การเก็บ ดีเอ็นเอ จากพื้นผิวหินที่ถูกสัมผัส

โดย

นายสุภัทร ตันติวิทยมาศ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การเก็บดีเอ็นเอจากพื้นผิวหินที่ถูกสัมผัส

โดย
นายสุภัทร ตันติวิทยมาศ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2554
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

DNA RECOVERY FROM TOUCHED STONE SURFACE

By

Supath Tantivitayamas

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 “ การเก็บ ดีเอ็นเอจากพื้นผิวหินที่ถูกสัมผัส ” เสนอโดย นายสุภัทร ตันติวิทยมาศ 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)

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

52312342 : สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์
คำสำคัญ : ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ / ผิวสัมผัส / หิน / การเก็บดีเอ็นเอ / การสกัดดีเอ็นเอ

สุภัทร ตันติวิทยมาศ : การเก็บ ดีเอ็นเอ จากพื้นผิวหินที่ถูกสัมผัส. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : รศ.ดร.บุษบา ฤกษ์อำนวยโชค และ รศ.พ.ต.อ.สันติ์ สุขวัจน์. 80 หน้า.

จากคดีปาหินที่พบทั้งในกรุงเทพมหานครและต่างจังหวัด ก้อนหินที่พบในสถานที่เกิดเหตุนับเป็นหลักฐานที่สำคัญในการติดตามหาตัวผู้ก่อเหตุ เนื่องจากหลักฐานที่พบในสถานที่เกิดเหตุมีจำกัด วิธีการเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอและวิธีการสกัดดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการจัดการหลักฐาน จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการเชื่อมโยงผู้ต้องสงสัยกับสถานที่เกิดเหตุ งานวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่เก็บได้จากพื้นผิวก้อนหิน โดยมีการเก็บตัวอย่างจากอาสาสมัครจำนวน 10 คน ด้วยวิธีเก็บโดยก้านสำลี และโดยเทปกาว จากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป QIAamp DNA Micro Kit และ Chelex Extraction วัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Real-Time PCR

ผลการวิจัยพบว่า วิธีการเก็บตัวอย่างด้วยก้านสำลี (0.60 นาโนกรัม) ได้ผลดีกว่าการเก็บตัวอย่างด้วยเทปกาว (0.16 นาโนกรัม) ในด้านปริมาณ (P-value = 0.032) และผลจากการสกัดดีเอ็นเอพบว่าการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Micro Kit (0.48 นาโนกรัม) และวิธี Chelex Extraction (0.29 นาโนกรัม) ได้ผลด้านปริมาณไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P-value = 0.341) และผลการวิจัยในด้านคุณภาพพบว่า วิธีการเก็บดีเอ็นเอด้วยเทปกาวพบว่าไม่สามารถเก็บดีเอ็นเอปริมาณมากพอที่นำมาวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ แต่การสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Micro Kit และวิธี Chelex Extraction จากการเก็บโดยก้านสำลีสามารถวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้สมบูรณ์ถึง 16 ตำแหน่ง (คิดเป็นร้อยละ 100) และ 6 ตำแหน่ง (คิดเป็นร้อยละ 36) ตามลำดับ

การวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า ดีเอ็นเอที่เก็บได้จากก้อนหินที่ถูกสัมผัสโดยผู้ก่อเหตุสามารถนำมาผ่านกระบวนการจัดการหลักฐานทางนิติวิทยาศาสตร์ด้วยวิธีการเก็บด้วยก้านสำลีและนำมาสกัดด้วยชุดสกัด ดีเอ็นเอสำเร็จรูป สามารถนำมาใช้พิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลและใช้ในกระบวนการคัดกรองผู้ต้องสงสัยได้

สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ปีการศึกษา 2554
ลายมือชื่อนักศึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ 1. ..... 2. .....

52312342 : MAJOR : FORENSIC SCIENCE
KEY WORD : DNA FINGERPRINT/ TOUCHED DNA/ STONE/ DNA RECOVERY/ DNA EXTRACTION
SUPATH TANTIVITAYAMAS : DNA RECOVERY FROM TOUCHED STONE SURFACE. THESIS ADVISORS : ASSOC. PROF. BUDSABA RERKAMNUAYCHOKE, ASSOC. PROF. POL.COL. SANT SUKHAVACHANA. 80 pp.

According to the stone throwing case occurred in Bangkok or outskirt, the stone found in the crime scene is a valuable evidence because of the limited of the evidences. Evidence processing including collecting and extracting DNA needs to be carefully selected for effective result to link suspects to the crime scene. This research is to compare the collecting and extracting methods from the touched stone in term of quantity and quality from 10 volunteers. After the stones were touched, they were collected by using swabs and tapes. Then they were extracted by using QIAamp DNA Micro Kit and Chelex Extraction Method. Then they were quantified by Real-Time PCR. The DNA profiles were generated using Identifiler Kits.

The result indicated that double swab method (0.60 ng) could recover more DNA quantity than tape-lifting method (0.16 ng) (P-value = 0.032). QIAamp DNA Micro Kit (0.48) could extract equal DNA quantity to Chelex Extraction (0.29) method (P-value = 0.341). In term of quality Tape-lifting could not recover enough DNA to generate profiles. The extraction methods, QIAamp DNA Micro kit could generate full profile DNA (100%) and Chelex extraction could generate 6 loci profile (37%)

This research showed that touched stone could be collected DNA using swabs and extract DNA using QIAamp DNA Micro Kit for most probability of individual identification and scoping suspects.

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

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยเรื่อง การเก็บ ดีเอ็นเอ จากพื้นผิวหินที่ถูกสัมผัส 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

นอกจากนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ คุณจิตติมา โชติวรานนท์ คุณธวัช รินทะชัย ที่คอยสอน ให้คำปรึกษาและแนะนำในการทำการทดลอง คุณอุบลรัตน์ จอมสวัสดิ์ และพี่ๆ ในหน่วยมนุษย์พันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี ที่คอยช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำการทดลองมาโดยตลอด ขอขอบคุณนางสาวอัจฉรีย์ คงเรืองที่คอยช่วยเหลือในการทำการทดลองในสำเร็จลุล่วงไปได้

ขอขอบคุณโรงเรียนนายร้อยตำรวจที่สนับสนุนทุนวิจัยและสถานที่ในการดำเนินวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ให้ลุล่วงไปได้ด้วยดี

ผู้วิจัยขอขอบคุณอาสาสมัครทุกท่านที่เสียสละเวลาอันมีค่า และให้ความร่วมมือเป็นอย่างดี ทำให้การวิจัยนี้ดำเนินไปได้อย่างราบรื่น

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณบิดา มารดา ครู อาจารย์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอน ให้ความรู้ และปลูกฝังให้เห็นคุณค่าของการศึกษา รวมทั้งผู้ที่ได้ให้ความช่วยเหลือทุกท่านที่มิได้เอ่ยนามมา ณ ที่นี้ด้วย ที่มีส่วนช่วยเหลือจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ประสบผลสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

สำหรับคุณประโยชน์อันพึงมีจากงานวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ บิดา มารดา ครูอาจารย์ ผู้ถ่ายทอดวิชาความรู้ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอน ตลอดจนผู้ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยในครั้งนี้ ส่งผลให้ผู้วิจัยทำวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ฌ

สารบัญภาพ ..... ญ

บทที่

1 บทนำ 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

วัตถุประสงค์การของวิจัย 2

สมมติฐานของการวิจัย 2

ขอบเขตของการวิจัย 3

กรอบแนวคิด 3

นิยามศัพท์เฉพาะ 3

ประโยชน์ที่ได้รับ 4

2 ทบทวนวรรณกรรม และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5

การตรวจสถานที่เกิดเหตุ 5

การเก็บวัตถุพยานทางชีววิทยา 7

ดีเอ็นเอ 8

การสกัดดีเอ็นเอ 10

ชุดสกัดสำเร็จรูป 12

การวัดปริมาณดีเอ็นเอ 12

การวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยกระบวนการ Real-time PCR 13

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 14

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 21

3 วิธีการดำเนินการวิจัย 24

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง 24

รูปแบบการวิจัย 24

บทที่ หน้า
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย 24
ขั้นตอนการทดลอง 26
การวิเคราะห์ข้อมูล 35
สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล 36
4 ผลการทดลอง 37
ค่าอ้างอิง 37
ผลการทดลอง 39
5 สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 48
อภิปรายผล 48
สรุปผล 50
ข้อเสนอแนะ 50

บรรณานุกรม 51

ภาคผนวก 53
ภาคผนวก ก เอกสารรับรองคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน 54
ภาคผนวก ข การวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี real-time PCR 60
ภาคผนวก ค การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 71

ประวัติผู้วิจัย 81

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ความหลากหลายของวิธีการวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป.....	13
2	แสดงที่อยู่ ขนาด และลำดับเบสของ STRs หลักทั้ง 13 ตำแหน่ง	17
3	ชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่ใช้ในการการวิเคราะห์ STRs	18
4	ตัวอย่างการเพิ่มปริมาณโดยใช้ primer จากชุดวิเคราะห์ STRs สำเร็จรูป ..	19
5	อุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการ PCR ของ Quantifiler Human DNA Quantification Kit	32
6	อุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการ PCR ของ AmpFℓSTR Identifiler PCR Amplification Kit.....	34
7	ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มขออาสาสมัคร	37
8	ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากการเก็บดีเอ็นเอจากฝ่ามือของอาสาสมัคร	38
9	ปริมาณดีเอ็นเอที่เก็บได้จากแต่ละวิธีในครั้งที่ 1.....	39
10	แสดงปริมาณดีเอ็นเอที่เก็บได้จากแต่ละวิธีในครั้งที่ 2	40
11	แสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณดีเอ็นเอที่เก็บได้จากแต่ละวิธี	40
12	การคำนวณค่า P-value โดยใช้สถิติ Paired sample t-test เปรียบเทียบระหว่างปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากวิธีเก็บ 2 วิธี.....	41
13	การคำนวณค่า P-value โดยใช้สถิติ Paired sample t-test เปรียบเทียบระหว่างปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากวิธีสกัด 2 วิธี	42
14	แสดงผลการเปรียบเทียบ STR จากอาสาสมัครหมายเลข 9 ด้วยก้านสำลีและสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Micro Kit	44
15	แสดงผลการเปรียบเทียบ STR จากอาสาสมัครหมายเลข 5 ด้วยก้านสำลีและสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีคีเล็กซ์.....	45
16	แสดงผลการเปรียบเทียบ STR จากอาสาสมัครหมายเลข 3 ด้วยเทปกาวและสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Micro Kit	46
17	แสดงผลการเปรียบเทียบ STR จากอาสาสมัครหมายเลข 6 ด้วยเทปกาวและสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีคีเล็กซ์.....	47

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	องค์ประกอบหน่วยย่อยพื้นฐานของดีเอ็นเอประกอบด้วยเบส 4 ชนิด ประกอบเป็นเกลียวดีเอ็นเอ	9
2	แบบจำลองเครื่อง real-time thermocycler.....	14
3	ขั้นตอนกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	15
4	แสดงการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วย Multicapillary Electrophoresis.....	16
5	การทำงานของ Primer ที่มีการติดสลากด้วยสีฟลูออเรสเซนซ์.....	19
6	ผลการเพิ่มปริมาณที่ได้ บอกถึงขนาดของ STRs ที่สนใจโดยการเปรียบเทียบจาก Allelic ladder.....	20
7	การเปรียบเทียบขนาดและสี ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้กับ Allelic ladder	21
8	ไม้โฟมและกระดาษ FTA พร้อมซองเก็บ	26
9	สำลีพร้อมกล่องเก็บก้านสำลี.....	27
10	ก้อนหินที่ใช้ในงานวิจัย	27
11	การเก็บเยื่อบุผิวที่ตกค้างบนวัตถุด้วยเทคนิค double swab.....	28
12	การเก็บเยื่อบุผิวที่ตกค้างบนวัตถุด้วยเทคนิค tape-lifting	28
13	การเจาะกระดาษ FTA ด้วย FTA Puncher	29
14	ลำดับขั้นตอนโดยย่อของ QIAamp DNA Micro Kit.....	30
15	10% Chelex	31
16	ชุดวัดปริมาณสำเร็จรูป Quantifiler Human DNA Quantification Kit.....	32
17	เครื่อง 7500 Fast Real-Time PCR System	33
18	ชุดวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ AmpFℓSTR Identifiler PCR Amplification	34
19	เครื่อง GeneAmp 9700 Themal Cycler.....	34
20	เครื่อง 3130 Genetic Analyzer	35

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันนี้ความปลอดภัยในชีวิตและทรัพย์สินของประชาชนถูกคุกคามมากขึ้น สังเกตได้จากเหตุการณ์รุนแรงที่เกิดขึ้นไม่ว่าจะเป็นการลักทรัพย์ ปล้น จี้ ลักพาตัว เรียกค่าไถ่ หรือแม้แต่การฆาตกรรม ซึ่งสามารถจับผู้กระทำผิดได้บางครั้ง และก็มีหลายครั้งที่ไม่สามารถหาตัวผู้กระทำผิดมาลงโทษได้ รวมทั้งเหตุการณ์ที่สะเทือนใจแก่ผู้ใช้ถนนและประชาชนทั้งประเทศ คือ การปาหินใส่กระจกรถยนต์ ดังที่ทราบจากข่าวผ่านสื่อโทรทัศน์และหนังสือพิมพ์ ที่มีทั้งทรัพย์สินเสียหาย การบาดเจ็บและการสูญเสียถึงชีวิต ซึ่งเกิดเหตุในเขตจังหวัดกรุงเทพมหานครและปริมณฑล หรือในเขตจังหวัดอื่นๆเช่น นครปฐม พระนครศรีอยุธยา ฯลฯ ในคดีประเภทนี้หากไม่มีผู้เห็นเหตุการณ์ก็เป็นเรื่องยากที่จะนำผู้กระทำผิดมาเข้าสู่กระบวนการยุติธรรมได้

หลักฐานทางนิติวิทยาศาสตร์ จึงได้เข้ามามีบทบาทสำคัญในกระบวนการยุติธรรมมากขึ้น เนื่องจากหลักฐานทางนิติวิทยาศาสตร์ในสถานที่เกิดเหตุสามารถทำให้ทราบว่าเกิดเหตุอะไรขึ้น กระทำการอย่างไร วิธีการใด ประสงค์ต่ออะไร และใครเป็นผู้กระทำผิด และในทางกลับกันพยานหลักฐานทางนิติวิทยาศาสตร์ยังมีบทบาทในการพิสูจน์ความบริสุทธิ์ของผู้ถูกกล่าวหา ซึ่งพยานหลักฐานเหล่านี้มีความสำคัญต่อการสืบสวนสอบสวน และสามารถนำมาใช้เป็นพยานหลักฐานในกระบวนการยุติธรรมได้ หนึ่งในพยานหลักฐานที่สำคัญทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ที่สามารถเก็บได้จากสถานที่เกิดเหตุคือ ลายนิ้วมือ เนื่องจากลายนิ้วมือของแต่ละบุคคลจะไม่ซ้ำกันและไม่มีการเปลี่ยนแปลงตั้งแต่เกิดจนกระทั่งเสียชีวิต ดังนั้นรอยลายนิ้วมือที่ตรวจเก็บได้จากสถานที่เกิดเหตุหรือของกลางที่พนักงานสอบสวนนำส่งจึงเป็นพยานหลักฐานที่แสดงว่าบุคคลผู้เป็นเจ้าของลายนิ้วมือนั้นมีความเกี่ยวโยงกับสถานที่เกิดเหตุ หากแต่ร่องรอยลายนิ้วมือบนพื้นผิววัตถุนั้นไม่ได้พบร่องรอยที่สมบูรณ์ทุกครั้งไป โดยอาจมีการเปรอะเปื้อนหรือการเลือน หรือพื้นผิวเป็นวัตถุที่เกิดร่องรอยลายพิมพ์นิ้วมือได้ยาก ทำให้ไม่สามารถหาจุดเปรียบเทียบตรวจหาลายนิ้วมือหรือได้รอยลายนิ้วมือที่มีตำหนิพิเศษไม่เพียงพอต่อการตรวจพิสูจน์เปรียบเทียบ อาทิเช่น ในคดีปาหินโดนกระจกหน้ารถยนต์ในต่างจังหวัด เนื่องจากก้อนหินเป็นวัตถุที่เกิดร่องรอยลายนิ้วมือได้ยาก ทำให้ไม่สามารถหาหลักฐานได้มากพอที่จะนำผู้กระทำผิดมาเข้าสู่กระบวนการยุติธรรม และรับการลงโทษต่อความผิดที่ก่อได้

ดังนั้นการศึกษาหาวิธีการที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจพิสูจน์หลักฐานที่ถูกสัมผัส เป็นสิ่งที่มีความจำเป็นอย่างมาก ในคดีที่พบหลักฐานจำนวนน้อยและพบลายพิมพ์นิ้วมือที่ไม่สมบูรณ์บนพื้นผิวที่หาร่องรอยลายพิมพ์นิ้วมือได้ยาก หนึ่งในวิธีทางเลือกดังกล่าวคือการหาวัตถุพยานดีเอ็นเอ หรืออีกนัยหนึ่งคือการหา สารพันธุกรรมดีเอ็นเอจากเยื่อบุผิวจากมือที่ตกค้างอยู่บนวัตถุหลังจากการถูกสัมผัส ซึ่งวัตถุพยานดีเอ็นเอนี้มีความจำเพาะเจาะจงต่อตัวบุคคลสูง แต่ละบุคคลจะไม่ซ้ำกันและไม่มีการเปลี่ยนแปลงตั้งแต่เกิดจนกระทั่งเสียชีวิต และมีความสามารถที่ยึดติดกับพื้นผิวได้ จึงสามารถใช้ในการเชื่อมโยงผู้ต้องสงสัยเข้ากับสถานที่เกิดเหตุได้ไม่แตกต่างกับร่องรอยลายพิมพ์นิ้วมือ แม้ว่าจะมีความยุ่งยากในการเลือกวิธีเก็บหลักฐาน การเลือกวิธีการสกัดดีเอ็นเอ การวัดปริมาณดีเอ็นเอ และการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ที่มีราคาที่สูง แต่ก็ยังเหมาะสมในการใช้ตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลในคดีที่ไม่พบวัตถุพยานประเภทอื่น หรือในคดีที่พบพยานหลักฐานจำนวนน้อย

