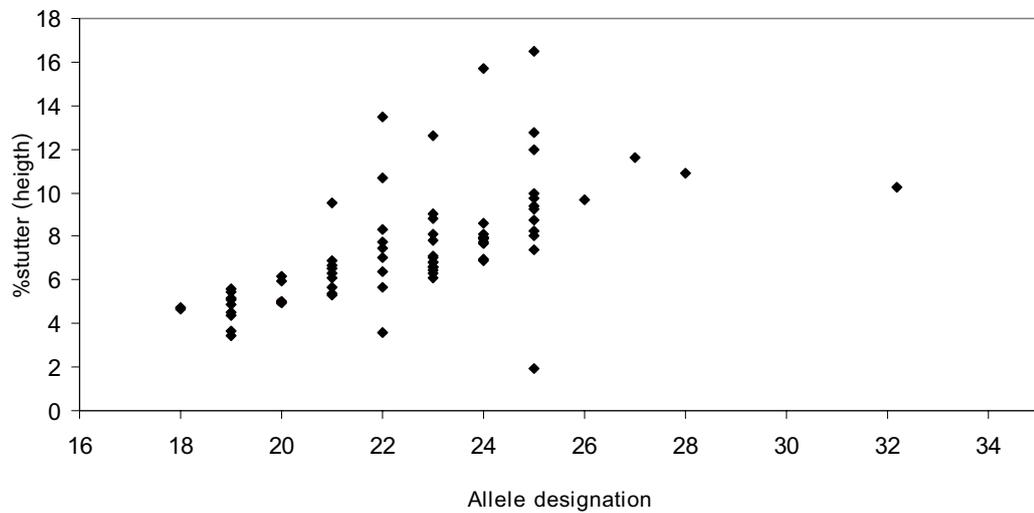
4.1.14 เปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ที่ตำแหน่ง D5S818



ภาพที่ 34 จำนวนเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ที่ตำแหน่ง D5S818 ใน Allele 7– 16

จากภาพที่ 34 ไมโครแซทเทลไลท์โลกัส D5S818 อยู่ในโครโมโซมคู่ที่ 5 ประกอบด้วยอัลลีลมาตรฐาน 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 และ 16 เมื่อติดฉลากด้วยสารฟลูออเรสเซนต์จะทำให้ผลผลิตพีซีอาร์มีสีแดงของ PET จากการศึกษา DNA profile จากวัตถุพยานทางชีววิทยาที่เก็บจากตัวบุคคลจำนวน 100 profile ใน 48 คดี จะพบ stutter ในอัลลีลมาตรฐาน 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 และ 14 ทั้งที่เป็นแบบโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัส รวมทั้งสิ้น 53 อัลลีล เมื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ต่ำสุดเท่ากับ 1.34 ในอัลลีลมาตรฐาน 10 และมีเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter สูงสุดเท่ากับ 22.64 ใน อัลลีลมาตรฐาน 12

4.1.15 เปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ที่ตำแหน่ง FGA



ภาพที่ 35 จำนวนเปอร์เซ็นต์ stutter ที่ตำแหน่ง FGA ใน Allele 17 – 51.2

จากภาพที่ 35 ไมโครแซทเทลไลท์โลกัธ FGA อยู่ในโครโมโซมคู่ที่ 4 ประกอบด้วยอัลลีลมาตรฐาน 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, และ 51.2 เมื่อติดฉลากด้วยสารฟลูออเรสเซนต์จะทำให้ผลผลิตพีซีอาร์มีสีแดงของ PET จากการศึกษาดู DNA profile จากวัตถุพยานทางชีววิทยาที่เก็บจากตัวบุคคลจำนวน 100 profile ใน 48 คดี จะพบ stutter ในอัลลีลมาตรฐาน 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26.2, 27, 28 และ 32.2 ทั้งที่เป็นแบบโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัส รวมทั้งสิ้น 75 อัลลีล เมื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ต่ำสุดเท่ากับ 1.96 ในอัลลีลมาตรฐาน 25 และมีเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter สูงสุดเท่ากับ 16.51 ในอัลลีลมาตรฐาน 25

4.2 การศึกษาเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter จากผลการตรวจดีเอ็นเอของวัตถุพยานทางชีววิทยาที่เก็บจากตัวบุคคล ปรากฏผลดังนี้

ตารางที่ 2 ค่าทางสถิติจากการศึกษาเปอร์เซ็นต์ stutter จากผลการตรวจดีเอ็นเอของวัตถุพยานทางชีววิทยาที่เก็บจากตัวบุคคล

CASE WORK								
STR locus	N	MIN	MAX	MEDIAN	AVERAGE	SD	3SD	MEDIAN±3SD
D8S1179	85	3.33	11.91	6.09	6.31	1.53	4.6	10.69
D21S11	58	2.26	10.7	6.42	6.5	1.42	4.26	10.68
D7S820	25	2.99	7.26	5.56	5.25	1.05	3.16	8.72
CSF1PO	30	2.11	12.3	5.285	5.37	2.01	6.03	11.31
D3S1358	58	5.07	12.32	7.39	7.46	1.44	4.31	11.70
TH01	13	1.75	5.12	3.1	3.45	1.08	3.23	6.33
D13S317	26	3.07	10.8	5.27	5.66	1.62	4.85	10.12
D16S539	37	2.08	9.38	5.68	5.5	1.8	10.9	11.08
D2S1338	82	4.88	26.75	6.945	7.46	2.69	8.07	15.02
D19S433	127	5.23	15.17	7.85	8.2	1.74	5.23	13.09
vWA	78	2.18	19.21	6.47	6.46	3.21	9.64	16.11
TPOX	23	1.2	5.42	2.78	2.81	1.13	3.39	6.17
D18S51	84	2.71	14.87	8.115	8.51	2.04	6.13	14.25
D5S818	53	1.34	22.64	4.88	5.45	2.89	8.66	13.54
FGA	75	1.96	16.51	6.96	7.49	2.67	8.06	15.02

เมื่อ STR locus คือ ตำแหน่งบนโครโมโซมที่ทำการศึกษาพิสูจน์ดีเอ็นเอจำนวน 16 โลกัศ ได้แก่ D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D5S818, FGA

