การเก็บกู้ดีเอ็นเอจากพื้นผิวสัมผัส

โดย

นางสาวศศิธร พรหมวัลย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การเก็บกู้ดีเอ็นเอจากพื้นผิวสัมผัส

โดย
นางสาวศศิธร พรหมวัลย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2554
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

DNA RECOVERY FROM TOUCHED SURFACES

By

Sasithorn Promwan

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree

MASTER OF SCIENCE

Program of Forensic Science

Graduate School

SILPAKORN UNIVERSITY

2011

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร อนุมัติให้วิทยานิพนธ์เรื่อง “ การเก็บกู้ดีเอ็นเอจากพื้นผิวสัมผัส ” เสนอโดย นางสาวศศิธร พรหมวัลย์ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

…….....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปานใจ ธารทัศนวงศ์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่.....เดือน..... พ.ศ.....

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

1. รองศาสตราจารย์ ดร.บุษบา ฤกษ์อำนวยโชค
2. รองศาสตราจารย์ พันตำรวจเอกสันติ์ สุขวัจน์

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธงชัย เตโชวิศาล)

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

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร. ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต)

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

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.บุษบา ฤกษ์อำนวยโชค)

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

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ พันตำรวจเอกสันติ์ สุขวัจน์)

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

52312334 : สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์
คำสำคัญ : นิติวิทยาศาสตร์/ ลายพิมพ์นิ้วมือ/ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ/ พื้นผิวสัมผัส

ศศิธร พรหมวัลย์ : การเก็บกู้ดีเอ็นเอจากพื้นผิวสัมผัส. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : รศ.ดร.บุษบา ฤกษ์อำนวยโชค และ รศ.พ.ต.อ.สันติ์ สุขวัจน์. 82 หน้า.

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจะศึกษาเปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอ และคุณภาพของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จากการสัมผัสพื้นผิวที่มีลักษณะแตกต่างกัน

วัตถุที่ใช้ในการสัมผัสที่มีลักษณะพื้นผิวที่แตกต่างกัน 4 ชนิดได้แก่ ลูกบิดประตู, ปลอกสวมด้ามจับรถจักรยานยนต์, ค้อนที่มีด้ามจับเป็นไม้ และอิฐบล็อก เก็บตัวอย่างเยื่อบุกระพุ้งแก้มและเยื่อบุผิวหนังที่ได้จากรอยสัมผัสของอาสาสมัครจำนวน 5 คน ที่ไม่ได้ทำการล้างมือโดยจับวัตถุนาน 1 นาที เก็บตัวอย่างด้วยวิธี double swab จากนั้นนำไปสกัดด้วย QIAamp® DNA Micro Kit แล้ววัดปริมาณดีเอ็นเอด้วย Quantifiler® Human DNA Quantifiler Kit ในหน่วยความเข้มข้น ng/µl เลือกตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีปริมาณสูงมาเพิ่มปริมาณและวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มของอาสาสมัคร

ผลการวิจัยในด้านปริมาณดีเอ็นเอ พบว่า ด้ามจับของค้อน ปลอกสวมด้ามจับรถจักรยานยนต์ อิฐบล็อก และลูกบิดประตู มีปริมาณดีเอ็นเอเฉลี่ย 0.1197, 0.0780, 0.0503 และ 0.0268 ng/µl ตามลำดับ ในด้านคุณภาพ สามารถวิเคราะห์ตำแหน่งดีเอ็นเอที่พบจาก ปลอกสวมด้ามจับรถจักรยานยนต์ คิดเป็นร้อยละ 100 จากอิฐบล็อก ร้อยละ 50 และลูกบิดประตู ร้อยละ 6.25 แต่ผลจากด้ามจับของค้อน ได้เป็น mixed DNA profile อาจเนื่องจากลักษณะพื้นผิวของไม้ที่สามารถยึดเกาะกับเซลล์ได้ดีมาก ทำให้พบดีเอ็นเอที่อาจปนเปื้อนจากมือของอาสาสมัครได้

สรุปด้านปริมาณ ดีเอ็นเอที่ได้จากด้ามจับของค้อนพบปริมาณมากที่สุด รองลงมาคือ ปลอกสวมด้ามจับรถจักรยานยนต์ อิฐบล็อก และลูกบิดประตู ตามลำดับ ด้านคุณภาพ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากปลอกสวมด้ามจับรถจักรยานยนต์ได้ตำแหน่งดีเอ็นเอครบ แต่จากอิฐบล็อกและลูกบิดประตู ได้ตำแหน่งดีเอ็นเอน้อยลงมาตามลำดับ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำไปเป็นข้อมูลประกอบในการตัดสินใจดำเนินการกับวัตถุพยานที่ตรวจพบในสถานที่เกิดเหตุได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการหาตัวผู้กระทำความผิดได้

สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ปีการศึกษา 2554

ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ 1. ..... 2. .....

52312334 : MAJOR : FORENSIC SCIENCE
KEY WORD : FORENSIC SCIENCE/ DNA QUANTITY/ DNA FINGERPRINT/ TOUCHED SURFACE
SASITHORN PROMWAN : DNA RECOVERY FROM TOUCHED SURFACES. THESIS ADVISORS : ASSOC. PROF. BUDSABA RERKAMNUAYCHOKE, AND ASSOC. PROF. POL.COL. SANT SUKHAVACHANA. 82 pp.

The objective of this research is to study the quantity and quality of DNA from various touched surfaces.

There were 4 types of surfaces, including door knob, motorcycle grip case, halve and brick. A total of 5 volunteers' buccal cells and epithelial cells from unwashed hand was collected. Objects were touched for 1 minute, Then touched cells were collected with double swab technique and DNA was extracted using QIAamp® DNA Micro Kit. Extracted DNA was quantified using real-time PCR and typed using Identifiler Kit. The profiling results were compared to the baccal DNA profiles.

The result indicated that in the term of quantity, the average amounts of recovered DNA from halve, motorcycle grip case, brick and door knob were 0.1197, 0780, 0.0503 and 0.0268 ng/µl, respectively. In the term of quality, the percentage of alleles recovered from motorcycle grip case, brick and door knob were 100, 50 and 6.25 % respectively. However, DNA recovered from halve was mixed profile because of the characteristic of halve itself that was too easily to attach to cells.

In conclusion, the amount of DNA recovered from halve was considered to be the best in this experiment. The complete profile can only be obtained from motorcycle grip case. Therefore, the data from this experiment is useful for determining crime scene in dunce management.

Program of Forensic Science Graduate School, Silpakorn University Academic Year 2011
Student's signature .....
Thesis Advisors' signature 1. .....2. .....

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยเรื่อง การเก็บกู้ดีเอ็นเอจากพื้นผิวสัมผัส สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เพราะได้รับความช่วยเหลือและร่วมมือจากบุคคลหลายท่านที่ได้สละเวลา ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยเป็นอย่างยิ่ง ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.บุษบา ฤกษ์อำนวยโชค และ รองศาสตราจารย์ พันตำรวจเอกสันติ์ สุขวัจน์ ที่ได้กรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธงชัย เตโชวิศาล ที่ได้กรุณาเป็นประธานและอาจารย์ดร. ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต ที่กรุณาเป็นกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิในการสอบวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ และให้คำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนมีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คุณจิตติมา โชติวรานนท์ คุณธวัช รินทะชัย ที่คอยสอน ให้คำปรึกษาและแนะนำในการทำการทดลอง คุณอุบลรัตน์ จอมสวัสดิ์ และพี่ๆ ในหน่วยมนุษย์พันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี ที่คอยช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำการทดลองมาโดยตลอด ขอขอบคุณนางสาวอัจฉรีย์ คงเรืองที่คอยช่วยเหลือในการทำการทดลองให้สำเร็จลุล่วงไปได้

ขอขอบคุณอาสาสมัครทุกท่านที่เสียสละเวลาอันมีค่า และให้ความร่วมมือเป็นอย่างดี ทำให้การวิจัยนี้ดำเนินไปได้อย่างราบรื่น

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณบิดา มารดา ครู อาจารย์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอน ให้ความรู้ และปลูกฝังให้เห็นคุณค่าของการศึกษา รวมทั้งผู้ที่ได้ให้ความช่วยเหลือทุกท่านที่มิได้เอ่ยนามมา ณ ที่นี้ด้วย ที่มีส่วนช่วยเหลือจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ประสบผลสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

สำหรับคุณประโยชน์อันพึงมีจากงานวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ บิดา มารดา ครู อาจารย์ ผู้ถ่ายทอดวิชาความรู้ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอน ตลอดจนผู้ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยในครั้งนี้ ส่งผลให้ผู้วิจัยทำวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ญ

สารบัญภาพ ..... ฎ

บทที่

1 บทนำ 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย 3

สมมติฐานของการวิจัย 3

ขอบเขตของการวิจัย 3

นิยามศัพท์เฉพาะ 3

ตัวแปรที่ใช้ในการวิจัย 5

กรอบแนวความคิดในการวิจัย 5

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 5

2 ทบทวนวรรณกรรม และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 6

ความหมายของพยานหลักฐาน 6

ประเภทของพยานหลักฐาน 6

ชนิดของพยานวัตถุ 7

ประเภทของวัตถุพยานทางวิทยาศาสตร์ 7

คุณค่าของพยานวัตถุ 8

ความเป็นมาของการวิเคราะห์ดีเอ็นเอทางนิติวิทยาศาสตร์ 8

โครงสร้างของดีเอ็นเอ (DNA) 9

แหล่งที่พบตัวอย่างดีเอ็นเอ 11

ขั้นตอนในการจัดการกับตัวอย่างดีเอ็นเอ 12

การเก็บตัวอย่าง 13

การสกัดดีเอ็นเอ 13

บทที่ หน้า
การสกัดดีเอ็นเอ 13
การวัดปริมาณดีเอ็นเอ..... 15
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) 16
เทคนิค Quantitative Realtime PCR..... 19
การตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR (PCR product) 22
STR (Short Tendam Repeat) หรือ Microsatellite 25
ผลลัพธ์ที่พบได้จากการเพิ่มปริมาณและการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ.... 30
การรายงานผล..... 32
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 33
3 วิธีดำเนินการวิจัย 36
วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง 36
วิธีการทดลอง 38
การเก็บตัวอย่าง 38
การสกัดดีเอ็นเอ 42
การวัดปริมาณดีเอ็นเอ..... 44
การเพิ่มปริมาณและการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ 46
4 ผลการทดลอง..... 48
ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากพื้นผิววัตถุ 48
ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากพื้นผิววัตถุ..... 52
5 อภิปรายผล สรุป และข้อเสนอแนะ..... 56
อภิปรายผล..... 56
สรุปผลการทดลอง..... 57
ข้อควรระวัง..... 58
ข้อเสนอแนะ 59

บรรณานุกรม..... 60

หน้า

ภาคผนวก 62
ภาคผนวก ก เอกสารรับรองการทำวิจัยในคน เอกสารชี้แจงข้อมูล
และหนังสือยินยอม..... 63
ภาคผนวก ข ผลการทดลองการวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี real-time PCR
และลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 69

ประวัติผู้วิจัย..... 82

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	รายงานผลการป้องกันปราบปรามอาชญากรรม และคดีเก่าของบช.น. ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2552 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2553	2
2	ตัวอย่างวัตถุพยานชีวภาพที่สามารถนำมาตรวจดีเอ็นเอได้.....	12
3	ตัวอย่างปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากส่วนประกอบทางชีวภาพ.....	15
4	ความหลากหลายของวิธีการวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป	16
5	รายละเอียดของ STR 13 ตำแหน่งที่ใช้ในการเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ...	27
6	สภาวะของเครื่องที่ใช้ในกระบวนการ PCR ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป AmpF*l*STR® Identifiler™ PCR Amplification Kit	46
7	ผลการวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี real-time PCR ของอาสาสมัครทั้ง 5 คน เก็บตัวอย่างครั้งที่ 1	48
8	ผลการวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี real-time PCR ของอาสาสมัครทั้ง 5 คน เก็บตัวอย่างครั้งที่ 2	49
9	ค่าสถิติพื้นฐานของปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากพื้นผิววัตถุ 4 ชนิด	49
10	ค่าสถิติ Paired T- test ในการเปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอจากพื้นผิววัตถุ แต่ละชนิด	51
11	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากปลอกสวมที่จับรถจักรยานยนต์เทียบกับลายพิมพ์ ดีเอ็นเออ้างอิง (เยื่อบุกระพุ้งแก้ม) ของอาสาสมัครหมายเลข 1	52
12	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากด้ามค้อนที่เป็นไม้เทียบกับลายพิมพ์ดีเอ็นเออ้างอิง (เยื่อบุกระพุ้งแก้ม) ของอาสาสมัครหมายเลข 1	53
13	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากอิฐบล็อกเทียบกับลายพิมพ์ดีเอ็นเออ้างอิง (เยื่อบุกระพุ้งแก้ม) ของอาสาสมัครหมายเลข 2.....	54
14	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากลูกบิดประตูเทียบกับลายพิมพ์ดีเอ็นเออ้างอิง (เยื่อบุกระพุ้งแก้ม) ของอาสาสมัครหมายเลข 2.....	55

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างของดีเอ็นเอ	10
2	กระบวนการของ PCR ขั้นพื้นฐาน	17
3	กระบวนการในแต่ละขั้นตอนของการทำ real-time PCR	21
4	การทำงานของ Capillary Electrophoresis	23
5	กระบวนการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี Restriction Fragment Length Polymorphisa (RFLP)	25
6	วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ติดตามผลด้วยการติดฉลากสี fluorescence	28
7	ตัวอย่างการเปรียบเทียบแอลลีลของตัวอย่างกับ allelic ladder	29
8	ตัวอย่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอหลังจากใช้โปรแกรม GeneMapper ทำการวิเคราะห์ผล	30
9	ลักษณะของ stutter product	31
10	ลักษณะของ Microvariant and Off-Ladder (OL) Allele	31
11	ลักษณะของ Allele drop-out	32
12	ลักษณะของ Mixed sample result	32
13	อุปกรณ์การเก็บดีเอ็นเอจากเยื่อบุกระพุ้งแก้ม (FTA card และ ไม้โฟม)	38
14	วัตถุและลักษณะพื้นผิวของวัตถุที่นำมาใช้ในการทดลอง	40
15	การป้ายเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอจากพื้นผิวสัมผัสบนวัตถุด้วย เทคนิค double swab	41
16	การจัดเก็บไม้พันสำลีที่ทำการเก็บตัวอย่างบนพื้นผิววัตถุ	42
17	การเจาะเยื่อของ FTA card เพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอ	43
18	ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอด้วย QIAamp MinElute™ Columns	44
19	น้ำยาวัดปริมาณสำเร็จรูป Quantifiler® Human DNA Quantifiler Kit (Applied Biosystem, CA, USA)	45
20	เครื่อง 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystem, CA, USA)	45
21	เครื่อง GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystem, CA, USA)	47
22	เครื่อง 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, CA, USA)	47

บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันการดำเนินชีวิตของคนส่วนใหญ่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ที่อยู่ในเมืองหลวงหรือแหล่งเศรษฐกิจต่างๆ มีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมค่อนข้างมาก อีกทั้งเศรษฐกิจในปัจจุบันที่ส่งผลกระทบทำให้ค่าครองชีพสูงขึ้น มีผู้ตกงานมากขึ้น ประกอบกับสภาพอากาศที่แปรปรวน ส่งผลให้ภาคการเกษตรมีปัญหาด้านการสร้างผลผลิต ทำให้ผู้คนหลั่งไหลเข้ามาอาศัยอยู่ในเมืองเพิ่มขึ้น ทั้งหมดนี้ล้วนเป็นปัจจัยที่ทำให้สังคมเกิดมิจฉาชีพและอาชญากรรม ซึ่งส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิต ความปลอดภัยในชีวิตและทรัพย์สิน อาชญากรรม คือ การกระทำความผิดทางอาญา ซึ่งเป็นปัญหาของสังคมอย่างหนึ่งที่มีผลกระทบต่อความปลอดภัยในชีวิต และทรัพย์สินเป็นจำนวนมาก โดยการกระทำผิดทางอาญานั้น ได้กระทำขึ้นโดย “อาชญากร” เช่น คดีฆ่าผู้อื่น ทำร้ายร่างกาย ข่มขืนกระทำชำเรา ลักทรัพย์ วิ่งราวทรัพย์ ชิงทรัพย์ และปล้นทรัพย์ เป็นต้น

จากสถิติการรายงานผลการป้องกันและปราบปรามอาชญากรรมของกองบัญชาการตำรวจนครบาล (บช.น.) ดังตารางที่ 1 จะเห็นได้ว่าในกลุ่มคดีลักทรัพย์ การโจรกรรมรถนั้นมีการแจ้งเหตุสูงมาก แต่ผลการจับกุมผู้กระทำผิดมีจำนวนน้อยกว่า 2-3 เท่าตัว ซึ่งปัจจัยที่อาจเข้ามามีส่วนทำให้จับกุมผู้กระทำผิดได้น้อยนั้น มีหลายประการ เช่น ขาดหลักฐานที่เชื่อมโยงไปสู่ตัวผู้กระทำความผิด เจ้าหน้าที่ไม่สามารถเก็บวัตถุพยานที่พบได้ในสถานที่เกิดเหตุได้ หรือ เก็บวัตถุพยานได้ไม่ครบถ้วน ขาดผู้ชำนาญในการเก็บตัวอย่าง รวมถึงขั้นตอนวิธีการต่าง ๆ ในกระบวนการตรวจวิเคราะห์ไม่เหมาะสมกับตัวอย่างที่ได้ เป็นต้น เมื่อเกิดคดีอาชญากรรมขึ้นคดีหนึ่ง สิ่งที่สำคัญที่มีส่วนช่วยในการนำไปหาตัวผู้กระทำผิด คือ พยานหลักฐาน ซึ่งพยานหลักฐานสามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่ พยานบุคคล พยานเอกสาร และพยานวัตถุ โดยสิ่งที่เจ้าหน้าที่สามารถตรวจพบได้ในสถานที่เกิดเหตุ และถือเป็นพยานที่แท้จริงคือ พยานวัตถุ ซึ่งเป็นสิ่งที่ศาลให้ความเชื่อถือและนำไปใช้ในการตัดสินคดี โดยพยานวัตถุมีหลายประเภท เช่น ลายพิมพ์นิ้วมือ ลายพิมพ์ฝ่ามือ อาวุธปืนและเครื่องกระสุนปืน พยานวัตถุทางชีวภาพ (คราบเลือด เส้นผม เส้นขนต่าง ๆ คราบอสุจิ คราบ

น้ำลาย) เอกสาร อุปกรณ์ที่ใช้ในการลักทรัพย์ เป็นต้น มีหลายคดีที่ไม่สามารถตรวจพบวัตถุพยานในสถานที่เกิดเหตุได้มากพอ แต่เมื่อพิจารณาถึงขั้นตอน กิจกรรมที่ผู้กระทำผิดปฏิบัติ เช่นในคดีลักทรัพย์ นับตั้งแต่ผู้กระทำผิดเริ่มเข้าสู่เคหสถานที่อาจจะต้องมีการปีนกำแพง งัดแงะประตู จนกระทั่งนำสิ่งของมีค่ากลับออกไป พบว่า ผู้กระทำผิดอาจมีการจับต้องหรือสัมผัสวัตถุต่างๆ ในสถานที่เกิดเหตุได้ ดังนั้นโอกาสที่จะพบร่องรอยจากการสัมผัสวัตถุดังกล่าวจึงมีได้เช่นกัน

ตารางที่ 1 รายงานผลการป้องกันปราบปรามอาชญากรรม และคดีเก่าของกองบัญชาการตำรวจนครบาล (บช.น.) ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2552 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2553

ประเภทความผิด	รับแจ้ง (คดี)	จับ (คดี)	ผู้ต้องหา (คน)	คดีเก่า		รวมจับ	
				จับ (คดี)	ผู้ต้องหา (คน)	จับ (คดี)	ผู้ต้องหา (คน)
ปล้นทรัพย์	72	44	105	21	31	65	136
ชิงทรัพย์	274	175	220	54	61	229	281
ลักทรัพย์	12,974	3,350	3,956	927	1,009	4,277	4,965
ลักทรัพย์ในเคหสถาน	2,160	700	824	240	269	940	1,093
ทำร้ายร่างกาย	3,771	1,780	2,274	996	1,187	2,776	3,461
ข่มขืนกระทำชำเรา	399	119	138	157	162	276	300
โจรกรรมรถจักรยานยนต์	5,870	333	469	162	177	495	646

ที่มา: กองบัญชาการตำรวจนครบาล, **ข้อมูลรายงานสถิติผลการป้องกันปราบปรามอาชญากรรมของกองบัญชาการตำรวจนครบาล** [ออนไลน์], เข้าถึงเมื่อ 15 กุมภาพันธ์ 2554. เข้าถึงได้จาก http://www.thaimetropolice.com/index.ph

จากความก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีในปัจจุบัน ทำให้มีการค้นพบและพัฒนาเทคนิคใหม่ ที่ใช้ตรวจพิสูจน์วัตถุพยานได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น เช่น การตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอ ซึ่งมีความจำเพาะต่อตัวบุคคลมาก โดยทำการตรวจวิเคราะห์จากวัตถุพยานทางชีวภาพที่เก็บได้จากสถานที่เกิดเหตุ ซึ่งขั้นตอนวิธีการจะเริ่มตั้งแต่การสกัดดีเอ็นเอจากวัตถุพยานที่ได้มา นำไปวัดปริมาณ เพิ่มปริมาณเพื่อนำไปวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอแล้วนำไปเปรียบเทียบกับลายพิมพ์ดีเอ็นเออ้างอิงเพื่อหาตัวผู้กระทำความผิดต่อไป และเมื่อไม่กี่ปีที่ผ่านมา ในวารสารงานวิจัยของต่างประเทศมีการศึกษาโดยนำวัตถุที่เชื่อว่ามีการสัมผัสจากบุคคล มาทดสอบ

หาดีเอ็นเอ ได้ประสบความสำเร็จ และมีการศึกษาในหลายๆ ด้าน เช่น ศึกษาเกี่ยวกับวิธีการเก็บตัวอย่างจากพื้นผิวสัมผัส ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากพื้นผิวสัมผัส เปรียบเทียบชุดน้ำยาที่ใช้ในการสกัด เป็นต้น แต่สำหรับในประเทศไทยการศึกษาในเรื่องนี้ยังมีอยู่น้อยมาก และยังไม่เป็นการตรวจวิเคราะห์ที่แพร่หลาย

ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาเกี่ยวกับการเก็บกู้ดีเอ็นเอจากวัตถุที่ถูกสัมผัสที่มีลักษณะพื้นผิวแตกต่างกัน เพื่อเป็นทางเลือกหนึ่งในการติดตามผู้กระทำผิดให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

2.1 เพื่อศึกษาเปรียบเทียบปริมาณของดีเอ็นเอ จากการสัมผัสพื้นผิวที่มีลักษณะแตกต่างกัน

2.2 เพื่อศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จากการสัมผัสพื้นผิวที่มีลักษณะแตกต่างกัน

3. สมมติฐานของการวิจัย

ลักษณะพื้นผิวของวัตถุที่ต่างกันจะพบปริมาณของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน

4. ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้ ผู้วิจัยศึกษาเปรียบเทียบปริมาณของดีเอ็นเอ จากการสัมผัสพื้นผิวของวัตถุที่มีลักษณะแตกต่างกัน 4 ชนิด ได้แก่ ลูกบิดประตู, ปลอกสวมด้ามจับรถจักรยานยนต์, ค้อนที่มีด้ามจับเป็นไม้ และอิฐบล็อก โดยอาสาสมัครชายไทยจำนวน 5 คน อายุระหว่าง 18-25 ปี ซึ่งแสดงความยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษร ทำการจับวัตถุแต่ละชนิดเป็นเวลานาน 1 นาที โดยไม่ล้างมือ

5. นิยามศัพท์เฉพาะ

พยานหลักฐาน หมายถึง พยานวัตถุ พยานเอกสาร หรือพยานบุคคล ตลอดจนหลักฐานอื่น ๆ ซึ่งอาจจะใช้เป็นเครื่องพิสูจน์การกระทำผิดได้

วัตถุพยาน หมายถึง วัตถุทุกชนิดที่พบในสถานที่เกิดเหตุหรือเกี่ยวข้องกับคดีไม่ว่าจะเป็นสถานะของแข็ง ของเหลวหรือก๊าซ ซึ่งสามารถพิสูจน์ถึงข้อเท็จจริงในคดี มีความชัดแจ้งในตัวเองโดยไม่ต้องการคำอธิบายใด ๆ เพียงแต่ให้รู้ว่าเป็นอะไรเท่านั้น

ดีเอ็นเอ หมายถึง สารพันธุกรรมทำหน้าที่ควบคุมและถ่ายทอดลักษณะต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิต โดยดีเอ็นเอจะประกอบด้วยหน่วยย่อยพื้นฐานที่เรียกว่า “นิวคลีโอไทด์” อันเป็นชุดของโมเลกุลฟอสเฟต น้ำตาลเพนโตส และสารเคมีที่มีสมบัติเป็นด่างหรือ “เบส” 1 ตัว ซึ่งเบสจะมีอยู่ 4 ชนิดคือ adenine (A), guanine (G), cytosine (C) และ thymine (T)

Double swab หมายถึง เทคนิคการเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอแบบหนึ่ง ที่ใช้ไม้พันสำลีเปียกทำการป้ายเก็บตัวอย่างให้ทั่ว จากนั้นใช้ไม้พันสำลีแห้งป้ายเก็บตัวอย่างซ้ำบริเวณเดียวกัน

การสกัดดีเอ็นเอ หมายถึง วิธีการในการแยกโปรตีนและส่วนประกอบของเซลล์อื่น ๆ ออกจากโมเลกุลของดีเอ็นเอ

PCR หมายถึง การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการในหลอดทดลอง หลักการของ PCR คือการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอสายคู่ที่ปฏิกิริยาเร่งโดยเอนไซม์ DNA Polymerase ให้ปฏิกิริยาดำเนินไปอย่างต่อเนื่องเป็นลูกโซ่

Real-time PCR หมายถึง เทคนิคการทำ PCR แบบหนึ่งซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอไปพร้อมกับการคำนวณ และวิเคราะห์ผลในเวลาเดียวกันภายในหลอดทดลอง ในระยะเวลาอันสั้น โดยจะตรวจตามผลจากสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่เกิดขึ้นระหว่างทำ PCR และการที่เราสามารถตรวจวัด PCR products ได้ เกิดจากการทำให้ PCR products

Primer หมายถึง สายดีเอ็นเอที่เข้าจับกับเบสคู่สมของสายดีเอ็นเอต้นแบบเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกระบวนการ PCR