จากความสำคัญและปัญหาข้างต้น จึงได้ออกแบบการวิจัยเพื่อศึกษาเปรียบเทียบวิธีการเก็บวัตถุพยานดีเอ็นเอจากพื้นผิวก้อนหิน โดยแยกออกเป็นวิธีการเก็บด้วยก้านสำลีด้วยเทคนิค Double Swabและวิธีการเก็บด้วย เทปกาว ด้วยเทคนิค Tape-Lifting และสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป QIAamp Micro Extraction Kit และการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการ Chelex Extraction จากนั้นนำมาวัดปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ ด้วยกระบวนการ Real-Time PCR และวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ทั้งนี้เพื่อเปรียบเทียบหาวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการจัดการกับวัตถุพยานประเภทก้อนหิน

วัตถุประสงค์การของวิจัย

1. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพวิธีการเก็บตัวอย่างสารพันธุกรรมดีเอ็นเอจากการสัมผัสผิวหิน
2. เพื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากการสัมผัสผิวหิน

สมมติฐานของการวิจัย

จากวิธีการเก็บและวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน จะให้ประสิทธิผลที่แตกต่างกันทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ

ขอบเขตของการวิจัย

1. กลุ่มตัวอย่าง

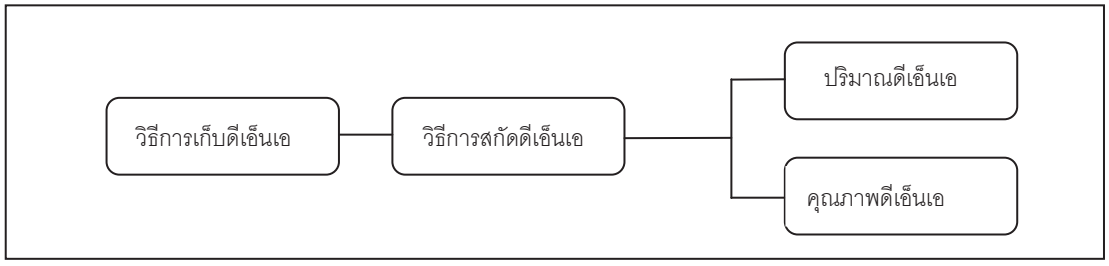
งานวิจัยในครั้งนี้ทำการจำลองสถานการณ์ในสภาวะควบคุมเท่านั้น โดยให้ผู้ทดลองที่คัดเลือกมาโดยสุ่มอายุระหว่าง 19-25 ปี เป็นเพศชายที่มีสุขภาพร่างกายสมบูรณ์แข็งแรง เริ่มทำการทดลองโดยทำการสัมผัสวัตถุและเก็บดีเอ็นเอ โดยไม่มีความเสี่ยงใดๆ และทำการยินยอมอย่างเป็นลายลักษณ์อักษรตามระเบียบของคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคนคณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี เลขที่ 2554/390 โดยอาสาสมัครสามารถทราบข้อมูลการทดลองได้ทุกขั้นตอน

2. ตัวแปรที่ทำการศึกษา

2.1 ตัวแปรต้น คือ วิธีการเก็บตัวอย่าง และวิธีการสกัดดีเอ็นเอ

2.2 ตัวแปรตาม คือ ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ ที่ได้จากการเก็บตัวอย่าง และวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน

กรอบแนวคิด



แผนภูมิที่ 1 กรอบแนวคิด

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. ดีเอ็นเอ หมายถึง เป็นสารพันธุกรรมที่อยู่ในนิวเคลียสของสิ่งมีชีวิต มีความจำเพาะเจาะจง มีความแตกต่างกันในแต่ละบุคคล ทำหน้าที่เป็นต้นแบบสร้าง mRNA เพื่อใช้ในการสร้างโปรตีนที่จำเป็นในการดำรงของสิ่งมีชีวิต

2. การเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอ หมายถึงการเก็บหลักฐานมาดำเนินกระบวนการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

3. การสกัดดีเอ็นเอ หมายถึงการสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากนิวเคลียสของเซลล์

4. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ หมายถึง ข้อมูลดีเอ็นเอที่ผ่านการวิเคราะห์แล้ว โดยแต่ละคนจะมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอเฉพาะเจาะจงไม่ซ้ำกัน และไม่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดชีวิต

ประโยชน์ที่ได้รับ

1. ได้ทราบวิธีที่มีประสิทธิภาพในการเก็บดีเอ็นเอที่ติดกับพื้นผิวก้อนหินจากการสัมผัส

2. สามารถนำวิธีการตรวจเก็บดีเอ็นเอที่ติดบนพื้นผิวก้อนหินไปประยุกต์ใช้ในการตรวจเก็บดีเอ็นเอบนพื้นผิวที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันได้

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรม และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากแนวคิดที่ว่า อาชญากรมักทิ้งร่องรอยในสถานที่เกิดเหตุเสมอ ดังนั้น ถ้าทำการตรวจสถานที่เกิดเหตุอย่างมีขั้นตอนตามหลักวิชาแล้ว จะทำให้สามารถใช้ประโยชน์จากวัตถุพยานต่างๆ ในสถานที่เกิดเหตุรวมถึงจากตัวผู้เสียหายและตัวคนร้ายได้อย่างเต็มที่ ซึ่งจะนำไปสู่ความสำเร็จในการคลีคลายคดีนั้นๆ

สถานที่เกิดเหตุ คือหัวใจสำคัญของการสืบสวนและสอบสวน คนร้ายย่อมทิ้งร่องรอยหลักฐานไว้ในสถานที่เกิดเหตุเสมอ ขึ้นอยู่กับความรู้ความสามารถและปฏิภาณไหวพริบของผู้ตรวจสถานที่เกิดเหตุ และเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจสถานที่เกิดเหตุ

การรักษาสถานที่เกิดเหตุหมายถึง การรักษาสถานที่เกิดเหตุให้อยู่ในสภาวะเดียวกับที่พบครั้งแรกไว้ระยะหนึ่ง ในขณะเดียวกันก็ป้องกันไม่ให้เอกาสารหรือหลักฐานสูญหาย ดังที่มีผู้กล่าวว่าสถานที่เกิดเหตุเหมือนเป็น “คลังสมบัติแห่งหลักฐาน” แม้ว่าจะเป็นอาชญากรที่วางแผนรอบคอบเพียงใด ก็จะต้องมีข้อมูลทั้งที่มีรูปร่างลักษณะและไม่มีรูปร่างลักษณะซึ่งสามารถสืบหาเบาะแสของคนร้าย หรือข้อเท็จจริงเกี่ยวกับอาชญากรรมนั้นได้ แต่ข้อมูลที่หลงเหลือ ณ สถานที่เกิดเหตุนั้นไม่เพียงแต่จะสูญหายหรือเปลี่ยนแปลงเมื่อเวลาผ่านไป อาจถูกเหยียบย่ำหรือทำให้แปรเปลี่ยนจากการขาดความระมัดระวังของผู้เสียหายหรือบุคคลที่สามซึ่งเข้าไปในสถานที่เกิดเหตุด้วยความอยากรู้อยากเห็น

การรักษาสถานที่เกิดเหตุพึงระลึกไว้เสมอว่า การรักษาสถานที่เกิดเหตุให้คงเดิมนั้นจุดประสงค์หลักคือการรักษาข้อมูลที่อยู่ในสถานที่เกิดเหตุ เจ้าหน้าที่ตำรวจที่รุดไปยังสถานที่เกิดเหตุพึงระลึกเสมอว่า การรักษาสถานที่เกิดเหตุให้สภาพคงเดิมนั้น จะมีผลอย่างยิ่งต่อการคลี่คลายคดี จึงต้องทำการรักษาสถานที่เกิดเหตุให้คงสภาพเดิมไว้ให้ดีที่สุด

การตรวจสถานที่เกิดเหตุ

การตรวจสถานที่เกิดเหตุ คือการค้นหา เก็บรวบรวมและรักษาข้อมูลทั้งที่มีรูปร่างลักษณะและไม่มีรูปร่างลักษณะซึ่งเกี่ยวข้องทั้งทางตรงและทางอ้อมกับอาชญากรรม เพื่อทำให้รูปร่างหน้าตาของคนร้าย วิธีก่ออาชญากรรม และรายละเอียดของอาชญากรรมมีความชัดเจนมาก

ขึ้น เราเรียกว่าการตรวจสอบทุกสิ่งทุกอย่างที่มีอยู่ในสถานที่เกิดเหตุและสภาพของสถานที่เกิดเหตุด้วยประสาททั้งห้า

การตรวจบริเวณที่เกิดเหตุนั้น เป็นพื้นฐานของแนวคิดการสืบสวน แนวทางการสืบสวนจะเกิดจากการคาดคะเนและตัดสินใจ โดยมีพื้นฐานมาจากข้อมูลที่ได้รับจากการตรวจสอบ เนื่องจากจะต้องดำเนินการสืบสวนต่อไป ดังนั้น จึงต้องตรวจสอบสถานที่เกิดเหตุโดยละเอียดรอบคอบ ไม่มองข้ามหรือเกิดความเข้าใจผิดต่อข้อมูลต่างๆ

สถานที่เกิดเหตุนั้น จะเกิดการเปลี่ยนแปลงอันเนื่องมาจากการตรวจสอบ ถ่ายรูป การวัดระยะ การบันทึกและการรวบรวมหลักฐาน ด้วยเหตุนี้การตรวจสอบบริเวณที่เกิดเหตุนั้นการเกิดความผิดพลาดก็จะไม่สามารถแก้ไขกลับคืนมาได้

โดยเฉพาะอย่างยิ่ง หากพบเบาะแสเกี่ยวกับคนร้ายที่ชัดเจนก็จะทำให้การตรวจสอบบริเวณที่เกิดเหตุนั้นไม่ละเอียดถี่ถ้วนเท่าที่ควร การสืบสวนจะให้ได้ผลดีนั้น สิ่งสำคัญคือการตรวจสอบบริเวณสถานที่เกิดเหตุอย่างถี่ถ้วน ค้นหาและรวบรวมหลักฐานทั้งที่มีรูปร่างลักษณะและไม่มีรูปร่างลักษณะในสถานที่นั้น

1. ขั้นตอนการตรวจสถานที่เกิดเหตุ เมื่อยังไม่มีการค้นพบดีเอ็นเอ

ตามหลักการที่มีการตีพิมพ์ไว้ในคู่มือการตรวจสถานที่เกิดเหตุในปี ค.ศ. 1984 นอกจากหลักการการรักษา การค้น การวาดภาพและการถ่ายภาพสถานที่เกิดเหตุแล้ว เน้นไปที่การหาหลักฐานเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ เชื่อมโยงผู้ต้องสงสัยเข้ากับสถานที่เกิดเหตุ โดยใช้การเก็บร่องรอยต่างๆที่มาผู้ต้องสงสัย เครื่องมือ และหลักฐานที่มาจากผู้ต้องสงสัยอื่นๆ เช่น เส้นผม เส้นขน หรือเลือดเป็นต้น

1.1 รอยลายนิ้วมือแฝง เป็นหลักฐานที่พบในสถานที่เกิดเหตุสามารถใช้เป็นหลักฐานพิสูจน์ว่าผู้ต้องสงสัยเคยเข้ามายังสถานที่เกิดเหตุและสัมผัสบางสิ่งบางอย่างและทิ้งรอยลายนิ้วมือแฝงไว้แต่ร่องรอยแฝงนี้เป็นร่องรอยที่มองเห็นได้ยาก จำเป็นต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการตรวจสถานที่เกิดเหตุ เน้นไปที่การทำให้ร่องรอยลายนิ้วมือแฝงนั้นปรากฏชัดเจนขึ้นด้วยวิธีต่างๆ เช่นการปัดด้วยผงปัดลายนิ้วมือที่แตกต่างชนิดกันหรือการใช้ super glue และการใช้ขนแปรงปัดแบบต่างๆ บนพื้นผิวต่างชนิดกันไปจนถึงบนผิวหนังของมนุษย์ รวมไปถึงการใช้เทคนิคการลอกลายนิ้วมือแฝงที่พบขึ้นมาให้ได้ความสมบูรณ์สูงสุด

1.2 ร่องรอยรองเท้า เป็นหลักฐานที่มักถูกมองข้ามในสถานที่เกิดเหตุ แต่ในความเป็นจริงแล้วสามารถใช้บอกข้อมูลที่สำคัญในหลายส่วนเช่น ช่องทางเข้า-ออกของผู้ต้องสงสัย ใช้บอกจำนวนของผู้ต้องสงสัย เส้นทางการเดินทางของผู้ต้องสงสัย ลักษณะการเดิน มุมของการเดิน รวมทั้งสามารถตรวจสอบหาที่มาทั้งยี่ห้อ ขนาด ซึ่งสามารถเชื่อมโยงไปสู่ตัวผู้ต้องสงสัยได้

เช่นเดียวกัน โดยการเก็บหลักฐานประเภทนี้สามารถใช้การหล่อแม่พิมพ์ไม่ว่าจะเป็นซิลิโคน หรือปูนพลาสเตอร์เพื่อใช้เป็นตัวอย่างเปรียบเทียบกับผู้ต้องสงสัยได้

1.3 ร่องรอยเครื่องมือ เป็นหลักฐานที่บอกว่ามีการงัดแงะเกิดขึ้นในสถานที่เกิดเหตุ ซึ่งร่องรอยเครื่องมือนี้จะมีความแตกต่างกันในเครื่องมือแต่ละชนิด โดยร่องรอยนี้สามารถบอกข้อมูลเช่น เครื่องมือชนิดใดและขนาดเท่าไร รวมทั้งเป็นที่เชื่อกันว่าแม้ว่าจะเป็นเครื่องมือชนิดเดียวกันก็จะทิ้งร่องรอยที่มีเอกลักษณ์ไม่เหมือนกัน และเมื่อทราบถึงเครื่องมือแล้วแต่ไม่พบเครื่องมือนั้นในสถานที่เกิด ก็เป็นไปได้ว่าเครื่องมือถูกนำออกไปจากสถานที่เกิดเหตุ และเมื่อหาพบแล้วก็มีความเป็นไปได้มากที่จะพบหลักฐานอื่นๆบนเครื่องมือนั้น การเก็บร่องรอยเครื่องมือออกจากวัตถุที่ถูกงัดแงะทำโดยใช้วิธีหล่อแม่พิมพ์เพื่อใช้เป็นตัวอย่างเปรียบเทียบ

2. ขั้นตอนการตรวจสถานที่เกิดเหตุ ในเมื่อมีการพบดีเอ็นเอ

การตรวจร่องรอยก็ยังสามารถใช้เทคนิคเดิม แต่จำเป็นต้องมีการปรับรายละเอียดในส่วนปลีกย่อย และเพิ่มเติมในส่วนของความระมัดระวังในการปนเปื้อนของผู้ตรวจ-ตัวอย่าง และตัวอย่าง-ตัวอย่าง เนื่องจากตัวอย่างที่ทำการเก็บนั้นมีความละเอียดอ่อนมากขึ้น เพราะมีการเก็บดีเอ็นเอเพิ่มเติมเข้ามา ดีเอ็นเอเป็นตัวอย่างที่ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าแต่สามารถเก็บข้อมูลได้มากจากตัวอย่างนั้น

การเก็บดีเอ็นเอจากสถานที่เกิดเหตุอาทิเช่น เลือด เส้นผม เส้นขน กระดูก น้ำอสุจิ น้ำจากช่องคลอด น้ำลาย แม้กระทั่งเนื้อเยื่อที่ตกค้างจากการสัมผัสวัตถุของผู้ต้องสงสัย เนื่องจากทราบแล้วว่าดีเอ็นเอสามารถใช้เทคนิคการเพิ่มปริมาณโดยใช้เทคนิค STR สามารถใช้พิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลได้อย่างแม่นยำ รวมทั้งสามารถนำข้อมูลที่ได้มาจัดทำเป็นฐานข้อมูลได้

และเนื่องจากเป็นหลักฐานที่ไม่สามารถมองเห็นได้ การส่งทอดหลักฐานจากผู้เก็บไปยังหน่วยงานที่รับผิดชอบและไปยังผู้ตรวจนั้นจำเป็นต้องมีความรัดกุมมากขึ้นจึงเกิดระบบห่วงโซ่หลักฐานขึ้น (Chain of Custody) เพื่อเป็นการยืนยันและสามารถสืบย้อนไปถึงผู้รับผิดชอบได้

การเก็บวัตถุพยานทางชีววิทยา

วัตถุพยานทางชีววิทยา เป็นวัตถุพยานที่ได้มาจากสิ่งที่มีชีวิตหรือเป็นส่วนของสิ่งมีชีวิตมาก่อน เช่น คราบเลือด คราบอสุจิ เส้นผม ฯลฯ การพบวัตถุพยานทางชีววิทยาอย่างใดอย่างหนึ่งของผู้ต้องสงสัย เป็นการเชื่อมโยงผู้ต้องสงสัยไปสู่สถานที่เกิดเหตุและผู้เสียหาย การจัดการกับวัตถุพยานอย่างถูกวิธีและพิถีพิถัน จะทำให้มีโอกาสที่จะได้ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ใช้เปรียบเทียบที่สมบูรณ์สามารถนำมาใช้ในการยืนยันตัว การคัดกรอง หรือการพิสูจน์ความบริสุทธิ์ของผู้ต้องสงสัยได้

การเก็บวัตถุพยานทางชีววิทยาประเภทต่างๆมีดังนี้

1. การเก็บวัตถุพยานทางชีววิทยาประเภทโลหิต

ถ้าเป็นเลือดสดใหม่จากที่เกิดเหตุ ควรเก็บใส่หลอดแก้วที่สะอาดปลอดเชื้อ ปิดจุกให้สนิท ถ้าส่งไม่ได้ทันทีควรเก็บไว้ในตู้เย็นหรือแช่น้ำแข็งไว้ แต่ถ้าไม่มีทั้งสองอย่างควรทำให้แห้งเสียก่อน เพื่อป้องกันการเน่าเสีย ถ้าเป็นเลือดที่แห้งอยู่แล้ว เช่น เลือดที่ติดอยู่กับวัตถุ เสื้อผ้า อาวุธ ให้จัดส่งทั้งวัตถุนั้น แต่ถ้าคราบควรใช้มีดบางคม ๆ แซะหรือขูดลงบนกระดาษกรองหรือใช้ไม้พันสำลีชุบ น้ำเกลือหรือชุบ 10% แล้วผึ่งให้แห้ง นำใส่ภาชนะที่ระบายอากาศได้ดี เพื่อป้องกันการเน่าเสีย

2. การเก็บวัตถุพยานทางชีววิทยาประเภทคราบอสุจิ

หากพบบนวัตถุให้จัดส่งทั้งวัตถุนั้น โดยหากเป็นคราบเปียกให้ทำการผึ่งลมให้แห้งก่อนเพื่อป้องกันการเน่าเสีย แต่หากเป็นก้านสำลีที่เก็บตัวอย่างจากช่องคลอดเหยื่อ ให้ทำการผึ่งให้แห้ง นำใส่ภาชนะที่ระบายอากาศได้ดี เพื่อป้องกันการเน่าเสีย