N คือ จำนวน Stutterของอัลลีลในแต่ละโลกัศที่พบจาก DNA profile 100 profile

Min คือ ค่าเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ต่ำสุดที่พบในแต่ละโลกัศที่พบจาก DNA profile 100 profile

MAX คือ ค่าเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter สูงสุดที่พบในแต่ละโลกัศที่พบจาก DNA profile 100 profile

Median คือ ค่ามัธยฐานของเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ในแต่ละโลกัศที่พบจาก DNA profile 100 profile

Average คือ ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ในแต่ละโลกัศที่พบจาก DNA profile 100 profile

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ในแต่ละโลกัศที่พบจาก DNA profile 100 profile

จากตารางที่ 2 พบว่าการเกิด stutter มากที่สุดที่โลกัส D19S433 จำนวน 127 อัลลีล รองลงมาที่โลกัส D18S51 และ D8S1179 จำนวน 85 อัลลีล และ 84 อัลลีล เปอร์เซ็นต์ความสูง stutter สูงสุดที่โลกัส D2S1338 เท่ากับ 26.75 มีค่า median \pm 3SD เท่ากับ 15.02 รองลงมาที่โลกัส D5S818, vWA, FGA และ D19S433 ตามลำดับ มีเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter เท่ากับ 22.64, 19.21 และ 15.17 ตามลำดับ โดยโลกัส D2S1338 มีค่า median \pm 3SD เท่ากับ 15.02 โลกัส D5S818 มีค่า median \pm 3SD เท่ากับ 13.54 โลกัส vWA มีค่า median \pm 3SD เท่ากับ 16.11 และโลกัส D19S433 มีค่า median \pm 3SD เท่ากับ 13.09 นอกจากนี้ยังพบเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ต่ำสุดที่โลกัส TH01 เท่ากับ 5.12 มีค่า median \pm 3SD เท่ากับ 6.33

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter จากการวิจัยกับคู่มือการใช้เครื่อง

Applied Biosystem

STR Locus	เปอร์เซ็นต์ความสูง stutter สูงสุด จากการวิจัย	เปอร์เซ็นต์ความสูง stutter สูงสุดจาก คู่มือการใช้เครื่อง Applied Biosystem
D8S1179	11.91	8.2
D21S11	10.7	9.4
D7S820	7.26	8.2
CSF1PO	12.3	9.2
D3S1358	12.32	10.7
TH01	5.12	5.1
D13S317	10.8	8
D16S539	9.38	10.4
D2S1338	26.75	11.1
D19S433	15.17	13.3
vWA	19.21	12.6
TPOX	5.42	4.8
D18S51	14.87	17
D5S818	22.64	6.8
FGA	16.51	14.7

จากตารางที่ 3 เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter จากผลการตรวจดีเอ็นเอของวัตถุพยานทางชีววิทยาที่เก็บจากตัวบุคคลกับเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ในคู่มือการใช้เครื่อง Applied Biosystem พบว่า stutter ในคู่มือการใช้เครื่อง Applied Biosystem มีเปอร์เซ็นต์ความสูงไม่เกิน 15 เปอร์เซ็นต์ของพีคหลัก ส่วนในการวิจัยพบว่ามี 10 โลกัสได้แก่ D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, TPOX และ D18S51 ที่มีเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ไม่เกิน 15 เปอร์เซ็นต์ของพีคหลัก และที่เหลืออีก 5 โลกัสได้แก่ D2S1338, D19S433, vWA, D5S818 และ FGA มีเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter เกิน 15 เปอร์เซ็นต์ของพีคหลัก

ตารางที่ 4 ค่า peak height ของเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter สูงสุดในแต่ละโลกัส

STR Locus	เปอร์เซ็นต์ความสูง stutter สูงสุด จากการวิจัย	ค่า peak height ของเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter สูงสุด
D8S1179	11.91	1067
D21S11	10.7	20
D7S820	7.26	156
CSF1PO	12.3	91
D3S1358	12.32	128
TH01	5.12	56
D13S317	10.8	59
D16S539	9.38	123
D2S1338	26.75	88
D19S433	15.17	110
vWA	19.21	246
TPOX	5.42	54
D18S51	14.87	69
D5S818	22.64	333
FGA	16.51	54

จากตารางที่ 4 ค่า peak height ของเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter สูงสุดในแต่ละโลกัส พบว่าความสูงต่ำกว่า 100 RFU มีทั้งหมด 8 โลกัส ความสูงมากกว่า 100 RFU มีทั้งหมด 6 โลกัส และความสูงมากกว่า 500 RFU มี 1 โลกัส

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การศึกษาค้นคว้าอิสระเรื่องการศึกษาเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter จากผลการตรวจดีเอ็นเอของวัตถุพยานทางชีววิทยาที่เก็บจากตัวบุคคล มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter จากผลการตรวจดีเอ็นเอของวัตถุพยานที่เก็บจากตัวบุคคลจำนวน 100 profile ใน 48 คดี ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2551 ถึง เดือนมกราคม 2552 และเปรียบเทียบกับค่าเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ในคู่มือเครื่อง Applied Biosystem นอกจากนี้แล้วยังศึกษาค่า peak height ของเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter สูงสุดของแต่ละโลกัสที่ทำการตรวจพิสูจน์