STR หมายถึง เป็นตำแหน่งของดีเอ็นเอที่มีชุดของเบสที่ซ้ำมีขนาด 2-6 คู่เบสกระจายอยู่ทั่วไปในสายดีเอ็นเอ โดยจะมีอยู่เฉลี่ยทุกๆ 6-10 กิโลเบส

DNA profile หมายถึง ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ มีลักษณะที่จำเพาะในแต่ละบุคคล จึงทำให้สามารถแยกแต่ละบุคคลออกจากกันได้

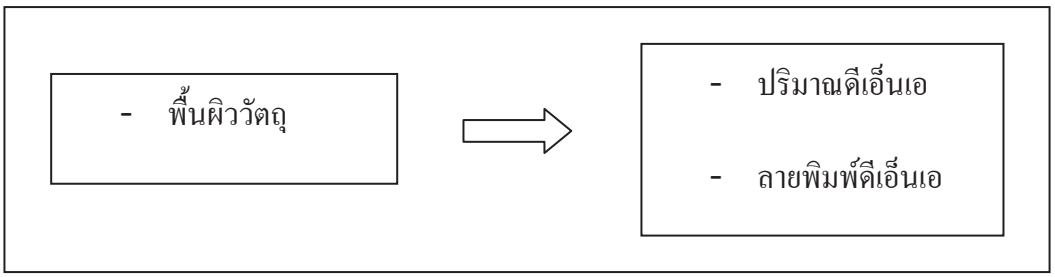
Mixed profile หมายถึงลักษณะของลายพิมพ์ดีเอ็นเอมากกว่า 1 บุคคล คือที่เครื่องหมายพันธุกรรมแต่ละตำแหน่งมีแอลลีลปรากฏมากกว่า 2 peak และ peak ที่พบจะสูงกว่า peak ของ stutter หรือมีลักษณะของ heterozygote peak ที่ไม่สมดุลกันมากกว่า 30%

6. ตัวแปรที่ใช้ในการวิจัย

ตัวแปรอิสระ ได้แก่ ลักษณะพื้นผิวของวัตถุแต่ละชนิด

ตัวแปรตาม ได้แก่ ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ และลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

7. กรอบแนวความคิดในการวิจัย



แผนภูมิที่ 1 กรอบแนวความคิด

8. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เพื่อเป็นแนวทางในการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จากวัตถุพยานที่พบในสถานที่เกิดเหตุได้อย่างเหมาะสม

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

คดีอาชญากรรมประเภทชิงทรัพย์ ลักทรัพย์ ทำร้ายร่างกาย สามารถเกิดขึ้นได้ทุกสถานที่ ทุกช่วงเวลา และเกิดขึ้นได้กับทุกเพศ ทุกเชื้อชาติ โดยผู้กระทำผิดอาจมีประสบการณ์ในการก่อเหตุหรือไม่มีประสบการณ์ การสืบสวนสอบสวนในกระบวนการยุติธรรมมีวัตถุประสงค์ในการหาความเชื่อมโยงของเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นว่ามีสิ่งใด หรือบุคคลใดเกี่ยวข้อง และเกี่ยวข้องกันอย่างไร ดังนั้นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์จึงเป็นสิ่งที่สำคัญในการคลี่คลายปมปริศนาได้ เพื่อจรรโลงไว้ซึ่งความยุติธรรม

1. ความหมายของพยานหลักฐาน

พยานหลักฐาน หมายถึง สิ่งที่สามารถจับต้องได้ตามกฎหมายและเป็นสิ่งที่สามารถเสนอในชั้นศาลเพื่อพิสูจน์ถึงข้อเท็จจริงในคดีได้ ตามประมวลกฎหมายวิธีพิจารณาความอาญา มาตรา 226 “พยานหลักฐาน” หมายถึง พยานวัตถุ พยานเอกสาร หรือพยานบุคคล ตลอดจนหลักฐานอื่นๆ ซึ่งอาจจะใช้เป็นเครื่องพิสูจน์การกระทำผิดได้ ตัวอย่างเช่น บุคคลผู้ได้รู้เห็นพฤติกรรมในการกระทำผิดของคนร้าย ถือเป็น “พยานบุคคล” หรือเอกสารต่างๆ ที่ได้กระทำขึ้นโดยชอบ หรือมิชอบด้วยกฎหมายก็ดี และกระทำขึ้นโดยผู้ร้ายหรือบุคคลหนึ่งบุคคลใดก็ตาม ถือเป็น “พยานเอกสาร” หรือวัตถุต่างๆ ที่คนร้ายใช้เป็นเครื่องมือในการกระทำผิด ซึ่งตรวจพบในสถานที่เกิดเหตุ ถือเป็น “พยานวัตถุ”

2. ประเภทของพยานหลักฐาน

พยานหลักฐานแบ่งออกเป็น 3 ประเภท ดังนี้

1. พยานหลักฐานโดยตรง (Direct Evidence) หรือ “พยานบุคคล” คือ หลักฐานคำให้การที่ได้จากปากคำของผู้ที่รู้เห็นเหตุการณ์ (ประจักษ์พยาน) ซึ่งได้สัมผัสกับเหตุการณ์ที่

เกิดขึ้นด้วยตัวเอง โดยประสาท ตา หู จมูก การสัมผัส หรือลิ้มรส คำให้การนั้นต้องไม่ได้มาจากการเสริมแต่ง สมมติฐานเอาเอง หรือได้ยินได้ฟังมากจากการบอกเล่าของผู้อื่นอีกทอดหนึ่ง

2. พยานแวดล้อมกรณี (Circumstantial Evidence) พยานหลักฐานประเภทนี้มักไม่สามารถพิสูจน์ข้อเท็จจริงที่ต้องการทราบในคดีได้โดยตรง แต่สามารถนำมาปะติดปะต่อให้เกิดความคิดลำดับหรือเชื่อมโยงเหตุการณ์ เพื่อบอกถึงข้อเท็จจริงบางอย่างหรือหลายอย่าง ซึ่งนำมาใช้คลี่คลายปัญหาในทางคดีหรือตอบคำถามบางประการได้ บางครั้งอาจเรียกพยานประเภทนี้ว่าพยานหลักฐานทางอ้อม (Indirect evidence)

3. พยานหลักฐานแท้จริง (Real Evidence) คือ พยานวัตถุทุกชนิดไม่ว่าจะเป็นสถานะของแข็ง ของเหลวหรือก๊าซ ซึ่งสามารถพิสูจน์ถึงข้อเท็จจริงในคดี มีความชัดแจ้งในตัวเองโดยไม่ต้องการคำอธิบายใด ๆ เพียงแต่ให้รู้ว่าเป็นอะไรเท่านั้น

3. ชนิดของพยานวัตถุ

พยานวัตถุ แบ่งตามลักษณะการเก็บได้เป็น 2 ชนิด คือ

3.1 พยานวัตถุที่เคลื่อนย้ายไม่ได้ (Fixed of Immovable Evidence) เป็นพยานวัตถุที่มีขนาดใหญ่ น้ำหนักมาก หรือการเคลื่อนย้ายอาจทำให้คุณลักษณะบางอย่างเปลี่ยนไป เช่น ผนังเตาผิง รอยประทับยางรถยนต์ เป็นต้น พยานวัตถุชนิดนี้จะใช้วิธีการเก็บรักษาโดยการถ่ายภาพ วาดรูปเหมือนตามมาตราส่วนของจริง หล่อปูนปลาสเตอร์ เป็นต้น

3.2 พยานวัตถุที่เคลื่อนย้ายได้ (Movable Evidence) เป็นพยานวัตถุที่มีขนาดเล็กน้ำหนักเบา สามารถเคลื่อนย้ายโดยไม่ทำให้คุณสมบัติเปลี่ยนไป เช่น กระป๋อง เก้าอี้ ของเหลว ชิ้นส่วนพรม เป็นต้น

4. ประเภทของวัตถุพยานทางวิทยาศาสตร์

วัตถุพยานทางวิทยาศาสตร์ที่ได้จากสถานที่เกิดเหตุ ผู้เสียหาย ตัวผู้ต้องหาและอื่น ๆ สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มดังนี้

1. วัตถุพยานประเภทลายนิ้วมือ ลายนิ้วเท้า ลายฝ่ามือ ลายฝ่าเท้า
2. วัตถุพยานประเภทเอกสาร
3. วัตถุพยานประเภทอาวุธปืนและเครื่องกระสุนปืน

4. วัตถุพยานประเภทชีววิทยา

5. วัตถุพยานประเภทยาเสพติด

6. วัตถุพยานประเภทอื่น ๆ เช่น เศษดิน เศษสี เศษแก้ว รอยดอกยางรถยนต์ เป็นต้น

5. คุณค่าของพยานวัตถุ

1. เป็นสิ่งที่พิสูจน์ถึงการเกิดขึ้นจริงของคดี หรือเป็นการพิสูจน์ว่ามีการกระทำผิดเกิดขึ้น

2. สามารถเชื่อมโยงผู้ต้องสงสัยให้เข้ามาเกี่ยวข้องกับผู้เสียหาย หรือกับสถานที่เกิดเหตุ

3. สามารถชี้ถึงตัวผู้กระทำความผิด

4. สามารถป้องกันผู้บริสุทธิ์ที่ถูกกล่าวหาได้

5. สามารถยืนยันคำให้การของผู้เสียหาย

6. สามารถทำให้เกิดการสารภาพหรือยอมรับการกระทำความผิด

7. สามารถเชื่อถือได้มากกว่าประจักษ์พยาน

8. ในกรณีที่พนักงานสอบสวนมีปัญหาในเรื่องการทำสำนวน พยานวัตถุยิ่งมีความสำคัญมากขึ้น ศาลจะใช้พยานวัตถุเป็นหลักเพื่อช่วยตัดสินคดีได้เร็วขึ้น

9. พยานวัตถุ ซึ่งผ่านการตรวจวิเคราะห์ โดยวิธีการทางวิทยาศาสตร์ที่ทันสมัย จะเพิ่มความน่าเชื่อถือได้มากขึ้นในชั้นศาล

10. การไม่มีพยานวัตถุซึ่งจะนำชี้ถึงข้อเท็จจริงในสถานที่เกิดเหตุ จะเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการยุติข้อโต้แย้ง

วัตถุพยานที่ตรวจพบได้ในสถานที่เกิดเหตุ จะไม่มีส่วนช่วยในการบอกความเชื่อมโยงของเหตุการณ์ได้เลย ถ้าไม่นำมาวิเคราะห์ ซึ่งเทคโนโลยีการตรวจพิสูจน์วัตถุพยานทางชีวภาพที่เข้ามามีบทบาทในการจัดการกับวัตถุพยานประเภทคือ การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

6. ความเป็นมาของการวิเคราะห์ดีเอ็นเอทางนิติวิทยาศาสตร์

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอหรือ DNA typing (profile) ที่รู้จักกันในขณะนี้ ถูกเผยแพร่ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1985 โดยนักพันธุศาสตร์ของประเทศอังกฤษ มีชื่อว่า Alec Jeffreys เขาได้ทำการค้นคว้า

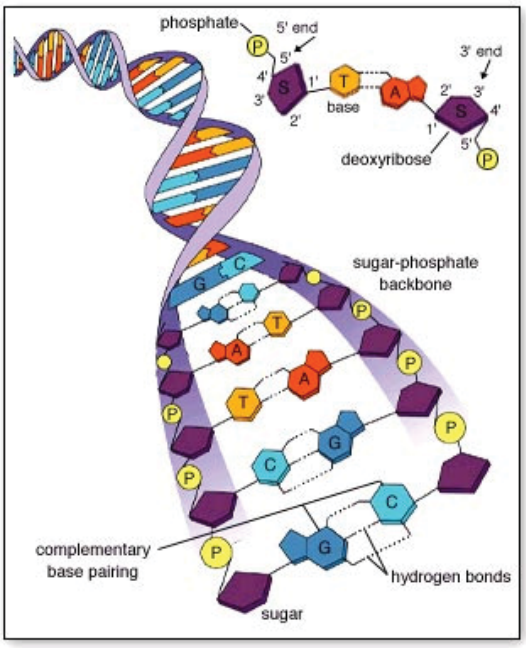
เกี่ยวกับ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีลำดับของดีเอ็นเอเรียงตัวในลักษณะซ้ำกัน เพื่อหาในส่วนจำนวนของลำดับที่ซ้ำกันในตัวอย่างที่แตกต่างกันจากแต่ละบุคคล โดยพัฒนาเทคนิคที่ใช้ในการหาความแตกต่างในแต่ละช่วงของการซ้ำกันของลำดับดีเอ็นเอ และออกแบบให้มีความสามารถในการพิสูจน์แยกเอกลักษณ์บุคคล

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ซ้ำกันนี้รู้จักกันในชื่อของ VNTRs (variable number of tandem repeats) ซึ่งเทคนิคที่ใช้ในการค้นหา VNTRs เรียกว่า restriction fragment length polymorphism (RFLP) เนื่องจากมีความเกี่ยวข้องกันในส่วนของการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะสำหรับตัดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ล้อมรอบ VNTRs โดยวิธี RFLP นี้เป็นวิธีแรกที่นำมาใช้ในการช่วยไขคดีฆาตกรรม 2 คดี ตั้งแต่นั้นเป็นต้นมาการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล โดยการใช้วิธี DNA typing จึงเป็นที่นิยมอย่างแพร่หลาย ต่อมาการใช้วัตถุพยานด้านดีเอ็นเอในการตรวจสถานที่เกิดเหตุก็มีมากขึ้นใกล้เคียงกับการพิสูจน์ความเป็นพ่อ-แม่-ลูก ปัจจุบันห้องปฏิบัติการทางนิติวิทยาศาสตร์มีมากกว่า 150 แห่ง ในประเทศอังกฤษ และในประเทศทางทวีปยุโรปและเอเชียเองมีงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องพร้อมกับการเพิ่มเทคนิคการตรวจพิสูจน์ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

7. โครงสร้างของดีเอ็นเอ (DNA)

ดีเอ็นเอ หรือ Deoxyribonucleic acid (DNA) เป็นสารพันธุกรรมทำหน้าที่ควบคุมและถ่ายทอดลักษณะต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิต โดยดีเอ็นเอจะประกอบด้วยหน่วยย่อยพื้นฐานที่เรียกว่า “นิวคลีโอไทด์” อันเป็นชุดของโมเลกุลฟอสเฟต น้ำตาลเพนโตส และสารเคมีที่มีสมบัติเป็นด่าง หรือ “เบส” 1 ตัว ซึ่งเบสจะมีอยู่ 4 ชนิดคือ adenine (A), guanine (G), cytosine (C) และ thymine (T)

ลักษณะโครงสร้างของดีเอ็นเอประกอบขึ้นจากสายชุดนิวคลีโอไทด์ 2 สายที่มาพันเข้าด้วยกันเป็นลักษณะเกลียวคู่หรือบันไดเวียน โดยมีเบสที่เรียงรายอยู่ตามสายแต่ละสาย แต่ละสายทำหน้าที่ยึดจับระหว่างสายทั้งสอง และปรากฏว่าสายส่วนที่มีเบส A จะจับคู่สร้างพันธะกับเบส T และส่วนที่มีเบส G จะจับคู่เบส C ซึ่งการจับคู่กันนี้เรียกว่าเป็นเบสคู่สม และแต่ละส่วนบนสายดีเอ็นเอนี้เองที่เป็นที่อยู่ของ “ยีน” (gene) ซึ่งเป็นส่วนที่บรรจุข้อมูลสำหรับการสร้างโปรตีนชนิดใดชนิดหนึ่ง โดยยีนที่ต่างกันก็จะมีตำแหน่งที่อยู่และการเรียงลำดับของเบสบนตัวมันแตกต่างกันไป



ภาพที่ 1 โครงสร้างของดีเอ็นเอ

ที่มา: **Flick the switch** [Online], accessed 29 February 2012. available from http://captain-nitrogen.tumblr.com/post/9506375016/flick-the-switch

ดีเอ็นเอพบในเซลล์ได้ 2 แหล่ง สามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางนิติเวชคือ พบในนิวเคลียสของเซลล์ และพบในไมโตคอนเดรีย

1. ดีเอ็นเอพบในนิวเคลียสเรียกว่า นิวเคลียร์ดีเอ็นเอ (Nuclear DNA) ดีเอ็นเอส่วนนี้จับกับโปรตีนเป็นเส้นโครโมโซมซึ่งมี 23 คู่ โดยเด็กจะได้รับโครโมโซมจากพ่อ-แม่อย่างละครึ่ง ภายในโครโมโซมประกอบด้วย ยีนจำนวนมาก ยีนเป็นส่วนของดีเอ็นเอที่ควบคุมการสร้างโปรตีนที่มีความจำเป็นต่อพัฒนาการและการทำหน้าที่ของร่างกายดีเอ็นเอในร่างกายที่เป็นยีนมีประมาณ 1% เท่านั้น ส่วนที่เหลือ 99% ไม่ใช่ยีนและไม่มีหน้าที่ในการควบคุมการสร้างโปรตีน ในส่วนนี้จะมีดีเอ็นเอเรียงตัวซ้ำกันเป็นชุด ๆ จำนวนซ้ำในแต่ละคนไม่เท่ากัน ชุดของดีเอ็นเอเหล่านี้มีอยู่ทั่วไปในตำแหน่งต่าง ๆ บนเส้นโครโมโซม ตำแหน่งของยีนหรือตำแหน่งของดีเอ็นเอ ที่มีความซ้ำดังกล่าวเรียกว่า โลกัส (Locus) หรือรูปพหูพจน์คือโลไซ (Loci) เนื่องจากโครโมโซมเป็นเส้นคู่ เพราะฉะนั้นในโลกัสต่างๆ จึงมีลักษณะของดีเอ็นเอเป็นคู่ ๆ ซึ่งเรียกลักษณะนี้ว่า แอลลีล (allele) ดังนั้นในโลกัสหนึ่งจะมีดีเอ็นเอไม่เกิน 2 แอลลีล

2. ดีเอ็นเอที่พบในไมโตคอนเดรีย เรียกว่า ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ (Mitochondrial DNA) ไมโตคอนเดรียเป็นส่วนประกอบของเซลล์ที่มีหน้าที่ในการสร้างพลังงาน พบในเซลล์หนึ่ง ๆ ได้หลายพันชุด ภายในไมโตคอนเดรียแต่ละชุดจะมีดีเอ็นเออยู่ประมาณ 16,569 คู่เบส ในขณะที่มีการปฏิสนธิระหว่างตัวอสุจิกับไข่ อสุจิจะปล่อยให้เฉพาะนิวเคลียสเข้าไปผสมกับไข่ (Ovum) ดังนั้นไมโตคอนเดรียที่อยู่ในไข่ที่ผสมแล้วจะมาจากเซลล์แม่เท่านั้น จึงสามารถนำมาตรวจความสัมพันธ์ทางโลหิตสายมารดาได้ ขณะเดียวกันเนื่องจากไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ เป็นดีเอ็นเอที่คงทนกว่า Nuclears DNA จึงสามารถตรวจวัตถุพยานที่เก่ามากและมีปริมาณน้อยได้

8. แหล่งที่พบตัวอย่างดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอพบได้ในทุก ๆ เซลล์ที่มีนิวเคลียสและสามารถพบได้ในส่วนประกอบที่มาจากสิ่งมีชีวิตในสถานที่เกิดเหตุ ดีเอ็นเอถูกแยกและถูกวิเคราะห์จากส่วนประกอบทางชีวภาพที่หลายหลากได้สำเร็จ วัตถุพยานส่วนใหญ่ที่ถูกนำมาทดสอบในห้องปฏิบัติการทางนิติวิทยาศาสตร์ส่วนใหญ่คือ เลือด อสุจิ หรือ คราบเลือดและคราบอสุจิ แต่ก็มีวัตถุพยานอีกหลายชนิดที่สามารถนำมาทำการทดสอบได้ ดังตารางที่ 2

วัตถุพยานทางชีวภาพที่พบในสถานที่เกิดเหตุมีหลากหลายชนิดซึ่งสามารถนำมาใช้ในการจำแนกหรือแยกบุคคลหนึ่งออกจากบุคคลอื่น ๆ ในคดีอาชญากรรมได้ โดยเฉพาะการส่งผ่านโดยตรงของดีเอ็นเอจากบุคคลหนึ่งไปยังบุคคลอื่น ๆ หรือไปยังวัตถุต่าง ๆ สามารถใช้เชื่อมโยงสิ่งที่เกิดขึ้นในสถานที่เกิดเหตุ

ตารางที่ 2 ตัวอย่างวัตถุพยานชีวภาพที่สามารถนำมาตรวจดีเอ็นเอได้

Material	Reference
Blood and blood stain	Budowle *et al.* (1995)
Semen and semen stain	Budowle *et al.*(1995)
Bones	Gill *et al.* (1994)
Teeth	Alvarez Garcia *et al.*(1996)
Hair with root	Higuchi *et al.* (1988)
Saliva (with nucleated cells)	Sweet *et al.* (1997)
Urine	Benecke *et al.* (1996), Yasuda *et al.* (2003)
Feces	Hopwood *et al.* (1996)
Debris from fingernail	Wiegand *et al.* (1993)
Muscle tissue	Hochmeister (1998)
Cigarette butts	Hochmeister *et al.* (1991)
Postage stamps	Hopkins *et al.* (1994)
Envelope sealing flaps	Word and Gregory (1997)
Dandruff	Herber and Herold (1998)
Fingerprints	Van Oorschot and Jones (1997)
Personal item: razor blade, chewing gum, wrist watch, ear wax, toothbrush	Tahir *et al.* (1996)

ที่มา: John M. Butler, **Forensic DNA Typing**, 2nd ed. (Oxford : Elsevier, 2005), 34.

9. ขั้นตอนในการจัดการกับตัวอย่างดีเอ็นเอ

ด้านชีวภาพ

เริ่มต้นตั้งแต่การเก็บส่วนประกอบทางชีวภาพจากสถานที่เกิดเหตุ นำชิ้นส่วนดังกล่าวไปทำการสกัดดีเอ็นเอออกมา แล้วนำไปวัดปริมาณดีเอ็นเอที่ทำการเก็บกู้ขึ้นมาได้ หลังจากแยกดีเอ็นเอออกจากเซลล์แล้ว ลำดับที่มีความจำเพาะจะถูกเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคที่เรียกว่า polymerase chain reaction (PCR)

ด้านเทคโนโลยี

ผลผลิต PCR ที่ได้ถูกนำไปแยกและตรวจหาลักษณะคุณสมบัติของลำดับ STR วิธีการแยกที่ใช้ในปัจจุบันคือ slab gel และ capillary electrophoresis (CE) สำหรับวิธีที่ใช้ในการตรวจหา

นั้น fluorescence เป็นตัวช่วยที่ดีในเรื่องความไว และง่ายต่อการวัด PCR-amplified STR alleles หลังจากการตรวจหา STR alleles จำนวนการซ้ำของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่กำหนด ก็จะทราบลักษณะจีโนไทป์ของตัวอย่างตรวจได้

ด้านพันธุกรรม

ผลลัพธ์ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่าง ที่มีการรวมกันของจีโนไทป์ของแต่ละบุคคล ถูกนำไปเปรียบเทียบกับตัวอย่างอื่น ในกรณีของการสืบสวนทางนิติวิทยาศาสตร์ นำตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เป็นตัวอย่างอ้างอิงซึ่งอาจได้มาจากตัวของเหยื่อหรือผู้ต้องสงสัย ไปเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ได้จากวัตถุพยานที่เก็บได้ ถ้าผลที่ได้ไม่ตรงกันระหว่างตัวอย่างที่สงสัยกับตัวอย่างอ้างอิง ตัวอย่างที่สงสัยนั้นก็อาจจะมาจากตัวอย่างอื่น ๆ ก็ได้ ซึ่งการที่ได้ผลไม่ตรงกันระหว่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอทั้ง 2 ตัวอย่างนั้นเรียกว่า “exclusion” แต่ถ้าได้ผลตรงกันจะเรียกว่า “inclusion”

9.1 การเก็บตัวอย่าง

การเก็บวัตถุพยานเพื่อหาดีเอ็นเอจากสถานที่เกิดเหตุจะต้องมีความระมัดระวังเป็นอย่างมาก และต้องมีห่วงโซ่ในการครอบครองวัตถุพยานเสมอ วัตถุพยานทางชีวภาพที่สามารถนำมาวิเคราะห์หาดีเอ็นเอมีหลายชนิด หลายลักษณะ เช่น คราบเลือด คราบอสุจิ หยดเลือด หรือแม้พื้นผิวที่ถูกสัมผัส เป็นต้น ซึ่งวิธีการในการเก็บตัวอย่างที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบันคือเทคนิค double swab นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาวิธีการเก็บตัวอย่างขึ้นมาอีกหลายวิธี อย่างไรก็ตาม การเลือกใช้เทคนิคในการเก็บตัวอย่างแบบใดก็ตาม ควรคำนึงถึงลักษณะของวัตถุพยานที่พบในสถานที่เกิดเหตุนั้น ๆ ด้วย

9.2 การสกัดดีเอ็นเอ

ตัวอย่างทางชีวภาพที่ได้มาจากสถานที่เกิดเหตุ ซึ่งอยู่ในรูปของคราบเลือด หรือคราบอสุจิ หรือน้ำเลือดจากผู้ต้องสงสัย หรือจากครอบครัว จะมีดีเอ็นเออยู่ภายใน โมเลกุลของดีเอ็นเอจะต้องถูกแยกออกจากส่วนประกอบเซลล์อื่น ๆ ก่อนที่จะนำไปทำการทดลองต่อ ซึ่งส่วนประกอบโปรตีนที่ห่อหุ้มหรือป้องกันดีเอ็นเอตามธรรมชาติของเซลล์นั้น สามารถไปยังยั้งความสามารถในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอได้ อย่างไรก็ตาม วิธีการสกัดดีเอ็นเอได้ถูกพัฒนาให้มีการแยกโปรตีนและส่วนประกอบของเซลล์อื่น ๆ ออกจากโมเลกุลของดีเอ็นเอ ซึ่งเทคนิคแรกเริ่มในการสกัดดีเอ็นเอที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทางนิติวิทยาศาสตร์ในปัจจุบันมี 3 วิธี ได้แก่ organic extraction,

Chelex extraction และ FTA paper การสกัดดีเอ็นเอหรือวิธีการในการแยกดีเอ็นเอมีหลากหลายขึ้นอยู่กับวัตถุพยานทางชีวภาพที่นำมาทดสอบ ตัวอย่างเช่น เลือดจะถูกนำไปสกัดด้วยวิธีที่ต่างจากคราบเลือดหรือชิ้นส่วนกระดูก เป็นต้น

การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี organic extraction บางครั้งจะถูกเรียกเป็นวิธีสกัด phenol chloroform extraction มักใช้เวลาในการสกัดค่อนข้างนาน และใช้ร่วมกับการทำ RFLP หรือ PCR typing

การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Chelex method ใช้เวลาน้อยกว่าวิธี organic extraction โดยวิธี Chelex นั้นมีขั้นตอนที่ซับซ้อนน้อยกว่าและมีโอกาสปนเปื้อนจากตัวอย่างหนึ่งไปอีกตัวอย่างหนึ่งได้น้อยกว่า อย่างไรก็ตามผลลัพธ์ของวิธีการนี้จะสร้างดีเอ็นเอสายเดี่ยวได้ และใช้สำหรับกระบวนการ PCR-based testing เพียงอย่างเดียว

การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี FTA paper ถูกพัฒนาขึ้นโดย Lee Burgoyne มหาวิทยาลัย Flinders ในประเทศออสเตรเลีย กระดาษ FTA นั้นจะดูดซับเซลล์เยื่อบุไว้ โดยในกระดาษจะมีสารเคมี 4 ชนิดที่ใช้ในการรักษาโมเลกุลของดีเอ็นเอไม่ให้มีการสลายตัว และป้องกันกระดาษจากการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ผลลัพธ์ที่ได้ ดีเอ็นเอที่อยู่บนกระดาษ FTA สามารถอยู่ได้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 2-3 ปี

ตัวอย่างปริมาณดีเอ็นเอที่สามารถเก็บกู้ได้จากส่วนประกอบต่าง ๆ ทางชีวภาพแสดงในตารางที่ 3

ทุก ๆ ตัวอย่างจะต้องดูแลอย่างระมัดระวังในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ เพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนจากตัวอย่างหนึ่งไปยังอีกตัวอย่างหนึ่ง หรือจากสิ่งปนเปื้อนภายนอก ซึ่งในกระบวนการสกัดดีเอ็นเอนั้นมีความเป็นไปได้ที่ตัวอย่างมีความไวต่อการปนเปื้อนในห้องปฏิบัติการมากกว่าขั้นตอนอื่น ๆ ในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอทางนิติวิทยาศาสตร์ ด้วยเหตุนี้ ในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากวัตถุพยานจึงควรแยกสถานที่สกัดออกจากตัวอย่างอื่น ๆ

ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ถูกสกัดแล้วจะทำการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส หรือ ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสในเก็บเป็นเวลานาน ๆ

ตารางที่ 3 ตัวอย่างปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากส่วนประกอบทางชีวภาพ

Type of Sample	Amount of DNA
Liquid blood	20,000-40,000 ng/ml
Blood stain	250-500 ng/cm^2
Liquid semen	150,000-300,000 ng/ml
Post-coital vaginal swab	10-3,000 ng/swab
Plucked hair (with root)	1-750 ng/root
Shed hair (with root)	1-10 ng/root
Liquid saliva	1,000-10,000 ng/ml
Oral swab	100-1,500 ng/swab
Urine	1-20 ng/ml
Bone	3-10 ng/mg
Tissue	50-500 ng/mg

ที่มา: John M. Butler, **Forensic DNA Typing**, 2nd ed. (Oxford : Elsevier, 2005), 49.