3. การเก็บวัตถุพยานทางชีววิทยาประเภทเส้นผมหรือเส้นขน

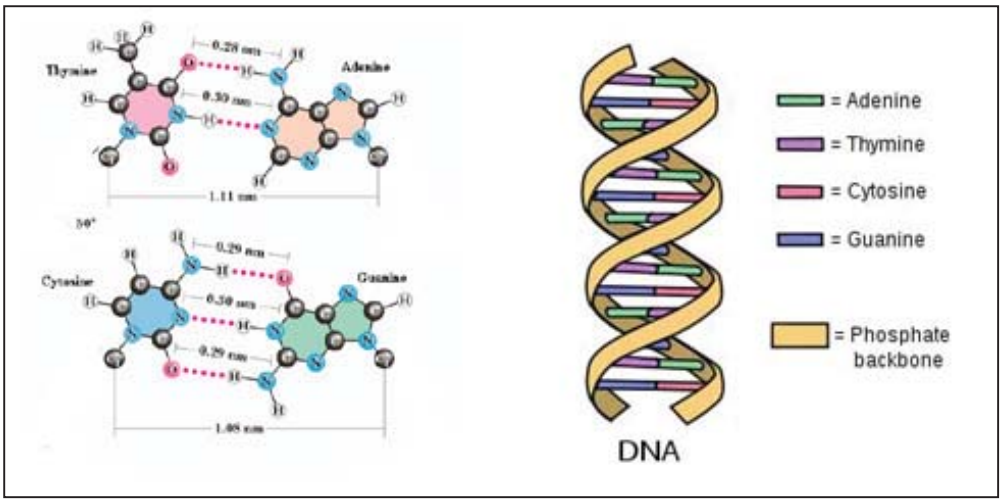
ให้ทำการเก็บวัตถุพยานที่พบใส่ลงบนกระดาษกรองเพื่อความสะดวกในการจำแนกชนิดของเส้นผมหรือเส้นขนที่พบ หากเป็นเส้นผมหรือเส้นขนที่มีราก สามารถนำมาหาดีเอ็นเอของเจ้าของได้โดยตรง แต่หากเป็นเส้นผมหรือเส้นขนที่ไม่มีรากจำเป็นต้องนำมาหาดีเอ็นเอจาก ไมโตคอนเดรียแทน

4. การเก็บวัตถุพยานทางชีววิทยาจากการสัมผัส

เป็นการเก็บเยื่อบุผิวที่ตกค้างอยู่บนวัตถุที่มั่นใจว่าถูกสัมผัสโดยผู้ต้องสงสัย โดยการใช้ก้านสำลี (ด้วยเทคนิค Double swab) ป้ายเก็บ 2 ครั้งด้วย โดยครั้งแรกใช้ก้านสำลีเปียกชุบน้ำเกลือหรือน้ำกลั่นหรือ 95% แอลกอฮอล์ป้ายเก็บลงบนพื้นผิวตัวอย่างในลักษณะวงกลม จากนั้นใช้ก้านสำลีแห้งป้ายเก็บความชื้อทั้งหมดจากการป้ายเก็บก้านสำลีครั้งแรก ทำการผึ่งก้านสำลีทั้ง 2 ให้แห้ง นำใส่ภาชนะที่ระบายอากาศได้ดี เพื่อป้องกันการเน่าเสีย

ดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอ คือ คือสารพันธุกรรม พบในเซลล์เกือบทุกเซลล์ในสิ่งมีชีวิต โมเลกุลของดีเอ็นเอประกอบด้วยเบสพื้นฐาน 4 ชนิดเรียกว่า A (Adenine), T (Thymine), C (Cytosine) และ G (Guanine) เบสทั้ง 4 เรียงกันเป็นสายสองสายพันกันเป็นเกลียวคล้ายเชือกโดยจะจับเป็นสายคู่ เชื่อมกันด้วยแรงพันธะทางเคมี (Hydrogen bond) ดังภาพที่ 1 ในเซลล์แต่ละเซลล์มีดีเอ็นประมาณ 3 พันล้านเบส การเรียงของเบสในแต่ละคนแตกต่างกัน ยกเว้นในฝาแฝดไข่ใบเดียวกัน



ภาพที่ 1 องค์ประกอบหน่วยย่อยพื้นฐานของดีเอ็นเอประกอบด้วยเบส 4 ชนิด ประกอบเป็นเกลียวดีเอ็นเอ

ที่มา: กรเกียรติ วงศ์ไพศาลสิน, Forensic DNA [ออนไลน์], เข้าถึงเมื่อ 28 กุมภาพันธ์ 2555. เข้าถึงได้จาก http://www.forensicchula.net/FMJ/journal/topic/DNAinforensic.pdf

Sir Alex Jeffreys เป็นนักวิทยาศาสตร์คนแรกที่นำดีเอ็นเอไปใช้เพื่อช่วยในกระบวนการยุติธรรม โดยเทคนิคที่เรียกกันว่า DNA fingerprint ซึ่งเป็นการตรวจเปรียบเทียบดีเอ็นเอของผู้ต้องสงสัย กับดีเอ็นเอจากชีววัตถุในสถานที่เกิดเหตุ หรือชีววัตถุที่อยู่บนผู้เสียหาย โดยในสายดีเอ็นเอมนุษย์ ดังที่กล่าวมา มีบริเวณตำแหน่งที่เรียงตัวกันซ้ำๆ เป็นหน่วยแกน (Core unit) ประกอบด้วยลำดับดีเอ็นเอปริมาณ 7 - 25 คู่เบสต่อหนึ่งหน่วยแกน และแต่ละหน่วยจะเชื่อมต่อกันด้วยจำนวนการซ้ำเป็นชุด ๆ ประมาณ 50 ชุด เรียกลำดับเบสเหล่านี้ว่า Variable Number of Tandem Repeats (VNTRs)

ดีเอ็นเอพบได้จาก 2 แหล่ง ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในทางนิติเวชคือ ดีเอ็นเอที่พบในนิวเคลียส และในไมโตคอนเดรีย

1. ดีเอ็นเอในนิวเคลียส

เป็นดีเอ็นเอที่จับกับโปรตีนเป็นเส้นโครโมโซมซึ่งมี 23 คู่ โดยเด็กจะได้รับโครโมโซมจากพ่อ-แม่ ฝ่ายละ 23 แท่ง ซึ่งเกิดขึ้นเมื่อไข่ของแม่ปฏิสนธิกับ ตัวอสุจิของพ่อเกิดเป็นไซโกทขึ้น ภายในโครโมโซมประกอบด้วยยีนจำนวนมาก ยีนเป็นส่วนของดีเอ็นเอที่ควบคุมการสร้างโปรตีนที่มีความจำเป็นต่อพัฒนาการและการทำหน้าที่ของร่างกาย ดีเอ็นเอในร่างกายที่เป็นยีนมีประมาณ 1% เท่านั้น ส่วนที่เหลือ 99% ไม่ใช่ยีนและไม่มีหน้าที่ในการสร้างโปรตีน ในส่วนนี้จะมี

ดีเอ็นเอเรียงตัวซ้ำกันเป็นชุดๆ ชุดของดีเอ็นเอเหล่านี้มีอยู่ทั่วไปในตำแหน่งต่างๆ บนเส้นโครโมโซม ตำแหน่งของยีนหรือตำแหน่งของดีเอ็นเอที่มีความซ้ำดังกล่าว ที่เรียกว่าโลกัส (Locus) เนื่องจากโครโมโซมเป็นเส้นคู่ เพราะฉะนั้นในโลกัสต่างๆ จึงมีลักษณะของดีเอ็นเอเป็นคู่ๆ ซึ่งเราเรียกลักษณะ แอลลีล ดังนั้นในโลกัสหนึ่งจะมีดีเอ็นเอไม่เกิน 2 แอลลีล ในกลุ่มประชากรต่างๆ มีแอลลีล ได้หลายแอลลีล ถ้าตำแหน่งดีเอ็นเอใดที่มีความหลากหลายจะมีประโยชน์ในการแยกแยะตัวบุคคล

2. ดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรีย

เป็นส่วนประกอบของเซลล์ที่มีหน้าที่สร้างพลังงาน พบในเซลล์หนึ่งๆ ได้หลายพันชุด ภายในไมโตคอนเดรียแต่ละชุดจะมีดีเอ็นเออยู่ประมาณ 16,569 คู่เบส ในขณะที่มีการปฏิสนธิระหว่างตัวอสุจิกับไข่ อสุจิจะปล่อยเฉพาะนิวเคลียสเข้าไปผสมกับไข่ ดังนั้นไมโตคอนเดรียที่อยู่ในไข่ที่ผสมแล้วจะมาจากแม่ทั้งนั้น จึงสามารถนำมาตรวจความสัมพันธ์ทางโลหิตสายมารดาได้ ขณะเดียวกันเนื่องจากดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรีย เป็นดีเอ็นเอที่มีความคงทนกว่าดีเอ็นเอในนิวเคลียส จึงสามารถตรวจวัตถุพยานที่เก่ามากและมีปริมาณน้อยได้

การสกัดดีเอ็นเอ

จากตัวอย่างทางชีววิทยาที่เก็บได้จากสถานที่เกิดเหตุไม่ว่าจะเป็นเลือด คราบอสุจิ หรือน้ำลาย นอกจากส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการแล้ว ยังมีองค์ประกอบของเซลล์นานาชนิดในปริมาณมาก โมเลกุลของดีเอ็นเอนี้ จำเป็นต้องได้รับการแยกออกจากองค์ประกอบดังกล่าวก่อนที่จะเข้ากระบวนการการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ โปรตีนในเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการป้องกันและมัดรวมสายดีเอ็นเอ สามารถมีผลยับยั้งกระบวนการในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอได้ ดังนั้นขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจึงถูกออกแบบให้ทำการแยกองค์ประกอบของเซลล์ต่างๆ รวมทั้งโปรตีน ให้แยกออกจากดีเอ็นเอ และผลจากการสกัดดีเอ็นเอจะต้องมีการวัดผลทั้งปริมาณและคุณภาพก่อนการนำไปวิเคราะห์ต่อไป

ปัจจุบันมี 3 วิธีเบื้องต้นในการสกัดดีเอ็นจากตัวอย่างทางนิติวิทยาศาสตร์ คือ การสกัดด้วยวิธีอินทรีย์ (organic extraction) วิธีคีเล็กซ์ (Chelex extraction) และวิธีสกัดจาก FTA (FTA extraction) การเลือกวิธีสกัดแต่ละวิธีขึ้นอยู่กับตัวอย่างทางชีววิทยาที่ทำการสกัด

1. การสกัดด้วยวิธีอินทรีย์ (organic extraction)

ในบางครั้งเรียกว่าการสกัดด้วย phenol และ chroloform ได้มีการใช้วิธีนี้มาอย่างยาวนาน สามารถใช้ได้ร่วมกับกระบวนการ RFLP และ PCR ผลที่ได้จากวิธีอินทรีย์ นี้จะได้โมเลกุลดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักมากเหมาะสมแก่การตรวจด้วยกระบวนการ RFLP

2. การสกัดด้วยวิธีคีเล็กซ์ (Chelex extraction)

เป็นวิธีการที่รวดเร็วกว่า การสกัดด้วยวิธีอินทรีย์และการสกัดด้วยวิธีคีเล็กซ์ นี้มีขั้นตอนน้อยกว่าทำให้มีโอกาสที่มีการปนเปื้อนจากตัวอย่าง – ตัวอย่างน้อยกว่า อย่างไรก็ตามการผลของการสกัดวิธีนี้จะได้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวโดยสามารถนำมาดำเนินกระบวนการ PCR ต่อได้เท่านั้น

ตัวอย่างทางนิติวิทยาศาสตร์ต้องมีการดำเนินการทุกๆขั้นตอนอย่างระมัดระวังเพื่อป้องกันการปนเปื้อน โดยในบางครั้งอาจต้องทำการแยกจุดการทำงานระหว่างตัวอย่างตรวจ ออกจากตัวอย่างที่ใช้อ้างอิง

3. การสกัดจาก FTA (FTA extraction)

วิธีการเก็บตัวอย่างด้วยกระดาษ FTA เป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็วที่สุดในการเก็บตัวอย่างทางชีวภาพ เพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอและในการเก็บระยะยาวที่อุณหภูมิห้องสามารถประยุกต์ใช้กับตัวอย่างประเภท เลือด เยื่อบุกระพุ้งแก้ม เซลล์พืช แบคทีเรีย ฯลฯ โดยกระดาษ FTA นี้จะทำการย่อยเซลล์โดยทันทีและทำการกักเก็บดีเอ็นเอลงในช่องว่าง (matrix) ระหว่างเยื่อกระดาษและกระดาษ FTA นั้นได้ทำการเคลือบสารยับยั้งการทำงานของโปรตีนเพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ หลายชนิดเช่นเอนไซม์ nuclease ที่เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยดีเอ็นเอได้ และสามารถย่อยเยื่อหุ้มของไวรัส แบคทีเรียและราได้ ซึ่งสามารถทำให้เก็บตัวอย่างเป็นระยะเวลายาวนานได้ ด้วยเหตุข้างต้นจังทำให้กระดาษ FTA สามารถเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลาที่ยาวนานได้ โดยการทดลองกับตัวอย่างเลือดเมื่อพบว่าเมื่อทำให้ติดบนกระดาษ FTA โดยสมบูรณ์แล้วสามารถเก็บที่อุณหภูมิห้องและนำมาสกัดดีเอ็นเอได้สมบูรณ์ในระยะเวลามากกว่า 17 ปี

การสกัดดีเอ็นเอจากกระดาษ FTA เนื่องจากเซลล์ที่ติดกับกระดาษ FTA นั้นผ่านการย่อยเซลล์แล้ว กระบวนการหลักคือการล้างโปรตีนและ organelle ออกจากผิวกระดาษและทำการแยกดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ระหว่างเยื่อกระดาษออกมา

ดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยทั่วไปแล้วสามารถเก็บที่ -20 ถึง -80 องศาเซลเซียส ขึ้นกับความยาวนานของการเก็บ เพื่อป้องกันการเสื่อมสลายของดีเอ็นเอ เอนไซม์ nuclease ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบทั่วไปในเซลล์ ทำหน้าที่ย่อยสลายดีเอ็นเอเพื่อนำกลับไปสร้างดีเอ็นเอใหม่ เอนไซม์นี้ทำงานโดยมีแมกนีเซียมเป็นตัวช่วยเร่งปฏิกิริยา ดังนั้นการยับยั้งแมกนีเซียมโดยใช้ EDTA ในการจับแมกนีเซียม จึงสามารถลดการสลายของดีเอ็นเอได้

ชุดสกัดสำเร็จรูป

เป็นการใช้เทคนิคประยุกต์ใช้เหมาะกับชนิดและปริมาณของตัวอย่างทางชีววิทยา ในรูปแบบต่างๆ โดยมีการปรับอัตราส่วนของสารเคมีและระยะเวลาในขั้นตอนต่างๆ เช่นชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป QIAamp DNA Micro kit ที่เหมาะสำหรับตัวอย่างประเภทเลือดและเนื้อเยื่อ ที่มีปริมาณน้อยมาก

การวัดปริมาณดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอที่ได้หลังจากการสกัดแยกแล้วต้องมีความน่าเชื่อถือทั้งในด้านปริมาณและด้านคุณภาพ จึงจะทำให้แน่ใจได้ว่าดีเอ็นเอที่ทำการเก็บกู้มาได้นั้นเป็นดีเอ็นเอของมนุษย์มากกว่าที่จะเป็นดีเอ็นเอจากแหล่งอื่นๆ 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 ทั้งที่สามารถวัดปริมาณเฉพาะเจาะจงเฉพาะดีเอ็นเอของมนุษย์และการตรวจหาสารยับยั้งกระบวนการ PCR ดังตารางที่ 1

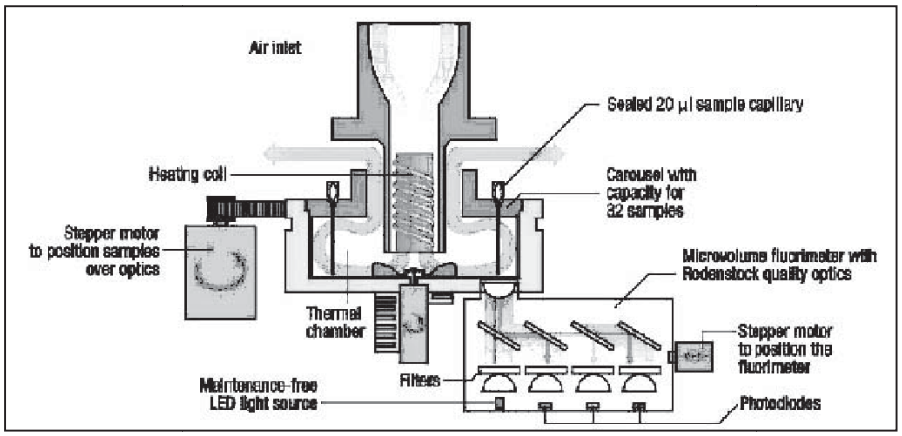
ตารางที่ 1 ความหลากหลายของวิธีการวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป

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.

การวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยกระบวนการ Real-time PCR

Real-time PCR เกิดจากการพัฒนาเทคโนโลยี 2 ส่วน คือ การพัฒนาเทคโนโลยีในการตรวจหา PCR product ในสารละลายโดยการใช้สารเรืองแสง (fluorescence reporter) และการพัฒนาเครื่อง thermocycler ซึ่งแต่เดิมเป็นแค่เครื่องควบคุมอุณหภูมิขึ้นลงตามระยะเวลาที่กำหนดมาเป็นเครื่อง real time thermocycler โดยเพิ่มส่วนที่เป็นแหล่งกำเนิดแสงเพื่อไปก่อให้เกิดการเรืองแสงของ PCR product และส่วนตรวจวัดการเรืองแสงที่เกิดจาก PCR product ในหลอดปฏิกิริยา ดังภาพที่ 2 ดังนั้น การทำ real-time PCR จึงเป็นการทำการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ โดยที่สามารถตรวจวัดปริมาณ PCR products ที่เกิดขึ้นจริง ณ เวลานั้น ๆ เปรียบเทียบลงบนกราฟมาตรฐานที่ทำขึ้นจาก standard 1-8 ซึ่งต่างจาก conventional PCR ซึ่งการตรวจ PCR product จะกระทำหลังจากปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณสิ้นสุดแล้ว



ภาพที่ 2 แบบจำลองเครื่อง real-time thermocycler

ที่มา: วีระพงศ์ ลุลิตานนท์, Real Time Polymerase Chain Reaction [ออนไลน์], เข้าถึงเมื่อ 28 กุมภาพันธ์ 2555. เข้าถึงได้จาก http://www.microbio.md.kku.ac.th

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

1. เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

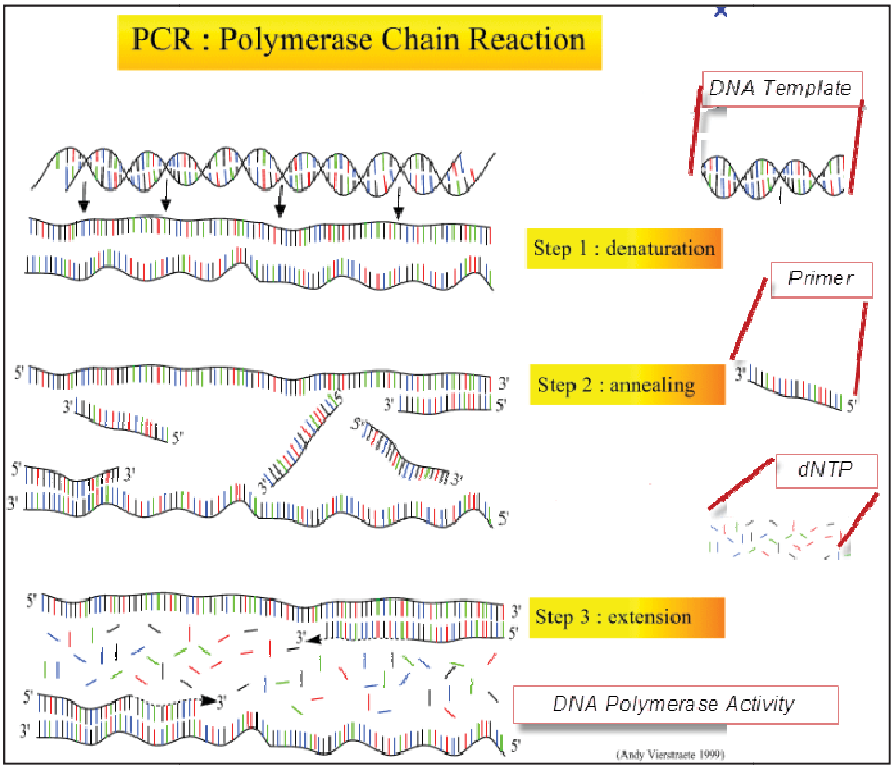
เทคนิคการทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยทั่วไปมักมีวัตถุประสงค์ที่จะให้ได้ยีนที่ต้องการและเพิ่มปริมาณของยีนดังกล่าวให้มากขึ้นหลายเท่า โดยใช้ primer เป็นตัวเริ่มปฏิกิริยา เทคนิคนี้จึงมีอีกชื่อหนึ่งว่า In vitro enzymatic gene amplification วิธีนี้มีประโยชน์ในการตรวจหาชิ้นส่วนหรือเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการในสิ่งตรวจ ค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1983 โดยใช้หลักการเลียนแบบกระบวนการตามธรรมชาติโดยใช้ primer เป็นตัวเริ่มต้นปฏิกิริยาและใช้เอนไซม์ DNA polymerase เป็นตัวช่วยให้ดีเอ็นเอเกิดเป็นสายยาวออกไปโดยใช้นิวคลีโอไทด์ 4 ชนิดเป็นวัตถุดิบ ได้แก่ dATP dGTP dCTP และ dTTP เข้ามาต่อเป็นเบสคู่สมกับดีเอ็นเอสายต้นแบบ ดังนั้นส่วนประกอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอนี้คือดีเอ็นเอต้นแบบ เอนไซม์ DNA polymerase dNTP ทั้ง 4 ชนิด primer อย่างน้อย 1 ชนิดและ บัฟเฟอร์ที่เพื่อปรับสภาวะให้เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอ มีการอาศัยขั้นตอนปฏิกิริยาต่อเนื่องหลายรอบซึ่งแต่ละรอบประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ

1.1 ขั้นตอน denature เป็นขั้นตอนที่ทำให้สายดีเอ็นเอต้นแบบแยกสายออกโดยอาศัยความร้อน

1.2 ขั้นตอน primer annealing เป็นขั้นตอนที่ใช้อุณหภูมิในการปรับให้ primer ที่ใส่ในปฏิกิริยาเข้าเกาะกับดีเอ็นเอต้นแบบบริเวณคู่สม

1.3 ขั้นตอน primer extension เป็นขั้นตอนการขยายสายดีเอ็นเอส่วนที่ต่อจากการเข้าจับของ primer โดยมีทิศทางจาก 5’ ไปยัง 3’ โดยอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และใช้ dNTP ทั้ง 4 ชนิด เป็นวัตถุดิบในการสร้างสายดีเอ็นเอใหม่

ดังนั้นถ้าพิจารณาจากการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอโดยเริ่มจากดีเอ็นเอต้นแบบ 1 คู่ สิ้นสุดกระบวนการ 1 รอบจะได้ดีเอ็นเอ 2 คู่และจะเพิ่มขึ้น 2 เท่าในทุกๆรอบของกระบวนการเพิ่มปริมาณ หากเพิ่มปริมาณ n รอบ ก็จะได้ปริมาณดีเอ็นเอ 2^n เท่าดังภาพที่ 3



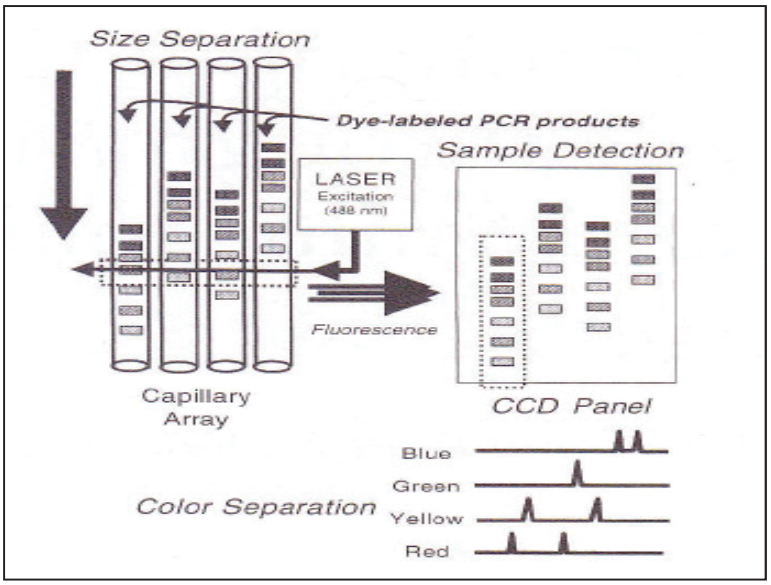
ภาพที่ 3 ขั้นตอนกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ที่มา: มาลินี อัศวดิษฐเลิศ, เทคนิคพีซีอาร์คืออะไรและมีประโยชน์อย่างไร? [ออนไลน์], เข้าถึงเมื่อ 28 กุมภาพันธ์ 2555. เข้าถึงได้จาก http://www.vcharkarn.com

2. การจำแนกบุคคลจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

การจำแนกความแตกต่างของดีเอ็นเอของแต่ละบุคคล ในส่วนของความยาวลักษณะคู่เบส หรือรูปร่างโครโมโซม มาใช้ในหลายงานเช่น การวินิจฉัยโรค การตัดต่อพันธุกรรม การทำแผนที่ยีน การถ่ายทอดทางพันธุกรรม รวมทั้งการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลในทางกฎหมาย ทำ

ให้มีการพัฒนาความสามารถในการจำแนกให้มีความละเอียดและสามารถใช้ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างมากขึ้น รวมทั้งการพัฒนาคิดค้นเครื่องมืออัตโนมัติเพื่อช่วยในกระบวนการตรวจวิเคราะห์



ภาพที่ 4 แสดงการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ผ่านการเพิ่มปริมาณแล้ว ด้วย Multicapillary Electrophoresis

ที่มา: Thomas Weissensteiner et al., PCR Technology Current Innovation. (Florida: CRC Press LLC, 2004), 112.

STRs (Short Tandem Repeats) เป็นส่วนของดีเอ็นเอที่มีขนาดตั้งแต่ 2 ถึง 6 คู่เบส โดยซ้ำไปเรื่อยๆตั้งแต่ 5 ถึง 50 ครั้งหรือมากกว่า การวิเคราะห์ STRs มีประโยชน์ในการจำแนกบุคคลในประชากร วงการนิติวิทยาศาสตร์ได้กำหมดมาตรฐานให้ใช้อย่างน้อย 13 ตำแหน่งหลัก และรายชื่อชุดวิเคราะห์ STRs สำเร็จรูปดังในตารางที่ 2 ตำแหน่งหลักทั้ง 13 ตำแหน่งได้แก่ CSF1PO, FGA, TH01, TPOX1 VWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51 และ D21S11

ตารางที่ 2 แสดงที่อยู่ ขนาด และลำดับเบสของ STRs หลักทั้ง 13 ตำแหน่ง

ตำแหน่ง	ตำแหน่งบนโครโมโซม	ลำดับเบสการซ้ำ	ช่วงของแอลลีล
CSF1PO	5q33.1	TAGA	5-16
FGA	4q31.3	CTTT	12.2-51.2
TH01	11p15.5	TCAT	3-14
TPOX	2p25.5	GAAT	4-16
VWA	2p25.3	[TCTG][TCTA]	10-25
D351358	12p13.31	[TCTG][TCTA]	8-21
D5S818	5q23.2	AGAT	7-18
D75820	7q21.11	GATA	5-16
D851179	8q24.13	[TCTA][TCTG]	7-20
D13S317	13q31.1	TATC	5-16
D16S539	16q24.1	GATA	5-16
D18S51	18q21.33	AGAA	7-39.2
D21S11	21q21.1	Complex [TCTA][TCTG]	12-41.2

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

ในการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้ชุดวิเคราะห์สำเร็จรูปเช่นชุดน้ำยา AmpFℓSTR Identifiler (Applied Biosystems) สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่ง STRs ทั้ง 16 ตำแหน่ง และชุดวิเคราะห์สำเร็จรูปนี้ได้ใช้ primer ที่ผ่านการติดสลากด้วยฟลูออเรสเซนซ์แบบหลายสี เพื่อการแยกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีขนาดใกล้เคียงกันขณะทำการ Electrophoresis การวิเคราะห์ STRs นี้ได้มีการใช้อย่างแพร่หลายในวงการนิติวิทยาศาสตร์ ดังตารางที่ 3 และ 4

ตารางที่ 3 ชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่ใช้ในการการวิเคราะห์ STRs

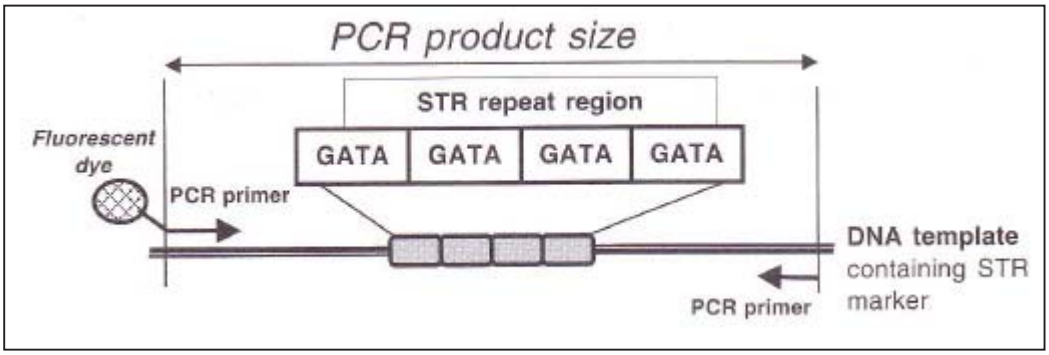
ชุดสำเร็จรูป	ผู้ผลิต	ตำแหน่งของโลคัสที่ทำการวิเคราะห์
AmpFℓSTR® Blue™	Applied Biosystems	D3SI358. VWA. FGA
AmpFℓSTR® Green I™	Applied Biosystems	Amelogenin, THO1,TPOX, CSF1PO
AmpFℓSTR® Profiler™	Applied Biosystems	D3S1358, VWA, FGA, Amelogenin. THO1, TPOX. CSFlPO. D5S818, D13S317, D7S820
AmpFℓSTR® Profiler Plus™	Applied Biosystems	D3S1358, VWA, FGA, Amelogenin, D8S1179, D2lS11, D18S51. D5S818, D13S317, D7S820
AmpFℓSTR® COfiler™	Applied Biosystems	D3S1358, D165539, Amelogenin. THO1, TPOX. CSFIPO, D7S820
AmpFℓSTR® SGM Plus™	Applied Biosystems	D3S1358, VWA, D16S539, D2S1338. Amelogenin. D8S1179, D2lS11, D18S51, D19S433, THO1, FGA
AmpFℓSTR® Identifiler™	Applied Biosystems	CSFIPO, FGA, TPOX, THO1, VWA, D3S1358, D5S818, D7S820. D8S I 179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, D19S433, D2S1338, amelogenin
CCTv Multiplex	Promega Corporation	CSFIPO, TPOX, THOl, VWA (vWF)
FFFL Multiplex	Promega Corporation	F13A1, FES/FPS, F13B, LPL
GammaSTR® Multiplex	Promega Corporation	D16S539, D13S3l7, D7S820. D5S818
PowerPlex® 1.2	Promega Corporation	CSF1PO, TPOX, TH01, VWA, D16S539, D13S317, D7S82O. D5S81 8, amelogenin
PowerPlex® E5	Promega Corporation	D3S1358. TH0l, D21Sl1, D18S5l, VWA, D8Sll79, FGA, SE33 (ACTBP2), amelogenin
PowerPlex® 16	Promega Corporation	CSFIPO. FGA, TPOX, TH01, VWA, D3S1358. D5S818, D7S820, D85S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, Penta D, Penta E, amelogenin

ที่มา Thomas Weissensteiner et al., PCR Technology Current Innovation. (Florida: CRC Press LLC, 2004), 113.

ตารางที่ 4 ตัวอย่างการเพิ่มปริมาณโดยใช้ primer จากชุดวิเคราะห์ STRs สำเร็จรูป

ขั้นตอน	Initial Inbubation	Denature	Annealing	Extension	Final Extension	Final
จำนวนรอบ	1	28			1	1
อุณหภูมิ (°C) / ระยะเวลา (MM:SS)	95 / 10:00	94 / 01:00	59 01:00	72 / 01:00	60 / 45:00	25 / ∞

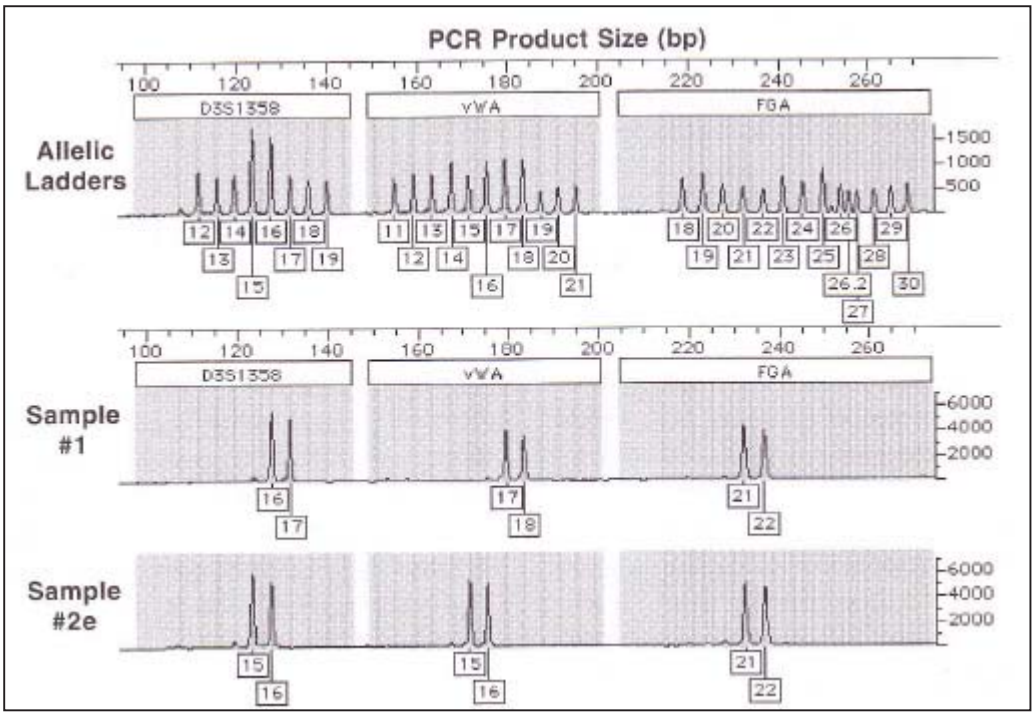
หลักการการเพิ่มปริมาณ STRs เป็นการเพิ่มปริมาณเฉพาะส่วนซ้ำที่ต้องการ โดยใช้ Primer 2 ชนิด โดย Primer ที่มีการติดสลากด้วยสีฟลูออเรสเซนซ์ทำการเพิ่มปริมาณจากฝั่ง 5' ดังภาพที่ 5 ส่วนนี้ใช้ในการแยกสีเมื่อทำการเพิ่มปริมาณสมบูรณ์แล้ว



ภาพที่ 5 การทำงานของ Primer ที่มีการติดสลากด้วยสีฟลูออเรสเซนซ์

ที่มา: Thomas Weissensteiner et al., PCR Technology Current Innovation. (Florida: CRC Press LLC, 2004), 116.