5.1 สรุปผลการทดลอง

กราฟอเล็กโทรฟีโรแกรมจากบุคคลจำนวน 100 profile ที่มีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในความเข้มข้น 0.1 นาโนกรัมด้วย AmpFLSTR Identifier Kit และวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องตรวจดีเอ็นเออัตโนมัติ ยี่ห้อ Applied Biosystem รุ่น 3130XL เมื่อนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter พบว่าในแต่ละ STR โลกัสมีเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ดังนี้ โลกัส D8S1179 มีเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ต่ำสุด เท่ากับ 3.33 เปอร์เซ็นต์ สูงสุด 11.91 เปอร์เซ็นต์ โลกัส D21S11 มีเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ต่ำสุด เท่ากับ 2.26 เปอร์เซ็นต์ สูงสุด 10.7 เปอร์เซ็นต์ โลกัส D7S820 มีเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ต่ำสุด เท่ากับ 2.99 เปอร์เซ็นต์ สูงสุด 7.26 เปอร์เซ็นต์ โลกัส CSF1PO มีเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ต่ำสุด เท่ากับ 2.11 เปอร์เซ็นต์ สูงสุด 12.30 เปอร์เซ็นต์ โลกัส D3S1358 มีเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ต่ำสุด เท่ากับ 5.07 เปอร์เซ็นต์ สูงสุด 12.32 เปอร์เซ็นต์ โลกัส TH01 มีเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ต่ำสุด เท่ากับ 1.75 เปอร์เซ็นต์ สูงสุด 5.12 เปอร์เซ็นต์ โลกัส D13S317 มีเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ต่ำสุด เท่ากับ 3.07 เปอร์เซ็นต์ สูงสุด 10.80 เปอร์เซ็นต์

โลกัส D16S539 มีเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ต่ำสุด เท่ากับ 2.08 เปอร์เซ็นต์ สูงสุด 9.38 เปอร์เซ็นต์ โลกัส D2S1338 มีเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ต่ำสุด เท่ากับ 4.88 เปอร์เซ็นต์ สูงสุด 26.75 เปอร์เซ็นต์ โลกัส D19S433 มีเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ต่ำสุด เท่ากับ 5.23 เปอร์เซ็นต์ สูงสุด 15.17 เปอร์เซ็นต์ โลกัส vWA มีเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ต่ำสุด เท่ากับ 2.18 เปอร์เซ็นต์ สูงสุด 20.38 เปอร์เซ็นต์ โลกัส TPOX มีเปอร์เซ็นต์ stutter ต่ำสุด เท่ากับ 1.2 เปอร์เซ็นต์ สูงสุด 5.42 เปอร์เซ็นต์ โลกัส D18S51 มีเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ต่ำสุด เท่ากับ 2.71 เปอร์เซ็นต์ สูงสุด 14.87 เปอร์เซ็นต์ โลกัส D5S818 มีเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ต่ำสุด เท่ากับ 1.34 เปอร์เซ็นต์ สูงสุด 22.64 เปอร์เซ็นต์ โลกัส FGA มีเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ต่ำสุด เท่ากับ 1.96 เปอร์เซ็นต์ สูงสุด 16.51 เปอร์เซ็นต์ จากการวิจัยพบ stutter มากที่สุดที่ตำแหน่ง D19S433 รองลงมาที่โลกัส D8S1179, D18S51, D2S1338, vWA และ FGA ตามลำดับ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter สูงสุดที่ โลกัส D8S1179 เท่ากับ 26.75 เปอร์เซ็นต์ โลกัส D5S818 เท่ากับ 22.64 เปอร์เซ็นต์ โลกัส vWA เท่ากับ 19.21 เปอร์เซ็นต์ และโลกัส FGA เท่ากับ 19.51 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

5.2 อภิปรายผล

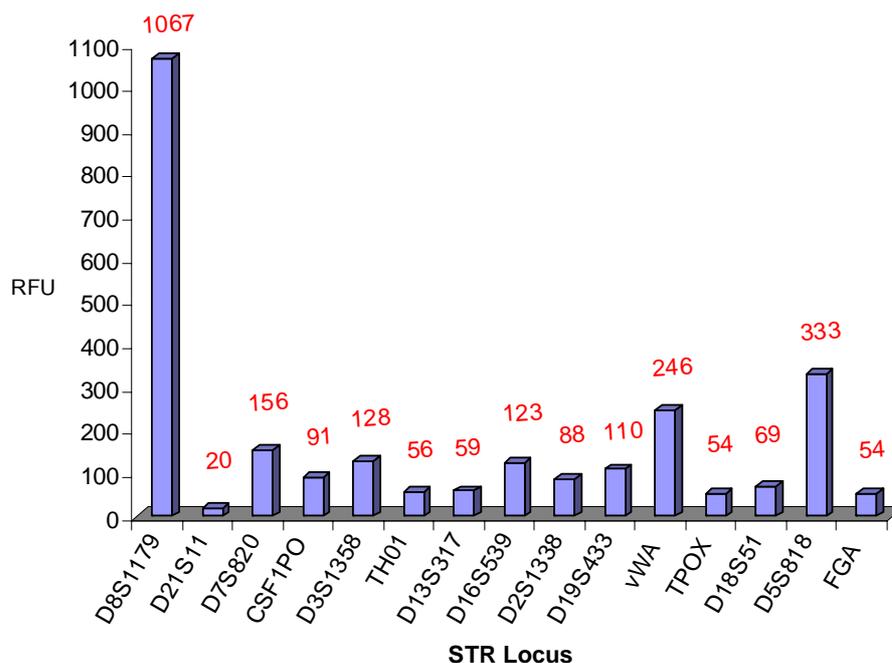
การศึกษาวิจัยพบว่า มี stutter มากที่สุดที่ตำแหน่ง D19S433 จำนวน 127 อัลลีล รองลงมาที่ตำแหน่ง D8S1179 จำนวน 85 อัลลีล และตำแหน่ง D18S51 จำนวน 84 อัลลีล ตามลำดับ ซึ่งการศึกษา stutter จะศึกษาอัลลีลที่มีอยู่ในไทป์แบบ heterozygus และแบบ homozygous เฉพาะในตำแหน่ง n-4 หรือ มีจำนวนซ้ำของเบสน้อยกว่า 4 bp ของพีคหลัก การพบ stutter มากในตำแหน่ง D19S433, D8S1179 และ D18S51 ทั้ง 3 ตำแหน่งนี้เป็นจำนวนมาก อาจมีสาเหตุจากลำดับเบสแกนในโลกัสดังกล่าวมีแบบของเบสสายสั้น เช่น ตำแหน่ง D8S1179 มีลำดับเบสแกน TCTR ตำแหน่ง D18S51 มีลำดับเบสแกน AGAA สอดคล้องกับรายงานของ John และคณะ ซึ่งได้กล่าวไว้ว่าลำดับเบสแกนที่มีชนิดของเบสซ้ำกันน้อยๆหรือเป็นแบบ dinucleotide เมื่อเข้าสู่ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอซึ่งเป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ลำดับเบสเพื่อสร้างสายใหม่มักจะเกิดความผิดพลาดในการเลื่อนลำดับเบสทำให้เกิด loop จึงทำให้เกิด stutter ได้มาก