9.3 การวัดปริมาณดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอที่ได้หลังจากการสกัดแยกแล้วต้องมีความน่าเชื่อถือทั้งในด้านปริมาณและด้านคุณภาพ จึงจะทำให้แน่ใจได้ว่าดีเอ็นเอที่ทำการเก็บกู้มาได้นั้นเป็นดีเอ็นเอของมนุษย์มากกว่าที่จะเป็นดีเอ็นเอจากแหล่งอื่น ๆ เช่น แบคทีเรีย การคำนวณปริมาณของดีเอ็นเอในตัวอย่างที่ได้เป็นสิ่งจำเป็นอย่างมากสำหรับกระบวนการทำ PCR เพราะจะมีผลดีเมื่อช่วงของความเข้มข้นอยู่ในช่วงที่แคบ ตัวอย่างเช่น ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Applied Biosystems' Profiler Plus™ และ COfiler™ multiplex STR จำเพาะกับตัวอย่างดีเอ็นเอต้นแบบที่อยู่ในช่วง 1-2.5 นาโนกรัม ชุดน้ำยา Promega STR จะทำงานได้ดีในช่วงความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่อยู่ในช่วง 1-2.5 นาโนกรัม เช่นกัน ปริมาณดีเอ็นเอที่มีมากเกินไปจะส่งผลให้เกิด peak ที่มีรอยแยกหรือ peak ที่อยู่นอกช่วงของเครื่องมือที่ใช้ในการวัดปริมาณ แต่ถ้าดีเอ็นเอต้นแบบมีปริมาณที่น้อยเกินไปก็อาจจะเกิดผลที่มีลักษณะของแอลลีลหายไป เพราะปฏิกิริยา PCR เกิดไม่สมบูรณ์ ซึ่งปรากฏการณ์ดังกล่าวอาจเรียกอีกอย่างหนึ่งว่าเป็นการผันผวนแบบสุ่ม (stochastic fluctuation)

การวัดปริมาณดีเอ็นเอที่เป็นชุดสำเร็จรูปในปัจจุบันมีหลายวิธี ดังตาราง 4

ตารางที่ 4 ความหลากหลายของวิธีการวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป

Kit or Assay	Principle Behind Detection	Limit of Detection	Volume of DNA Used	Human/Primate Specific	PCR Inhibition Detected
Quantiblot Kit	Hybridization	~ 150 pg	5 µl	Y	N
PicoGreen Assay	Intercalating Dye Fluorescent	250 pg	10 µl	N	N
AluQuant Kit	Pyrophosphorylation and luciferase light production	100 pg	1-10 µl	Y	N
BodeQuant	End-point PCR	~100 pg	1-10 µl	Y	Y
TQS-TH01	End-point PCR	~100 pg	1-10 µl	Y	Y
Quantifiler Kit	Real-time PCR	20 pg	2 µl	Y	Y
Alu Assay	Real-time PCR	1 pg	1-10 µl	Y	Y
CFS TH01 Assay	Real-time PCR	20 pg	1-10 µl	Y	Y
RB1 and mtDNA multiplex	Real-time PCR	20 pg	1-10 µl	Y	Y

ที่มา: John M. Butler, **Forensic DNA Typing**, 2nd ed. (Oxford : Elsevier, 2005), 54.

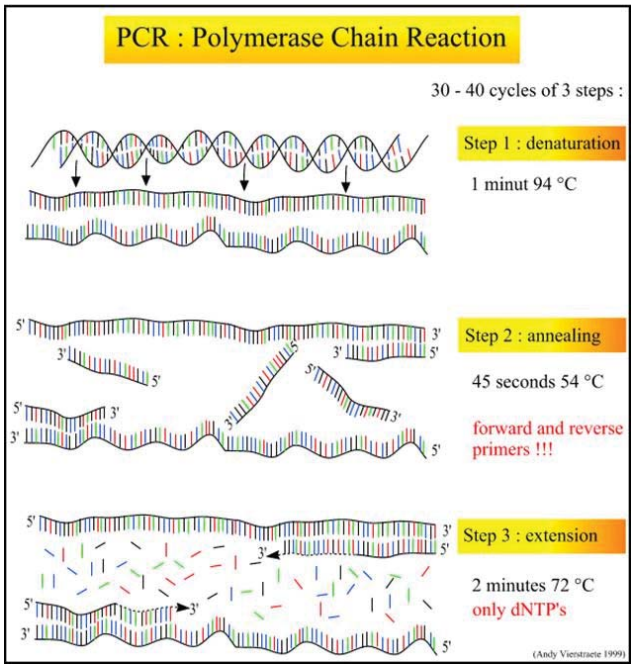
9.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR คือการเพิ่ม ปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการในหลอดทดลอง เทคนิคนี้พัฒนาขึ้นเมื่อปี (ค.ศ. 1983) โดย Kary Mullis และคณะ หลักการของ PCR คือการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอสายคู่ที่ปฏิกิริยาเร่งโดยเอนไซม์ DNA Polymerase ให้ปฏิกิริยาดำเนินไปอย่างต่อเนื่องเป็นลูกโซ่ การเพิ่มปริมาณต้องการดีเอ็นเอต้นแบบ (template) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆ ขนาด 15-30 เบสที่เป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่ต้องการใช้ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ฟอตเฟส ทั้ง 4 ชนิด (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) เป็นสับสเตรท และต้องมีสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ขบวนการของ PCR ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนต่อเนื่องกันคือ

1. Denaturation เป็นการแยกดีเอ็นเอสายคู่ออกจากกันเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว ปฏิกิริยาเกิดที่อุณหภูมิประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส

2. Annealing เมื่อลดอุณหภูมิลงประมาณ 50-65 องศาเซลเซียส Primer 2 สายที่อยู่ในส่วนผสมของสารเคมีเข้าไปจับคู่ (anneal) กับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นแม่พิมพ์ตรงบริเวณที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกัน

3. Primer extension การต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตเข้าที่ปลายของ Primer โดยอาศัยเอนไซม์ DNA Polymerase และดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ครบทั้ง 4 ชนิด อุณหภูมิที่ใช้ซึ่งเหมาะสมสำหรับการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ Polymerase คือ 70-75 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 2 กระบวนการของ PCR ขั้นพื้นฐาน

ที่มา: **วิวัฒนาการของ PCR Technology** [ออนไลน์], เข้าถึงเมื่อ 29 กุมภาพันธ์ 2555. เข้าถึงได้จาก http://ku-scmicro36bkk.tripod.com/PCR.html

เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสิ้นนับเป็น 1 รอบจะได้ดีเอ็นเอเป็น 2^n เท่าของจำนวนคู่เมื่อเริ่มต้น ฉะนั้นในรอบที่หนึ่งจากดีเอ็นเอต้นแบบ 1 คู่จะได้ดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็น 2 คู่ ในรอบต่อมาดีเอ็นเอที่มีอยู่เดิมและที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่จะถูกใช้เป็นต้นแบบของการสังเคราะห์ในรอบต่อไป ดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์จึงมีปริมาณเพิ่มขึ้น ในอัตราทวีคูณ คือจะใช้ 2^n เท่า (n=จำนวนรอบ) ส่วนใหญ่จะใช้เพิ่มประมาณ 30 รอบโดยใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง ซึ่งจะได้ดีเอ็นเอประมาณ 1-10 ล้านเบส เพียงพอที่จะนำมาตรวจหาชนิดได้ แต่จะมีข้อเสียเปรียบคือ ดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนมาแม้เพียงเล็กน้อยก็จะ

เพิ่มปริมาณด้วย ซึ่งทำให้ผลผิดพลาดได้ ดังนั้นจึงต้องมีการทำ negative control ควบคู่ไปด้วย จุดเด่นของเทคนิค PCR คือ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ได้อย่างเฉพาะเจาะจงโดยมีขั้นตอนการทำงานน้อยและใช้เวลาน้อย

9.4.1 สารเคมีที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยา PCR

เนื่องจากการทำ PCR เป็นการสร้างสายดีเอ็นเอ สายใหม่ในหลอดทดลอง จึงต้องมีการเติมสารเคมีและสารตั้งต้นที่เกี่ยวข้อง เพื่อใช้ในการนำมาสร้างเป็นดีเอ็นเอสายใหม่ สารเคมีที่ต้องใช้ปฏิกิริยา PCR มีดังต่อไปนี้

1.Deoxynucleotides (dNTPs) เป็นนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นหน่วยย่อยสำหรับนำไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่

2.DNA polymerase เป็นเอนไซม์สำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอให้ช่วยเร่งปฏิกิริยาเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์ใหม่เข้ากับไพรเมอร์

3.Primer เป็นดีเอ็นเอเริ่มต้นสายสั้น ๆ ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบของการสังเคราะห์ ในการทำ PCR จึงต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการจะเพิ่มจำนวน เพื่อใช้ในการสร้างไพรเมอร์จำเพาะ

4. PCR buffer เป็นสารละลายที่ควบคุมสภาวะของการทำปฏิกิริยาให้เหมาะสม เช่น pH และเกลือต่าง ๆ ซึ่งจะต้องมีอนุมูลแมกนีเซียม (Mg^{2+}) อยู่ด้วย

5. Template คือดีเอ็นเอต้นแบบหรือยีนส่วนที่ต้องการเพิ่มปริมาณ หรือเป็นตัวอย่างดีเอ็นเอ ที่ต้องการนำมาตรวจหาดีเอ็นเอจำเพาะ

สารเคมีที่เป็นส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR จะผสมกันไว้ในหลอดทดลองเล็กปริมาตรสาร 20-100 ไมโครลิตร เมื่อนำหลอดส่วนผสมไปใส่ไว้ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่เรียกว่า DNA thermal cycler (นิยมเรียกว่าเครื่อง PCR) ที่ปรับอุณหภูมิได้ตามโปรแกรมที่กำหนด จะเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้นในหลอด เมื่อเกิดปฏิกิริยาจนครบรอบและระยะเวลาที่กำหนดจะได้ผลผลิตดีเอ็นเอ ขนาดที่ต้องการเป็นจำนวนมาก

9.4.2. ประโยชน์ของ PCR

1. ใช้เพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการแม้ปริมาณเพียงเล็กน้อย เช่น เซลล์เพียงเซลล์เดียง เลือดเพียงหยดเดียว หรือเส้นผมเพียงเส้นเดียว และสามารถทำได้รวดเร็ว

2. ดีเอ็นเอไม่จำเป็นต้องบริสุทธิ์มากคือ อาจจะเจือจางไปบ้างบางส่วน แต่ให้มีเหลือบางส่วนยาวประมาณ 50-20,000 เบส ก็สามารถเพิ่มปริมาณได้

ข้อจำกัดในการทำ PCR ต้องทราบลำดับเบสขนาบข้างของดีเอ็นเอส่วนที่จะนำมาเพิ่มปริมาณ และต้องสังเคราะห์ primer ที่เหมาะสม

ข้อควรระวังในการทำ PCR คือ PCR เป็นเทคนิคที่ไวมาก อาจจะมีผลบวกปลอมได้เนื่องจากการปนเปื้อนของดีเอ็นเอจากตัวอย่างอื่น จากตัวผู้ปฏิบัติงาน หรือจากเครื่องมือ ดังนั้นจึงต้องจัดระบบห้องปฏิบัติการให้เหมาะสม และสวมถุงมือทุกครั้งในการปฏิบัติงาน

10. เทคนิค Quantitative Real-time PCR

เป็นการนำเทคโนโลยีฟลูออเรสเซนส์ผสมผสานกับการทำ Thermal cycling แบบ Rapid PCR ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอไปพร้อมกับการคำนวณ และวิเคราะห์ผลในเวลาเดียวกันภายในหลอดทดลอง ในระยะเวลาอันสั้น โดยจะตรวจตามผลจากสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่เกิดขึ้นระหว่างทำ PCR และการที่เราสามารถตรวจวัด PCR products ได้ เกิดจากการทำให้ PCR products สามารถเกิดสัญญาณการเรืองแสงได้ คือ

10.1 การใช้ SYBR Green I Dye

SYBR Green I เป็นสารเรืองแสง (Fluorochrome) ประเภทหนึ่งที่สามารถเข้าจับกับ minor groove ของดีเอ็นเอสายคู่ เมื่อ SYBR Green I เกาะกับดีเอ็นเอสายคู่และถูกกระตุ้น (excite) ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต จะมีการคายพลังงาน (emission) ออกมาในรูปของแสงในช่วงคลื่น (λ) ยาวขึ้น สามารถตรวจจับได้ด้วยตัวรับสัญญาณแสงที่ติดตั้งอยู่กับเครื่อง Real time Thermocycler แม้นว่าการจับของ SYBR Green I กับดีเอ็นเอสายคู่ เป็นแบบไม่จำเพาะ เราสามารถแยกสัญญาณการเรืองแสง (fluorescence signal) ที่เกิดจาก primer-dimer และ/หรือ non-specific products อื่น ๆ ออกจาก specific amplified product ได้ด้วยการเปรียบเทียบค่า Tm โดยค่า Tm เป็นคุณสมบัติเฉพาะของดีเอ็นเอสายคู่แต่ละสาย แปรผันโดยตรงกับ % GC content และความยาวของดีเอ็นเอสายคู่ การหาค่า Tm จากเครื่อง real time thermocycler สามารถวิเคราะห์ได้จาก Melting

curve โดยสัญญาณการเรืองแสงที่ลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง พวก non-specific products หรือ primer-dimer จะมีค่า Tm แตกต่างจาก specific amplified product เช่น Tm ของพวก primer-dimer จะมีค่าต่ำ เนื่องจากมีขนาดสั้น (15-30 bp) ต่างจาก amplified DNA ซึ่งจะมีขนาดยาวกว่า (>100 bp) และมีค่า Tm ที่สูงกว่า

10.2 การใช้ probes ติดฉลากสาร fluorochrome โดยอาศัยเทคโนโลยีของ Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)

ในกรณีที่ต้องการความจำเพาะสูงสุด เช่น การบ่งชี้ single nucleotide mutations ในดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งไม่สามารถกระทำได้โดยการใช้ SYBR Green I Dye Probe ที่มีความจำเพาะกับ ดีเอ็นเอเป้าหมายและติดฉลากสาร Fluorochrome จะถูกนำมาใช้ในการตรวจหา โดยนำ Fluorochrome 2 ประเภทติดฉลากเข้ากับสายของ specific Probe เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงพลังงานสูง Fluorochrome ตัวแรกที่เราจะเรียกว่า Quencher จะดูดซับพลังงานเอาไว้ และถ่ายทอดพลังงานให้ Fluorochrome ตัวที่สองที่เรียกว่า Reporter dye โดยไม่สูญเสียพลังงานออกมาสู่ระบบภายนอก เมื่อ reporter molecule ได้รับพลังงานจาก Quencher จะปลดปล่อยพลังงานออกมาสู่ระบบภายนอกในรูปของแสง ซึ่งเราสามารถตรวจวัดได้ ปฏิกิริยาดังกล่าวเรียกว่า Fluorescent Resonance Energy Transfer (FRET) การติดฉลาก Fluorochrome เข้ากับตัว Probe เพื่อให้เครื่อง real time PCR สามารถตรวจจับ สัญญาณเรืองแสง อันเกิดจากปฏิกิริยา FRET สามารถกระทำได้ในหลายลักษณะ เช่น

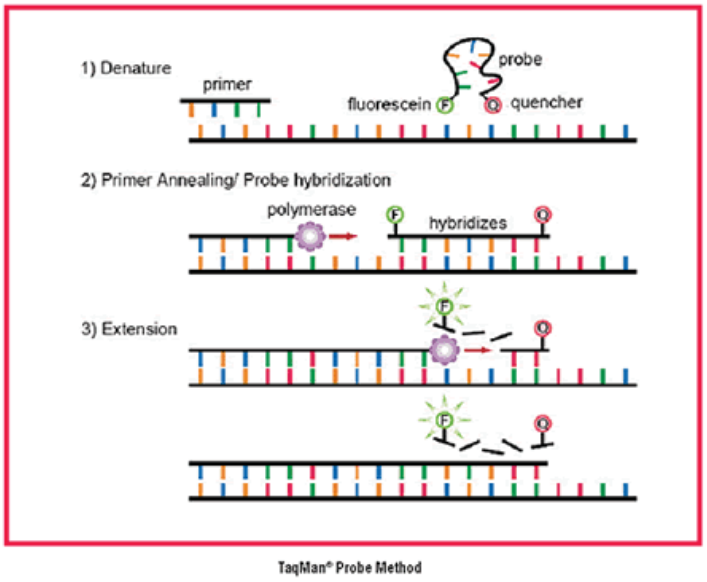
10.2.1 Hybridization probe

โดยการใช้ Oligonucleotide Probe สายสั้นสองสาย โดยสายแรกติดฉลากที่ปลายข้าง 3’ ด้วย Fluorescein ทำหน้าที่เป็น Quencher และสายที่สองติดฉลากด้วย สาร Red 640 หรือ Red 705 เข้าที่ปลาย 5’ โดยที่ปลาย 3’ ของ Oligonucleotide Probe สายที่สองจะถูกปิดด้วย Phosphate Group เพื่อไม่ให้ สามารถทำหน้าที่เป็น PCR primer ได้ ทั้งนี้ Probe ทั้งสองเส้นจะมีลำดับเบสต่อเนื่องกันโดยเว้นช่วงระหว่าง ปลาย 3’ ของ Oligonucleotide Probe เส้นแรก กับ ปลาย 5’ ของ Probe อีกเส้นหนึ่งประมาณ 1-5 bp เมื่อ Probe ทั้งสองทำการ Hybridization กับดีเอ็นเอเป้าหมาย (PCR products) จะเกิด FRET สามารถวัดสัญญาณการเรืองแสงได้ในทุกช่วงของขั้นตอนการ Annealing ในกระบวนการ PCR Hybridization probe สามารถนำมาตรวจสอบ amplified

products เพื่อบ่งชี้ single point mutation หรือ single nucleotide polymorphism (SNP) ได้เป็นอย่างดี ในขณะที่ SYBR Green I Dye ไม่สามารถทำได้ โดยเมื่อเพิ่มความร้อนขึ้นอย่างต่อเนื่อง probe ที่จับกับดีเอ็นเอเป้าหมายซึ่งมีเบสบางตำแหน่งไม่คู่สม (mismatch) จะหลุดตัวออกมาก่อนในช่วงอุณหภูมิที่ต่ำกว่า ในขณะที่ probe หากจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีเบสคู่สมกันทั้งหมด (perfect match) probe ดังกล่าวจะหลุดตัวออกจากดีเอ็นเอเป้าหมายในช่วงอุณหภูมิที่สูงกว่า

10.2.2 Hydrolysis Probe (Taqman)

Hydrolysis Probe หรือ Taqman Probe เป็นการใช้ Oligonucleotide เส้นเดียว โดยปลาย 5’ ของ Probe จะติดฉลาก Reporter dye และภายในสาย Probe ห่างจาก Reporter dye ไม่เกิน 5 bp จะติดฉลากด้วย Quencher dye หลังจากการ hybridization แล้ว เมื่อ Reporter dye ถูกกระตุ้นด้วยแสงจะถ่ายเทพลังงานผ่านไปให้ Quencher dye ตัว Quencher dye ดูดซับพลังงานนั้นไว้แล้วคายพลังงานออกมาในรูปของแสงที่มีช่วงความยาวคลื่นเพิ่มขึ้น เมื่อกระบวนการ PCR เข้าสู่ช่วงการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ (elongation) 5’exonuclease activity ของเอ็นไซม์ *Taq* (***Thermus aquaticus***) DNA polymerase จะทำการย่อย Taqman Probe ทำให้ Reporter dye หลุดเป็นอิสระและห่างจาก Quencher ทำให้สามารถคายพลังงานในรูปของแสง ได้เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงพลังงานสูง



ภาพที่ 3 กระบวนการในแต่ละขั้นตอนของการทำ real-time PCR

ที่มา: Gibthai Co., Ltd., **Real-time PCR technology** [ออนไลน์], เข้าถึงเมื่อ 28 กุมภาพันธ์ 2555. เข้าถึงได้จาก http://www.gibthai.com/services/technical_detail.php?ID=12&page=8

10.2.3 Molecular Beacons

Molecular beacons เป็น oligonucleotide probe ที่มีลักษณะโค้งงอเป็น loop คล้ายกิ๊บหนีบผม (hair pin loop) โดยมีส่วนที่ยึดติดกันด้วยพันธะ hydrogen bond ประมาณ 5-7 nucleotides เป็นส่วนที่มีลำดับเบสเป็น G-C rich ทำให้ปลาย 5’ และ 3’ ที่ติดฉลากด้วย reporter และ quencher dye เข้ามาอยู่ใกล้กันจน quencher dye สามารถดูดซับพลังงานจาก reporter dye ได้ บริเวณ loop ประมาณ 5 -30 nucleotides จะถูกสร้างให้มีลำดับเบสคู่สมกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่เราต้องการตรวจหา เมื่อ Molecular Becon เข้าจับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย hairpin structure จะถูกสลายไป ทำให้ reporter dye ที่ 5’ อยู่ห่างจาก quencher dye ที่ 3’ end สามารถเปล่งสัญญาณแสงออกมาได้เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงพลังงานสูง

หลังจากการทำ real time PCR เสร็จสิ้น ข้อมูลจะถูกนำไปประมวลผลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ของเครื่อง และแสดงผลออกมา โดยทั่วไป จะมีการแสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในแต่ละรอบ (cycle) รวมถึงกราฟแสดงระดับความเข้มแสงที่เปลี่ยนแปลงใน PCR แต่ละรอบ แบบ real-time การคำนวณหาปริมาณตั้งต้นของดีเอ็นเอเป้าหมายจากตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ สามารถทำได้โดยใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบปริมาณ มาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมควบคู่กับดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการทราบปริมาณจากตัวอย่าง ข้อมูลที่ได้จากกลุ่มของดีเอ็นเอมาตรฐานจะถูกนำไปสร้างเป็น calibration graph เพื่อให้กลุ่มตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ ใช้เทียบเพื่อคำนวณหาปริมาณของดีเอ็นเอตั้งต้น

Dynamic range และความไว (sensitivity) ของ real-time PCR จะสูงกว่าเทคโนโลยีอื่นในปัจจุบันที่ใช้ตรวจหาปริมาณตั้งต้นของดีเอ็นเอเป้าหมายในสิ่งส่งตรวจ dynamic range ของ real-time PCR จะกว้างมาก โดยสามารถตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายปริมาณไม่กี่โมเลกุลไปจนถึงระดับล้านโมเลกุลได้โดยไม่ต้องเพิ่มความเข้มข้น (concentration) หรือเจือจางดีเอ็นเอตั้งต้น ทำให้มีความสะดวกและประหยัดเวลาในการทำการวิเคราะห์

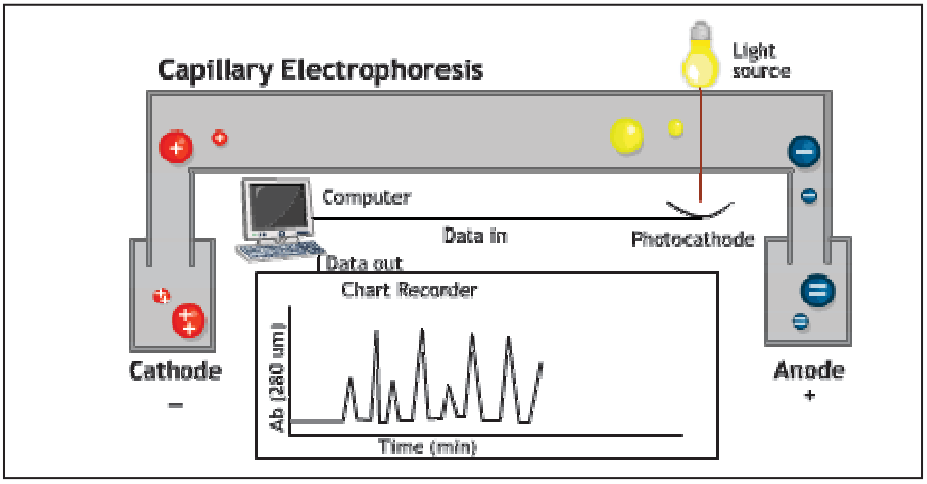
11. การตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR (PCR product)