เมื่อใช้ชุด Primer หลายตัวเพิ่มปริมาณในส่วนที่มีจำนวนการซ้ำไม่เท่ากัน จะทำให้ได้ผลการเพิ่มปริมาณที่มีขนาดแตกต่างกัน จึงสามารถแยกผลของการเพิ่มปริมาณที่ได้ทั้งในเชิงขนาด ดังภาพที่ 6 ผลการเพิ่มปริมาณที่ได้ ขนาดจะบอกถึงความยาวของการซ้ำของ STRs ที่สนใจ โดยการเปรียบเทียบจาก Allelic ladder ที่ผ่านการ Electrophoresis ภายใต้สภาวะเดียวกัน Allelic ladder นี้ถูกจัดทำขึ้นเพื่อการใช้เปรียบเทียบจากขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่พบบ่อย เพื่อให้ทราบขนาดที่แน่นอนของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ผ่านการเพิ่มปริมาณแล้ว

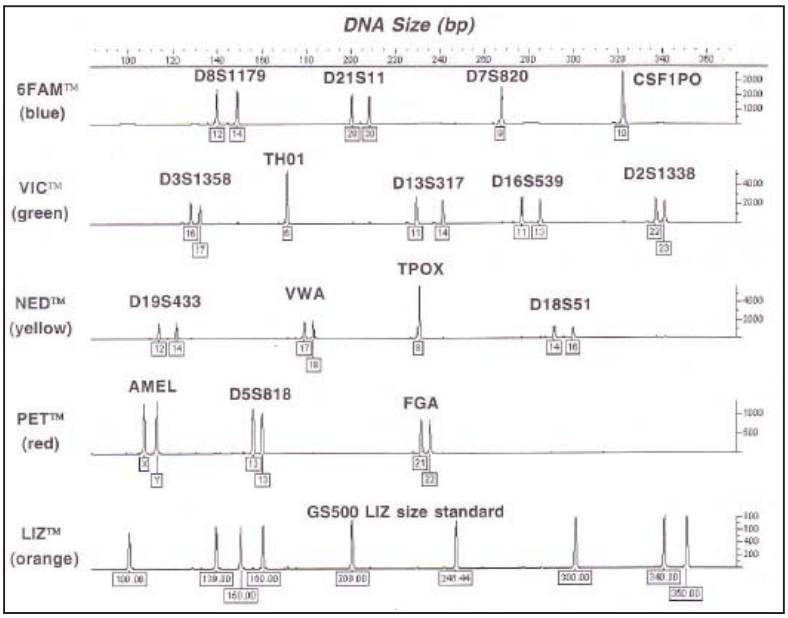


ภาพที่ 6 ผลการเพิ่มปริมาณที่ได้ บอกถึงขนาดของ STRs ที่สนใจโดยการเปรียบเทียบจาก Allelic ladder

ที่มา: Thomas Weissensteiner et al., PCR Technology Current Innovation. (Florida: CRC Press LLC, 2547), 116.

การสังเกตผลด้วยเครื่อง ABI Prism 3100 Genetic Analyzer จากผลการเพิ่มปริมาณจากชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป AmpFℓSTR Identifiler (Applied Biosystems) เป็นการอ่านผลการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ทั้ง 5 สีที่ติดสลากไว้ 6FAM™ VIC™ NED™ PET™ และ LIZ™ ตัวอย่างจะถูกฉีดเข้าไปในเครื่อง Capillary ของเครื่อง ABI 3100 เป็นเวลา 5 วินาทีที่ 2000 โวลต์ หรือ 10 วินาทีที่ 3000 โวลต์ การแยกตัวของดีเอ็นเอจะเกิดขึ้นที่ 15000 โวลต์ในช่วงเวลา 20 ถึง 45 นาที ขึ้นอยู่กับขนาดของชิ้นส่วนนั้น

หลังจากเก็บข้อมูลดิบด้วยเครื่อง ABI 3100 แล้วผลที่ได้จะนำมาอ่านผลด้วยโปรแกรม Genescan เป็นการเปรียบเทียบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้กับ Allelic ladders และการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ทั้งขนาดและสี ดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 การเปรียบเทียบขนาดและสี ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้กับ Allelic ladder ที่มา Thomas Weissensteiner et al., PCR Technology Current Innovation. (Florida: CRC Press LLC, 2547), 117.

3. การอ่านผลการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

3.1 Match คือการอ่านผลยืนยันว่าดีเอ็นเอดีเอ็นเอที่ทำการวิเคราะห์ตรงกับดีเอ็นเอที่ใช้อ้างอิงตั้งแต่ 8 ถึง 16 ตำแหน่ง แต่หากดีเอ็นเอที่ได้สามารถเพิ่มปริมาณได้ไม่ถึง 8 ตำแหน่ง จำเป็นต้องมีกระบวนการเพิ่มเติมอื่นๆเพื่อให้ได้ ปริมาณครบ 8 ตำแหน่ง

3.2 Exclusion (non-Match) คือการอ่านผลยืนยันว่าดีเอ็นเอที่ทำการตรวจวิเคราะห์ไม่ตรงกับดีเอ็นเอที่ใช้อ้างอิงตั้งแต่ 8 ถึง 16 ตำแหน่งแต่หากดีเอ็นเอที่ได้สามารถเพิ่มปริมาณได้ไม่ถึง 8 ตำแหน่งจำเป็นต้องมีกระบวนการเพิ่มเติมอื่นๆเพื่อให้ได้ ปริมาณครบ 8 ตำแหน่ง

3.3 Inconclusive คือการอ่านผลที่ไม่สามารถวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ถึง 8 ตำแหน่งด้วยวิธี conventional PCR และ กระบวนการเพิ่มเติมอื่นๆ เช่น LCN-PCR

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. งานวิจัยต่างประเทศ

ในปีค.ศ. 1997 ได้ศึกษาเกี่ยวกับการเก็บลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากรอยลายพิมพ์นิ้วมือสำเร็จ โดย van Oorschot และคณะ ในปีเดียวกัน Sweet ได้พัฒนาการเก็บดีเอ็นเอด้วยเทคนิค

double swab โดยทดลองเก็บตัวอย่างน้ำลายจากผิวหนังมนุษย์ และพิสูจน์ได้ว่ามีประสิทธิผลดีกว่าการเก็บด้วยเทคนิค single swab นอกจากนี้ยังมีผลการวิจัยของ Wiegand และ Kleiber ที่ได้ทำการวิจัยหาการเก็บดีเอ็นเอจากเซลล์เยื่อบุผิวที่ตกค้างบนเชือกในคดีฆ่ารัดคอ จึงทำให้การเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอจากผิวสัมผัสมีความแพร่หลายมากขึ้น ต่อมามีการศึกษาการถ่ายดีเอ็นเอ จากบุคคลสู่วัตถุ (secondary transfer) โดย Ladd และคณะในปี ค.ศ.1999 ศึกษาเกี่ยวกับการถ่ายดีเอ็นเอ จากบุคคลสู่วัตถุ โดยเน้นไปที่การวิเคราะห์กระบวนการการถ่ายทอดโดยพบว่า การที่ดีเอ็นเอของบุคคลสามารถถ่ายทอดไปยังวัตถุได้นั้นเกิดจาก เซลล์เยื่อบุที่ฝ่ามือหลุดลอกตามธรรมชาติไปติดที่วัตถุ และการศึกษาของ Lowe และคณะในปี ค.ศ. 2002 ศึกษาเกี่ยวกับการปลดปล่อยเซลล์ของแต่ละบุคคลและการถ่ายดีเอ็นเอจากบุคคลสู่พื้นผิวของวัตถุ โดยแบ่งออกเป็น 3 ช่วงเวลาคือ 15 นาที 2 ชั่วโมง และ 6 ชั่วโมงหลังการล้างมือ ทดลองให้อาสาสมัครจับวัตถุเป็นเวลา 10 วินาที และนำมาเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอด้วยเทคนิค double swab โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวละลายเซลล์ออกจากวัตถุ จากนั้นนำมาเพิ่มปริมาณด้วยชุดวิเคราะห์ STR สำเร็จรูป AMPFℓSTR SGM Plus เพื่อตรวจสอบความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอที่เก็บได้ โดยจำแนกระดับความสามารถการปลดปล่อยเซลล์ของอาสาสมัครออกเป็น 2 ระดับ ผลคือสามารถเก็บกู้ดีเอ็นเอจากพื้นผิววัตถุได้มีความสมบูรณ์ที่สุดใน 6 ชั่วโมงหลังการล้างมือจึงสรุปได้ว่าการล้างมือทำให้ความสามารถในการปลดปล่อยเซลล์จากมือลดลง ต่อมาในปี 2004 Bright และ Petricevic ได้ทดลองโดยมีแนวคิดที่ว่าการเชื่อมโยงสถานที่เกิดเหตุไปยังรองเท้า และรองเท้าไปยังผู้ต้องสงสัยผ่านทางดีเอ็นเอที่ติดอยู่ในรองเท้านั้นเป็นไปได้ จึงทำการทดลองเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอด้วยเทคนิค double swab โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวละลายเซลล์ออกและสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีอินทรีย์และคีเล็กซ์ ได้ผลว่าสามารถเก็บกู้ดีเอ็นเอที่มีความสมบูรณ์สูงได้ และปี ค.ศ. 2012 ได้มีการทดลองของ Bruin คณะทำการทดลองเปรียบเทียบวิธีการเก็บตัวอย่างเซลล์เยื่อบุผิวของผู้ต้องสงสัยบนผิวหนังของเหยื่อ โดนใช้เทคนิค double swab และ เทคนิค stubbing ที่เป็นเทคนิคประยุกต์ของเทคนิค tape-lifting และผลการทดลองพบว่าเทคนิค double swab ให้ผลดีกว่าเล็กน้อย แต่เทคนิค stubbing ในแง่การใช้งานแล้วทางผู้วิจัยแนะนำว่าเหมาะสมกว่าเทคนิค double swab

การสกัดดีเอ็นเอนอกเหนือจากวิธีการพื้นฐาน 3 วิธีได้แก่ วิธีการสกัดอินทรีย์ วิธีคีเล็กซ์ และวิธีสกัด FTA แล้วมีการทดลองเปรียบเทียบการสกัดมากมายที่เปรียบเทียบวิธีการหลักกับชุดสกัดสำเร็จรูปอาทิเช่นในปี ค.ศ.2008 โดย Sewell ทำการทดลองเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอ The DNeasy plant mini kit (QIAGEN) และ QIAamp DNA mini kit จากตัวอย่างน้ำลายบนเอกสาร พบว่า DNeasy plant mini kit ได้ผลดีกว่า ต่อมาในปี ค.ศ. 2011 โดย Bogas และคณะทำการทดลองเปรียบเทียบ วิธีการสกัดดีเอ็นเอ 4 วิธี ได้แก่ Chelex DNAIQ QIAamp DNA Investigator และ

AutoMate Express กับตัวอย่างทางนิติวิทยาศาสตร์ ประเภท เช่นเลือด ในหลายเงื่อนไขเช่นเลือดบนผ้าชนิดต่างๆ เลือดแห้ง เลือดที่ผ่านรังสี UV เลือดในดินแห้ง เลือดในดินเปียก และแยกระยะเวลาการเก็บออกเป็น 1 วัน 3 วัน และ 7 วันเพื่อจำลองการเสื่อมของดีเอ็นเอ พบว่าวิธี DNA Investigator และ AutoMate Express ได้ผลดีกว่าวิธี Chelex และ DNAIQ และในปี 2012 Phillips ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบการสกัดดีเอ็นเอ 3 วิธี ได้แก่ Chelex-100 QIAGEN DNA Investigator Kit และ QIAcube จากตัวอย่างทางนิติวิทยาศาสตร์ประเภทเยื่อบุกระพุ้งแก้มและคราบเลือด ผลที่ได้พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่วิธีการ QIAcube เป็นวิธีการที่จัดการกับตัวอย่างได้อย่างรวดเร็วและไม่มีการปนเปื้อนเนื่องจากเป็นเครื่องอัตโนมัติ

2. งานวิจัยในประเทศไทย

ในปี ค.ศ. 2007 Lempan ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบวิธีการเก็บตัวอย่างและการสกัดดีเอ็นเอจากเสื้อผ้าที่ผ่านการสวมใส่แล้ว โดยเปรียบเทียบวิธีเก็บ 2 วิธีคือ วิธีใช้ก้านสำลีและวิธีการใช้เทปกาว และเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอ 3 วิธีคือ ChargeSwitch Forensic DNA Purification Kit Chelex® 100 และ QIAamp® DNA Mini Kit ผลการทดลองพบว่าชุดสกัดสำเร็จรูป ChargeSwitch Forensic DNA Purification Kit ให้ประสิทธิผลสูงสุด ต่อมาในปี ค.ศ. 2010 Duangshatome และคณะ ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบวิธีการเก็บตัวอย่างจากน้ำลายบนเทปกาว 2 วิธีได้แก่ การสกัดดีเอ็นเอจากเทปกาวโดยตรงและการใช้ก้านสำลีเก็บจากนั้นจึงนำมาสกัดดีเอ็นเอ รวมทั้งศึกษาตัวทำละลายเทปกาวที่เหมาะสมระหว่าง แอลกอฮอล์และไซลีน ผลการทดลองพบว่าวิธีการเก็บทีมีประสิทธิภาพกว่าคือวิธีการเก็บด้วยก้านสำลี และตัวทำละลายเทปกาวที่เหมาะสมคือแอลกอฮอล์ ในปีเดียวกัน Sirichantrawong และคณะได้ทำการศึกษาการเก็บดีเอ็นเอจากรองเท้าแตะที่ผ่านการสวมใส่ 1 7 และ 14 วัน โดยเปรียบเทียบวิธีการเก็บด้วยเทคนิค double swab โดยใช้ น้ำกลั่น และ 95% ethanol เป็นตัวละลายเซลล์ ผลการทดลองพบว่าเทคนิค double swab โดยใช้ 95% ethanol เป็นตัวละลายเซลล์ให้ผลดีเอ็นเอปริมาณมากกว่า

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

คัดเลือกอาสาสมัคร เพศชายอายุ 19-25 ปี สุขภาพร่างกายสมบูรณ์แข็งแรง ที่คัดเลือกเข้าโครงการทดลองโดยสุ่ม โดยไม่มีการเปิดเผยชื่อทำตามระเบียบของคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคนคณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี โดยอาสาสมัครสามารถทราบข้อมูลการทดลองได้ทุกขั้นตอน

รูปแบบการวิจัย

การวิจัยเชิงทดลอง (Experimental Research)

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์

1.1. Swabs (Thai Guaze, Thailand)

1.2. Tape (3M, Thailand)

1.3. UV lamp

1.4. Swab boxes (Royal Thai Police, Thailand)

1.5. Pur-Wraps (Puritan Medical, U.S.A.)

1.6. FTA Cards (Whatman, U.S.A.)

1.7. Non- sterile gloves

1.8. Sterile scalpels

1.9. Pipettes

1.10. Tips

1.11. Vortex mixer

1.12. Microcentrifuge

1.13. Microcentrifuge tubes

1.14. Baskets

1.15. Hot Plate

1.16. Water Bath

1.17. 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, U.S.A.)

1.18. GeneAmp 9700 Themal Cycler (Applied Biosystems, U.S.A.)

1.19. 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, U.S.A.)

1.20. 15ml centrifuge tube

1.21. 50ml centrifuge tube

1.22. 96-Well Plate

2. สารเคมี

2.1. 95% Ethanol

2.2. 70% Ethanol

2.3. Proteinase K (QIAGEN Inc., U.S.A.)

2.4. Aseptic soap

2.5. 10% Chelex

2.6. TE buffer

2.7. Hidi Formamide

2.8. GeneScan 500 LIZ

3. ชุดน้ำยาสำเร็จรูป

3.1. Quantifiler Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems, U.S.A.)

3.2. AmpFℓSTR Identifiler PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, U.S.A.)

3.3. QIAamp DNA Micro Kit (QIAGEN Inc., U.S.A.)

4. โปรแกรมคอมพิวเตอร์

4.1. GeneMapper ID V.3.2 (Applied Biosystems, U.S.A.)

4.2. 7500 Fast System Sequence Detection Software V.14.0.25 (Applied Biosystems, U.S.A.)

5. วัตถุที่ใช้ทำการทดลอง

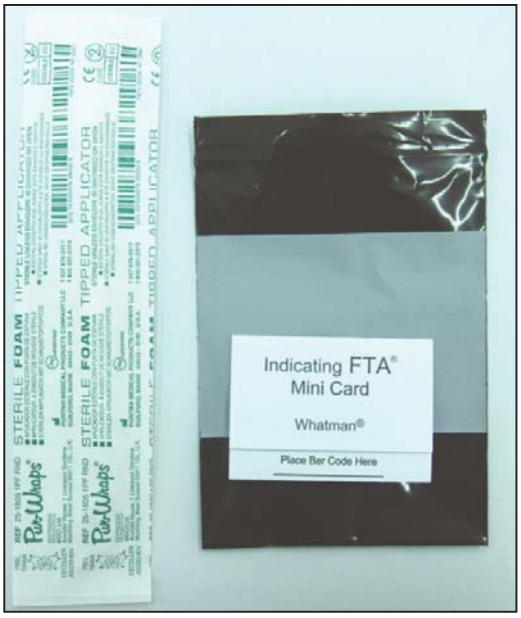
5.1. ก้อนหิน

ขั้นตอนการทดลอง

1. การเก็บดีเอ็นเออ้างอิง

1.1 ค่าดีเอ็นเออ้างอิงจากเยื่อบุกระพุ้งแก้ม

ใช้ไม้โฟม (Pur-Wraps, Puritan Medical, Maine, U.S.A.) เก็บเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มของอาสาสมัครทั้ง 10 คน และทำการถ่ายเซลล์ที่ได้ลงบนกระดาษ FTA (Indicating FTA Mini Card, Whatman) ดังภาพที่ 8



ภาพที่ 8 ไม้โฟมและกระดาษ FTA พร้อมซองเก็บ

1.2 ค่าดีเอ็นเออ้างอิงจากฝ่ามือ

ทำการเก็บเซลล์จากมือของอาสาสมัครโดยตรง ด้วยวิธี double swab โดยใช้ก้านสำลี (Thai Gauze, Thailand) หยอด 95% ethanol ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ป้ายเก็บให้ทั่วบริเวณฝ่ามือในลักษณะวงกลมและใช้ก้านสำลีอีกอันที่แห้งป้ายเก็บส่วนของ ethanol ที่เหลือบนฝ่ามือและเก็บก้านสำลีทั้งคู่ลงในกล่องเก็บปลอดเชื้อ (Royal Thai Police, Thailand) ดังภาพที่ 9

ภาพที่ 9 สำลีพร้อมกล่องเก็บก้านสำลี

2. การเก็บดีเอ็นเอจากการทดลองสัมผัสก้อนหิน

ให้อาสาสมัครใช้มือข้างที่ถนัดสัมผัสก้อนหิน (น้ำหนัก 600 – 800 กรัม) ดังภาพที่ 10 ที่ผ่านการล้างด้วยสบู่ฆ่าเชื้อและผ่านรังสี ultra violet เป็นเวลา 30 นาทีเพื่อทำลายดีเอ็นเอแปลกปลอมที่อาจติดอยู่ โดยให้สัมผัสก้อนหินดังกล่าวเป็นเวลา 1 นาที และแบ่งวิธีการเก็บออกเป็น 2 วิธี จากการแบ่งพื้นที่ผิวก้อนหินเป็น 2 ส่วนเพื่อทำการเก็บทั้ง 2 วิธี

ภาพที่ 10 ก้อนหินที่ใช้ในงานวิจัย

2.1 วิธี double swab โดยใช้ก้านสำลีหยอด 95% ethanol ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ป้ายเก็บให้ทั่วบริเวณพื้นผิวก้อนหิน ดังภาพที่ 11 และใช้ก้านสำลีแห้งป้ายเก็บส่วนของ ethanol ที่เหลือ และเก็บก้านสำลีทั้งคู่ลงในกล่องเก็บปลอดเชื้อ