การศึกษาวิจัยพบว่าเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter สูงสุดในตำแหน่ง D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, TPOX และ D18S51 มีค่าไม่เกิน 15 เปอร์เซ็นต์ของพีคหลัก และพบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter สูงสุดในตำแหน่ง D2S1338, D5S818, vWA และ FGA มีค่าเกิน 15 เปอร์เซ็นต์ของพีคหลัก และเมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ในการทดลองของ Nor Aidora Saedon และจากคู่มือใน

เครื่อง Applied Biosystem พบว่า โลกัสด D2S1338, D5S818, vWA และ FGA มีค่าเปอร์เซ็นต์ stutter ไม่เกิน 15 เปอร์เซ็นต์ของพีคหลัก สาเหตุที่การวิจัยพบเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter เกิน 15 เปอร์เซ็นต์ในโลกัสดที่ D2S1338, D5S818, vWA และ FGA ซึ่งมีผลมาจากความยาวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของพีคหลักมีความยาวมาก จึงทำให้ความสูงของ stutter ที่อยู่หน้าพีคหลักสูงตามเช่นเดียวกับการทดลองของ walsh ที่ได้ศึกษาความยาวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอในโลกัสด vWA โดยการเพิ่มขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอให้ยาวขึ้นจาก 158 bp จนกระทั่งมีความยาวถึง 198 bp จะทำให้เปอร์เซ็นต์ความสูงของ stutter เพิ่มขึ้นจาก 3.9 เปอร์เซ็นต์ เป็น 8.7 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีผลมาจากคุณภาพของวัตถุพยานทางชีววิทยาซึ่งเสื่อมสภาพได้เนื่องจากมีระยะเวลาในการเก็บรักษานาน การพบเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter เกิน 15 เปอร์เซ็นต์ของพีคหลักในการวิจัยอาจแปลความหมายว่ามีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอของบุคคลมากกว่า 2 คน แต่เนื่องจากการวิจัยได้ใช้วัตถุพยานจากตัวบุคคลเพียงคนเดียวใน 1 ตัวอย่าง ดังนั้นการตัดสินใจว่าพีคที่ปรากฏในผลดีเอ็นเอเป็น stutter peak นั้น นอกจากจะใช้ค่าเปอร์เซ็นต์ความสูงต่อพีคหลักแล้วยังต้องนำค่า median+3SD มาใช้ประกอบการตัดสินใจอีกด้วย เช่น ในโลกัสด D2S1338 มีเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter เท่ากับ 26.75 แต่มีค่า median+3SD เท่ากับ 15.02 ในโลกัสด D5S818 มีเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter เท่ากับ 22.64 แต่มีค่า median+3SD เท่ากับ 13.54 เป็นต้น ค่า median+3SD สามารถนำมาใช้ประกอบการตัดสินใจที่จะทำซ้ำในแต่ละตัวอย่าง เช่น โลกัสด D21S11 พบเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter เท่ากับ 10.7 มีค่า median+3SD เท่ากับ 10.68 หากได้ทำการตรวจผลดีเอ็นเอในภายหลังและพบว่าเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter เกิน 10.68 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่เกิน 15 เปอร์เซ็นต์ การแปรผลเบื้องต้นก่อนทำการวิจัยจะระบุว่าพีคที่พบในผลการตรวจดีเอ็นเอเป็นพีคของ stutter แต่เมื่อได้ทำการวิจัยในเรื่องนี้แล้วจะทำให้การแปรผลเปลี่ยนไปซึ่งพีคที่พบต้องสันนิษฐานก่อนว่าเกิดจากการปนเปื้อนของดีเอ็นเอมากกว่า 1 คน เพราะมีค่า median+3SD เกิน 10.68 การพิจารณาว่าเป็นพีค stutter จึงต้องสังเกตจากพีคในโลกัสดอื่นๆด้วย และควรเช็คผลดีเอ็นเออีกครั้งโดยการทำซ้ำในตัวอย่างนั้นอีกรอบ แล้วเปรียบเทียบผลก่อนการตัดสินใจว่าพีคที่พบเป็นของบุคคลอีกบุคคลหรือเป็นพีค stutter

นอกจากนั้นการวิจัยนี้จึงสะท้อนให้เห็นว่าการกำหนดค่า cut off ของเครื่องตรวจวัดดีเอ็นเออัตโนมัติยังมีความสำคัญที่จะคัดแยกพีคที่ไม่ใช่พีคอัลลีลที่แท้จริงได้ ซึ่งเมื่อผลการอ่านถูกส่งเข้าเครื่องคอมพิวเตอร์ที่มีโปรแกรมแปลงผลการอ่านให้ออกมาในรูปแบบกราฟอเล็กโทรฟีโรแกรม การกำหนดค่า cut off จะทำให้เครื่องคอมพิวเตอร์นี้อ่านพีคเฉพาะพีคที่มีความสูงมากกว่าที่ได้กำหนดค่า cut off ไว้ เมื่อพิจารณาจากผลการวิจัยพบว่า

ค่า peak height ของเปอริเซ็นต์ความสูง stutter สูงสุดของแต่ละโลกัส ส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 50-200 RFU ดังภาพที่ 36