การตรวจวิเคราะห์ผลผลิตมีด้วยกันหลายวิธี ที่นิยมใช้ทั่วไปคือ

11.1 Gel electrophoresis โดยนำผลผลิต PCR ที่สร้างได้มาแยกตามขนาดดีเอ็นเอ โดยใช้กระแสไฟฟ้าแยกดีเอ็นเอบน agarose gel หรือ polyacrylamide gel เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอ

มาตรฐานที่ทราบขนาดที่แน่นอน จากนั้นย้อมชิ้นดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide แล้วนำไปส่องดูด้วยแสงอุลตราไวโอเลต ผลผลิต PCR ที่ดีควรให้ชิ้นดีเอ็นเอที่ชัดเจน และตรงตามขนาดความต้องการ แต่ถ้ามีขนาดเล็กและแถบดีเอ็นเอไม่ชัดเจน อาจเป็นดีเอ็นเอที่เป็น primer dimer

11.1.1 Capillary electrophoresis (CE) เกี่ยวข้องกับการให้ศักย์ไฟฟ้าสูงตั้งแต่ 10 ถึง 30 กิโลโวลต์ แก่หลอดแคปิลารี (capillary tube) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 25 ถึง 100 ไมโครเมตร บรรจุด้วยสารละลายอิเล็กโทรไลต์ โดยที่ปลายทั้ง 2 ข้าง ของหลอดรูเล็กจะจุ่มอยู่ในภาชนะบรรจุสารละลายอิเล็กโทรไลต์ เมื่อมีการให้ศักย์ไฟฟ้าจะทำให้ไอออนในตัวอย่างวิ่งไปที่ขั้วไฟฟ้าแต่ละขั้ว ตัววัดสัญญาณส่วนใหญ่เป็นแบบยูวี ซึ่งให้รูปแบบการตอบสนองเป็นสัญญาณต่อเวลา เรียกว่า electropherogram ส่วนการไหลของอิเล็กโทรไลต์ไปตามหลอดรูเล็กนี้



ภาพที่ 4 การทำงานของ Capillary Electrophoresis

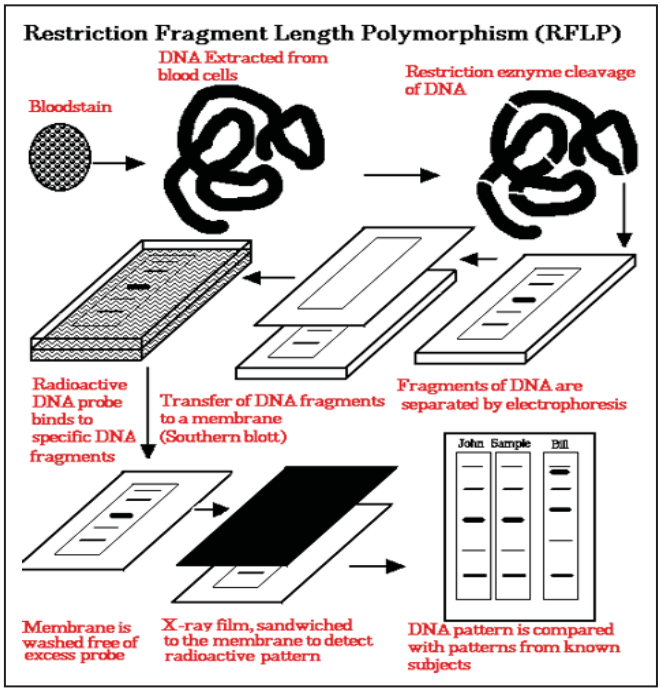
ที่มา: Rhonda Roby, **Microchip Capillary Electrophoresis** [Online], accessed 29 February 2012. available from http://www.nfstc.org/pdi/Subject09/pdi_s09_m03_01_a.htm

11.2 Nucleic acid hybridization ในกรณีที่ดูผลจากเจลไม่ชัดเจน สามารถนำผลผลิต PCR ที่ได้มาตรึงกับแผ่น nitrocellulose หรือ แผ่น nylon แล้วนำมาทำ southern blot, dot blot หรือ slot blot โดยอาศัยตัวติดตาม (probe) ที่จำเพาะกับเบสคู่สม ซึ่งติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีหรือสารปลอดรังสี แล้วจึงนำผลไปดูการจับของผลผลิต PCR กับตัวติดตามได้

11.2.1 Restriction Enzyme Fragment Length Polymorphism (RFLP) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจความแตกต่างของดีเอ็นเอโดยมีพื้นฐานมาจากวิธีการ “Southern Blotting”

ที่ถูกพัฒนาขึ้นในปี พ.ศ. 2518 โดยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) มาตัดสายดีเอ็นเอ ณ ตำแหน่งจำเพาะแล้วจึงนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกตัดนี้ไปแยกตามขนาดของชิ้นส่วนนั้นๆ ด้วยไฟฟ้าบนแผ่นวุ้น (agarose gel) ซึ่งชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กกว่า (หรือสั้นกว่า) จะเคลื่อนที่ไปได้เร็วกว่า ได้ระยะทางมากกว่าบนแผ่นวุ้น หลังจากนั้นดีเอ็นเอที่ถูกแยกขนาดแล้ว จะถูกย้ายด้วยไฟฟ้าอีกครั้งไปยังแผ่นเยื่อไนล่อน แล้วจึงใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบ (DNA probe) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สม (complimentary basepair) กับดีเอ็นเอของมนุษย์ และถูกติดฉลากด้วยสารรังสี มาทำการตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดและอยู่บนแผ่นเยื่อไนล่อนนั้น โดยกระบวนการจับคู่ดีเอ็นเอ (hybridization) เมื่อนำแผ่นเยื่อไนล่อนที่ถูกทำปฏิกิริยาแล้วไปประกบกับฟิล์มเอ็กซ์เรย์ ก็จะทำให้ฟิล์มเอ็กซ์เรย์มีสีดำตามแถบดีเอ็นเอที่ถูกตรวจสอบ ซึ่งแถบดีเอ็นเอจำนวนมากนี้จะมีรูปเหมือนบาร์โค้ด (bar code) โดยบุคคลแต่ละบุคคลจะมีรูปแบบบาร์โค้ดที่เป็นเอกลักษณ์จำเพาะตัวที่เรียกว่า “ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ” ที่เป็นเช่นนี้ก็เพราะเบสซ้ำต่อเนื่องที่ตำแหน่งหนึ่งๆ บนโครโมโซมของแต่ละบุคคลจะมีความยาวแตกต่างกัน

ดังจะเห็นได้ว่าเทคนิค RFLP นี้ เป็นเทคนิคที่ให้ผลการทดลองเป็นแถบดีเอ็นเอจำนวนมาก แสดงว่าเทคนิคนี้อาศัยหลักการในการตรวจหาความแตกต่างของจำนวนเบสซ้ำในหลายตำแหน่งบนโครโมโซมในคราวเดียวกัน ดังนั้นการใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบที่เหมาะสม หรือการใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบมากกว่าหนึ่งชนิด จะทำให้เราสามารถบ่งชี้ถึงความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอ 2 เส้น หรือความแตกต่างของดีเอ็นเอจากคนสองคนได้อย่างชัดเจน



ภาพที่ 5 กระบวนการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี Restriction Fragment Length Polymorphisa (RFLP)

ที่มา: Santa Monica College, **RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)** [Online], accessed 29 February 2012. available from http://homepage.smc.edu/hgp/tools.htm

11.3 Direct sequencing ในกรณีต้องการรู้รายละเอียดของลำดับเบสหรือของผลผลิต PCR ว่าถูกต้องแน่นอนหรือไม่ สามารถตรวจหาลำดับเบสโดยวิธี sequencing PCR ที่เป็นสายคู่ (double strand PCR products) หรือ sequencing PCR ที่เป็นสายเดี่ยว (single strand PCR products)

12. STR (Short Tandem Repeat) หรือ Microsatellite

เป็นตำแหน่งของดีเอ็นเอที่มีชุดของเบสที่ซ้ำมีขนาด 2-6 คู่เบสกระจายอยู่ทั่วไปในสายดีเอ็นเอ โดยจะมีอยู่เฉลี่ยทุกๆ 6-10 กิโลเบส ในโครโมโซมของคนมี STR อยู่หลายแสนตำแหน่ง แต่ที่นำมาใช้ทางนิติเวชในปัจจุบันประมาณ 20 ตำแหน่งเท่านั้น ในแต่ละตำแหน่งของ STR จำนวนซ้ำจะต่างกันในแต่ละบุคคล ดังนั้นแอลลีลจึงมีขนาดที่ต่างกัน ความแตกต่างของ STR จึงสามารถนำมาตรวจพิสูจน์บุคคลและตรวจความเป็นพ่อแม่ลูกได้

STR สามารถนำมาตรวจโดยการเพิ่มปริมาณและนำมาแยกโดยกระแสไฟฟ้าที่ต่างกันและสามารถบอกชนิดตามจำนวนซ้ำของดีเอ็นเอ การตรวจนี้เรียกว่า PCR-based STR Analysis

หรือ PCR-based STR typing เริ่มนำมาใช้ในปี 1995 สามารถตรวจได้หลายวิธี เช่น การย้อมด้วย silver stain การติดสี fluorescence

12.1 การตรวจโดยการติดสี fluorescence

การตรวจด้วยวิธีการติดสี fluorescence เป็นวิธีการที่ใช้กันอย่างแพร่หลายสำหรับห้องปฏิบัติการทางนิติวิทยาศาสตร์ สามารถทำการวิเคราะห์ได้หลายๆ สีในเวลาเดียวกัน รวดเร็วและง่ายต่อการใช้งาน เครื่องมือที่วัด fluorescence เป็นการวัดแสงที่เกิดจากสีที่ติดกับโมเลกุลถูกกระตุ้นออกมา ซึ่งแสงจะออกมาในรูป emitted form ในการประยุกต์ใช้กับ DNA typing ด้วย STR marker นั้น สี fluorescence จะติดอยู่กับ PCR primer ที่ได้มาจากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่กำหนด ตำแหน่งแอลลีลของ amplified STR สามารถดูได้จาก band ที่เกิดขึ้นบนแผ่น gel สำหรับวิธี gel electrophoresis หรือจาก peak ที่เกิดขึ้นบน electropherogram สำหรับวิธี capillary electrophoresis

Fluorophore ถูกติดกับส่วนปลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ จะดูดกลืนพลังงานเลเซอร์และปลดปล่อยแสงที่ระดับพลังงานต่ำ (ความยาวคลื่นสูง) ออกมา filter ถูกใช้ในการเก็บแสงที่ถูกปล่อยออกมาที่ ความยาวคลื่นนั้นๆ หรือเป็นช่วงของความยาวคลื่น หลอด photomultiplier หรือ charge-couple device ถูกใช้ในการเก็บและเพิ่มจำนวนสัญญาณจาก fluorophore และเปลี่ยนไปเป็นสัญญาณไฟฟ้า การวัดสัญญาณนี้จะออกมาในรูปของสี fluorescence แสดงเป็น peak ใน capillary electropherogram หรือ band บนแผ่น gel

ข้อดีของวิธีติดสี fluorescence คือ มีความไวที่สูง ได้ค่าในช่วงที่กว้างกว่าวิธี colorimetric และสามารถวิเคราะห์ได้หลายๆ พารามิเตอร์ของตัวอย่างพร้อมๆ กัน เช่น การติดสี fluorescence ที่ต่างกันในการทำ multiplex PCR เป็นต้น

การตรวจสามารถทำได้โดยวิธี manual ที่ตรวจได้ครั้งละตำแหน่งเดียวหรือ 3-4 ตำแหน่ง หรืออาจตรวจด้วยเครื่องตรวจอัตโนมัติที่สามารถตรวจได้รวดเร็วโดยชุดน้ำยาสำเร็จรูป ซึ่งมี 2 บริษัทที่ผลิต มีทั้งที่ตรวจได้ครั้งละ 10, 13 และ 16 ตำแหน่งซึ่งรวมตำแหน่งที่บอกเพศด้วย ปัจจุบัน PCR-based STR Analysis ใช้กันแพร่หลายทั่วโลกเนื่องจากมีข้อได้เปรียบกว่าการตรวจ RFLP และวิธีอื่นดังนี้

(1) ขนาดของ STR สั้น ทำให้การตรวจได้ผลดีกว่า โดยเฉพาะในดีเอ็นเอที่มีปริมาณน้อยหรือดีเอ็นเอเสื่อม

(2) ขนาดที่สั้นของ STR ทำให้เพิ่มปริมาณได้หลายตำแหน่งในครั้งเดียวกัน แอลลีลที่ได้มีขนาดน้อยกว่า 350 เบส ซึ่งตรวจได้หลายตำแหน่งในครั้งหนึ่งๆ

(3) แอลลีลที่ได้มีขนาดสั้นทำให้แปลผลได้ง่าย

(4) การตรวจทำได้เร็ว สามารถให้ผลภายใน 24 ชั่วโมงหรือน้อยกว่า

แต่ละห้องปฏิบัติการจะมีฐานข้อมูลของตัวเองไว้ โดยเฉพาะ FBI ได้พัฒนา software ที่เรียกว่า CODIS (Combined DNA Index System) เพื่อเก็บข้อมูลดีเอ็นเอของผู้ต้องหาในคดีอุกฉกรรจ์และคดีข่มขืนซึ่งสามารถจับกุมผู้กระทำผิดได้หลายร้อยรายแล้ว จากการเก็บรวบรวมหลักฐานในที่เกิดเหตุวิเคราะห์หาชนิดของดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอบนฐานข้อมูล FBI ใช้ STR 13 ตำแหน่ง ดังตารางที่ 5 การตรวจปัจจุบันของสถาบันนิติเวชวิทยาใช้เครื่องมืออัตโนมัติตรวจ 10 ตำแหน่ง

ตารางที่ 5 รายละเอียดของ STR 13 ตำแหน่งที่ใช้ในการเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

Locus Name	Chromosomal Location	Physical Position	Repeat Motif ISFG Format	GenBank Accession	GenBank Allele	Allele Range	Number of Alleles Seen
CSF1PO	5q33.1 c-fms proto-oncogene, 6th intron	Chr 5 149.484 Mb	TAGA	X14720	12	5-16	20
FGA	4q31.3 Alpha fibrinogen, 3rd intron	Chr 4 156.086 Mb	CTTT	M64982	21	12.2-51.2	80
TH01	11p15.5 Tyrosine hydroxylase, 1st intron	Chr 11 2.156 Mb	TCAT	D00269	9	3-14	20
TPOX	2p25.3 Thyroid peroxidase, 10th intron	Chr 2 1.436 Mb	GAAT	M68651	11	4-16	15
vVA	12p13.31 Von Willebrand Factor, 40th intron	Chr 12 19.826 Mb	[TCTG][TCTA]	M25858	18	10-25	28
D3S1358	3p21.31	Chr 3 45.543 Mb	[TCTG][TCTA]	NT_005997	18	8-21	24
D5S816	5q23.3	Chr 5 123.187 Mb	AGAT	G08446	11	7-18	15
D7S820	7q21.11	Chr 7 83.401 Mb	GATA	G08616	12	5-16	30
D8S1179	8q24.13	Chr 8 125.863 Mb	[TCTA][TCTG]	G08710	12	7-20	17
D13S317	13q31.1	Chr 13 80.52 Mb	TATC	G09017	13	5-16	17
D16S539	16q24.1	Chr 16 86.168 Mb	GATA	G07925	11	5-16	19
D18S51	18q21.33	Chr 18 59.098 Mb	AGAA	L18333	13	7-39.2	51
D21S11	21q21.1	Chr 21 19.476 Mb	Complex [TCTA][TCTG]	AP000433	29	12-41.2	82

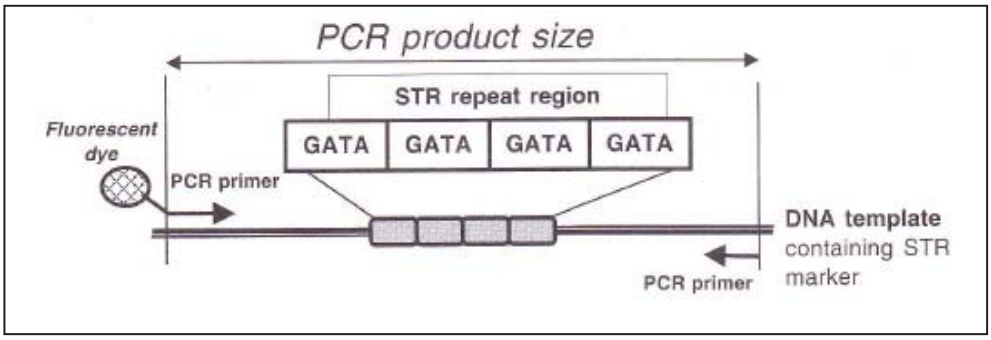
ที่มา: John M. Butler, **Forensic DNA Typing**, 2nd ed. (Oxford : Elsevier, 2005), 96.

วิธีการตรวจ เริ่มตั้งแต่การสกัดดีเอ็นเอ การหาปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมก่อนเข้าเครื่อง PCR และเตรียมสารเคมีซึ่งประกอบด้วย primer ติดฉลากด้วยสี fluorescence, $MgCl_2$, Deoxynucleotidetriphosphate เติมเอนไซม์ Taq Polymerase นำเข้าเครื่อง PCR แล้วจึงตรวจหาชนิดของ STR

ปัจจุบัน STR ใช้กันทั่วไปทั้งในอังกฤษ ประเทศในยุโรปอื่นๆ FBI และ Lab อื่นๆ ของสหรัฐอเมริกา แคนาดา เม็กซิโก ญี่ปุ่น ออสเตรีย ประเทศอื่นๆ โดยเฉพาะประเทศไทยก็ใช้ STR ในการพิสูจน์พ่อแม่ลูกและพิสูจน์บุคคล

12.2 STR Typing

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่เป็น STR ในตัวอย่างดีเอ็นเอ จะมี primer 2 ชิ้นที่ใช้เป็นต้นแบบ ซึ่งใน primer หนึ่งๆ จะถูกติดสี fluorescence เข้าที่ปลายด้าน 5' เพื่อใช้เป็นตัวแยกสีของผลผลิต PCR ที่ได้ในส่วนของ STR ที่ต้องการ โดยผลที่ได้จะมีช่วงขนาดของ STR ที่แตกต่างกัน



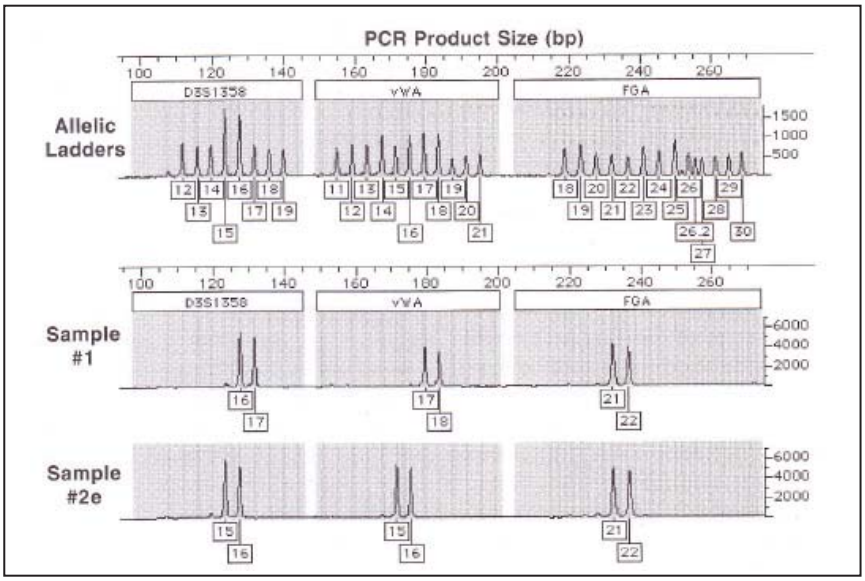
ภาพที่ 6 วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ติดตามผลด้วยการติดฉลากสี fluorescence

ที่มา: Thomas Weissensteiner et al., **PCR technology : current innovations**, (Florida : CRC Press LLC, 2004), 116.

ขนาดของผลผลิต PCR ถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปจำนวนของตำแหน่งซ้ำของลำดับ STR เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการเปรียบเทียบกับ allelic ladder ที่ทำการทดสอบภายใต้สภาวะเงื่อนไขเดียวกับตัวอย่าง allelic ladder จะมาพร้อมกันกับชุดน้ำยาสำเร็จรูปและประกอบด้วยแอลลีลที่พบมากในกลุ่มประชากร ทุกแอลลีลใน allelic ladder เป็นตัวอย่างของลำดับจำนวนซ้ำที่ถูกต้อง อย่างไรก็ตาม ถ้าผลผลิต PCR ที่ถูกย้ายลงแผ่นเจลหรือใน capillary มีลำดับตำแหน่งที่ตรงกับแอล

ลีลใน allelic ladder ที่ทดสอบภายใต้สภาวะเงื่อนไขเดียวกัน แอลลีลที่ได้นี้จะถูกประเมินว่ามีขนาดตรงกับแอลลีลใน allelic ladder

ผลลัพธ์ของการทำ genotyping ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป Applied Biosystem AmpFISTR® Identifiler ™ STR ชุดน้ำยานี้จะใช้สี 4 สีในการติดตามผลผลิต PCR คือ สีน้ำเงิน (6-FAM™), สีเขียว (VIC™), สีเหลือง (NED™) และสีแดง (PET™) โดย STR ขนาดมาตรฐานซึ่งระบุชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 16 ตำแหน่ง มีขนาดอยู่ระหว่าง 35-500 base pair (bp) จะถูกติดเป็นสีที่ห้า (LIZ™) เพื่อใช้บอกความเป็นไปได้ของขนาดของ PCR-amplified allele ในตัวอย่าง ชุดน้ำยานี้จะแสดงผลเป็นตำแหน่งของ STR ที่แตกต่างกัน 15 ตำแหน่งของพันธุกรรมมนุษย์ได้แก่ CSF1PO, FGA, TPOX, TH01, VWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, D2S1338, D19S433 และตำแหน่งของ amelogenin sex-typing



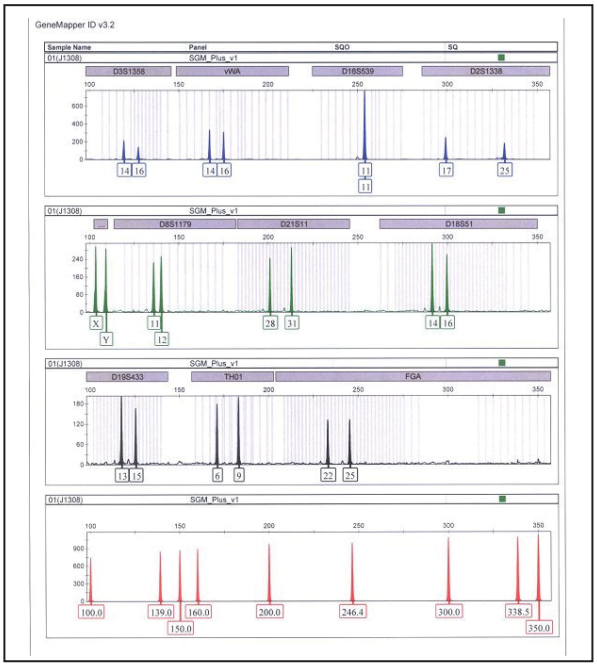
ภาพที่ 7 ตัวอย่างการเปรียบเทียบแอลลีลของตัวอย่างกับ allelic ladder

ที่มา: Thomas Weissensteiner et al., **PCR technology : current innovations**, (Florida : CRC Press LLC, 2004), 116.