ภาพที่ 11 การเก็บเยื่อบุผิวที่ตกค้างบนวัตถุด้วยเทคนิค double swab

2.2 วิธีการ tape lifting โดยใช้เทปกาว (3M Transparent, Thailand) ทำการแปะด้านเหนียวของเทปกาวลงบนพื้นผิวของก้อนหินให้สัมผัสเข้าถึงทุกส่วนของพื้นผิวก้อนหินดังภาพที่ 12 และทำการแปะด้านเหนียวของเทปกาวเข้าหากันเพื่อเก็บรักษาตัวอย่าง

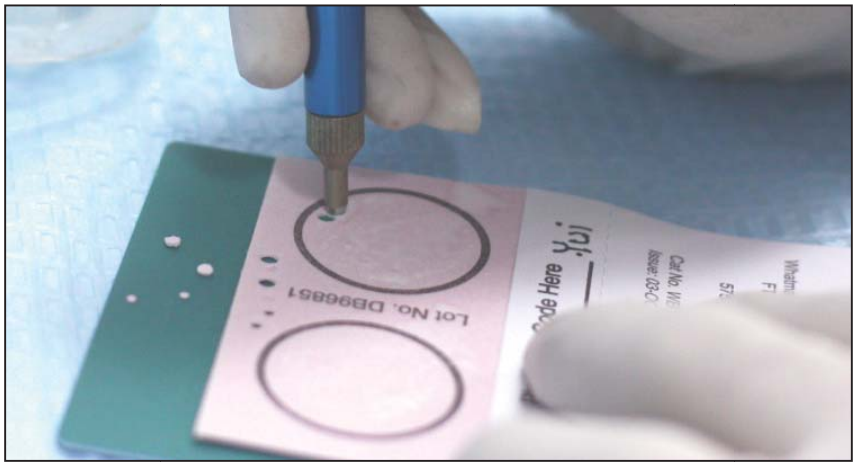
ภาพที่ 12 การเก็บเยื่อบุผิวที่ตกค้างบนวัตถุด้วยเทคนิค tape-lifting

3. การสกัดดีเอ็นเอ

จากการเก็บตัวอย่างจากหัวข้อการเก็บดีเอ็นเออ้างอิงการเก็บดีเอ็นเอจากการทดลอง นำมาแบ่งแยกตามวิธีการสกัดที่เหมาะสมเป็น 3 วิธีคือ

3.1 วิธี FTA Extraction

ใช้สกัดดีเอ็นเอที่ได้จากการเก็บในหัวข้อ 1.1 โดยเจาะกระดาษ FTA ใช้ FTA puncher เจาะบริเวณที่มีเซลล์จำนวน 10 ตำแหน่ง ดังภาพที่ 13 ใส่ลงใน microcentrifuge tube 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาณ 600 ไมโครลิตรเพื่อทำการล้าง ทำการเขย่าวนและบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วถ่ายส่วนน้ำทิ้ง จากนั้นเติม TE Buffer ปริมาณ 600 ไมโครลิตร ทำการเขย่าวนและบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วถ่ายส่วนน้ำทิ้ง และเติม TE Buffer ปริมาณ 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูดส่วนน้ำที่มีดีเอ็นเอเก็บไว้ใน microcentrifuge Tube



ภาพที่ 13 การเจาะกระดาษ FTA ด้วย FTA Puncher

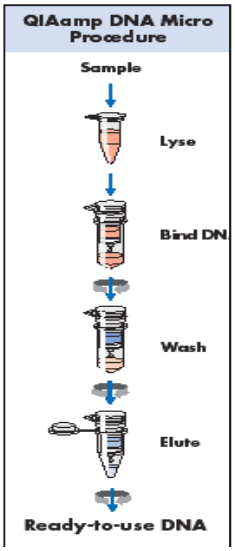
3.2 การสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป QIAamp DNA Micro Kit (QIAGEN Inc.,U.S.A.)

ใช้สกัดดีเอ็นเอที่ได้จากการเก็บในหัวข้อ 1.2 2.1 และ 2.2 โดยแยกวิธีการจัดการกับก้านสำลีและเทปกาวดังนี้

3.2.1 ใช้ sterile scalpel ตัดสำลีจากปลายก้านสำลี ใส่ลงใน 1.5 ml microcentrifuge tube

3.2.2 ใช้ sterile scalpel ตัดเทปกาวเป็นชิ้นเล็กบน ใส่ลงใน 1.5 ml microcentrifuge tube

จากนั้นเติม ALT Buffer ปริมาณ 400 ไมโครลิตร และ Proteinase K ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ทำการเขย่าวนและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมงเพื่อทำการย่อยเซลล์ จากนั้นนำก้านสำลีที่ได้มาแยกใส่ basket และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ทำการแยกส่วนสำลีทิ้งและเติม AL Buffer ปริมาณ 400 ไมโครลิตร เขย่าวนให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม 95% ethanol ปริมาณ 200 ไมโครลิตรและบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการถ่ายส่วนใสทั้งหมดลงใน Minlute Column (QIAGEN Inc., CA) และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที ทำการเปลี่ยนหลอดรองใหม่ จากนั้นเติม Buffer AW1 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทำการเปลี่ยนหลอดรองใหม่ และเติม Buffer AW2 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเปลี่ยนหลอดรองใหม่ และนำไปปั่นที่ 14000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาทีเพื่อทำให้ตัวอย่างแห้งอย่างสมบูรณ์ ก่อนที่จะย้าย Minlute Column ไปยัง microcentrifuge tube และเติม Buffer AE ปริมาณ 50 ไมโครลิตรลงที่กลาง Minlute Column และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที เก็บดีเอ็นเอที่ได้ใน microcentrifuge tube เพื่อไปทำกระบวนการต่อไป ดังในภาพที่ 14



ภาพที่ 14 ลำดับขั้นตอนโดยย่อของ QIAamp DNA Micro Kit

ที่มา: QIAamp DNA Micro Kit [Online], accessed 28 February 2012. available from http://www.qiagen.com

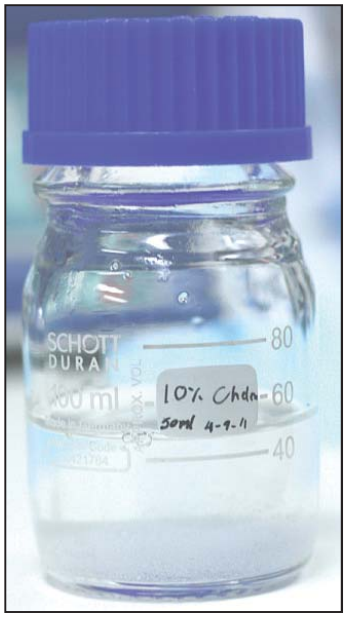
3.3 วิธีการสกัด Chelex Extraction

ใช้สกัดดีเอ็นเอที่ได้จากการเก็บในหัวข้อ 2.1 และ 2.2 โดยแยกวิธีการจัดการกับก้านสำลีและเทปกาวดังนี้

3.2.1 ใช้ sterile scalpel ตัดสำลีจากปลายก้านสำลี ใส่ลงใน 1.5 ml microcentrifuge tube

3.2.2 ใช้ sterile scalpel ตัดเทปกาวเป็นชิ้นเล็กบน ใส่ลงใน 1.5 ml microcentrifuge tube

จากนั้นเติม 95% Ethanol ปริมาณ 300 ไมโครลิตร และทำการปั่นวนเป็นเวลา 2 นาที ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 60 นาทีหรือจนระเหยหมด และเติมน้ำกลั่นปริมาณ 1000 ไมโครลิตร ปั่นวนให้เข้ากันเป็นเวลา 20 วินาที และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ระหว่างการบ่มนั้นทำการปั่นวนทุกๆ 10 นาที ทำการปั่นแยกใน basket ที่ 14000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 6 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และดูดส่วนใสทิ้งให้เหลือประมาณ 50 ไมโครลิตร และทำการเติม 10% Chelex ดังภาพที่ 15 ปริมาณ 180 ไมโครลิตร และ Proteinase K ปริมาณ 6 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 8 นาที จากนั้นทำการปั่นตกที่ 8000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาทีและทำการดูดเก็บดีเอ็นเอที่อยู่ในส่วนใส แยกใส่ microcentrifuge tube



ภาพที่ 15 10% Chelex

4. การวัดปริมาณดีเอ็นเอ

วัดปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากทุกตัวอย่างด้วยวิธี real-time PCR ด้วยชุดวัดปริมาณ Quantifiler Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems, CA, U.S.A.) ดังภาพที่ 16

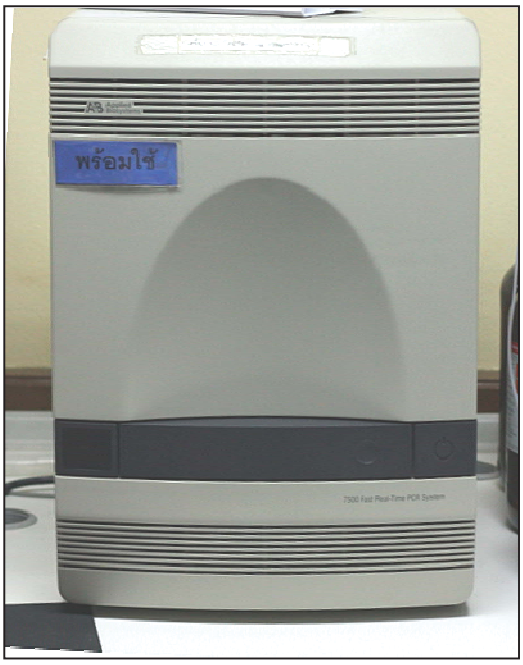
ใช้ Quantiiler Human Primer Mix เป็น Primer ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ทำได้โดยการผสมดีเอ็นเอที่สกัดได้ปริมาณ 1 ไมโครลิตร กับ Quantifiler PCR Reaction Mix ปริมาณ 6.25 ไมโครลิตรและ Quantifiler Human Primer Mix ปริมาณ 5.25 ไมโครลิตร ลงใน 96-Well Plate และทำกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ในเครื่อง 7500 Fast Real-Time PCR System ดังภาพที่ 17 โดยใช้โปรแกรม 9600 Emulation ที่มีสภาวะกระบวนการ PCR ดังในตารางที่ 5 โดยผลของ real-time PCR อ่านผลด้วยโปรแกรม 7500 Fast System Sequence Detection Software V.14.0.25 จะได้ผลปริมาณดีเอ็นเอในหน่วยนาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ng/µl)

ตารางที่ 5 อุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการ PCR ของ Quantifiler Human DNA Quantification Kit

ขั้นตอน	Initial Denature	Denature	Annealing	Extension
จำนวนรอบ	1	40		
อุณหภูมิ (°C) / ระยะเวลา (MM:SS)	95 / 10:00	95 / 00:15	60 / 01:00	

ภาพที่ 16 ชุดวัดปริมาณสำเร็จรูป Quantifiler Human DNA Quantification Kit

ที่มา: Invitrogen Product [Online], accessed 28 February 2012. available from http://products.invitrogen.com



ภาพที่ 17 เครื่อง 7500 Fast Real-Time PCR System

5. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

การคัดเลือกตัวอย่างมาทำการวัดปริมาณคัดมาจาก 2 ส่วนคือ

5.1 คัดเลือกจากผลปริมาณดีเอ็นเอที่มากที่สุดจากการเก็บและสกัดดีเอ็นเอแต่ละวิธี โดยอ้างอิงจากผล real-time PCR ในหัวข้อ 4

5.2 คัดเลือกผลจากเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มที่ตรงกับเจ้าของตัวอย่างที่คัดมาได้จากหัวข้อที่ 5.1 เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเออ้างอิงเปรียบเทียบ

จากนั้นนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ ไปเข้ากระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ Primer ในชุดวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอสำเร็จรูป AmpFℓSTR Identifiler PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, CA, U.S.A.) ภาพที่ 18 โดยทำการผสมดีเอ็นเอที่สกัดได้ปริมาณ 5 ไมโครลิตรกับ AmpFℓSTR PCR Reaction Mix ปริมาณ 5.25 ไมโครลิตร และ AmpFℓSTR Identifiler PCR Primer Set ปริมาณ 2.75 ไมโครลิตร และ AmpliTaq Gold DNA Polymerase ปริมาณ 0.25 ไมโครลิตร ใน 96-Well Plate จากนั้นดำเนินกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ในเครื่อง GeneAmp 9700 Themal Cycler ภาพที่ 19 ที่มีสภาวะกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดังในตารางที่ 6

ภาพที่ 18 ชุดวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ AmpFℓSTR Identifiler PCR Amplification Kit

ที่มา: Invitrogen Product [Online], accessed 28 February 2012. available from http://products.invitrogen.com

ภาพที่ 19 เครื่อง GeneAmp 9700 Themal Cycler

ตารางที่ 6 อุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการ PCR ของ AmpFℓSTR Identifiler PCR Amplification Kit

ขั้นตอน	Initial Inbubation	Denature	Annealing	Extension	Final Extension	Final
จำนวนรอบ	1	28			1	1
อุณหภูมิ (°C) / ระยะเวลา (MM:SS)	95 / 11:00	94 / 01:00	59 01:00	72 / 01:00	60 / 60:00	4 / ∞

6. การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ใช้กระบวนการ Capillary Electrophoresis โดยการผสม PCR Product ที่ได้ปริมาณ 1 ไมโครลิตรกับ Hidi Formamide ปริมาณ 10 ไมโครลิตร และ GeneScan 500 LIZ แล้วบ่มที่ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 นาทีเพื่อคลายเกลียวดีเอ็นเอ จากนั้นนำเข้าเครื่อง 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, U.S.A.) ภาพที่ 20 เพื่อทำการ capillary electrophoresis และทำการอ่านผลด้วยโปรแกรม GeneMapper ID V.3.2 เก็บผลเพื่อทำการเปรียบเทียบต่อไป

ภาพที่ 20 เครื่อง 3130 Genetic Analyzer

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. ค่าความแตกต่างทางสถิติจากการทดลองเชิงปริมาณ

1.1 จากการเก็บด้วยก้านสำลีและการเก็บด้วยเทปกาว โดยเปรียบเทียบจากผลปริมาณที่วัดด้วยวิธี real-time PCR

1.2 จากการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป QIAamp DNA Micro Kit และวิธีคีเล็กซ์โดยเปรียบเทียบจากผลปริมาณที่วัดด้วยวิธี real-time PCR

2. ค่าความแตกต่างจากการทดลองเชิงคุณภาพ

เปรียบเทียบความสมบูรณ์ของผลที่ได้จากการ เก็บดีเอ็นเอ – สกัดดีเอ็นเอแต่ละวิธี

3. ประเมินวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการจัดการตัวอย่างประเภทก้อนหิน

จากข้อมูลที่ได้ในหัวข้อ 1 และ 2

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

การหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างชุดข้อมูล 2 ชุด (Paired Samples t-test)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

ค่าอ้างอิง

ผลการวิจัยในส่วนของค่าอ้างอิงนั้น หลังจากทำการเก็บเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มด้วยไม้โฟม และทำการถ่ายเซลล์ที่เก็บได้ลงบนกระดาษ FTA และทำการสกัดดีเอ็นเอด้วย FTA Extraction ได้ผลปริมาณดีเอ็นเอดังในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มของอาสาสมัคร (นาโนกรัม)

หมายเลขอาสาสมัคร	ปริมาณดีเอ็นเอ (ng)
VT1	18.84
VT2	31.36
VT3	3.52
VT4	N/A
VT5	12.00
VT6	3.20
VT7	7.28
VT8	14.32
VT9	7.68
VT10	13.24

ผลการวิจัยในส่วนของการเก็บดีเอ็นเอจากมืออาสาสมัครโดยตรง โดยใช้เทคนิค double swab และมาทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป QIAamp DNA Micro Kit ได้ผลปริมาณดีเอ็นเอดังในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากการเก็บดีเอ็นเอจากฝ่ามือของอาสาสมัครโดยตรง (นาโนกรัม)

หมายเลขอาสาสมัคร	ปริมาณดีเอ็นเอ (ng)
VT1	17.60
VT2	13.52
VT3	3.52
VT4	N/A
VT5	7.20
VT6	18.04
VT7	43.00
VT8	4.92
VT9	2.52
VT10	65.00

ผลการทดลอง

ผลการเก็บตัวอย่างเซลล์บริเวณผิวสัมผัสก้อนหินด้วยก้านสำลีและเทปกาว จากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป QIAamp DNA Micro Kit และวิธีการสกัด Chelex Extraction

ตารางที่ 9 ปริมาณดีเอ็นเอที่เก็บได้จากแต่ละวิธีในครั้งที่ 1 (นาโนกรัม)

หมายเลขอาสาสมัคร	ก้านสำลี – QIAamp	ก้านสำลี – Chelex	เทปกาว - QIAamp	เทปกาว – Chelex
VT1	1.83	0	0	0
VT2	0.51	0	0	0.648
VT3	4.855	0	0.91	0
VT4	N/A	N/A	N/A	N/A
VT5	1.045	0	0	0
VT6	0.21	0.768	0	0
VT7	0.89	0	1.3	0
VT8	0.17	0	0	0.72
VT9	0	0.912	0.105	0
VT10	2.585	1.272	0	0

ตารางที่ 10 แสดงปริมาณดีเอ็นเอที่เก็บได้จากแต่ละวิธีในครั้งที่ 2 (นาโนกรัม)

หมายเลขอาสาสมัคร	ก้านสำลี – QIAamp	ก้านสำลี – Chelex	เทปกาว - QIAamp	เทปกาว – Chelex
VT1	1.21	0	0.08	0
VT2	0.135	0	0	0
VT3	0.19	0	0	0
VT4	N/A	N/A	N/A	N/A
VT5	0.425	0	0	0
VT6	0	0	0	2.088
VT7	0.175	0.72	0	0
VT8	0	0.264	0	0
VT9	0	0.48	0	0
VT10	0.475	2.472	0.04	0