ภาพที่ 36 ค่า peak height ของเปอริเซ็นต์ความสูง stutter สูงสุดของแต่ละโลกัส

การกำหนดค่า cut off เท่ากับ 50 RFU จะทำให้ยังพบ stutter ในทุกโลกัส ยกเว้น โลกัส D21S11 เมื่อกำหนดค่า cut off เท่ากับ 100 RFU จะทำให้พบ stutter น้อยลง โดยจะพบ stutter ที่โลกัส D8S1179, D7S820, D3S1358, D16S539, vWA และ D5S818 เมื่อกำหนดค่า cut off เท่ากับ 200 RFU จะทำให้พบ stutter ในโลกัส D8S1179, vWA และ D5S818 เพียง 3 โลกัสเท่านั้น งานวิจัยนี้จึงสะท้อนให้เห็นว่าการกำหนดค่า cut off จะสามารถช่วยกำจัด stutter peak ในดีเอ็นเอบุคคลได้ ซึ่งการกำหนดค่า cut off สามารถทำได้ทั้งอัลลีลแบบโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัส โดยการบรรยายของ Nicole Inacio ได้กล่าวไว้ว่าในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ได้ กำหนดค่า cut off ไว้ที่ 200 RFU และยังพบว่าในการทดลองของ Goodwin ได้กำหนดค่า cut off เกิน 100 RFU เช่นกัน โดยกำหนดค่า cut off ที่ 500 RFU

5.3 ข้อเสนอแนะ

5.3.1 ข้อเสนอแนะที่ได้จากการวิจัย

การศึกษาเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter จากผลการตรวจดีเอ็นเอของวัตถุประสงค์ของวิทยานิพนธ์ที่เก็บจากตัวบุคคล ผู้ศึกษามีข้อเสนอแนะดังนี้ จากการศึกษพบว่าเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ใน STR locus แต่ละตำแหน่งมีค่าแตกต่างกันขึ้นอยู่กับการขาดหายไปของลำดับเบสอันเนื่องจากการโค้งงอในขั้นตอน extension ของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและพีคหลักมีความยาวของลำดับเบสมาก คุณภาพดีเอ็นเอ เป็นต้น แต่เมื่อวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องตรวจดีเอ็นเออัตโนมัติ ควรเพิ่มค่า cut off ให้สูงกว่า 100 RFU เพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องมากยิ่งขึ้น

5.3.2 ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป

ในการทำวิจัยครั้งต่อไปควรศึกษาวัตถุประสงค์ของวิทยานิพนธ์ที่เก็บจากตัวบุคคลให้มีจำนวนมากกกว่านี้และเพิ่มการทดลองโดยวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องตรวจดีเอ็นเออัตโนมัติที่กำหนดค่า cut off ที่ระดับต่างๆ แล้วเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความสูง stutter ที่พบใน STR locus ในระดับนั้นๆ เพื่อให้ทราบว่าการตรวจวัตถุประสงค์ของวิทยานิพนธ์ในประเทศไทย ควรใช้ค่า cut off ที่ระดับใดผลการตรวจพิสูจน์จึงมีความน่าเชื่อถือมากที่สุด

บรรณานุกรม

ภาษาไทย

โครโมโซมและสารพันธุกรรม [online], accessed 9 May 2009. Available from

<http://www.sarinp.com/unit3/chromosome1.htm>

โครงสร้างดีเอ็นเอ [online], accessed 20 April 2009. Available from

<http://learners.in.th/file/tpanrat/dna2.jpg>

เซลล์ของสิ่งมีชีวิต [online], accessed 11 July 2008. Available from

www.microscopyu.com/galleries/dicphasecontrast/cheekcellsmall.html

ธานิน ภูพัฒน์. วิทยาการดีเอ็นเอในงานนิติเวช. เชียงใหม่ : ภาควิชานิติวิทยาศาสตร์, 2538.

พจน์ บุญยะจินดา. กองพิสูจน์หลักฐาน. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ตำรวจ, 2537.

เรื่องกรดนิวคลีอิก [online], accessed 9 May 2009. Available from

<http://learners.in.th/file/dawood/singleStrand.jpg>

วิชัย บุญแสง และคณะ. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากสารพันธุกรรมสู่เทคโนโลยีพิสูจน์บุคคล.

พิมพ์ครั้งที่ 3. ปทุมธานี: สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2547.

วิวัฒนาการของ PCR Technology [online], accessed 9 May 2009. Available from

<http://images.google.co.th/imgres?imgurl=http://ku->

www.sarinp.com/unit3/chromosome1.htm [online], accessed 9 May 2009. Available

from <http://www.sarinp.com/unit3/chromosome1.htm>

เส้นผมมนุษย์ [online], accessed 11 July 2008. Available from www.geocities.co

อภิรดี ปิลาตันธนภาคย์. "การทดลองของกริฟฟิท." เอกสารประกอบวิชา 305311 พันธุศาสตร์ของ

จุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา, 2531.

(อัดสำเนา)

ภาษาอังกฤษ

Buckleton, John., Christopher M. Triggs., and Walsh J Simon. Forensic DNA Evidence Interpretation. America : CRC Press,2005.

Daniel, Charles. It's Crowded in Your Blood [online], accessed 10 July 2008. Available from <http://www.cache.eb.com>

DNA [online], accessed 11 July 2008. Available from www.ifm.go.th/images/sperm01.jpg

DNA Forensics Problem Set [online], accessed 9 May 2009. Available from http://www.biology.arizona.edu/human_bio/problem_sets/DNA_forensics_2/graphics/10a.gif

Inacio, Nicole. "Validation and Quality Assurance." Paper present at Scientific crime detection division

Leclair, Benoit and others. "Systematic Analysis of Stutter Percentages and Allele Peak Height and Peak Area Ratios at Heterozygous STR Loci for Forensic Casework and Database Sample." Journal of forensic sciences 49,5 (September 2004) : 1-12

Nucleic acid [online], accessed 9 May 2009. Available from <http://www.bio.miami.edu/~cmallery/150/chemistry/c8.5x27b.bases.jpg>

Goodwin, William and others. An Introduction to forensic Genetic. England : John Wiley & Sons,Ltd. (2007).