12.3. Genotyping software

ซอฟแวร์ที่นำมาใช้จัดการกับข้อมูลที่ได้จากการแยกชิ้นส่วนด้วยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis) ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนโดยใช้ 2 โปรแกรมคือ GeneAcan® software สำหรับแยก

สีที่แสดงในแต่ละ peak ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอในแต่ละตัวอย่าง จากนั้นผลที่ได้จะถูกนำไปวิเคราะห์โปรแกรมที่สองคือ Genotyper® ซึ่งเป็นโปรแกรมประเมินค่าจีโนไทป์ของแต่ละตัวอย่างโดยการเปรียบเทียบขนาดของแอลลีลของตัวอย่างกับแอลลีลของ allelic ladder มาตรฐานออกมาเป็นตัวเลข โดยบริษัท Applied Biosystems ทำการรวมการทำงานของทั้ง 2 โปรแกรมนี้เข้าด้วยกันเรียกโปรแกรมใหม่ว่า “GeneMapper”

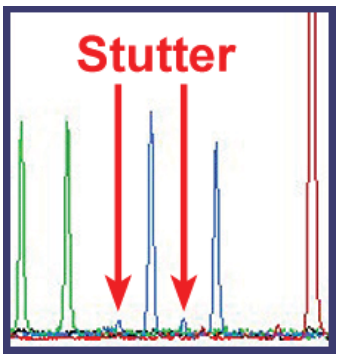


ภาพที่ 8 ตัวอย่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอหลังจากใช้โปรแกรม GeneMapper ทำการวิเคราะห์ผล

13. ผลลัพธ์ที่พบได้จากการเพิ่มปริมาณและการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ STR allele สามารถพบสิ่งแปลกปลอมเข้ามารบกวนปฏิกิริยาได้พร้อม ๆ กับการเกิดแอลลีลปกติในชิ้นส่วนดีเอ็นเอ เช่น การเกิด stutter, allele drop-out เป็นต้น

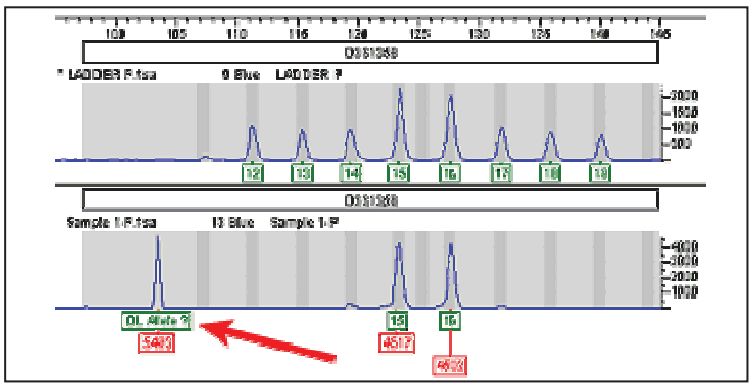
Stutter Product เป็นลักษณะของ peak ที่พบได้ส่วนใหญ่ใน electropherogram ของตัวอย่าง STR ที่ทำการเพิ่มปริมาณ โดยจะพบลักษณะเป็น peak ย่อย ที่เล็กกว่าและพบก่อนตำแหน่ง peak ของแอลลีลหลัก ถ้าในกรณีที่ peak ของแอลลีลหลักไม่ปรากฏ ก็อาจทำให้เข้าใจว่า peak ของ stutter นั้นเป็นตำแหน่งของแอลลีลหลักได้ ดังนั้นในการแปลความหมายของข้อมูลจึงต้องมีการกำหนดเปอร์เซนต์ค่าสูงสุดของ sutter ที่พบด้วย



ภาพที่ 9 ลักษณะของ stutter product

ที่มา: Russell Vossbrink, **Stutter** [Online], accessed 29 February 2012. available from http://www.nfstc.org/pdi/Subject06/pdi_s06_m02_05.htm

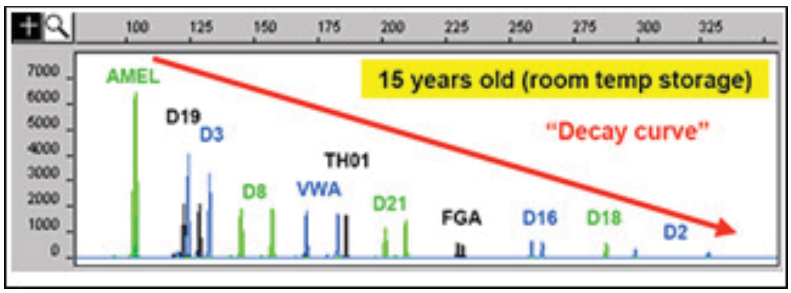
Microvariant and Off-Ladder (OL) Allele พบลักษณะของ peak ที่มีขนาดใหญ่กว่าหรือเล็กกว่า ช่วงของ allelic ladder ซึ่งสามารถทำการทวนซ้ำโดย ตรวจสอบผลผลิตที่ทำการเพิ่มจำนวนแล้ว หรือทำการเพิ่มปริมาณของตัวอย่าง หรือทำการเพิ่มปริมาณด้วย single-locus primer



ภาพที่ 10 ลักษณะของ Microvariant and Off-Ladder (OL) Allele

ที่มา: Russell Vossbrink, **Microvariant and Off-Ladder (OL) Allele** [Online], accessed 29 February 2012. available from http://www.nfstc.org/pdi/Subject06/pdi_s06_m02_06.htm

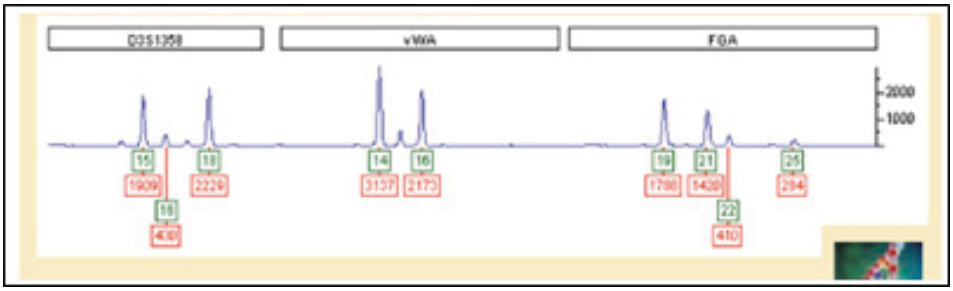
Allele drop-out เกิดขึ้นเมื่อในตัวอย่างมีตำแหน่งของแอลลีล 1 ตำแหน่งหรือมากกว่านั้นหายไป อาจเกิดจากปัจจัยคือ ปริมาณดีเอ็นเอมีน้อยเกินไป จึงไม่พอสำหรับการเพิ่มปริมาณของแอลลีลคู่นั้น หรือมีการผ่าเหล่าของดีเอ็นเอต้นแบบทำให้เกิดความล้มเหลวในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ หรือขนาดของแอลลีลไม่อยู่ในช่วงที่เทียบตำแหน่งกับ allelic ladder



ภาพที่ 11 ลักษณะของ Allele drop-out

ที่มา: Russell Vossbrink, **Allele drop-out** [Online], accessed 29 February 2012. available from http://www.nfstc.org/pdi/Subject06/pdi_s06_m02_09.htm

ผลการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่เป็น mixed sample พบลักษณะของลายพิมพ์ดีเอ็นเอมากกว่า 1 บุคคล คือที่เครื่องหมายพันธุกรรมแต่ละตำแหน่งมีแอลลีลปรากฏมากกว่า 2 peak และ peak ที่พบจะสูงกว่า peak ของ stutter หรือมีลักษณะของ heterozygote peak ที่ไม่สมดุลกันมากกว่า 30% ซึ่งเป็นการยากในการตรวจหา peak ย่อยที่ต่างกันมากถึง 20 เท่าเมื่อเทียบกับ peak หลัก ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ



ภาพที่ 12 ลักษณะของ Mixed sample result

ที่มา: Forensic bioinformatics, **Things that can complicate a DNA profile** [Online], accessed 29 February 2012. available from http://www.bioforensics.com/conference08/Complications/index.html

14. การรายงานผล

ในการรายงานผล การเปรียบเทียบระหว่าง 2 ตัวอย่างหรือมากกว่า มีขอบเขตของความเป็นไปได้ออกมา 3 แบบ

1. Match – peak ของตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เปรียบเทียบกันมีตำแหน่งตรงกันทุกตำแหน่ง

2. Exclusion (Non-match) - การเปรียบเทียบจีโนไทป์ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอให้ผลแตกต่างกัน และสรุปว่า 2 ตัวอย่างมาจากแหล่งที่แตกต่างกัน

3. Inconclusive – ข้อมูลมีไม่เพียงพอสำหรับการสรุปผลว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอตรงกัน เนื่องจากข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เปรียบเทียบกันไม่ไปในทิศทางเดียวกัน

15. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

15.1 งานวิจัยต่างประเทศ

Sweet et al. (1997 : 320-322) ได้ทำการศึกษา วิธีเก็บกู้น้ำลายจากผิวหนังมนุษย์ด้วยเทคนิค double swab โดยใช้ไม้พันสำลีเปียกในการเก็บตัวอย่างก่อนแล้วตามด้วยไม้พันสำลีแห้ง นำไปสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี modified Chelex พบว่า การเก็บกู้ดีเอ็นเอจากน้ำลายบนผิวหนังมนุษย์ด้วยเทคนิค double swab ให้ผลดีที่สุด เมื่อเทียบกับการใช้ไม้พันสำลีเปียกเพียงอันเดียว และการใช้กระดาษกรองเปียกซับ Pesaresi et al. (2003 : 947– 951) ตีพิมพ์ผลงานวิชาการเกี่ยวกับการวิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของการเก็บดีเอ็นเอจากรอยนิ้วมือ โดยใช้การวิเคราะห์ STR พบว่าสามารถสกัดดีเอ็นเอได้สำเร็จจากรอยนิ้วมือ และขณะเดียวกันก็มีรายงานของ Alessandrini et al. (2003 : 586–592) เกี่ยวกับดีเอ็นเอจากรอยนิ้วมือและปัจจัยที่มีผลต่อ DNA profile โดยทำการเก็บตัวอย่าง รอยนิ้วมือจำนวน 374 รอยจากผู้ปฏิบัติงานในห้องแลบ 11 คน บนวัสดุที่แตกต่างกัน 3 ชนิด (แก้ว, ไม้, โลหะ) ที่ใช้แรงกดมาตรฐาน 30 วินาที โดยให้ทำการล้างมือก่อนการทดลอง และไม่ล้างมือก่อนการทดลอง เพื่อศึกษารูปร่างลักษณะ ปริมาณ และการวิเคราะห์แยกชนิด พบว่าปริมาณดีเอ็นเอที่เก็บได้จากรอยนิ้วมืออยู่ในช่วง 0.04-0.2 นาโนกรัม และปริมาณดีเอ็นเอของอาสาสมัครที่ล้างมือก่อนการทดลองมีจำนวนลดลง แต่ไม่มีนัยสำคัญ ความสามารถในการปลดปล่อยเซลล์ของผู้ทดลองเป็นปัจจัยสำคัญมากที่ทำให้เกิดความแตกต่างในด้านปริมาณของแต่ละบุคคล ผลการเกิดแอลลีลปลอมสามารถเกิดได้จากการทดลอง และการปนเปื้อนจาก secondary transfer, stutter และสิ่งแปลกปลอมอื่น ๆ เมื่อทำการวิเคราะห์ดีเอ็นเอแบบ low-copy-number จากรายงานของ Pang and Cheung (2007 : 181–184) เกี่ยวกับการใช้เทคนิค double swab ในการเก็บตัวอย่างจากวัตถุพยานที่มีการสัมผัส พบว่า เมื่อเปรียบเทียบการตรวจดีเอ็นเอจากวัตถุพยานที่ได้จาก

การสัมผัส ระหว่างเทคนิคดั้งเดิม (การใช้ไม้พันสำลีเปียก 1 อัน) และเทคนิค double swab แสดงให้เห็นว่า เทคนิค double swab ให้ DNA profile ที่มีคุณภาพดีขึ้น และแนะนำให้เป็นวิธีการเก็บตัวอย่างจากวัตถุพยานที่มีการสัมผัสในสถานที่เกิดเหตุ ก่อนถึงปี ค.ศ. 2008 มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับลักษณะของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่อยู่บนวัตถุที่มีรอยสัมผัส พบว่า สามารถตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากรอยสัมผัสได้ และเสนอว่าดีเอ็นเอจากรอยสัมผัสบนวัตถุนี้น่าจะมาจากเซลล์ของผิวหนังชั้นนอก (epidermal cell) แต่ยังไม่สามารถยืนยันถึงกลไกได้ Kita et al. (2008 : 32-36) มีการศึกษารูปร่างของเซลล์ของ nuclear DNA โดยใช้เทคนิค immunohistochemistry Keratinocyte บนผิวหนัง และเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอที่ได้จากการ swab บริเวณผิวหนังของมนุษย์ โดยใช้กล้อง Immunoelectron พบว่า มี single-stranded DNA ทั้งใน cornified layer ของผิวหนังและใน swab ด้วยกล้อง electron ของ shadow-cast พบว่ามีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาดเล็กจาก swab และเสนอว่า ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากรอยสัมผัสบนวัตถุ อาจได้มาจากเซลล์ชั้นนอกของ cornified layer ที่ติดแน่นกับหนังชั้นนอกและจากเหงื่อที่อยู่ตามชั้นผิวหนัง จากรายงานของ Djuric et al. (2008 : 411–412) พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก ชิ้นส่วนหรือวัตถุที่มีการจับ ด้วยวิธีสกัดแบบ organic extraction สามารถประสบความสำเร็จในการวิเคราะห์ DNA profile โดยทำปฏิกิริยา PCR เป็นเวลา 34 รอบ ในส่วนแรกของการศึกษานี้ ให้อาสาสมัครจำนวน 7 คน จับหลอดทดลองพลาสติกเป็นเวลา 10 วินาที หลังจากล้างมือแล้ว 15 นาที จากการทดลอง 7 ตัวอย่าง ได้ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอแบบสมบูรณ์ 3 ตัวอย่าง แบบไม่สมบูรณ์ (partial profile) 4 ตัวอย่าง โดยมีผล 1 ตัวอย่างที่แตกต่างจากลายพิมพ์ดีเอ็นเออ้างอิง ในส่วนที่สองของการทดลอง เป็นการทดลองให้อาสาสมัครทำการลองจับข้อเท้าของผู้อื่น เพื่อศึกษาการปนเปื้อนของดีเอ็นเอระหว่างบุคคล ผลที่ได้คือพบลายพิมพ์ดีเอ็นเอแบบผสม ในอัตราส่วนต่างๆ กันขึ้นกับความสามารถในการปลดปล่อยเซลล์ ในส่วนที่สามของงานวิจัยนี้ทดลองถึงผลลัพธ์ของช่วงเวลาหลังจากการสกัดดีเอ็นเอทั้งด้านปริมาณและคุณภาพ โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์พบได้หลัง 24 ชั่วโมงจากบุคคลที่มีความสามารถในการปลดปล่อยเซลล์สูง Daly et al. (2012 : 41-46) มีการศึกษาวิจัยเรื่อง การถ่ายทอดดีเอ็นเอจากการสัมผัสจากมือไปยังแก้ว เศษผ้า และไม้ ทดสอบความแตกต่างของปริมาณดีเอ็นเอที่ส่งผ่านจากมือไปยังแก้ว เศษผ้า และไม้ โดยมีอาสาสมัครจำนวน 300 คน (จับแก้ว 100 คน จับเศษผ้า 100 คน และจับไม้ 100 คน) โดยร้อยละ 50 เป็นเพศชายและอีกร้อยละ 50 เป็นเพศหญิง ให้อาสาสมัครทำการจับวัตถุนาน 60 วินาที ทำการเก็บ

ดีเอ็นเอจากวัตถุด้วยวิธี minitape life วัดปริมาณโดยใช้ชุดสำเร็จรูป Quantifiler สกัดดีเอ็นเอโดยใช้ Qiagen® QIAamp DNA mini kit และเพิ่มปริมาณที่ 28 รอบ ด้วย AmpFISTR® SGM Plus™ Amplification kit พบว่า การส่งผ่านดีเอ็นเอและการเก็บเซลล์ตัวอย่าง จากไม้ให้ผลที่ดีที่สุด รองลงมาคือ เศษผ้า และแก้ว ตามลำดับ ความเป็นไปได้ในการได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอแบบสมบูรณ์ (full profile) จากแก้วร้อยละ 9จากผ้าร้อยละ 23 และจากไม้ร้อยละ 36 และพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างปริมาณของการส่งผ่านดีเอ็นเอของอาสาสมัครเพศชายและเพศหญิง

15.2 งานวิจัยในประเทศ

ในปี ค.ศ. 2011 Sirichantrawong และคณะได้ทำการศึกษาการเก็บดีเอ็นเอจากรองเท้าแตะที่ผ่านการสวมใส่ 1 7 และ 14 วัน โดยเปรียบเทียบวิธีการเก็บด้วยเทคนิค double swab โดยใช้ น้ำกลั่น และ 95% ethanol เป็นตัวละลายเซลล์ ผลการทดลองพบว่าเทคนิค double swab โดยใช้ 95% ethanol เป็นตัวละลายเซลล์ให้ผลดีเอ็นเอปริมาณมากกว่า (Kittisak Slrichantrawong et al. 2011)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ขออนุญาตทำวิจัยในคนกับคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล เลขที่ 2554/389 ทำการทดลองกับวัตถุที่ใช้ในการสัมผัสที่มีลักษณะพื้นผิวที่แตกต่างกันจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ ลูกบิดประตู (knob), ปลอกสวมด้ามจับรถจักรยานยนต์ (motorcycle grip case), ค้อนที่มีด้ามจับเป็นไม้ (halve) และอิฐบล็อก (brick) โดยทำการเก็บตัวอย่างเยื่อบุผิวหนังที่ได้จากรอยสัมผัสของอาสาสมัครจำนวน 5 คน แสดงความยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษร ที่ไม่ได้ทำการล้างมือ

1. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1.1 การเก็บตัวอย่าง

1.1.1 ลูกบิดประตู

1.1.2 ปลอกสวมที่จับรถจักรยานยนต์

1.1.3 ค้อนที่มีด้ามจับเป็นไม้

1.1.4 อิฐบล็อก

1.1.5 ไม้พันสำลี (size M)

1.1.6 กล่องกระดาษเก็บตัวอย่าง

1.1.7 กระดาษ FTA (Indicating FTA Mini Card®, Whatman)

1.1.8 ถุงมือ

1.1.9 ตู้อบที่ติดหลอด UV

1.1.10 95% ethanol

1.2 การสกัดดีเอ็นเอ

1.2.1 microentrifuge tube ขนาด 1.5 ml

1.2.2 ใบมีดสำหรับตัดสำลี

1.2.3 water bath

1.2.4 เครื่องเขย่าวน (vortex)

1.2.5 เครื่อง microcentrifuge (Hettich zentrifugen รุ่น MIKRO 200)

1.2.6 micropipette ขนาด 1000, 200, 20 และ 1 µL

1.2.7 tip ขนาด 1000, 200 และ 20 µL

1.2.8 ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป QIAamp® DNA Micro Kit (Applied Biosystem, CA, USA)

1.2.9 TE buffer

1.3 การวัดปริมาณดีเอ็นเอ

1.3.1 Fast 96 well-Reaction Plate 0.1mL (MicroAmp®, Applied Biosystem, CA, USA)

1.3.2 เครื่อง 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystem, CA, USA)

1.3.3 ชุดวัดปริมาณสำเร็จรูป Quantifiler® Human DNA Quantifiler Kit (Applied Biosystem, CA, USA)

1.4 การเพิ่มปริมาณและการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

1.4.1 Fast Reaction Tubes 8 Tubes 1 Strip (MicroAmp®, Applied Biosystem, CA, USA)

1.4.2 เครื่อง GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystem, CA, USA)

1.4.3 เครื่อง 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, CA, USA)

1.4.4 โปรแกรม Gene Mapper ID V.3.2

1.4.5 ชุดน้ำยาสำเร็จรูป AmpF*l*STR® Identifiler™ PCR Amplification Kit (Applied Biosystem, CA, USA)

1.4.6 Hi-di formamide

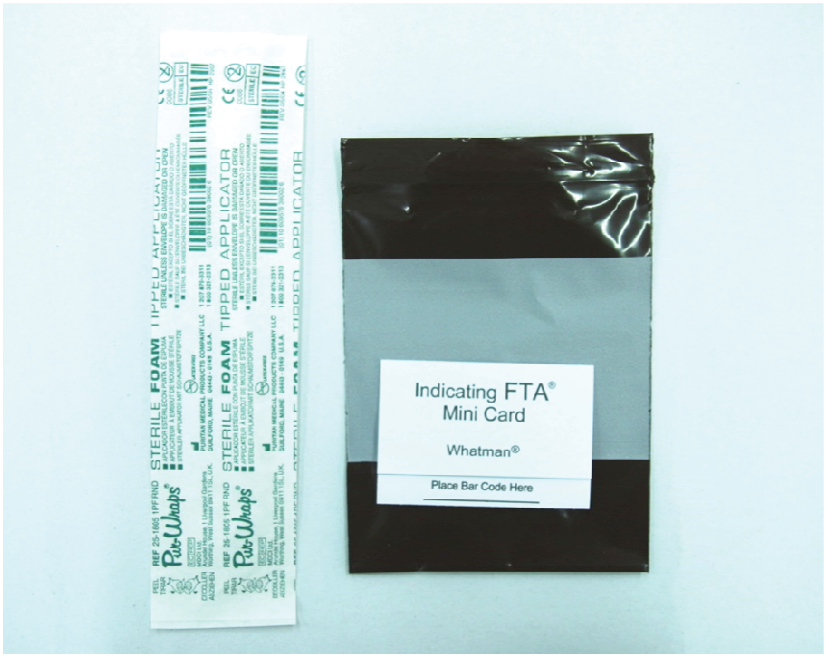
1.4.7 GeneScan-500 LIZ size standard

2. วิธีการทดลอง

2.1 การเก็บตัวอย่าง

2.1.1 การเก็บตัวอย่างดีเอ็นเออ้างอิงจากเยื่อบุกระพุ้งแก้มของอาสาสมัคร

อาสาสมัครชายไทยจำนวน 5 คน อายุระหว่าง 18-25 ปี โดยแสดงความยินยอมเข้าร่วมการวิจัยเป็นลายลักษณ์อักษร จะถูกเก็บตัวอย่างเยื่อบุกระพุ้งแก้มเพื่อนำมาวิเคราะห์ DNA profile สำหรับใช้เป็นดีเอ็นเออ้างอิง โดยมีวิธีการเก็บเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มคือ อาสาสมัครนำไม้โฟมเช็ดบริเวณกระพุ้งแก้มทั้ง 2 ด้าน (ซ้ายและขวา) จากนั้นนำไม้พันสำลีดังกล่าวไป กด ซับ กับ FTA card (Indicating FTA Mini Card®, Whatman) วางผึ่งลมให้แห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30-60 นาที นำมาบรรจุใส่ซองพลาสติกที่มีสารกันความชื้น และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อทำการสกัดดีเอ็นเอต่อไป



ภาพที่ 13 อุปกรณ์การเก็บดีเอ็นเอจากเยื่อบุกระพุ้งแก้ม (FTA card และ ไม้โฟม)

2.1.2. การเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอจากพื้นผิวสัมผัสของวัตถุ

ก่อนการทดลองในแต่ละครั้ง ทำความสะอาดวัตถุแต่ละชนิดด้วย 95% ethanol แล้วนำไปอาบ รังสี UV เป็นเวลา 15 นาที เพื่อทำลายดีเอ็นเอที่มีอยู่เดิม หรือสิ่งปนเปื้อน

ออกจากวัตถุทุกชิ้น จากนั้นให้อาสาสมัครจับวัตถุแต่ละชนิดเป็นเวลา 1 นาที เก็บตัวอย่างเซลล์จากการสัมผัสด้วยวิธี double swab โดยนำไม้พันสำลีอันที่ 1 ชุบด้วย 95% ethanol ให้หมาด ป้ายเก็บตัวอย่างบนพื้นผิววัตถุ จากนั้นนำไม้พันสำลีอันที่ 2 (แห้ง) ป้ายเก็บตัวอย่างซ้ำบริเวณเดิม เก็บไม้พันสำลีทั้ง 2 อัน ใส่กล่องเก็บตัวอย่าง แล้ววางพึ่งลมให้แห้ง ปิดผนึกให้เรียบร้อยเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อนำไปทำการสกัดต่อไป ทำการเก็บตัวอย่างในแต่ละวัตถุจำนวน 2 ครั้ง

ภาพที่ 14 วัตถุและลักษณะพื้นผิวของวัตถุที่นำมาใช้ในการทดลองได้แก่ ลูกบิดประตู (A-B) ค้อนที่มีด้ามเป็นไม้ (C-D) ปลอกสวมที่จับรถจักรยานยนต์ (E-F) และอิฐบล็อก (G-H)

ภาพที่ 15 การป้ายเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอจากพื้นผิวสัมผัสบนวัตถุด้วยเทคนิค double swab (A) เก็บตัวอย่างดีเอ็นเอจากอิฐบล็อก (B) เก็บตัวอย่างดีเอ็นเอจากด้ามค้อน

ภาพที่ 16 การจัดเก็บไม้พันสำลีที่ทำการเก็บตัวอย่างบนพื้นผิววัตถุ

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

2.3.1 ดีเอ็นเออ้างอิง

การสกัดดีเอ็นเอ จากเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มที่เก็บไว้ใน FTA card โดยนำ FTA card มาเจาะจำนวน 10 ชิ้น (ภาพที่ 17) และใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 600 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที นำไปเขย่าวน จากนั้นดูดของเหลวทิ้งเหลือเฉพาะเยื่อกระดาษ เติม TE buffer 600 ไมโครลิตร เขย่าวนและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที ดูดของเหลวทิ้ง เติม TE buffer 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูดส่วนใสใส่ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อวัดปริมาตร และทำขั้นตอนต่อไป

ภาพที่ 17 การเจาะเยื่อของ FTA card เพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอ

2.3.2 ดีเอ็นเอจากพื้นผิวสัมผัสของวัตถุ

1. ย่อยเซลล์เยื่อบุจากไม้พันสำลี

ตัวอย่างที่เก็บด้วยวิธี double swab ใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป QIAamp® DNA Micro Kit มาสกัดโดยนำไม้พันสำลีทั้ง 2 อันที่แห้งสนิทแล้วมาตัดลอกผิวของสำลีใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม ALT buffer 400 ไมโครลิตร proteinase K 20 ไมโครลิตรลงในหลอดตัวอย่าง เขย่าวนและบ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนถ่ายสำลีตัวอย่างลงใน basket เพื่อทำการแยกส่วนของของเหลวออกจากสำลี ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำส่วนของเหลวที่ได้ไปเติม AL buffer 400 ไมโครลิตร เขย่าวนและบ่มต่อที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม 95% ethanol 200 ไมโครลิตรและบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

2. แยกดีเอ็นเอออกจากเซลล์อื่น

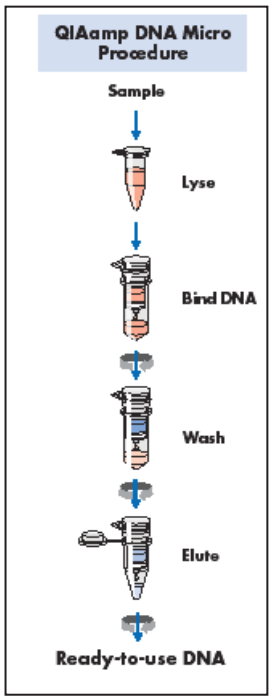
ถ่ายของเหลวดังกล่าวไปยัง QIAamp MinElute™ Columns นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 800 รอบต่อนาที นาน 1 นาที

3. ล้างคอลัมน์

เปลี่ยนหลอดรองคอลัมน์ใหม่ เติม AW1 buffer 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 800 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เติม AW2 buffer 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 800 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที

4. เก็บดีเอ็นเอ

เปลี่ยนคอลัมน์ไปยัง microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม AE buffer 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที นำตัวอย่างดีเอ็นเอ ที่ได้ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



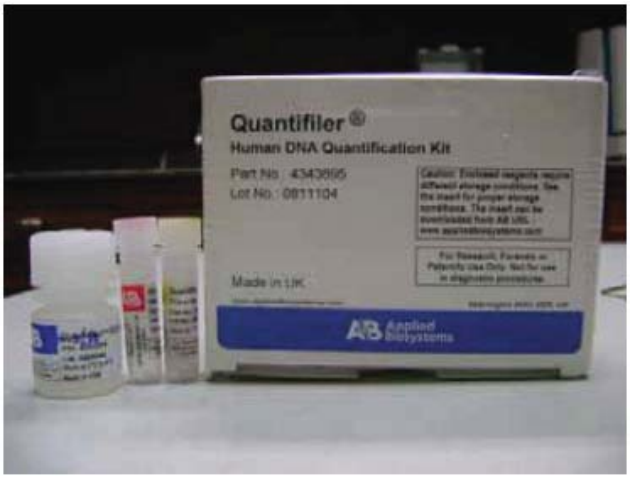
ภาพที่ 18 ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอด้วย QIAamp MinElute™ Columns