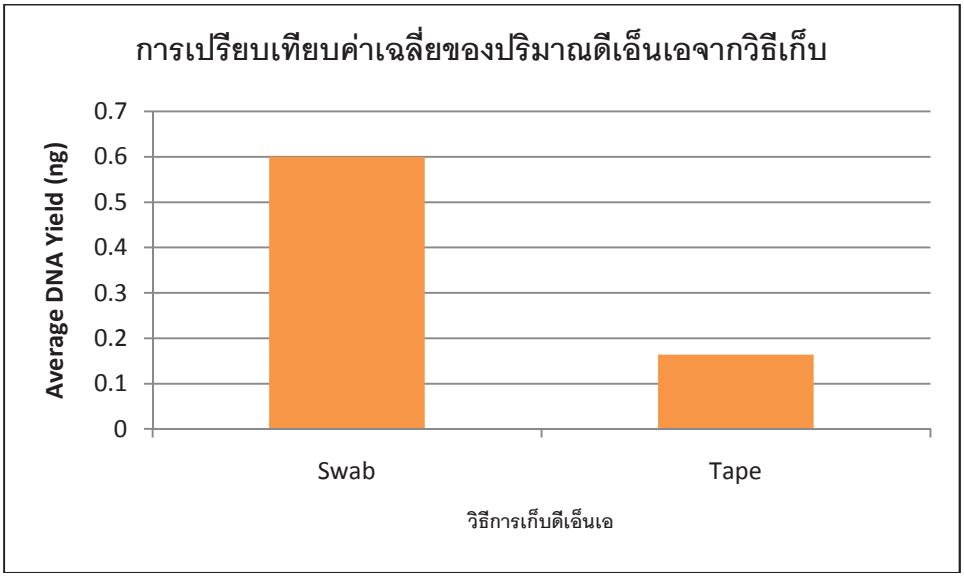
ตารางที่ 11 แสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณดีเอ็นเอที่เก็บได้จากแต่ละวิธี (นาโนกรัม)

หมายเลขอาสาสมัคร	ก้านสำลี – QIAamp	ก้านสำลี – Chelex	เทปกาว - QIAamp	เทปกาว – Chelex
VT1	1.52	0	0.04	0
VT2	0.3225	0	0	0.324
VT3	2.5225	0	0.455	0
VT4	N/A	N/A	N/A	N/A
VT5	0.735	0	0	0
VT6	0.105	0.384	0	1.044
VT7	0.5325	0.36	0.65	0
VT8	0.085	0.132	0	0.36
VT9	0	0.696	0.0525	0
VT10	1.53	1.872	0.02	0

การเปรียบเทียบวิธีการเก็บตัวอย่างด้วยการทดสอบทางสถิติ Paired sample t-test ดังในตาราง 11 จากการ พบว่าวิธีการเก็บด้วยก้านสำลีสามารถเก็บดีเอ็นเอได้มากกว่าวิธีการเก็บด้วยเทปกาวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P*-value = 0.032) และการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการเก็บตัวอย่างแต่ละวิธี ในแผนภูมิที่ 2

ตารางที่ 12 การคำนวณค่า P-value โดยใช้สถิติ Paired sample t-test เปรียบเทียบระหว่างปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากวิธีเก็บ 2 วิธี

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	SWAB - TAPE	.436167	.7937519	.187089	.041443	.830890	2.331	17	.032

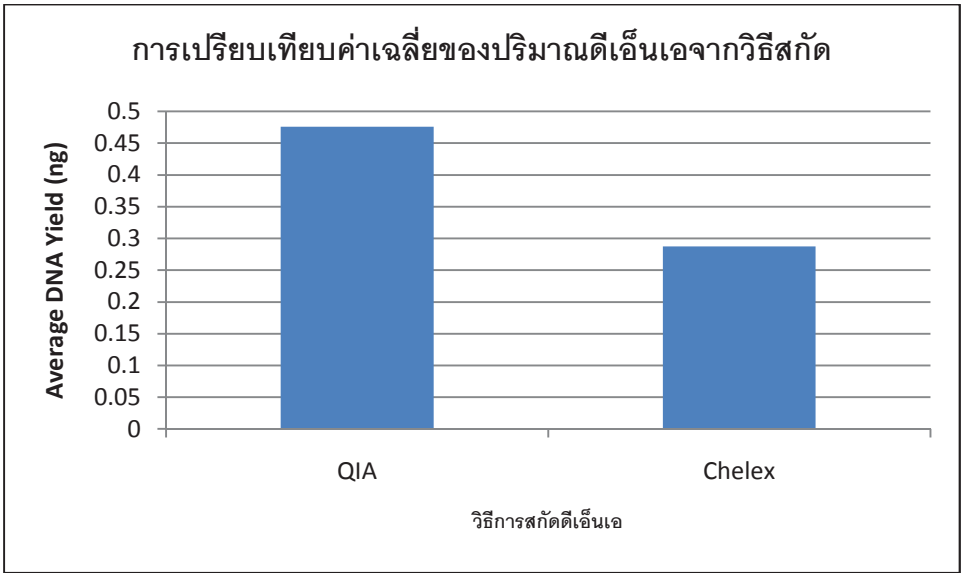


แผนภูมิที่ 2 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากแต่ละวิธีเก็บ

การเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอตัวอย่างด้วยการทดสอบทางสถิติ Paired sample t-test พบว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Micro Kit สามารถสกัดดีเอ็นเอได้ไม่แตกต่างกับวิธีการสกัดคีเล็กซ์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P-value = 0.341) และการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการสกัดดีเอ็นเอแต่ละวิธี ในแผนภูมิที่ 3

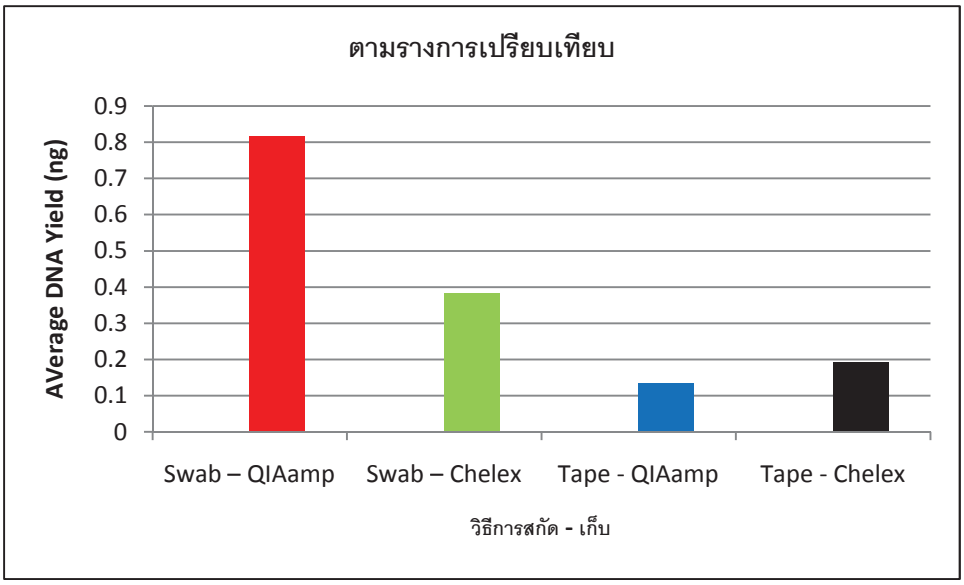
ตารางที่ 13 การคำนวณค่า P-value โดยใช้สถิติ Paired sample t-test เปรียบเทียบระหว่างปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากวิธีสกัด 2 วิธี

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	QIA - CHE	.188778	.8169581	.192558	-.217486	.595042	.980	17	.341



แผนภูมิที่ 3 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากแต่ละวิธีสกัด

จากข้อมูลที่ได้จึงสามารถสรุปได้ว่า วิธีการที่มีประสิทธิภาพสูงสุดคือวิธีการเก็บที่ใช้ก้านสำลี (Double Swab) และทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Micro Kit



แผนภูมิที่ 4 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากแต่ละ วิธีการเก็บและสกัด

ผลการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยการเพิ่มปริมาณจาก Primer จากชุดวิเคราะห์ STR สำเร็จรูป AmpFℓSTR Identifiler (Applied Biosystems) และทำ Electrophoresis จากตัวอย่างที่เลือกมาจากวิธีการเก็บและวิธีการสกัดต่างๆได้ผลดังนี้

ตารางที่ 14 แสดงผลการวิเคราะห์ STR จากการเก็บจากพื้นผิวก้อนหินโดยอาสาสมัครหมายเลข 3 ด้วยก้านสำลี และสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Micro Kit

ตำแหน่ง STR Marker	จีโนไทป์ของตัวอย่างอ้างอิง	จีโนไทป์ของดีเอ็นเอบริเวณรอยสัมผัส
D8S1179	13,15	13,15
S21S11	29.30	29.30
D7S820	11,12	11,12
CSF1PO	11,11	11,11
D3S1358	16,16	16,16
TH01	6,7	6,7
D13S317	11,11	11,11
D16S539	9,10	9,10
D2S1338	23,24	23,24
D19S433	14,15.2	14,15.2
vWA	17,19	17,19
TPOX	8,8	8,8
D18S51	15,18	15,18
Amelogenin	X,Y	X,Y
D5S818	11,11	11,11
FGA	22,22	22,22

* undet. หมายความว่า undetectable

ตารางที่ 15 แสดงผลการวิเคราะห์ STR จากการเก็บจากพื้นผิวก้อนหินโดยอาสาสมัครหมายเลข 6 ด้วยก้านสำลี และสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีคีเล็กซ์

ตำแหน่ง STR Marker	จีโนไทป์ของตัวอย่างอ้างอิง	จีโนไทป์ของดีเอ็นเอบริเวณรอยสัมผัส Conventional PCR	จีโนไทป์ของดีเอ็นเอบริเวณรอยสัมผัส LCN PCR
D8S1179	11,14	11.14	11,14
S21S11	30,31	undet.	30,31
D7S820	10,12	undet.	10,12
CSF1PO	11,12	undet.	11,12
D3S1358	16,17	17,17	16,17
TH01	9,10	9,9	9,10
D13S317	8,11	undet.	8,11
D16S539	12,12	undet.	12,12
D2S1338	18,19	undet.	18,19
D19S433	14,14.2	14,14	14,14.2
vWA	16,19	undet.	16,19
TPOX	8,10	undet.	8,10
D18S51	13,16	undet.	13,16
Amelogenin	X,Y	X,X	X,Y
D5S818	10,11	10,11	10,11
FGA	21,21	undet.	21,21

* undet. หมายความว่า undetectable

ตารางที่ 16 แสดงผลการวิเคราะห์ STR จากการเก็บจากพื้นผิวก้อนหินโดยอาสาสมัครหมายเลข 7 ด้วยเทปกาว และสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Micro Kit

ตำแหน่ง STR Marker	จีโนไทป์ของตัวอย่างอ้างอิง	จีโนไทป์ของดีเอ็นเอบริเวณรอยสัมผัส
D8S1179	10,12	undet.
S21S11	27,32.2	undet.
D7S820	10,11	undet.
CSF1PO	10,12	undet.
D3S1358	13,18	undet.
TH01	6,10	undet.
D13S317	8,10	undet.
D16S539	10,11	undet.
D2S1338	22,25	undet.
D19S433	14.2,15.2	undet.
vWA	17,18	undet.
TPOX	8,8	undet.
D18S51	19,10	undet.
Amelogenin	X,Y	undet.
D5S818	10,11	undet.
FGA	21,23	undet.

* undet. หมายความว่า undetectable

ตารางที่ 17 แสดงผลการวิเคราะห์ STR จากการเก็บจากพื้นผิวก้อนหินโดยอาสาสมัครหมายเลข 6 ด้วยเทปกาว และสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีคีเล็กซ์

ตำแหน่ง STR Marker	จีโนไทป์ของตัวอย่างอ้างอิง	จีโนไทป์ของดีเอ็นเอบริเวณรอยสัมผัส
D8S1179	13,15	undet.
S21S11	30.2,32.2	undet.
D7S820	9,12	undet.
CSF1PO	10,13	undet.
D3S1358	16,18	undet.
TH01	6,7	undet.
D13S317	8,9	undet.
D16S539	12,13	undet.
D2S1338	18,21	undet.
D19S433	12,14	undet.
vWA	15,18	undet.
TPOX	8,9	undet.
D18S51	16,18	undet.
Amelogenin	X,Y	undet.
D5S818	9,11	undet.
FGA	23,24	undet.

* undet. หมายความว่า undetectable

บทที่ 5

อภิปรายผล สรุปผล และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผล

งานวิจัยครั้งนี้จัดทำขึ้นเพื่อการเปรียบเทียบผลของดีเอ็นเอทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ จากวิธีการเก็บตัวอย่าง และวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างประเภทก้อนหินเพื่อศึกษาด้านปริมาณ จากนั้นทำการคัดเลือกมาทำการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อศึกษาด้านคุณภาพ

จากผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณดีเอ็นเอ จากการเก็บตัวอย่างด้วยก้านสำลีและการใช้เทปกาวนั้นพบว่าการเก็บตัวอย่างโดยใช้สำลีนั้นสามารถเก็บดีเอ็นเอได้มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เป็นการยืนยันผลการทดลองของ Duangshatome ในปีค.ศ.2010 ที่ให้ผลการทดลองการเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอด้วยก้านสำลีจากน้ำลายบนเทปกาว ให้ผลดีกว่าการเก็บและสกัดด้วยเทปกาวโดยตรง

การเก็บตัวอย่างด้วยก้านสำลีที่ได้ผลการทดลองสูงกว่าการเก็บด้วยเทปกาวนั้นอาจเกิดจากลักษณะทางกายภาพในด้านขนาดที่เล็กจึงสามารถสัมผัสไปได้ทั่วพื้นผิวของก้อนหิน และการใช้สารละลาย 95% Ethanol ในการละลายเซลล์ที่ติดอยู่ที่พื้นผิวก้อนหินออกมา และตรึงเซลล์ที่เก็บมาได้เมื่อ Ethanol ได้ระเหยหมดไปในขั้นตอนการผึ่งให้แห้ง ผลปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ มีความสอดคล้องกับรายงานการทดลองของ Sirichantrawong ในปี ค.ศ. 2010 ที่ทำการเก็บดีเอ็นเอจากกับรองเท้าแตะ โดยใช้ก้านสำลีชุบ ethanol เปรียบเทียบกับน้ำกลั่น

ผลการเก็บตัวอย่างด้วยเทปกาว แม้ว่าจะให้ผลการทดลองได้ไม่ดี เนื่องจากเทปกาวมีความเหนียวมากอาจไม่สามารถปล่อยเซลล์ออกจากเทปขณะทำการทดลองได้และเนื่องจากพื้นผิวก้อนหินมีลักษณะเป็นรูพรุน และมีส่วนโค้ง เป็นสัน และร่องมาก จึงทำให้พื้นที่ผิวด้านเหนียวของเทปกาว ไม่สามารถสัมผัสได้ทั่วทุกส่วนของผิวก้อนหิน ซึ่งผลการทดลองในครั้งนี้ให้ผลขัดแย้งกับ Lempan ในปี ค.ศ. 2007 ที่ใช้เทปกาวเก็บตัวอย่างจากเสื้อผ้าที่ผ่านการสวมใส่เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และสามารถวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ และยังขัดแย้งกับ Bruin ในปี ค.ศ. 2012 ที่ทำการทดลองเปรียบเทียบวิธีการเก็บดีเอ็นเอของผู้ต้องสงสัยจากผิวหนังของเหยื่อ 2 วิธีคือ Modified tape lift และ double swab ซึ่ง modified tape lift ให้ผลดีกว่า

แต่การเก็บตัวอย่างด้วยเทปกาว ก็ยังมีความเหมาะสมในบางกรณีเช่น ในกรณีที่จำเป็นต้องการเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอ จากพื้นผิวที่ต้องการการเก็บแบบแห้ง อาทิเช่น พื้นผิวของสิ่งมีค่า หรือเครื่องใช้ไฟฟ้าต่าง หรือพื้นผิวที่มีหมึกสามารถละลายออกมาเป็นสารที่อาจขัดขวางกระบวนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ รวมทั้งเทปกาว 3M นี้เป็นอุปกรณ์ที่มีอยู่แล้วในงานตรวจสถานที่เกิดเหตุ

จากผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณดีเอ็นเอ จากการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี QIAamp DNA Micro Kit และวิธีสกัดคีเล็กซ์ พบกว่าการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธี QIAamp DNA Micro Kit สามารถสกัดดีเอ็นเอได้ปริมาณไม่แตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยให้ผลสอดคล้องกับ Phillips ในปี ค.ศ. 2012 ที่ทดลองเปรียบเทียบการสกัดด้วยวิธีคีเล็กซ์ กับวิธีอื่น กับตัวอย่างหลายประเภท ผลที่ได้คือได้คือได้ผลจากวิธีสกัดคีเล็กซ์ให้ผลไม่แตกต่างกับการสกัดวิธีอื่น

แม้ว่าการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Chelex Extraction ให้ผลปริมาณดีเอ็นเอไม่แตกต่างจากวิธี QIAamp DNA Micro Kit แต่ได้ความเข้มข้นน้อยกว่ามากเนื่องจากละลายอยู่ในสารละลายปริมาณมาก จึงจำเป็นต้องมีขั้นตอนเพิ่มเติม แตกต่างจากการสกัดด้วยวิธี QIAamp DNA Micro Kit ที่เหมาะสมกับการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างปริมาณน้อยตามที่ระบุไว้ในคู่มือ ได้ผลการทดลองได้ความเข้มข้นดีเอ็นเอมากกว่า

ผลจากการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอโดยใช้ก้านสำลี และทำการสกัดด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Micro Kit มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการทดลองนี้

และแม้ว่าดีเอ็นเอที่ได้ในการทดลองนี้ไม่สามารถได้วิเคราะห์ STRs 16 ตำแหน่งได้อย่างสมบูรณ์ แต่ก็ยังมีวิธีทางเลือกอื่นที่มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอในระดับ Length Polymorphism เช่น Y-STR ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์เอกลักษณ์บุคคลบนโครโมโซม Y ซึ่งถ่ายทอดในครอบครัวสายบิดาเท่านั้น หรือทำการเพิ่มประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยการทำ LCN DNA ที่เพิ่มโอกาสในการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีปริมาณน้อยเกินกว่าที่จะสามารถทำการเพิ่มปริมาณแบบปกติได้ หรือใช้การวิเคราะห์ดีเอ็นเอในระดับการเรียงตัวลำดับเบส เช่น การวิเคราะห์ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียที่วิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับเบสในส่วนของ HV1 HV2 และ HV3 ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียเป็นดีเอ็นเอที่มีความคงทนมากกว่า และมีปริมาณมากกว่าเนื่องจากในเซลล์ 1 เซลล์มีไมโทคอนเดรียมากกว่า 1 ไมโทคอนเดรีย การวิเคราะห์ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียเป็นวิธีที่ใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลที่ถ่ายทอดในสายมารดา

สรุปผล

1. วิธีการเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอจากพื้นผิวก้อนหินที่ถูกสัมผัสด้วยก้านสำลีให้ประสิทธิภาพดีกว่าการเก็บด้วยเทปกาว

2. วิธีการเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอด้วยก้านสำลี และสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป QIAamp DNA Micro Kit ให้ประสิทธิผลดีที่สุดทั้งในด้านปริมาณคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการคัดเลือกวิธีการเก็บและวิธีการสกัดที่หลากหลายในการวิจัยครั้งต่อๆไป

2. ควรมีการศึกษาชนิดและองค์ประกอบของหิน ก่อนนำมาทำการทดลอง เพื่อความหลากหลายในงานวิจัยต่อไป

บรรณานุกรม

ภาษาไทย

อรรถพล แช่มสุวรรณ และคณะ. นิติวิทยาศาสตร์เพื่อการสืบสวนและสอบสวน 1-3. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพมหานคร: ทีซีจี พริ้นติ้ง จำกัด, 2546.