The Chemical Basis of Heredity [online], accessed 20 April 2009. Available from <http://www.chk.ac.th/web/biology/ch1.html>

Walsh, P.Sean. Nicola J. Fildes, and Rebecca Reynolds."Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA." Nucleic Acids Research 24,14 (May 1996): 2807-2812.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
เครื่องมือและสารเคมีในการวิจัย

1. ไมโครปิเปตขนาด 10 μ l, 20 μ l, 100 μ l, 200 μ l และ 1000 μ l



ภาพที่ 37 ไมโครปิเปตขนาด 10 μ l, 20 μ l, 100 μ l, 200 μ l และ 1000 μ l

2. เครื่องปั่นเหวี่ยง



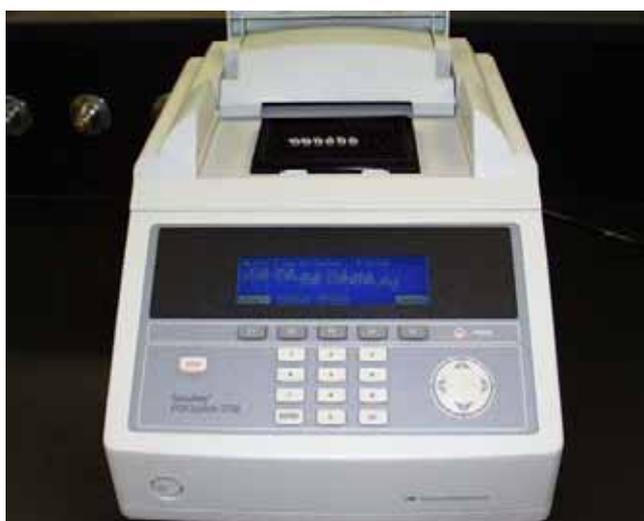
ภาพที่ 38 เครื่องปั่นเหวี่ยง

3. เครื่องตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอ



ภาพที่ 39 เครื่องตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอ

4. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ



ภาพที่ 40 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

5. เครื่องตรวจดีเอ็นเออัตโนมัติ ยี่ห้อ Applied Biosystem รุ่น 3130XL



ภาพที่ 41 เครื่องตรวจดีเอ็นเออัตโนมัติ ยี่ห้อ Applied Biosystem รุ่น 3130XL

6. ชุดน้ำยาสกัดสำเร็จรูป ยี่ห้อ Promega



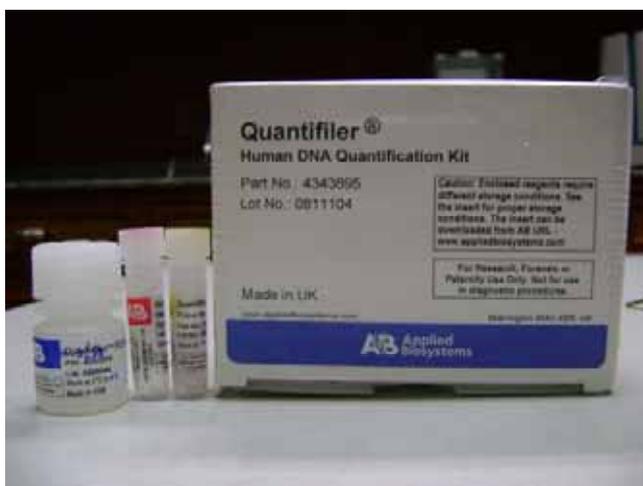
ภาพที่ 42 ชุดน้ำยาสกัดสำเร็จรูป ยี่ห้อ Promega

7. ชุดน้ำยาสกัดสำเร็จรูปสำหรับสกัดดีเอ็นเอ ยี่ห้อ QIAamp DNA Mini Kit



ภาพที่ 43 ชุดน้ำยาสกัดสำเร็จรูปสำหรับสกัดดีเอ็นเอ ยี่ห้อ QIAamp DNA Mini Kit

8. ชุดน้ำยาวัดปริมาณดีเอ็นเอ



ภาพที่ 44 ชุดน้ำยาวัดปริมาณดีเอ็นเอ

9. ชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ



ภาพที่ 45 ชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

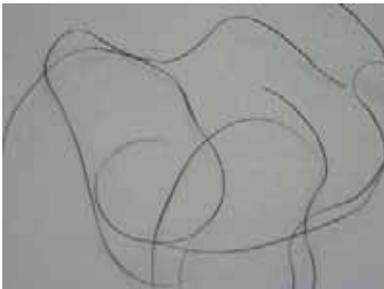
10. ชุดน้ำยาสำหรับตรวจวิเคราะห์ DNA



ภาพที่ 46 ชุดน้ำยาสำหรับตรวจวิเคราะห์ DNA

ภาคผนวก ข
การเตรียมวัตถุดิบทางชีววิทยาที่เก็บจากตัวบุคคล

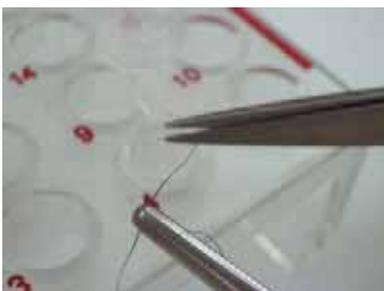
1.เส้นผมเส้นขน



ถ่ายรูป นับจำนวน และบันทึกรายละเอียด
ภาพที่ 47 เส้นผมเส้นขนที่ได้จากตัวบุคคล

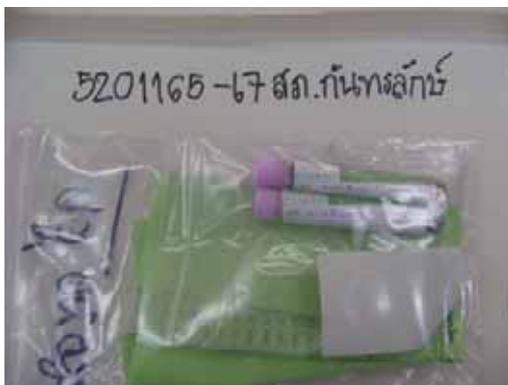


ตรวจสอบว่าเป็นเส้นผม ขนมนุษย์ หรือ เส้นขนสัตว์
โดยสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์
ภาพที่ 48 คุณลักษณะสัณฐานวิทยาของเส้นผมภายใต้
กล้องจุลทรรศน์



เลือกเฉพาะเส้นผมหรือเส้นขนมนุษย์ที่มีราก ตัด
รากใส่ micro tube เพื่อเตรียมสำหรับการ
สกัด DNA ต่อไป
ภาพที่ 49 การตัดรากเส้นผมลงหลอดทดลอง