ที่มา: QIAGEN in Thailand**, QIAGEN QIAamp DNA micro kit** [Online], accessed 29 February 2012. available from http://www.qiagen.com/Products/GenomicDnaStabilization Purification / QIAampSystem/QIAampDNAMicroKit.aspx?r=1392

2.4 การวัดปริมาณดีเอ็นเอ

วัดปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยวิธี real-time PCR โดยใช้ชุดน้ำยาวัดปริมาณสำเร็จรูป Quantifiler® Human DNA Quantifiler Kit (Applied Biosystem, CA, USA) เตรียมน้ำยาตามคู่มือปฏิบัติการของหน่วยมนุษย์พันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล โดยเติม Quantifiler PCR Reaction Mix 6.25 ไมโครลิตร และ Quantifiler Human Primer Mix 5.25 ไมโครลิตร ลงใน 96 well-plate จากนั้นเติม Standard ตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดไว้ลงไปอย่างละ 1 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่อง 7500 Fast Real-Time PCR System และ

ใช้โปรแกรม 9600 Emulation บันทึกความเข้มข้นของดีเอ็นเอในหน่วยความเข้มข้นนาโนกรัมต่อไมโครลิตร



ภาพที่ 19 ชุดน้ำยาวัดปริมาณสำเร็จรูป Quantifiler® Human DNA Quantifiler Kit (Applied Biosystem, CA, USA)

ภาพที่ 20 เครื่อง 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystem, CA, USA)

2.5 การเพิ่มปริมาณและการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เลือกตัวอย่างดีเอ็นเอจำนวน 8 ตัวอย่าง จาก 20 ตัวอย่าง ที่สกัดได้จาก double swab ด้วยวิธี QIAamp® DNA Micro Kit โดยเลือกปริมาณ DNA ที่สูงที่สุดในแต่ละพื้นผิววัตถุ มาเพิ่มปริมาณโดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป AmpF*l*STR® Identifiler™ PCR Amplification Kit เตรียมน้ำยาตามคู่มือปฏิบัติการของหน่วยมนุษย์พันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล โดยเติม AmpF*l*STR® Identifiler ™ PCR Reaction Mix 5.25 ไมโครลิตร AmpF*l*STR ® Identifiler™ Primer Set 2.75 ไมโครลิตร และ AmpliTaq Gold DNA Polymerase 0.25 ไมโครลิตร ลงในหลอดสำหรับปฏิกิริยา PCR นำไปเขย่าวน และเติมตัวอย่างดีเอ็นเอลงไป 5 ไมโครลิตร แล้วนำไปเข้าเครื่อง GeneAmp® PCR System 9700 เพื่อดำเนินกระบวนการ PCR ตามสภาวะของเครื่องดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 สภาวะของเครื่องที่ใช้ในกระบวนการ PCR ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป AmpF*l*STR® Identifiler™ PCR Amplification Kit

Initial Incubation Step	Denature	Anneal	Extend	Final Extension	Final Step
HOLD	Cycle (28 Cycle)			HOLD	HOLD
95 °C	94 °C	59 °C	72 °C	60 °C	4-25 °C
11 นาที	1 นาที	1 นาที	1 นาที	60 นาที	∞

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ 1 ไมโครลิตร เติมรวมกับ Hi-di formamide 10 ไมโครลิตร และ GeneScan-500 LIZ size standard 0.5 ไมโครลิตร เขย่าวนแล้วนำไปให้ความร้อนที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง 3130 Genetic Analyzer เพื่อทำการวิเคราะห์หาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ด้วยวิธี capillary electrophoresis โดยประมวลผลด้วยโปรแกรม GeneMapper ID V.3.2 แล้วนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกันระหว่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มของอาสาสมัครกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากพื้นผิวสัมผัสของวัตถุแต่ละชนิด เพื่อเป็นการดูผลในด้านคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ พร้อมกับผลในด้านปริมาณ

ภาพที่ 21 เครื่อง GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystem, CA, USA)

ภาพที่ 22 เครื่อง 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, CA, USA)

บทที่ 4
ผลการทดลอง

จากการทดลองเมื่อนำตัวอย่างที่เก็บได้โดยวิธี double swab จากพื้นผิววัตถุทั้ง 4 ชนิดที่มีการสัมผัสมาทำการสกัดดีเอ็นเอ แล้วนำไปวัดปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดออกมาได้ นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกันเพื่อดูความแตกต่างในด้านปริมาณของดีเอ็นเอในแต่ละพื้นผิวของวัตถุ จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณ แล้วนำไปวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

1. ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากพื้นผิววัตถุ

อาสาสมัครจับวัตถุที่นำมาใช้ในการทดลองที่มีลักษณะพื้นผิวต่างกัน 4 ชนิดได้แก่ ลูกบิดประตู, ปลอกสวมด้ามจับรถจักรยานยนต์, ค้อนที่มีด้ามจับเป็นไม้ และอิฐบล็อก เป็นเวลา 1 นาที โดยไม่ล้างมือ แล้วทำการเก็บตัวอย่างเซลล์จากการสัมผัส เพื่อนำไปสกัดด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป QIAamp® DNA Micro Kit และวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี real-time PCR มีหน่วยความเข้มข้นเป็นนาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ng/µl) ได้ผลดังตารางที่ 7-8

ตารางที่ 7 ผลการวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี real-time PCR ของอาสาสมัครทั้ง 5 คน เก็บตัวอย่างครั้งที่ 1

อาสาสมัคร	DNA quantity (ng/µl) ครั้งที่ 1			
	ลูกบิดประตู	ปลอกสวมที่จับรถจักรยานยนต์	ค้อนที่มีด้ามจับเป็นไม้	อิฐบล็อก
1	0.0187	0.0213	0.0877	0.0073
2	0	0.218	0.038	0.0559
3	0.0887	0.1214	0.4493	0
4	0.0133	0.1088	0.0819	0.0037
5	0.0048	0.0191	0.1973	0

ตารางที่ 8 ผลการวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี real-time PCR ของอาสาสมัครทั้ง 5 คน เก็บตัวอย่างครั้งที่ 2

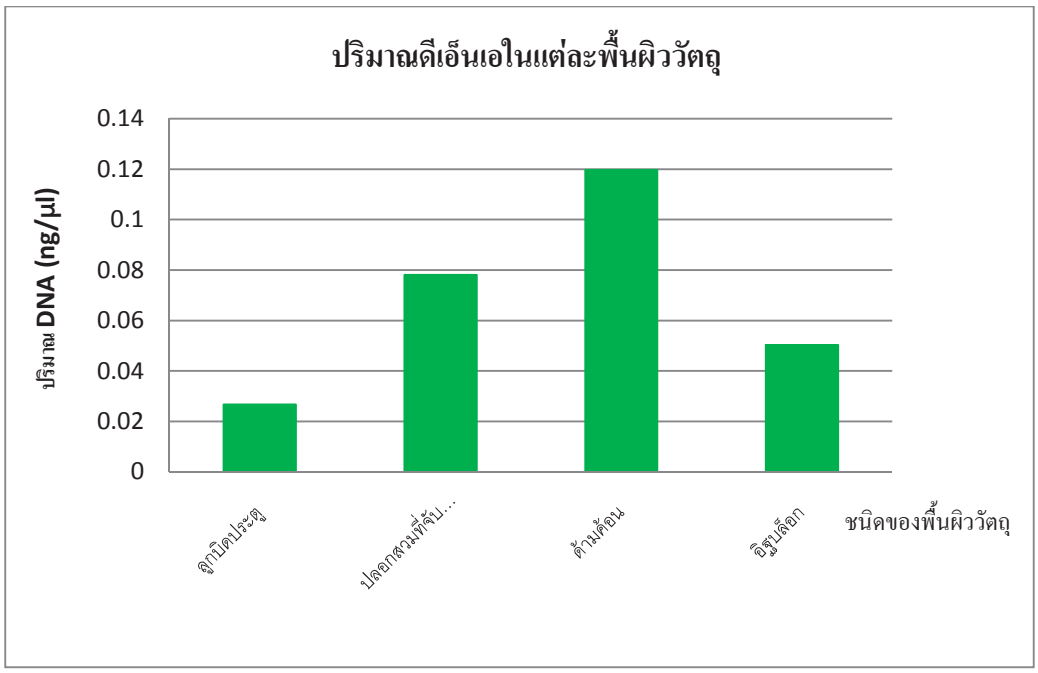
อาสาสมัคร	DNA quantity (ng/µl) ครั้งที่ 2			
	ลูกบิดประตู	ปลอกสวมที่จับรถจักรยานยนต์	ค้อนที่มีด้ามจับเป็นไม้	อิฐบล็อก
1	0.0139	0.2015	0.1284	0.0219
2	0.0157	0.0132	0.0759	0.1336
3	0.0832	0.0112	0.0248	0.1092
4	0.0076	0.049	0.1006	0.0308
5	0.0059	0.0174	0.0135	0.0159

เมื่อนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบด้วยค่าสถิติพื้นฐาน พบว่า ปริมาณดีเอ็นเอ จากด้ามจับของค้อน (ไม้) มีปริมาณมากที่สุด (เฉลี่ย = 0.1197 ng/µl, SD = 0.1275) โดยมากกว่าปริมาณดีเอ็นเอจากปลอกสวมด้ามจับรถจักรยานยนต์ (เฉลี่ย = 0.0780 ng/µl, SD =0.0799) ปริมาณดีเอ็นเอจากอิฐบล็อก (เฉลี่ย = 0.0503 ng/µl, SD =0.0475) และปริมาณดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดนั้นเป็นดีเอ็นเอที่ได้จากลูกบิดประตู (เฉลี่ย = 0.0268 ng/µl, SD =0.0325) ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ค่าสถิติพื้นฐานของปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากพื้นผิววัตถุ 4 ชนิด (ลูกบิดประตู, ปลอกสวมที่จับรถจักรยานยนต์, ด้ามจับของค้อนที่เป็นไม้, อิฐบล็อก)

Parameter	ลูกบิดประตู	ปลอกสวมด้ามจับ	ด้ามค้อน	อิฐบล็อก
Mean	0.0268	.078090	.119740	0.0503
Std. Deviation	.0325431	.0799605	.1275535	.0475340

ซึ่งเมื่อนำค่าที่ได้มาสร้างแผนภูมิแท่งจะสามารถเห็นความแตกต่างได้อย่างชัดเจนมากยิ่งขึ้น ดังแสดงในแผนภูมิที่ 2



แผนภูมิที่ 2 ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวัตถุที่มีพื้นผิวลักษณะต่างกัน โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป QIAamp® DNA Micro Kit จากการจับของอาสาสมัครทั้งหมด 5 คน

เมื่อนำผลปริมาณดีเอ็นเอที่วัดได้ไปเปรียบเทียบทางสถิติ โดยใช้สถิติ Paired t-test เปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในระดับ *P* value = 0.05 พบว่า ปริมาณดีเอ็นเอที่เก็บได้จากพื้นผิวของด้ามค้อน (ไม้) เปรียบเทียบกับปริมาณดีเอ็นเอที่เก็บได้จากพื้นผิวของลูกบิดประตู มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P* value = 0.028) แต่เมื่อเปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอที่เก็บได้จากพื้นผิวชนิดอื่นๆ พบว่า ปริมาณดีเอ็นเอที่เก็บได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ค่าสถิติ Paired T- test ในการเปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอจากพื้นผิววัตถุแต่ละชนิด

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 DOOR KNOB – MOTOR. GRIP CASE	-52.9230	89.52017	28.30876	-116.9619	11.1159	-1.869	9	.094
Pair 2 DOOR KNOB - HALVE	**-94.5840**	**114.23373**	**36.12388**	**-176.3019**	**-12.8661**	**-2.618**	**9**	**.028**
Pair 3 DOOR KNOB - BRICK	-12.6579	52.62558	16.64167	-50.3040	24.9882	-.761	9	.466
Pair 4 MOTOR. GRIP CASE - HALVE	-41.6610	138.09750	43.67026	-140.4500	57.1280	-.954	9	.365
Pair 5 MOTOR. GRIP CASE - BRICK	40.2651	101.69650	32.15926	-32.4842	113.0144	1.252	9	.242
Pair 6 HALVE - BRICK	81.9261	153.94632	48.68210	-28.2005	192.0527	1.683	9	.127

*เปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในระดับ P value < 0.05

2. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากพื้นผิววัตถุ

นำตัวอย่างดีเอ็นเอจำนวน 8 ตัวอย่างที่เก็บจากพื้นผิววัตถุทั้ง 4 ชนิดที่สกัดโดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป QIAamp® DNA Micro Kit และนำไปวัดปริมาณดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณและวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเทียบกับลายพิมพ์ดีเอ็นเออ้างอิงจากเยื่อบุกระพุ้งแก้ม พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากพื้นผิวของปลอกสวมด้ามจับรถจักรยานยนต์ สามารถพบแอลลีลทั้ง 16 ตำแหน่งของอาสาสมัครที่ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (full profile) และไม่พบลายพิมพ์ดีเอ็นเอแบบผสม (mixed profile) เกิดขึ้น

ตารางที่ 11 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากปลอกสวมที่จับรถจักรยานยนต์เทียบกับลายพิมพ์ดีเอ็นเออ้างอิง (เยื่อบุกระพุ้งแก้ม) ของอาสาสมัครหมายเลข 1

Locus name	ตำแหน่งดีเอ็นเออ้างอิง	ตำแหน่งดีเอ็นเอตัวอย่าง
D8S1179	12, 14	12, 14
D21S11	31	31
D7S820	9, 11	9, 11
CSF1PO	10, 12	10, 12
D3S1358	14, 16	14, 16
TH01	7, 9	7, 9
D13S317	9, 12	9, 12
D16S539	12	12
D2S1338	23, 24	23, 24
D19S433	14, 15.2	14, 15.2
vWA	14, 17	14, 17
TPOX	10	10
D18S51	16, 19	16, 19
D5S818	10, 11	10, 11
FGA	22, 24.2	22, 24.2
amelogenin	X, Y	X, Y

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากพื้นผิวของด้ามจับของค้อนที่เป็นไม้ พบตำแหน่งแอลลีลทั้ง 16 ตำแหน่ง แต่มีลักษณะเป็น mixed peofile

ตารางที่ 12 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากด้ามค้อนที่เป็นไม้เทียบกับลายพิมพ์ดีเอ็นเออ้างอิง (เยื่อบุกระพุ้งแก้ม) ของอาสาสมัครหมายเลข 1

Locus name	ตำแหน่งดีเอ็นเออ้างอิง	ตำแหน่งดีเอ็นเอ ตัวอย่าง	Major peck
D8S1179	12, 14	11, 12, 14	12, 14
D21S11	31	31	31
D7S820	9, 11	9, 11	9, 11
CSF1PO	10, 12	10, 12	10, 12
D3S1358	14, 16	14, 15, 16	14, 16
TH01	7, 9	7, 9	7, 9
D13S317	9, 12	9, 12	9, 12
D16S539	12	12	12
D2S1338	23, 24	23, 24	23, 24
D19S433	14, 15.2	14, 14.2, 15.2	14, 15.2
vWA	14, 17	14, 17	14, 17
TPOX	10	8, 10	10
D18S51	16, 19	16, 19	16, 19
D5S818	10, 11	10, 11	10, 11
FGA	22, 24.2	22, 24.2	22, 24.2
amelogenin	X, Y	X, Y	X, Y

ลายพิมพ์ดีเอ็นที่ได้จากพื้นผิวของอิฐบล็อก พบตำแหน่งแอลลีลเพียง 8 ตำแหน่ง ซึ่งถือว่าเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอแบบ Partial Profile

ตารางที่ 13 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากอิฐบล็อกเทียบกับลายพิมพ์ดีเอ็นเออ้างอิง (เยื่อบุกระพุ้งแก้ม) ของอาสาสมัครหมายเลข 2

Locus name	ตำแหน่งดีเอ็นเออ้างอิง	ตำแหน่งดีเอ็นเอตัวอย่าง
D8S1179	14, 15	14, 15
D21S11	29, 30.2	-
D7S820	8, 12	-
CSF1PO	10, 12	-
D3S1358	15	15
TH01	7, 9.3	7, 9.3
D13S317	12, 13	-
D16S539	9, 12	-
D2S1338	16, 20	-
D19S433	13, 14	13, 14
vWA	16, 19	16, 19
TPOX	11	11
D18S51	16, 18	-
D5S818	11	11
FGA	22	-
amelogenin	X, Y	X, Y

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากพื้นผิวของลูกบิดประตู พบตำแหน่งดีเอ็นเอเพียง 1 ตำแหน่ง เท่านั้น ซึ่งไม่เพียงพอในการสรุปว่าเป็นดีเอ็นเอที่ได้จากบุคคลคนเดียวกันเมื่อเทียบกับลายพิมพ์ดีเอ็นเออ้างอิงที่เก็บจากเยื่อบุกระพุ้งแก้ม

ตารางที่ 14 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากลูกบิดประตูเทียบกับลายพิมพ์ดีเอ็นเออ้างอิง (เยื่อบุกระพุ้งแก้ม) ของอาสาสมัครหมายเลข 2

Locus name	ตำแหน่งดีเอ็นเออ้างอิง	ตำแหน่งดีเอ็นเอตัวอย่าง
D8S1179	14, 15	-
D21S11	29, 30.2	-
D7S820	8, 12	-
CSF1PO	10, 12	-
D3S1358	15	15
TH01	7, 9.3	7
D13S317	12, 13	-
D16S539	9, 12	-
D2S1338	16, 20	-
D19S433	13, 14	-
vWA	16, 19	-
TPOX	11	-
D18S51	16, 18	-
D5S818	11	-
FGA	22	-
amelogenin	X, Y	-

บทที่ 5

อภิปรายผล สรุป และข้อเสนอแนะ

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาเปรียบเทียบดีเอ็นเอทั้งในด้านปริมาณและด้านคุณภาพ โดยเปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากพื้นผิววัตถุที่มีลักษณะแตกต่างกัน 4 ชนิดได้แก่ ลูกบิดประตู, ปลอกสวมด้ามจับรถจักรยานยนต์, ค้อนที่มีด้ามจับเป็นไม้ และอิฐบล็อก ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป QIAamp® DNA Micro Kit จากนั้นคัดเลือกดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เพื่อเปรียบเทียบคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้

1. อภิปรายผล

เมื่อพิจารณาด้านปริมาณและด้านคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้ผลแตกต่างกันนั้นเป็นผลมาจากลักษณะของพื้นผิววัตถุแต่ละชนิดมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน โดยเมื่อพิจารณาลักษณะพื้นผิวของด้ามจับของค้อนที่เป็นไม้ เป็นสารจากธรรมชาติ มีความแข็ง มีลักษณะพื้นผิวเป็นรูพรุน ไม่มีความมัน ทำให้ไม้นั้นมีคุณสมบัติในการดูดซับหรือทำให้เยื่อบุผิวหนังติดอยู่ได้ดีขึ้น จึงสามารถพบปริมาณดีเอ็นเอได้ในปริมาณที่มากกว่าพื้นผิวอื่นๆ แต่เมื่อดูด้านคุณภาพของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้กลับพบลักษณะของลายพิมพ์ดีเอ็นเอแบบ mixed profile ซึ่งอาจเป็นผลมากจากลักษณะพื้นผิวที่เป็นรูพรุนอีกเช่นกัน ที่ทำให้อาจพบดีเอ็นเอที่ติดมากับมือของอาสาสมัคร เนื่องจากไม่ได้มีการล้างมือก่อนการทดลอง

ลักษณะพื้นผิวของปลอกสวมที่จับรถจักยานยนต์ ซึ่งเป็นวัสดุสังเคราะห์ มีลักษณะพื้นผิวขรุขระ ไม่มีรูพรุน ไม่มีความมัน มีความยืดหยุ่น ฝืด มีความสามารถในการเกาะยึดเล็กน้อย (หนึบ) จากคุณสมบัติดังกล่าวทำให้พบปริมาณดีเอ็นเอได้ในปริมาณที่สามารถนำไปเพิ่มจำนวนและวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้

ลักษณะพื้นผิวของอิฐบล็อก เป็นวัสดุสังเคราะห์ มีลักษณะพื้นผิวขรุขระ หยาบ มีรูพรุน ไม่มีความมัน มีความแข็ง ทำให้เนื้อเยื่อสามารถเกาะติดได้ แต่ด้วยลักษณะพื้นผิวที่ขรุขระ

และหยาบ ทำให้มีความยากลำบากในขั้นตอนการเก็บตัวอย่างด้วยวิธี double swab ที่ใช้ไม้พันสำลีในการเช็ดเก็บ เพราะทำให้สำลีเป็นขุยมาก ดังนั้นปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จึงมีปริมาณที่น้อย และเมื่อพิจารณาลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ เป็นลักษณะ partial profile คือพบตำแหน่งของแอลลีล 8 ตำแหน่ง ซึ่งทั้ง 8 ตำแหน่งนั้นตรงกับลายพิมพ์ดีเอ็นเออ้างอิงที่ได้จากเยื่อบุกระพุ้งแก้มทั้งหมด

ลักษณะพื้นผิวของลูกบิดประตู เป็นวัสดุโลหะ พื้นผิวเรียบ ลื่น ไม่มีรูพรุน มีความมันวาว และมีความแข็ง ไม่มีการดูดซับทำให้เนื้อเยื่อเกาะติดได้น้อย เมื่อนำตัวอย่างมาสกัดแล้ววัดปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ จึงพบว่าปริมาณดีเอ็นเอที่ได้มีปริมาณที่น้อยที่สุด และจากเหตุผลข้างต้นเมื่อนำไปวิเคราะห์ลายพิมพ์ลายดีเอ็นเอจึงพบตำแหน่งของแอลลีลเพียง 1 ตำแหน่งซึ่งทำให้ไม่เพียงพอในการที่จะสรุปได้ว่าดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่เก็บจากพื้นผิววัตถุนั้นมาจากบุคคลเดียวกับตัวอย่างอ้างอิงจากเยื่อบุกระพุ้งแก้ม

ผลการวิจัยที่ได้ในครั้งนี้ มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ J. Daly, Dyan และคณะ (2012) ได้ทำการศึกษาเรื่อง “The transfer of touch DNA from hands to glass, fabric and wood” พบว่า ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากพื้นผิวไม้นั้นมีมากกว่าปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากพื้นผิวชนิดอื่น แต่มีความแตกต่างกันที่วิธีการเก็บตัวอย่างเนื่องจากงานวิจัยของ J. Daly, Dyan และคณะ นั้นทำการเก็บตัวอย่างด้วยวิธี tape-lifting นอกจากนี้ ยังสอดคล้องกันในด้านคุณภาพที่สามารถพบลายพิมพ์ดีเอ็นเอในลักษณะ mixed profile ได้ จาก secondary transfer หรือการที่อาสาสมัครไม่ได้ทำการล้างมือก่อนการจับวัตถุ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ Pesaresi, M. และคณะ (2003) ที่ทำการศึกษาเรื่อง “Qualitative and quantitative analysis of DNA recovered from fingerprints” เช่นกัน

2. สรุปผลการทดลอง

2.1 เปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอที่เก็บได้จากพื้นผิววัตถุ

เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้แล้วไปวัดปริมาณด้วยวิธี real-time PCR โดยมีหน่วยความเข้มข้นเป็นนาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ng/µl) แล้วนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกัน พบว่าปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากด้ามจับของค้อนที่มีลักษณะเป็นพื้นไม้นั้นมีปริมาณที่มากที่สุด ซึ่งมีมากกว่าปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากปลอกสวมที่จับรถจักรยานยนต์ และจากอิฐบล็อก โดยปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากลูกบิดประตูนั้นมีปริมาณที่น้อยที่สุด

2.2 เปรียบเทียบคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้

นำผลการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่สกัดดีเอ็นเอได้ เปรียบเทียบกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอเยื่อบุกระพุ้งแก้ม ก็พบลักษณะและจำนวนของตำแหน่งแอลลีลที่แตกต่างกันโดย ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากปลอกสามด้ามจับรถจักรยานยนต์นั้นพบตำแหน่งแอลลีลครบทั้ง 16 ตำแหน่ง (full profile) ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากพื้นผิวของด้ามจับของค้อนที่มีลักษณะเป็นไม้ พบลายพิมพ์ดีเอ็นเอในลักษณะ mixed profile ส่วนลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จากอิฐบล็อกนั้น พบลายพิมพ์ดีเอ็นเอในลักษณะ partial profile โดยพบตำแหน่งของแอลลีล 8 ตำแหน่ง และลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากพื้นผิวของลูกบิดประตู พบตำแหน่งของแอลลีลเพียง 1 ตำแหน่งเท่านั้น ซึ่งไม่เพียงพอในการสรุปว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอนั้นได้มาจากบุคคลคนเดียวกันกับลายพิมพ์ดีเอ็นเออ้างอิงที่ได้จากเยื่อบุกระพุ้งแก้ม

ในการศึกษานี้ แสดงให้เห็นว่า ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากพื้นผิวที่มีลักษณะต่างกัน จะพบลักษณะที่แตกต่างกัน ในด้านปริมาณที่พบจะได้ปริมาณดีเอ็นเอที่มากหรือน้อยนั้นขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของแต่ละวัตถุ ในด้านคุณภาพ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากตัวอย่างจะสามารถพบในแบบใด นอกจากจะอยู่ที่คุณสมบัติของวัตถุแล้ว วิธีการเก็บตัวอย่างก็สำคัญเช่น พื้นผิวของอิฐบล็อก หรือโลหะ อาจทำการเก็บโดยการใช้เทป หรือการ stub ลงบนพื้นผิวตัวอย่าง เป็นต้น ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำไปประยุกต์หรือเป็นข้อมูลในการคัดเลือกหรือตัดสินใจที่จะดำเนินการกับวัตถุพยานที่ตรวจพบในสถานที่เกิดเหตุต่างๆ ได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการหาตัวผู้กระทำความผิด หรือยืนยันความบริสุทธิ์ของผู้ถูกกล่าวหา ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งในกระบวนการยุติธรรมต่อไป

3.ข้อควรระวัง

1. ในการเก็บตัวอย่างจากพื้นผิวของอิฐบล็อกด้วยไม้พันสำลี ต้องใช้ความระมัดระวังเป็นอย่างมาก เนื่องจากสำลีจะเป็นขุยได้ถ้ากดหรือถูไม้พันสำลีกับพื้นผิวอิฐบล็อกแรง ๆ

2. ในการทดลองให้อาสาสมัครจับด้ามค้อน ควรควบคุมไม่ให้อาสาสมัครสัมผัสกับผู้อื่นหรือวัตถุที่อาจพบการปนเปื้อนดีเอ็นเออื่น ๆ ได้

4. ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะพื้นผิวชนิดอื่นๆ เพิ่มเติม เช่น ผ้าชนิดต่างๆ แก้ว เป็นต้น

2. ควรมีการเลือกหรือคิดวิธีการเก็บตัวอย่างอื่นๆ มาศึกษา เพื่อให้ได้วิธีการเก็บตัวอย่างที่เหมาะสมกับลักษณะพื้นผิว

3. ควรมีการศึกษาปัจจัยด้านอื่นๆ ที่มีผลต่อปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้จากวัตถุตัวอย่าง เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาต่อไป

บรรณานุกรม

ภาษาไทย

กองบัญชาการตำรวจนครบาล. **ข้อมูลรายงานสถิติผลการป้องกันปราบปรามอาชญากรรมของกองบัญชาการตำรวจนครบาล**. เข้าถึงเมื่อ 15 กุมภาพันธ์ 2554. เข้าถึงได้จาก http://www.thaimetropolice.com/index.ph

อรรถพล แช่มสุวรรณวงศ์ และคณะ. **นิติวิทยาศาสตร์ เพื่อการสืบสวนสอบสวน เล่ม 1**. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: บริษัท ทีซีจี พริ้นติ้ง จำกัด, 2546

อุทัยพิบูลย์ ชัยรัตน์, ชีววิวรรธน์ นำชัย และ ดำรงชัย นเรศ. **ดีเอ็นเอ ปริศนาลับรหัสชีวิต**. กรุงเทพฯ: ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, 2003

ภาษาต่างประเทศ

Alessandrini, Federica et al. “Fingerprints as Evidence for a Genetic Profile: Morphological Study on Fingerprints and Analysis of Exogenous and Individual Factors Affecting.” **Journal Forensic Sciences** 48 (2003): 586–592.

Butler, John M. **Forensic DNA Typing**. 2nd ed. Oxford : Elsevier, 2005.

Daly, Dyan J, Charlotte Murphy, and Sean D. McDermott. “The transfer of touch DNA from hands to glass, fabric and wood.” **Forensic Science International: Genetics** 6 (2012): 41–46.

Djuric, Marija et al. “DNA typing from handled items.” **Forensic Science International: Genetics Supplement Series** 1 (2008): 411–412.

Kita, Toshiro et al. “Morphological study of fragmented DNA on touched objects.” **Forensic Science International: Genetics** 3 (2008): 32-36.

Kittisak Slrichantrawong et al. “DNA Retrieval on Flip-Flops.” M.Sc. Dissertation, Mahidol University, 2011.

Pang, B.C.M., and B.K.K. Cheung. “Double swab technique for collecting touched evidence.” **Legal Medicine** 9 (2007): 181–184.

Pesaresi, M. et al. “Qualitative and quantitative analysis of DNA recovered from fingerprints.” **International Congress Series** 1239 (2003): 947– 951.

Sweet, David et al. “An Improved Method to Recover Saliva from Human Skin: The Double Swab Technique.” **Journal Forensic Science** 42 (1997): 320-322.

Weissensteiner, Thomas et al. **PCR technology : current innovations**. Florida : CRC Press LLC, 2004.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

เอกสารรับรองการทำวิจัยในคน เอกสารชี้แจงข้อมูล และหนังสือยินยอม

เอกสารรับรองการทำวิจัยในคน

คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล
๒๗๐ ถนนพระราม ๖ แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี กทม. ๑๐๔๐๐
โทร. ๐-๒๓๕๔-๗๒๗๕, ๐-๒๒๐๑-๑๒๙๖ โทรสาร ๐-๒๓๕๔-๗๒๓๓
Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University
270 Rama VI Road, Ratchathewi, Bangkok 10400, Thailand
Tel. (+66) 2354-7275, (+66) 2201-1296 Fax (+66) 2354-7233

เอกสารรับรองโดยคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน
คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี
มหาวิทยาลัยมหิดล

เลขที่ ๒๕๕๔/๓๙๕

ชื่อโครงการ	การเก็บกู้ดีเอ็นเอจากพื้นผิวสัมผัส
เลขที่โครงการ/รหัส	ID ๐๙ – ๕๔ – ๑๖ ว
ชื่อหัวหน้าโครงการ	นางสาวศศิธร พรหมวัลย์
สถานศึกษา	ภาควิชานิติวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

ขอรับรองว่าโครงการดังกล่าวข้างต้นได้ผ่านการพิจารณาเห็นชอบโดยสอดคล้องกับแนวปฏิญญาเฮลซิงกิ จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี

ลงนาม
กรรมการและเลขานุการจริยธรรมการวิจัยในคน .....
(ศาสตราจารย์ แพทย์หญิงควงฤดี วัฒนศิริชัยกุล)

ลงนาม
ประธานกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน .....
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์บุญส่ง องค์พิพัฒนกุล)

วันที่รับรอง ๑๗ สิงหาคม ๒๕๕๔

คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล
๒๗๐ ถนนพระราม ๖ แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี กทม. ๑๐๔๐๐
โทร. ๐-๒๒๐๔-๑๒๗๕, ๐-๒๒๐๑-๑๒๙๖ โทรสาร ๐-๒๒๐๔-๑๒๓๓
Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University
270 Rama VI Road, Ratchathewi, Bangkok 10400, Thailand
Tel. (+66) 2354-7275, (+66) 2201-1296 Fax (+66) 2354-7233

Documentary Proof of Ethical Clearance
Committee on Human Rights Related to Research Involving Human Subjects
Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University

No. MURA2011/389

Title of Project	DNA Recovery from Touched Surfaces
Protocol Number	ID 08 – 54 – 16
Principal Investigator	Miss Sasithorn Promwan
Education Address	Department of Forensic Science Faculty of Science Silpakorn University

The aforementioned project has been reviewed and approved by the Committee on Human Rights Related to Research Involving Human Subjects, based on the Declaration of Helsinki.

Signature of Secretary Committee on Human Rights Related to Research Involving Human Subjects	..... Prof. Duangrurdee Wattanasirichaigoon, M.D.
Signature of Chairman Committee on Human Rights Related to Research Involving Human Subjects	..... Prof. Boonsong Ongphiphadhanakul, M.D.
Date of Approval	August 17, 2011

เอกสารชี้แจงข้อมูล/คำแนะนำแก่ผู้เข้าร่วมการวิจัย

(Patient/Participant Information Sheet)

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การเก็บกู้ดีเอ็นเอจากพื้นผิวสัมผัส

(ภาษาอังกฤษ) DNA Recovery from Touched Surfaces

ชื่อผู้วิจัย นางสาวศศิธร พรหมวัลย์

สถานที่วิจัย หน่วยมนุษย์พันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล และคณะนิติวิทยาศาสตร์ โรงเรียนนายร้อยตำรวจสามพราน

บุคคลและวิธีการติดต่อเมื่อมีเหตุฉุกเฉินหรือความผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

รศ.ดร.บุษบา	ฤกษ์อำนวยโชค	หมายเลขโทรศัพท์	081-1800339
รศ.พ.ต.อ. สันติ์	สุขวัจน์	หมายเลขโทรศัพท์	089-4974882

ความเป็นมาของโครงการ

ปัจจุบันการดำเนินชีวิตของคนส่วนใหญ่โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ที่อยู่ในเมืองใหญ่มีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมค่อนข้างมาก บางคนต้องตื่นแต่เช้าเดินทางไปทำงานอย่างรีบเร่ง กลับถึงบ้านก็ค่ำมืดดึกดื่น อีกทั้งเศรษฐกิจในปัจจุบันค่าครองชีพสูงขึ้น มีผู้ตกงานมากขึ้น ประกอบกับสภาพอากาศที่แปรปรวน ส่งผลให้ภาคการเกษตรมีปัญหาด้านการสร้างผลผลิต ทำให้ผู้คนหลั่งไหลเข้ามาอาศัยอยู่ในเมืองเพิ่มขึ้นอีก ทั้งหมดนี้ล้วนเป็นปัจจัยที่ทำให้สังคมเกิดมิจฉาชีพและอาชญากรรม ซึ่งส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิต ความปลอดภัยในชีวิตและทรัพย์สิน จากสถิติการรายงานผลการป้องกันและปราบปรามอาชญากรรมของกองบัญชาการตำรวจนครบาล (บช.น.) ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2552 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2553 พบว่า ในกลุ่มคดีชีวิต ร่างกาย และเพศนั้น การทำร้ายร่างกาย มีการรับแจ้งเหตุ 3,771 คดี จับได้ 1,780 คดี ในกลุ่มคดีประทุษร้ายต่อทรัพย์ ปล้นทรัพย์ รับแจ้ง 72 คดี จับได้ 44 คดี ชิงทรัพย์ รับแจ้ง 274 คดี จับได้ 175 คดี ลักทรัพย์ รับแจ้ง 12,974 คดี จับได้ 3,350 คดี ในกลุ่มคดีที่น่าสนใจ โจรกรรมรถจักรยานยนต์ รับแจ้ง 5,870 คดี จับได้ 333 คดี ลักทรัพย์ในเคหสถาน รับแจ้ง 2,160 คดี จับได้ 700 คดี ซึ่งจากสถิติดังกล่าว จะเห็นได้ว่าในกลุ่มลักทรัพย์ การโจรกรรมรถนั้นมีการแจ้งเหตุสูงมาก แต่ผลการจับกุมผู้กระทำผิดนั้นมี

จำนวนน้อยกว่า 2-3 เท่าตัว ซึ่งปัจจัยที่อาจเข้ามามีส่วนทำให้จับกุมผู้กระทำผิดได้น้อยนั้น มีหลายประการ เช่น ขาดหลักฐานที่เชื่อมโยงไปสู่ตัวผู้กระทำความผิด เจ้าหน้าที่ไม่สามารถเก็บวัตถุพยานที่พบได้ในสถานที่เกิดเหตุได้ หรือ เก็บวัตถุพยานได้ไม่ครบถ้วน ขาดผู้ชำนาญในการเก็บตัวอย่าง รวมถึงขั้นตอนวิธีการต่าง ๆ ในกระบวนการตรวจวิเคราะห์ไม่เหมาะสมกับตัวอย่างที่ได้ เป็นต้น เมื่อเกิดคดีอาชญากรรมขึ้นคดีหนึ่ง สิ่งที่สำคัญที่มีส่วนช่วยในการนำไปหาตัวผู้กระทำผิด คือ พยานหลักฐาน และมีหลายคดีที่ไม่สามารถตรวจพบวัตถุพยานในสถานที่เกิดเหตุได้มากพอ แต่เมื่อพิจารณาถึงขั้นตอน กิจกรรมที่ผู้กระทำผิดปฏิบัติ เช่นในคดีลักทรัพย์ นับตั้งแต่ผู้กระทำผิดเริ่มเข้าสู่เคหสถานที่อาจจะต้องมีการปีนกำแพง งัดแงะประตู จนกระทั่งนำสิ่งของมีค่ากลับออกไป พบว่า ผู้กระทำผิดอาจมีการจับต้องหรือสัมผัสวัตถุต่างๆ ในสถานที่เกิดเหตุได้ ดังนั้นโอกาสที่จะพบร่องรอยจากการสัมผัสวัตถุดังกล่าวจึงมีได้เช่นกัน

จากความก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีในปัจจุบัน ทำให้มีการค้นพบและพัฒนาเทคนิคใหม่ ที่ใช้ตรวจพิสูจน์วัตถุพยานได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น เช่น การตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอ ซึ่งมีความจำเพาะต่อตัวบุคคลมาก และเมื่อไม่กี่ปีที่ผ่านมา ในวารสารงานวิจัยของต่างประเทศมีการศึกษาโดยนำวัตถุที่เชื่อว่ามีการสัมผัสจากบุคคล มาทดสอบหาดีเอ็นเอ ได้ประสบความสำเร็จ และมีการศึกษาในหลายๆ ด้าน แต่สำหรับในประเทศไทยการศึกษาในเรื่องนี้ยังมีอยู่น้อยมาก และยังไม่เป็นการตรวจวิเคราะห์ที่แพร่หลาย

ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาเกี่ยวกับการเก็บกู้ดีเอ็นเอจากวัตถุที่ถูกสัมผัสที่มีลักษณะพื้นผิวแตกต่างกัน เพื่อเป็นทางเลือกหนึ่งในการติดตามผู้กระทำผิดให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบเกี่ยวกับปริมาณของดีเอ็นเอ ที่พบบนพื้นผิวที่มีลักษณะแตกต่างกัน
2. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ที่พบบนพื้นผิวที่มีลักษณะแตกต่างกัน

รายละเอียดที่จะปฏิบัติต่อผู้เข้าร่วมการวิจัย

เก็บเยื่อบุกระพุ้งแก้มและเยื่อบุผิวหนังของอาสาสมัครก่อนการทดลอง และระหว่างการทดลอง

ประโยชน์และผลข้างเคียงที่จะเกิดแก่ผู้เข้าร่วมการวิจัย

เพื่อเป็นแนวทางในการเลือกวิธีการสกัดดีเอ็นเอ จากวัตถุพยานที่พบในที่เกิดเหตุได้อย่างเหมาะสม

สำหรับผลข้างเคียงที่จะเกิดกับผู้เข้าร่วมวิจัยนั้น ไม่มี

การเก็บข้อมูลเป็นความลับ ผู้วิจัยจะไม่เปิดเผยข้อมูลส่วนตัวของผู้เข้าร่วมวิจัย นอกจากจะได้รับอนุญาต

หนังสือยินยอมโดยได้รับการบอกกล่าวและเต็มใจ

(Informed Consent Form)

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การเก็บกู้ดีเอ็นเอ จากพื้นผิวสัมผัส

(ภาษาอังกฤษ) DNA Recovery from Touched Surfaces

ชื่อผู้วิจัย นางสาวศศิธร พรหมวัลย์

*ชื่อผู้เข้าร่วมการวิจัย .....

อายุ .....

คำยินยอมของผู้เข้าร่วมการวิจัย

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว ..... ได้ทราบรายละเอียดของโครงการวิจัยตลอดจนประโยชน์ และข้อเสี่ยงที่จะเกิดขึ้นต่อข้าพเจ้าจากผู้วิจัยแล้วอย่างชัดเจน ไม่มีสิ่งใดปิดบังซ่อนเร้นและยินยอมให้ทำการวิจัยในโครงการที่มีชื่อข้างต้น และข้าพเจ้ารู้ว่าถ้ามีปัญหาหรือข้อสงสัยเกิดขึ้นข้าพเจ้าสามารถสอบถามผู้วิจัยได้ และข้าพเจ้าสามารถไม่เข้าร่วมโครงการวิจัยนี้เมื่อใดก็ได้ โดยไม่มีผลกระทบต่อการรักษาที่ข้าพเจ้าพึงได้รับ นอกจากนี้ผู้วิจัยจะเก็บข้อมูลเฉพาะเกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าเป็นความลับและจะเปิดเผยได้เฉพาะในรูปที่เป็นสรุปผลการวิจัย การเปิดเผยข้อมูลเกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าต่อหน่วยงานต่างๆที่เกี่ยวข้องกระทำได้เฉพาะกรณีจำเป็นด้วยเหตุผลทางวิชาการเท่านั้น

ลงชื่อ.....(ผู้เข้าร่วมการวิจัย)

.....(พยาน)

.....(พยาน)

วันที่ .....

คำอธิบายผู้วิจัย

ข้าพเจ้าได้อธิบายรายละเอียดของโครงการ ตลอดจนประโยชน์ของการวิจัย รวมทั้งข้อเสี่ยงที่อาจจะเกิดขึ้นแก่ผู้เข้าร่วมการวิจัยทราบแล้วอย่างชัดเจนโดยไม่มีสิ่งใดปิดบังซ่อนเร้น

ลงชื่อ.....(ผู้วิจัย)

วันที่.....

หมายเหตุ : กรณีผู้เข้าร่วมการวิจัยไม่สามารถอ่านหนังสือได้ ให้ผู้วิจัยอ่านข้อความในหนังสือยินยอมฯ นี้ให้แก่ผู้เข้าร่วมการวิจัยฟังจนเข้าใจดีแล้ว และให้ผู้เข้าร่วมการวิจัยลงนามหรือพิมพ์ลายนิ้วหัวแม่มือรับทราบในการให้ความยินยอมดังกล่าวข้างต้นไว้ด้วย

* ผู้เข้าร่วมการวิจัย หมายถึง ผู้ยินยอมตนให้ทำวิจัย

ภาคผนวก ข

ผลการทดลองการวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี real-time PCR และลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

Standard Curve Information

Detector Name	Slope	Intercept	R2	Standards	Unknowns
Quantifiler	-2.746309	27.488213	0.986660	8	36

Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Quantity	Mean Qty	StdDev Qty	Filtered	User Defined #1 Tm
A1	std1	Quantifiler	Standard	22.9505		50				
A1	std1	IPC	Unknown	39.3784						
A2	std2	Quantifiler	Standard	23.6446		16.7				
A2	std2	IPC	Unknown	28.5518						
A3	std3	Quantifiler	Standard	25.186		5.56				
A3	std3	IPC	Unknown	27.0205						
A4	std4	Quantifiler	Standard	27.35		1.85				
A4	std4	IPC	Unknown	26.6248						
A5	std5	Quantifiler	Standard	28.4389		0.62				
A5	std5	IPC	Unknown	26.8933						
A6	std6	Quantifiler	Standard	29.4262		0.21				
A6	std6	IPC	Unknown	26.4561						
A7	std7	Quantifiler	Standard	30.3103		0.068				
A7	std7	IPC	Unknown	26.4531						
A8	std8	Quantifiler	Standard	31.9324		0.023				
A8	std8	IPC	Unknown	26.2088						
A9	Pos Cont	Quantifiler	Unknown	29.6994		0.156622				
A9	Pos Cont	IPC	Unknown	26.1648						
D6	FB1	Quantifiler	Unknown	Undet.						
D6	FB1	IPC	Unknown	26.1167						
D7	FB2	Quantifiler	Unknown	Undet.						
D7	FB2	IPC	Unknown	26.1591						
D8	FB3	Quantifiler	Unknown	35.2557		0.00148475				
D8	FB3	IPC	Unknown	26.19						
D9	FH1	Quantifiler	Unknown	35.0429		0.00177478				
D9	FH1	IPC	Unknown	25.5567						
D10	FH2	Quantifiler	Unknown	Undet.						
D10	FH2	IPC	Unknown	25.8962						
D11	FH3	Quantifiler	Unknown	32.105		0.0208409				

D11	FH3	IPC	Unknown	25.9154	
D12	FK1	Quantifiler	Unknown	Undet.	
D12	FK1	IPC	Unknown	26.144	
E1	FK2	Quantifiler	Unknown	Undet.	
E1	FK2	IPC	Unknown	26.3947	
E2	FK3	Quantifiler	Unknown	35.1188	0.00166533
E2	FK3	IPC	Unknown	26.125	
E3	FM1	Quantifiler	Unknown	35.5724	0.00113852
E3	FM1	IPC	Unknown	26.2493	
E4	FM2	Quantifiler	Unknown	Undet.	
E4	FM2	IPC	Unknown	26.2224	
E5	FM3	Quantifiler	Unknown	36.0786	7.44766e-004
E5	FM3	IPC	Unknown	26.1834	
E6	AB1	Quantifiler	Unknown	Undet.	
E6	AB1	IPC	Unknown	26.0582	
E7	AB2	Quantifiler	Unknown	Undet.	
E7	AB2	IPC	Unknown	26.1553	
E8	AB3	Quantifiler	Unknown	Undet.	
E8	AB3	IPC	Unknown	26.034	
E9	AH1	Quantifiler	Unknown	Undet.	
E9	AH1	IPC	Unknown	26.1125	
E10	AH2	Quantifiler	Unknown	Undet.	
E10	AH2	IPC	Unknown	26.0661	
E11	AH3	Quantifiler	Unknown	33.7394	0.00529416
E11	AH3	IPC	Unknown	26.2126	
E12	AK1	Quantifiler	Unknown	Undet.	
E12	AK1	IPC	Unknown	26.1667	
F1	AK2	Quantifiler	Unknown	Undet.	
F1	AK2	IPC	Unknown	26.3254	
F2	AK3	Quantifiler	Unknown	Undet.	
F2	AK3	IPC	Unknown	26.161	
F3	AM1	Quantifiler	Unknown	34.4612	0.00289046
F3	AM1	IPC	Unknown	26.218	
F4	AM2	Quantifiler	Unknown	32.79	0.0117346
F4	AM2	IPC	Unknown	26.0075	
F5	AM3	Quantifiler	Unknown	Undet.	
F5	AM3	IPC	Unknown	26.196	

Standard Curve Information

Detector Name	Slope	Intercept	R2	Standards	Unknowns
Quantifiler	-3.064582	26.034729	0.995228	8	23

Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Quantity	Mean Qty	StdDev Qty	Filtered	User Defined #1 Tm
A1	STD1	Quantifiler	Standard	20.9281		50				
A1	STD1	IPC	Unknown	31.8339						
A2	STD2	Quantifiler	Standard	22.1633		16.7				
A2	STD2	IPC	Unknown	25.0199						
A3	STD3	Quantifiler	Standard	23.5916		5.56				
A3	STD3	IPC	Unknown	24.1107						
A4	STD4	Quantifiler	Standard	25.1716		1.85				
A4	STD4	IPC	Unknown	24.3956						
A5	STD5	Quantifiler	Standard	26.8819		0.62				
A5	STD5	IPC	Unknown	24.5303						
A6	STD6	Quantifiler	Standard	28.0971		0.21				
A6	STD6	IPC	Unknown	24.1742						
A7	STD7	Quantifiler	Standard	30.036		0.068				
A7	STD7	IPC	Unknown	24.1043						
A8	STD8	Quantifiler	Standard	30.6641		0.023				
A8	STD8	IPC	Unknown	24.1996						
A9	TK1	IPC	Unknown	24.1297						
A9	TK1	Quantifiler	Unknown	31.3289		0.0187269				
A10	TK2	IPC	Unknown	24.0499						
A10	TK2	Quantifiler	Unknown	Undet.						
A11	TK3	IPC	Unknown	24.1459						
A11	TK3	Quantifiler	Unknown	29.2588		0.0887048				
A12	TK4	IPC	Unknown	24.2563						
A12	TK4	Quantifiler	Unknown	31.7865		0.0132788				
B1	TK5	Quantifiler	Unknown	33.1436		0.00478983				
B1	TK5	IPC	Unknown	24.4955						
B2	TM1	Quantifiler	Unknown	31.1547		0.0213464				
B2	TM1	IPC	Unknown	24.6542						
B3	TM2	Quantifiler	Unknown	28.0619		0.218033				

B3	TM2	IPC	Unknown	24.2721	
B4	TM3	Quantifiler	Unknown	28.8412	0.121404
B4	TM3	IPC	Unknown	24.2943	
B5	TM4	Quantifiler	Unknown	28.9872	0.108791
B5	TM4	IPC	Unknown	24.2345	
B6	TM5	Quantifiler	Unknown	31.3048	0.0190688
B6	TM5	IPC	Unknown	24.0426	
B7	TH1	Quantifiler	Unknown	29.2739	0.0877029
B7	TH1	IPC	Unknown	24.0468	
B8	TH2	Quantifiler	Unknown	30.3887	0.0379537
B8	TH2	IPC	Unknown	24.0292	
B9	TH3	Quantifiler	Unknown	27.0994	0.449347
B9	TH3	IPC	Unknown	23.9738	
B10	TH4	Quantifiler	Unknown	29.3649	0.0819071
B10	TH4	IPC	Unknown	23.844	
B11	TH5	Quantifiler	Unknown	28.1949	0.197291
B11	TH5	IPC	Unknown	23.5782	
B12	TB1	Quantifiler	Unknown	32.5765	0.00733441
B12	TB1	IPC	Unknown	24.1413	
C1	TB2	Quantifiler	Unknown	29.8724	0.0559395
C1	TB2	IPC	Unknown	24.5018	
C2	TB3	Quantifiler	Unknown	Undet.	
C2	TB3	IPC	Unknown	24.2177	
C3	TB4	Quantifiler	Unknown	33.4908	0.00368981
C3	TB4	IPC	Unknown	24.1134	
C4	TB5	Quantifiler	Unknown	Undet.	
C4	TB5	IPC	Unknown	23.9996	
D11	Pos Cont	Quantifiler	Unknown	28.1221	0.208392
D11	Pos Cont	IPC	Unknown	23.7677	
D12	Neg Cont	Quantifiler	Unknown	Undet.	
D12	Neg Cont	IPC	Unknown	23.6409	