2. คราบเลือด



นำวัตถุพยานมาถ่ายรูปและบันทึก
รายละเอียด

ภาพที่ 50 วัตถุพยานประเภทคราบเลือดจาก
ตัวบุคคล



ตรวจพิสูจน์ว่ารอยคราบนั้นเป็นคราบโลหิต
หรือไม่ โดยใช้สารละลาย phenolphthalein
และ H_2O_2

- Positive เป็นสีชมพูเข้ม
- Negative ไม่เปลี่ยนสี

ภาพที่ 51 การทดสอบคราบโลหิต



ตรวจสอบว่าคราบโลหิตนั้น เป็นคราบโลหิต
มนุษย์ โดยใช้ anti-human serum

- positive เกิด ring ตรงรอยต่อของโลหิตกับ
anti-human serum
- negative ไม่เกิด ring ตรงรอยต่อของโลหิต
กับ anti-human serum

ภาพที่ 52 การทดสอบโลหิตมนุษย์



ตัดรอยคราบที่ผ่านการทดสอบแล้วว่าเป็น
คราบโลหิตมนุษย์ใส่ใน micro tube ระบุ
หมายเลขหลอด สำหรับเตรียมสู่ขั้นตอน
การสกัด DNA

ภาพที่ 53 ตัดรอยคราบใส่ micro tube

3. เชื้อบูซังแก้ม

บันทึกรายละเอียดและถ่ายภาพ ก้านสำลีที่ใช้เก็บเยื่อบูซังแก้มจากตัวบุคคล



ตัดสำลีด้วยใบมีดปลอดภัยให้
มีขนาด 1 ตารางเซนติเมตร

ภาพที่ 54 ตัดสำลีที่ใช้เก็บเยื่อบูซังแก้ม



บรรจุสำลีที่ตัดลงในหลอด micro tube
ระบุหมายเลขหลอด

ภาพที่ 55 บรรจุสำลีใส่ micro tube

ภาคผนวก ค
การวัดปริมาณดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

การวัดปริมาณดีเอ็นเอ



ภาพที่ 56 การ spin down

นำ Quantifiler Human Kit (PCR reaction Mix จาก 4°C , Human DNA standard และ Human Primer Mix จาก -20°C) มา vortex และ spin down



ภาพที่ 57 เตรียม master mix

เตรียม Human DNA standard ความเข้มข้นต่างๆ ทั้งหมด 5 ความเข้มข้น สำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) และเตรียม master mix



ภาพที่ 58 แบ่ง master mix ใส่ reaction plate

แบ่ง master mix ใส่ reaction plate หลุมละ $24\ \mu\text{l}$ เติม Human DNA standard และตัวอย่าง DNA ที่ต้องการวัดปริมาณ ลงไปใน master mix แต่ละหลุม หลุมละ $1\ \mu\text{l}$ กำจัดฟองอากาศ แล้วปิด plate ให้สนิทด้วย optical adhesive cover



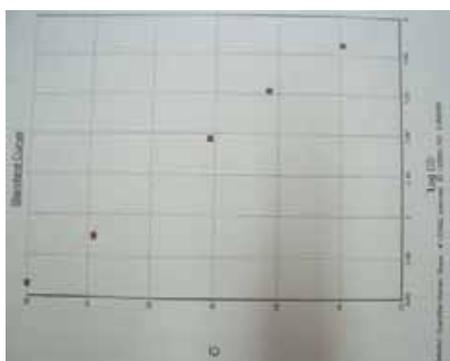
นำ plate ใส่เข้าไปในเครื่อง Real-Time PCR ABI PRISM[®] 7500 system

ภาพที่ 59 นำ plate ใส่เครื่อง Real-Time PCR ABI PRISM[®] 7500 system



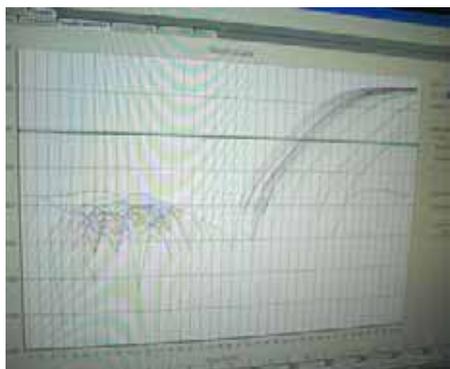
สร้าง sample sheet โดยกำหนดค่าต่างๆของ standard และกำหนดตำแหน่งของตัวอย่าง DNA ที่จะวัดปริมาณ

ภาพที่ 60 การแสดงผล sample sheet



การแสดงผลของกราฟมาตรฐาน (standard curve) ที่ใช้สำหรับเทียบหาปริมาณ DNA

ภาพที่ 61 การแสดงผลกราฟมาตรฐาน



การแสดงผลของปริมาณ DNA ที่เพิ่มขึ้นในแต่ละรอบ

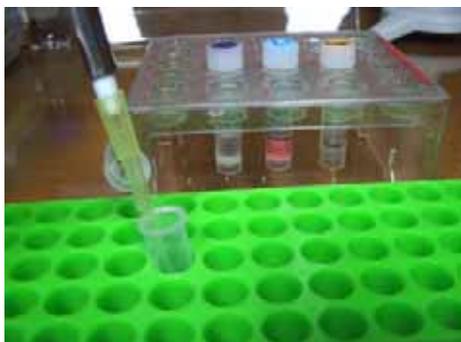
ภาพที่ 62 ผลของปริมาณ DNA ที่เพิ่มขึ้นในแต่ละ

Ct	Qty
23.38	50.00
24.65	
25.42	16.70
24.75	
26.96	5.56
24.77	
28.99	1.85
24.80	
33.15	6.20e-001
24.87	
32.35	6.20e-001
24.96	

แสดงปริมาณ DNA ในตัวอย่าง
คำนวณได้จากเครื่องซึ่งมีหน่วย ng

ภาพที่ 63 แสดงปริมาณ DNA ในตัวอย่าง

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ



ผสม master mix จากชุดน้ำยาสำเร็จรูป ซึ่งประกอบด้วย PCR Reaction mix Primer Taq enzyme