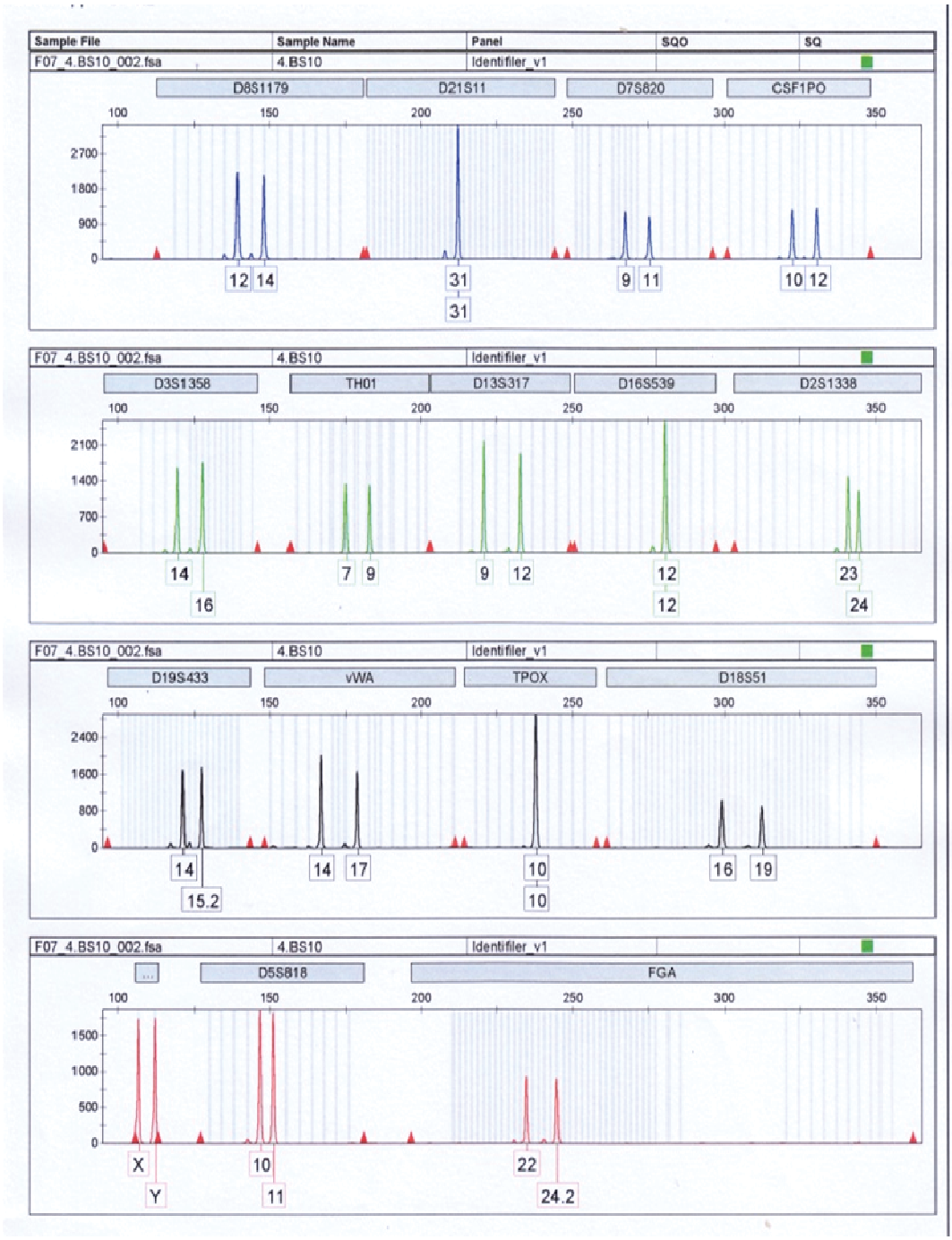
Standard Curve Information

Detector Name	Slope	Intercept	R2	Standards	Unknowns
Quantifiler	-3.389533	27.849974	0.997721	8	23

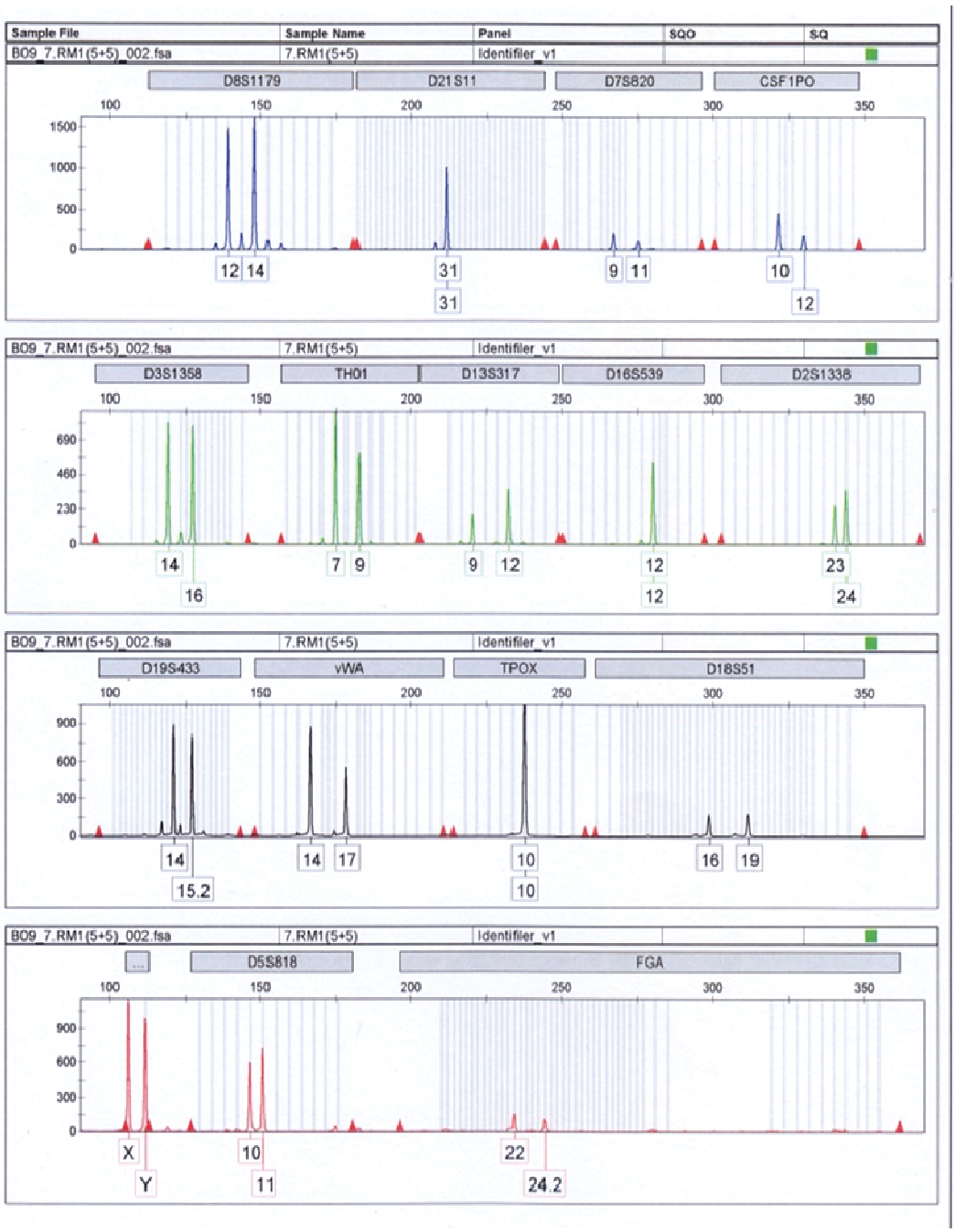
Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Quantity	Mean Qty	StdDev Qty	Filtered	User Defined #1 Tm
E1	STD1	Quantifiler	Standard	22.1354		50				
E1	STD1	IPC	Unknown	34.9992						
E2	STD2	Quantifiler	Standard	23.6243		16.7				
E2	STD2	IPC	Unknown	27.7582						
E3	STD3	Quantifiler	Standard	25.3509		5.56				
E3	STD3	IPC	Unknown	26.7857						
E4	STD4	Quantifiler	Standard	27.0981		1.85				
E4	STD4	IPC	Unknown	26.4739						
E5	STD5	Quantifiler	Standard	28.6409		0.62				
E5	STD5	IPC	Unknown	26.3996						
E6	STD6	Quantifiler	Standard	29.7212		0.21				
E6	STD6	IPC	Unknown	26.3283						
E7	STD7	Quantifiler	Standard	31.8367		0.068				
E7	STD7	IPC	Unknown	26.3877						
E8	STD8	Quantifiler	Standard	33.5693		0.023				
E8	STD8	IPC	Unknown	26.3438						
E9	RK1	Quantifiler	Unknown	34.1399		0.0139416				
E9	RK1	IPC	Unknown	26.2562						
E10	RK2	Quantifiler	Unknown	33.9694		0.0156534				
E10	RK2	IPC	Unknown	26.3345						
E11	RK3	Quantifiler	Unknown	31.5111		0.0831516				
E11	RK3	IPC	Unknown	26.3065						
E12	RK4	Quantifiler	Unknown	35.0411		0.00755838				
E12	RK4	IPC	Unknown	26.5647						
F1	RK5	Quantifiler	Unknown	35.3965		0.00593717				
F1	RK5	IPC	Unknown	27.1328						
F2	RM1	Quantifiler	Unknown	30.2084		0.201467				
F2	RM1	IPC	Unknown	27.0076						
F3	RM2	Quantifiler	Unknown	34.2156		0.0132427				

F3	RM2	IPC	Unknown	26.6696	
F4	RM3	Quantifiler	Unknown	34.4604	0.0112138
F4	RM3	IPC	Unknown	26.5606	
F5	RM4	Quantifiler	Unknown	32.2908	0.0489612
F5	RM4	IPC	Unknown	26.5648	
F6	RM5	Quantifiler	Unknown	33.8109	0.017433
F6	RM5	IPC	Unknown	26.5206	
F7	RH1	Quantifiler	Unknown	30.8706	0.128482
F7	RH1	IPC	Unknown	26.4648	
F8	RH2	Quantifiler	Unknown	31.6444	0.0759524
F8	RH2	IPC	Unknown	26.391	
F9	RH3	Quantifiler	Unknown	33.2899	0.0248355
F9	RH3	IPC	Unknown	26.3633	
F10	RH4	Quantifiler	Unknown	31.2303	0.100625
F10	RH4	IPC	Unknown	26.4567	
F11	RH5	Quantifiler	Unknown	34.1902	0.0134733
F11	RH5	IPC	Unknown	26.5222	
F12	RB1	Quantifiler	Unknown	33.478	0.0218561
F12	RB1	IPC	Unknown	26.6222	
G1	RB2	Quantifiler	Unknown	30.8134	0.133575
G1	RB2	IPC	Unknown	27.3629	
G2	RB3	Quantifiler	Unknown	31.1098	0.109209
G2	RB3	IPC	Unknown	27.0203	
G3	RB4	Quantifiler	Unknown	32.9715	0.0308321
G3	RB4	IPC	Unknown	26.8373	
G4	RB5	Quantifiler	Unknown	33.9489	0.0158729
G4	RB5	IPC	Unknown	26.6848	
G5	FT42-1	Quantifiler	Unknown	36.8143	0.0022661
G5	FT42-1	IPC	Unknown	27.7654	
G6	FT42-2	Quantifiler	Unknown	Undet.	
G6	FT42-2	IPC	Unknown	26.906	
G7	POS Cont	Quantifiler	Unknown	30.4945	0.165878
G7	POS Cont	IPC	Unknown	26.5073	
G8	NEG Cont	Quantifiler	Unknown	35.3686	0.00605063
G8	NEG Cont	IPC	Unknown	26.4648	

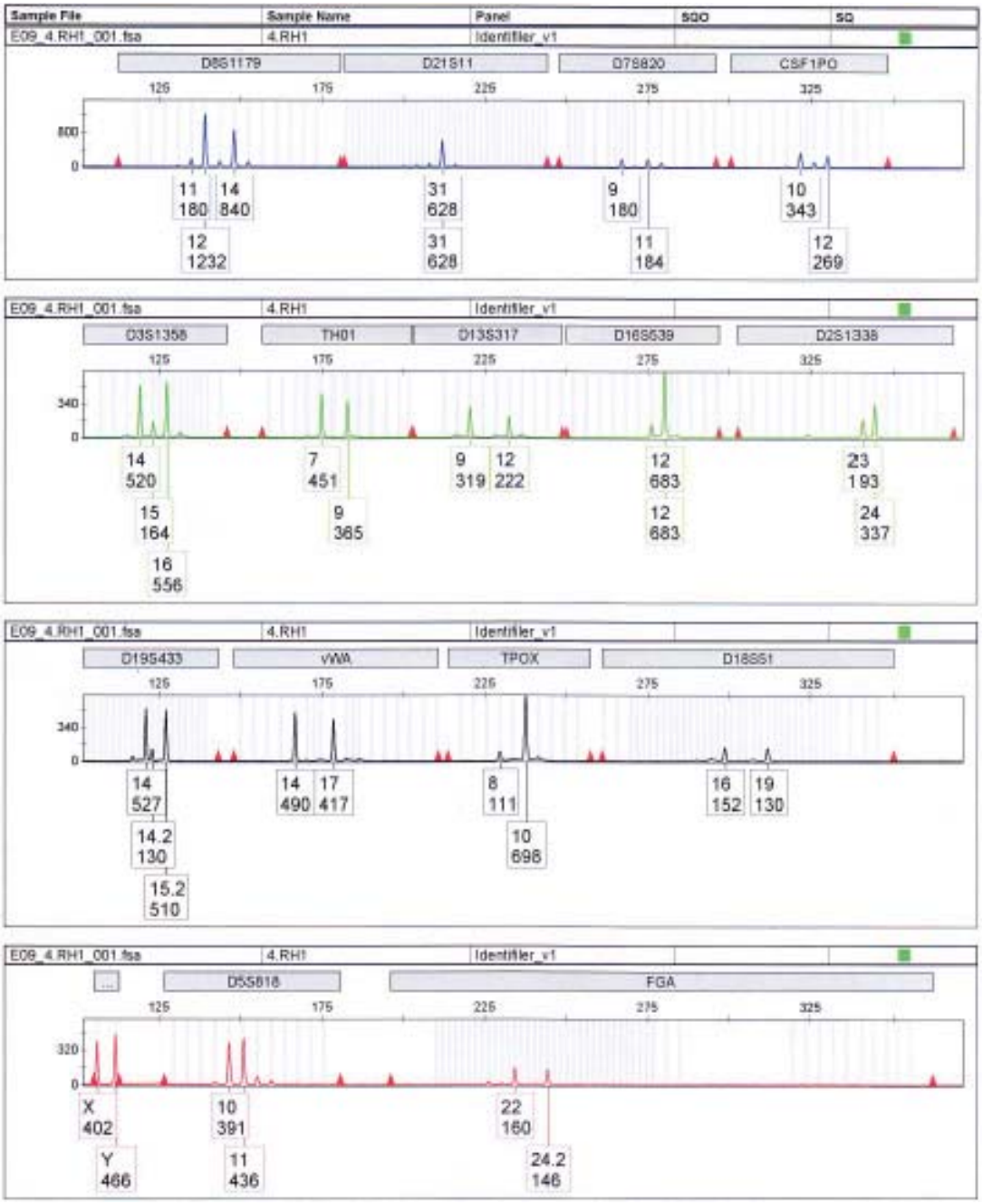
เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากพื้นผิววัตถุกับลายพิมพ์ดีเอ็นเออ้างอิง (เยื่อบุกระพุ้งแก้ม)



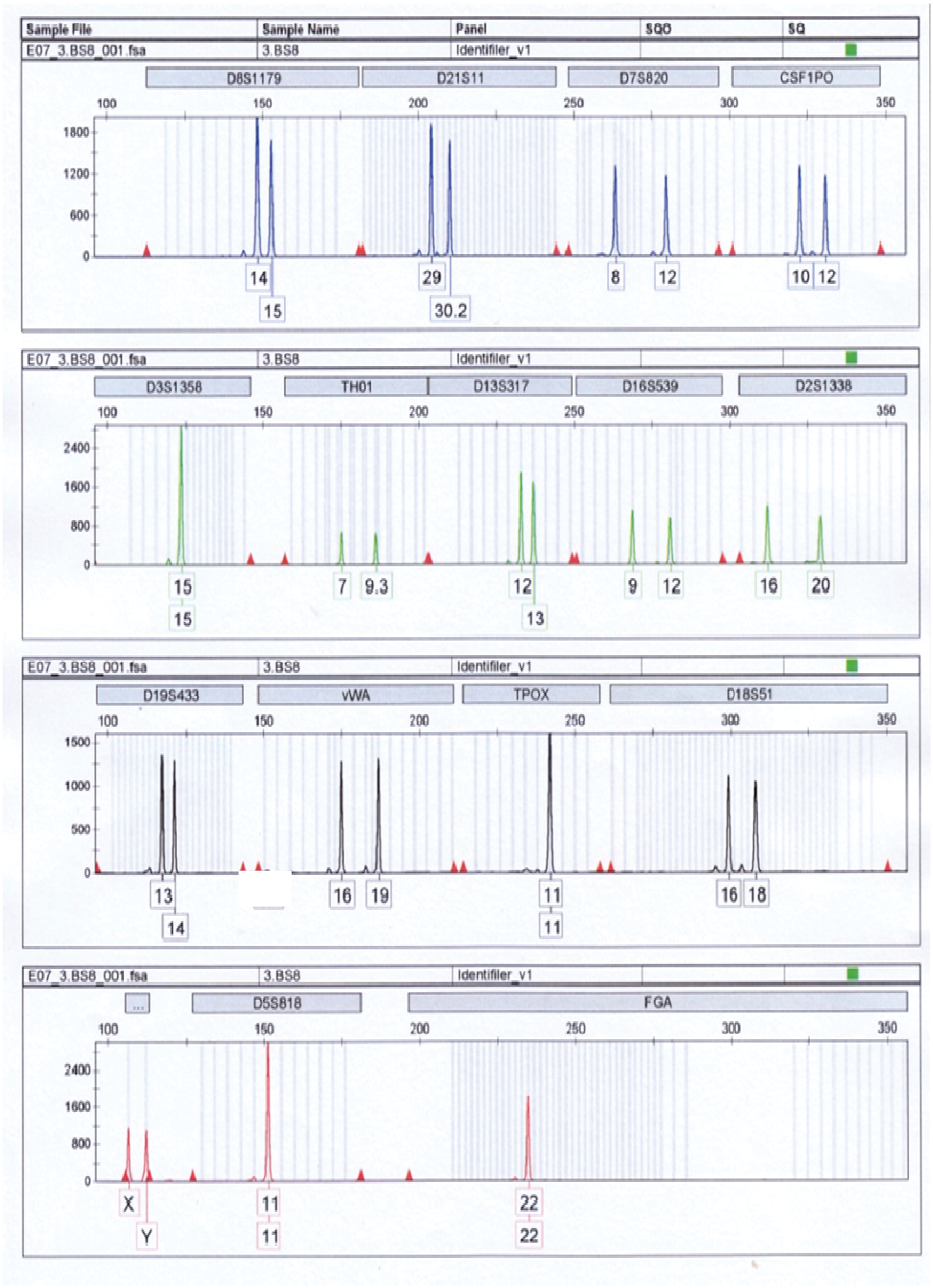
ลายพิมพ์ดีเอ็นเออ้างอิงที่เก็บได้จากเยื่อบุกระพุ้งแก้มของอาสาสมัครคนที่ 1



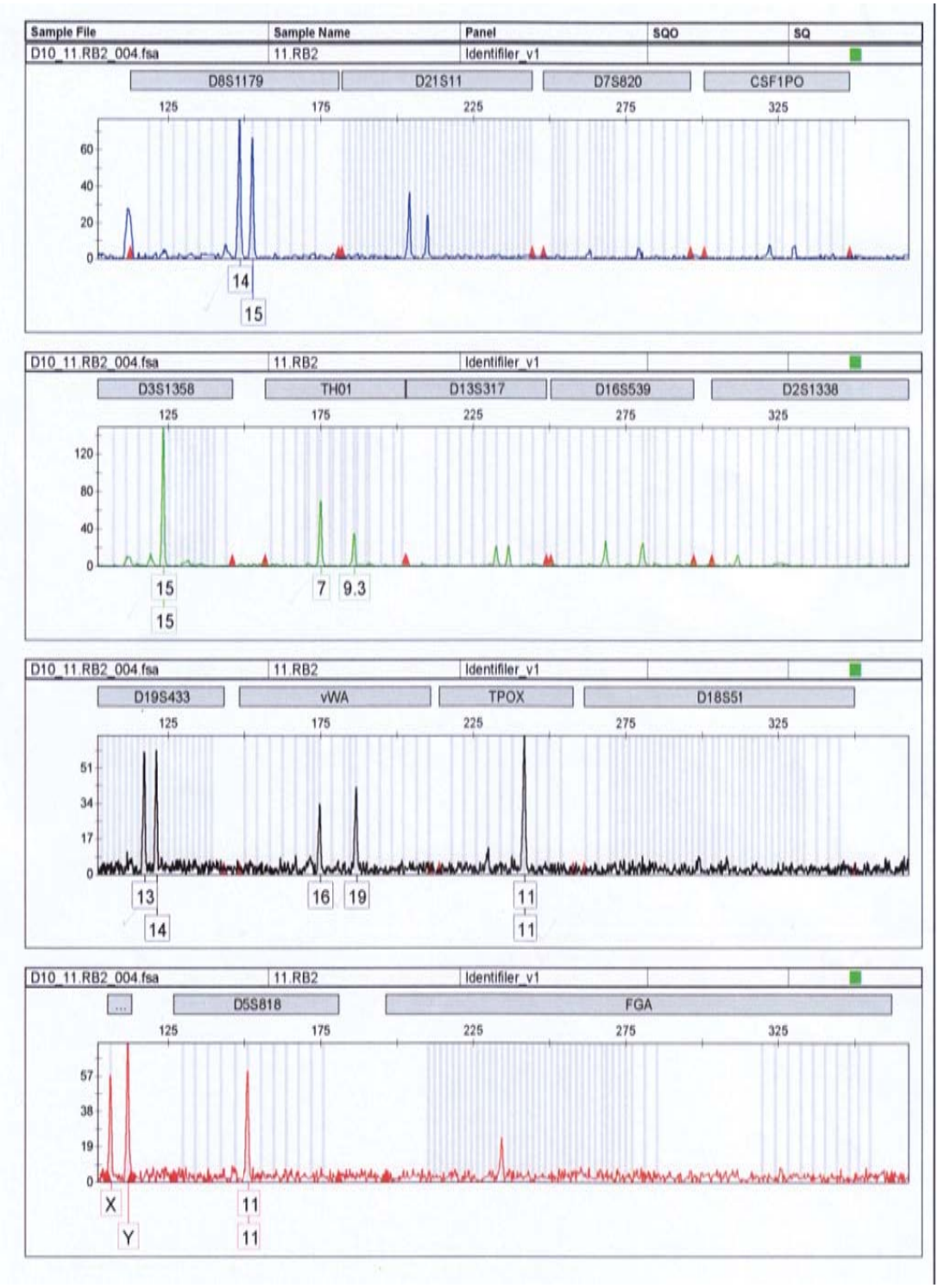
ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากพื้นผิวปลอกสวมด้ามจับรถจักรยานยนต์ที่สัมผัสโดยอาสาสมัครคนที่ 1 ที่เป็นแบบ full profile



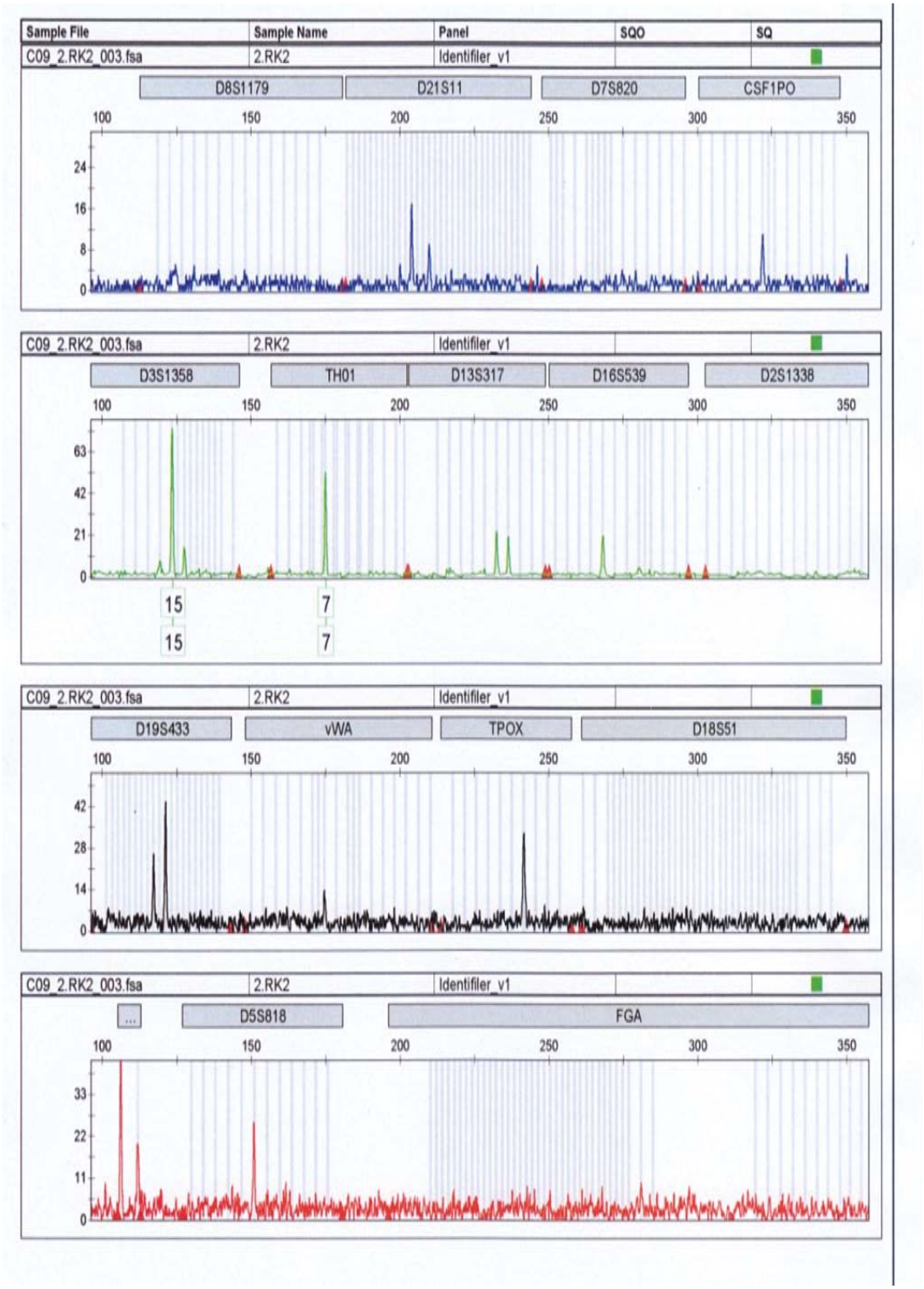
ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากพื้นผิวของด้ามค้อนที่สัมผัสโดยอาสาสมัครคนที่ 1 ที่เป็นแบบ mixed profile



ลายพิมพ์ดีเอ็นเออ้างอิงที่เก็บได้จากเยื่อบุกระพุ้งแก้มของอาสาสมัครคนที่ 2



ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากพื้นผิวของอิฐบล็อกที่สัมผัสโดยอาสาสมัครคนที่ 2 ที่เป็นแบบ partial profile



ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากพื้นผิวของลูกบิดประตูที่สัมผัสโดยอาสาสมัครคนที่ 2

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวศศิธร พรหมวัลย์
ที่อยู่	38 หมู่ 9 ตำบลหน้าพระธาตุ อำเภอพนัสนิคม จังหวัดชลบุรี รหัสไปรษณีย์ 20140

ประวัติการศึกษา

พ.ศ.2551	สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) จากมหาวิทยาลัยมหิดล
พ.ศ.2552	ศึกษาต่อระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ประวัติการทำงาน

พ.ศ.2552-ปัจจุบัน	นักเทคนิคการแพทย์ (Part-time) โรงพยาบาลตา หู คอ จมูก