ภาพที่ 64 ผสม master mix เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ



ปิเปต master mix ใส่หลอดสำหรับทำ PCR หลอดละ 15 ไมโครลิตร

ภาพที่ 65 ปิเปต master mix ใส่หลอด PCR



ปิเปต DNA 10 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดที่มี master mix อยู่แล้ว

ภาพที่ 66 ปิเปต DNA 10 ไมโครลิตร ใส่หลอด PCR



นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ 8000 rpm 1 นาที
นำหลอดใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ภาพที่ 67 นำหลอดใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ



เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใช้เวลา 3.5
ชั่วโมง ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยเพิ่ม
ได้ครั้งละ 96 ตัวอย่าง

ภาพที่ 68 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ภาคผนวก ง
การวิเคราะห์ผล (Analyse)



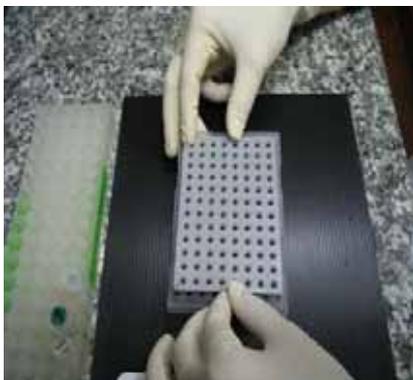
ภาพที่ 69 การ vortex

นำ LIZ[®] Size Standard จาก 4⁰C และ Hi-Di Formamide จาก -20⁰C มา vortex และ spin down เตรียม master mix โดยใช้สัดส่วน Hi-Di Formamide : LIZ[®] Size Standard เป็น 8.7: 0.3 μ l



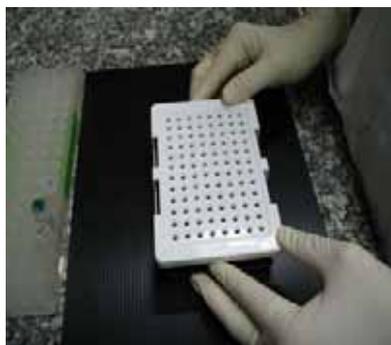
ภาพที่ 70 แบ่ง master mix ใส่ใน 96-well

แบ่ง master mix ใส่ใน 96-well reaction plate หลุมละ 9 μ l เติม Allelic ladder และ PCR product ลงไปใน master mix แต่ละหลุม หลุมละ 1 μ l



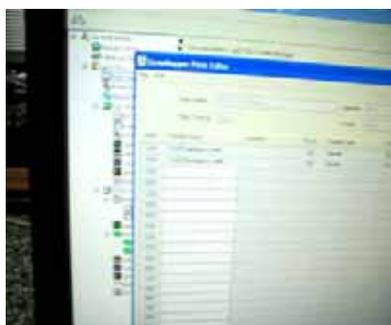
ภาพที่ 71 การปิดด้วย 96-well plate septa

กำจัดฟองอากาศออกให้หมดแล้วปิดด้วย plate septa



นำ 96-well reaction plate วางลงบน plate base แล้วครอบด้านบนของ plate ด้วย plate retainer

ภาพที่ 72 ครอบด้านบนของ plate ด้วย plate retainer



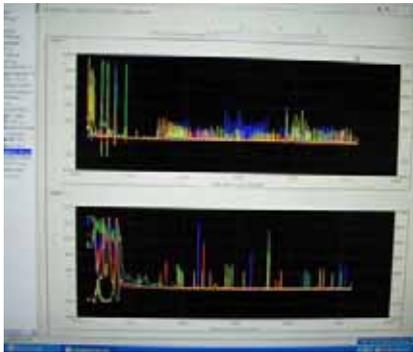
สร้าง sample sheet โดยกำหนดค่าและตำแหน่งของ Allelic ladder, Positive control และ sample

ภาพที่ 73 การทำ sample sheet ในเครื่อง ABI



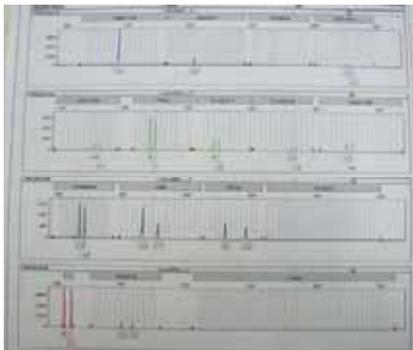
นำ plate ใส่เข้าไปในเครื่องวิเคราะห์ (3130XL Genetic Analyzer)

ภาพที่ 74 นำ plate ใส่เข้าไปในเครื่องวิเคราะห์ 3130XL Genetic Analyzer



แสดง DNA profiles ขณะเครื่องกำลังทำงาน

ภาพที่ 75 DNA profiles ขณะเครื่องกำลังทำงาน



แสดงผลการวิเคราะห์ DNA ทั้ง 16 โลกั๊ส ซึ่ง
ต้องทำการตรวจสอบข้อมูลโดยละเอียดถี่ถ้วน
โดยผู้ชำนาญอีกครั้งหนึ่ง เพื่อนำไปสู่ขั้นตอน
การเขียนรายงานต่อไป

ภาพที่ 76 DNA profiles แสดงผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ – นามสกุล ที่อยู่	ร้อยตำรวจโทหญิง ศิรินทิพย์ พลชา 1/734 หมู่บ้านพาร์ควิวิภาวดี ตึก A6 ถนนกำแพงเพชร 6 แขวงสีกัน เขตดอนเมือง กรุงเทพฯ 10210 โทรศัพท์ (086-3054344)
ที่ทำงาน	กลุ่มงานตรวจทางเคมี ฟิสิกส์ และชีววิทยา กองพิสูจน์หลักฐาน สำนักงานตำรวจแห่งชาติ ถนนอังรีดูนังต์ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทรศัพท์ (02)2051892
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2549	สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา จากมหาวิทยาลัยบูรพา
พ.ศ. 2550	ศึกษาต่อระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขานิติวิทยาศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ประวัติการทำงาน	
พ.ศ. 2549 - ปัจจุบัน	รับราชการตำรวจ สังกัด กองพิสูจน์หลักฐาน สำนักงานตำรวจ แห่งชาติ ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์ (สบ.1)