ภาษาอังกฤษ

Aree Lempan, Thanit Kusamran, and Nathinee Panvisavas. “DNA recovery from forensic clothing samples by Tape-Lift.” M.Sc. Dissertation, Mahidol University, 2007.

Bogas, V. et al. “Comparison of four DNA extraction methods for forensic application.” Forensic Science International: Genetics Supplement Series 3 (2011): e194–5.

Bright, Jo-Anne, and Susan F. Petricevic. “Recovery of trace DNA and its application to DNA profiling of shoe insoles.” Forensic Science International 145 (2004): 7–12.

de Bruin, Karla G. et al. “Comparison of stubbing and the double swab method for collecting offender epithelial material from a victim’s skin.” Forensic Science International: Genetics 6 (2011): 219-23.

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): 41–6.

Djuric, Marija et al. “DNA typing from handled items.” Forensic Science International: Genetics Supplement Series 1 (2008): 411–2.

Joseph, Alexander, and. Harrison C. Allison. Hand Book of Crime Scene Investigation. Boston: Allyn and Bacon Inc., 1980.

Kittisak Sirichantrawong, Pattamawadee Yanatatsaneejit, and Budsaba Rerkamnuaychoke. “DNA retrieval on flip-flops.” M.Sc. Dissertation, Mahidol University, 2010.

Pang, B.C.M., and B.K.K. Cheung. “Double swab technique for collecting touched evidence.” Legal Medicine 9 (2007): 181–4.

Phillips, Kirsty, Nicola McCallum, and Lindsey Welch. “A comparison of methods for forensic DNA extraction: Chelex-1001 and the QIAGEN DNA Investigator Kit (manual and automated).” Forensic Science International: Genetics 6 (2012): 282–5.

Sewell, Jonathan et al. “Recovery of DNA and fingerprints from touched documents.” Forensic Science International: Genetics 2 (2008): 281–5.

Vij, Krishan, and Rajesh Biswas. Basics of DNA & Evidentiary Issues. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publusher (P) Ltd, 2004.

Weawgarn Duangshatome, Pattamawadee Yanatatsaneejit, and Budsaba Rerkamnuaychoke. “DNA recovery method comparison from black electrical tapes.” M.Sc. Dissertation, Mahidol University, 2010.

Weissensteiner, Thomas, Hugh G. Griffin, and Annette Griffin. PCR Technology Current Innovations. 2nd ed. Florida: CRC Press LLC, 2004.

Wolfgramm, Eldamaria de Vargas et al. “Simplified buccal DNA extraction with FTA Elute Cards.” Forensic Science International: Genetics 3 (2009): 125–7.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

เอกสารรับรองคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน

คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี

มหาวิทยาลัยมหิดล

คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล
๒๗๐ ถนนพระราม ๖ แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี กทม. ๑๐๔๐๐
โทร. ๐-๒๓๕๔-๗๒๗๕, ๐-๒๒๐๑-๑๒๕๖ 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 ๒๕๕๔/๓๕๐

ชื่อโครงการ	การเก็บตัวอย่างเอาจากพื้นผิวหินที่ถูกสัมผัส
เลขที่โครงการ/รหัส	ID ๐๔ – ๕๔ – ๑๗ ว
ชื่อหัวหน้าโครงการ	นายสุภัทร ตันติวิทยมาศ
สถานศึกษา	ภาควิชานิติวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

ขอรับรองว่าโครงการดังกล่าวข้างต้นได้ผ่านการพิจารณาหินชอบโดยสอดคล้องกับแนวปฏิญญาเฮลซิงกิ จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี

ลงนาม
กรรมการและเลขานุการจริยธรรมการวิจัยในคน .....
(ศาสตราจารย์ แพทย์หญิงดวงฤดี วัฒนศิริชัยกุล)

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

วันที่รับรอง ๑๗ สิงหาคม ๒๕๕๔

คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล
ถนนพระราม ๖ แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี กทม. ๑๐๔๐๐
โทร. ๐-๒๒๐๙-๑๒๗๕, ๐-๒๒๐๑-๑๒๙๖ โทรสาร ๐-๒๒๐๙-๑๒๓๓
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. MURA2011/390

Title of Project	DNA Recovery from Touched Stone Surface
Protocol Number	ID 08 – 54 – 17
Principal Investigator	Mr. Supath Tantivitayamas
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

การเก็บดีเอ็นเอจากพื้นผิวหินที่ถูกสัมผัส

ชื่อผู้วิจัย

นายสุภัทร ตันติวิทยมาศ

สถานที่วิจัย

หน่วยมนุษย์พันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล และคณะนิติวิทยาศาสตร์ โรงเรียนนายร้อยตำรวจ

บุคคลและวิธีการติดต่อเมื่อมีเหตุฉุกเฉินหรือความผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

รศ.ดร. บุษบา ฤกษ์อำนวยโชค โทรศัพท์ 081-810-0339

รศ.พ.ต.อ. สันติ์ สุขวัจน์ โทรศัพท์ 084-497-4882

ผู้สนับสนุนการวิจัย

โรงเรียนนายร้อยตำรวจ เอื้อเฟื้อสถานที่และเงินทุนวิจัย

ความเป็นมาของโครงการ

ปัจจุบันนี้ความปลอดภัยในชีวิตและทรัพย์สินของประชาชนถูกคุกคามมากขึ้น สังเกตได้จากเหตุการณ์รุนแรงที่เกิดขึ้นไม่ว่าจะเป็นการลักทรัพย์ ปล้น จี้ ลักพาตัว เรียกค่าไถ่ หรือแม้แต่การถูกฆาตกรรม ซึ่งในหลายๆ ครั้งสามารถจับผู้กระทำผิดได้ แต่ก็มีหลายๆ เหตุการณ์ที่ไม่สามารถหาตัวผู้กระทำผิดมาลงโทษได้ รวมทั้งเหตุการณ์ที่สะเทือนใจแก่ผู้ที่สัญจรไปมาบนถนนก็คือ การปาหินใส่กระจกรถยนต์ ดังที่ทราบจากข่าวผ่านสื่อโทรทัศน์และหนังสือพิมพ์ ที่มีทั้งทรัพย์สินเสียหาย การบาดเจ็บและการสูญเสียถึงชีวิต ในเหตุเกิดเช่นนี้หากไม่มีผู้เห็นเหตุการณ์ก็เป็นเรื่องยากที่จะนำผู้กระทำผิดมาเข้าสู่กระบวนการยุติธรรมได้

หลักฐานทางนิติวิทยาศาสตร์ จึงได้เข้ามามีบทบาทสำคัญในกระบวนการยุติธรรมมากขึ้น เนื่องจากหลักฐานทางนิติวิทยาศาสตร์ในสถานที่เกิดเหตุสามารถทำให้ทราบว่าเกิดเหตุอะไร และในทางกลับกันพยานหลักฐานทางนิติวิทยาศาสตร์ยังมีบทบาทในการพิสูจน์ความบริสุทธิ์ของผู้ถูกกล่าวหา หนึ่งในพยานหลักฐานที่สำคัญทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ที่สามารถเก็บได้จากสถานที่เกิดเหตุคือ ลายนิ้วมือ เนื่องจากลายนิ้วมือของแต่ละบุคคลจะไม่ซ้ำกันและไม่มีการเปลี่ยนแปลงตั้งแต่เกิดจนกระทั่งเสียชีวิต ดังนั้นรอยลายนิ้วมือที่ตรวจเก็บได้จากจากสถานที่เกิดเหตุหรือของกลางที่พนักงานสอบสวนนำส่ง เป็นพยานหลักฐานที่

แสดงว่าบุคคลผู้เป็นเจ้าของลายนิ้วมือนั้นมีความเกี่ยวโยงกับสถานที่เกิดเหตุ หากแต่ร่องรอยลายนิ้วมือบนพื้นผิววัตถุนั้นไม่ได้พบร่องรอยที่สมบูรณ์ทุกครั้งไป โดยอาจมีการเปรอะเปื้อนหรือการเลือน ทำให้ไม่สามารถหาจุดเปรียบเทียบตรวจหาลายนิ้วมือหรือได้รอยลายนิ้วมือที่มีตำหนิพิเศษไม่เพียงพอต่อการตรวจพิสูจน์เปรียบเทียบ อาทิเช่น ในคดีปาหินโดนกระจกหน้ารถยนต์ในต่างจังหวัด เนื่องจากก้อนหินเป็นวัตถุที่เกิดร่องรอยลายนิ้วมือได้ยาก ทำให้ไม่สามารถหาหลักฐานได้มากพอที่จะนำผู้กระทำผิดมาเข้าสู่กระบวนการยุติธรรม และรับการลงโทษต่อความผิดที่ก่อได้

ดังนั้นการศึกษาหาวิธีการทางที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจพิสูจน์หลักฐานที่ถูกสัมผัส เป็นสิ่งที่มีความจำเป็นอย่างมาก ในคดีที่พบหลักฐานจำนวนน้อยและพบลายพิมพ์นิ้วมือที่ไม่สมบูรณ์บนพื้นผิวที่หาร่องรอยลายพิมพ์นิ้วมือได้ยาก หนึ่งในวิธีการทางเลือกดังกล่าวคือการหาวัตถุพยานดีเอ็นเอ ในอีกนัยหนึ่งคือการหา สารพันธุกรรมดีเอ็นเอจากเยื่อบุผิวที่ตกค้างอยู่บนวัตถุจากการถูกสัมผัส ซึ่งวัตถุพยานดีเอ็นเอนี้มีความจำเพาะเจาะจงต่อตัวบุคคลสูง และมีความสามารถที่ยึดติดกับพื้นผิวได้แตกต่างกับสารประกอบของร่องรอยลายพิมพ์นิ้วมือ แต่ก็มีความยุ่งยากในการเก็บหลักฐาน ในการเลือกวิธีการสกัดดีเอ็นเอทั้งยังมีราคาที่สูง แต่ก็ยังเหมาะสมในการใช้ตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลในคดีที่ไม่พบวัตถุพยานประเภทอื่นๆ มากนัก

จากความสำคัญและปัญหาข้างต้น จึงได้ออกแบบการวิจัยเพื่อศึกษาเปรียบเทียบวิธีการเก็บวัตถุพยานดีเอ็นเอจากพื้นผิวก้อนหิน โดยแยกออกเป็นวิธีการเก็บด้วยเทปกาว (Tape-Lifting) และวิธีการเก็บด้วยก้านสำลี (Double Swab) และสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป QIAmp Micro Extraction Kit และการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการ Chelex Extraction Method จากนั้นนำมาวัดปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยกระบวนการ Real Time PCR และตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ทั้งนี้เพื่อเปรียบหาวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการจัดการกับวัตถุพยาน

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเปรียบเทียบวิธีการเก็บตัวอย่างเซลล์จากการสัมผัสผิวหิน
2. เพื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากการสัมผัสผิวหิน

รายละเอียดที่จะปฏิบัติต่อผู้เข้าร่วมการวิจัย

เก็บตัวอย่างเยื่อบุกระพุ้งแก้ม เยื่อบุผิวหนังบริเวณฝ่ามือ และบนพื้นผิวก้อนหินที่ผู้เข้าร่วมวิจัยสัมผัส

ประโยชน์และผลข้างเคียงที่จะเกิดแก่ผู้เข้าร่วมการวิจัย

ไม่มีผลข้างเคียงต่อผู้เข้าร่วมการวิจัย เนื่องจากข้อมูลที่ได้ไม่ได้สร้างความเสียหายหรือเกิดอันตรายต่อบุคคลใดๆ ทั้งแก่ผู้ทำการวิจัย หน่วยงานที่เกี่ยวข้อง ผู้ตรวจและผู้เกี่ยวข้อง

การเก็บข้อมูลเป็นความลับ

ทางผู้วิจัยจะทำการเก็บข้อมูลของอาสาสมัครไว้เป็นความลับ

ถ้าท่านมีปัญหาข้องใจหรือรู้สึกกังวลใจกับการเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ท่านสามารถติดต่อกับประธานกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน สำนักงานวิจัยคณะฯ อาคารวิจัยและสวัสดิการ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี

หนังสือยินยอมโดยได้รับการบอกกล่าวและเต็มใจ

(Informed Consent Form)

ชื่อโครงการ การเก็บดีเอ็นเอจากผิวหินที่ถูกสัมผัส

ชื่อผู้วิจัย นายสุภัทร ตันติวิทยมาศ

*ชื่อผู้เข้าร่วมการวิจัย ..... อายุ .....

คำยินยอมของผู้เข้าร่วมการวิจัย

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว ..... ได้ทราบรายละเอียดของโครงการวิจัยตลอดจนประโยชน์ และข้อเสี่ยงที่จะเกิดขึ้นต่อข้าพเจ้าจากผู้วิจัยแล้วอย่างชัดเจน ไม่มีสิ่งใดปิดบังซ่อนเร้นและยินยอมให้ทำการวิจัยในโครงการที่มีชื่อข้างต้น และข้าพเจ้ารู้ว่าถ้ามีปัญหาหรือข้อสงสัยเกิดขึ้นข้าพเจ้าสามารถสอบถามผู้วิจัยได้ และข้าพเจ้าสามารถไม่เข้าร่วมโครงการวิจัยนี้เมื่อใดก็ได้ โดยไม่มีผลกระทบต่อการรักษาที่ข้าพเจ้าพึงได้รับ นอกจากนี้ผู้วิจัยจะเก็บข้อมูลเฉพาะเกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าเป็นความลับ และจะเปิดเผยได้เฉพาะในรูปที่เป็นสรุปผลการวิจัย การเปิดเผยข้อมูลเกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าต่อหน่วยงานต่างๆที่เกี่ยวข้อง กระทำได้เฉพาะกรณีจำเป็นด้วยเหตุผลทางวิชาการเท่านั้น

ลงชื่อ.....(ผู้เข้าร่วมการวิจัย)

.....(พยาน)

.....(พยาน)

วันที่ .....

คำอธิบายของแพทย์หรือผู้วิจัย

ข้าพเจ้าได้อธิบายรายละเอียดของโครงการ ตลอดจนประโยชน์ของการวิจัย รวมทั้งข้อเสี่ยงที่อาจจะเกิดขึ้นแก่ผู้เข้าร่วมการวิจัยทราบแล้วอย่างชัดเจนโดยไม่มีสิ่งใดปิดบังซ่อนเร้น

ลงชื่อ.....(แพทย์หรือผู้วิจัย)

วันที่.....

หมายเหตุ : กรณีผู้เข้าร่วมการวิจัยไม่สามารถอ่านหนังสือได้ ให้ผู้วิจัยอ่านข้อความในหนังสือยินยอมฯ นี้ให้แก่ผู้เข้าร่วมการวิจัยฟังจนเข้าใจดีแล้ว และให้ผู้เข้าร่วมการวิจัยลงนามหรือพิมพ์ลายนิ้วหัวแม่มือรับทราบในการให้ความยินยอมดังกล่าวข้างต้นไว้ด้วย

* ผู้เข้าร่วมการวิจัย หมายถึง ผู้ยินยอมตนให้ทำวิจัย

ภาคผนวก ข

การวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี real-time PCR

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						
B10	LT1	Quantifiler	Unknown	35.1786		0.00158392				
B10	LT1	IPC	Unknown	26.0484						
B11	LT2	Quantifiler	Unknown	Undet.						
B11	LT2	IPC	Unknown	26.0653						
B12	LT3	Quantifiler	Unknown	Undet.						
B12	LT3	IPC	Unknown	26.0269						
C1	LT4	Quantifiler	Unknown	Undet.						
C1	LT4	IPC	Unknown	26.6993						
C2	LT5	Quantifiler	Unknown	Undet.						
C2	LT5	IPC	Unknown	26.6554						
C3	LT6	Quantifiler	Unknown	Undet.						

C3	LT6	IPC	Unknown	26.5502	
C4	LT7	Quantifiler	Unknown	Undet.	
C4	LT7	IPC	Unknown	26.1749	
C5	LT8	Quantifiler	Unknown	Undet.	
C5	LT8	IPC	Unknown	26.3268	
C6	LT9	Quantifiler	Unknown	36.001	7.94811e-004
C6	LT9	IPC	Unknown	26.106	
C7	LT10	Quantifiler	Unknown	Undet.	
C7	LT10	IPC	Unknown	26.1256	
C8	LS1	Quantifiler	Unknown	31.9285	0.0241656
C8	LS1	IPC	Unknown	26.0224	
C9	LS2	Quantifiler	Unknown	34.5273	0.00273457
C9	LS2	IPC	Unknown	25.8849	
C10	LS3	Quantifiler	Unknown	34.1447	0.00376871
C10	LS3	IPC	Unknown	25.8182	
C11	LS4	Quantifiler	Unknown	31.5782	0.0324136
C11	LS4	IPC	Unknown	26.0357	
C12	LS5	Quantifiler	Unknown	33.1803	0.00845987
C12	LS5	IPC	Unknown	26.0381	
D1	LS6	Quantifiler	Unknown	Undet.	
D1	LS6	IPC	Unknown	26.5193	
D2	LS7	Quantifiler	Unknown	34.2358	0.00349167
D2	LS7	IPC	Unknown	26.3118	
D3	LS8	Quantifiler	Unknown	Undet.	
D3	LS8	IPC	Unknown	26.158	
D4	LS9	Quantifiler	Unknown	Undet.	
D4	LS9	IPC	Unknown	26.1214	
D5	LS10	Quantifiler	Unknown	33.0468	0.00946223
D5	LS10	IPC	Unknown	26.1715	

Standard Curve Information

Detector Name	Slope	Intercept	R2	Standards	Unknowns
Quantifiler	-3.565157	28.578527	0.990779	8	31

Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Quantity	Mean Qty	StdDev Qty	Filtered	User Defined #1 Tm
E1	STD1	IPC	Unknown	28.0502						
E1	STD1	Quantifiler	Standard	22.6172		50				
E2	STD2	IPC	Unknown	26.8432						
E2	STD2	Quantifiler	Standard	23.639		16.7				
E3	STD3	IPC	Unknown	26.3987						
E3	STD3	Quantifiler	Standard	25.9973		5.56				
E4	STD4	IPC	Unknown	26.2871						
E4	STD4	Quantifiler	Standard	27.6368		1.85				
E5	STD5	IPC	Unknown	26.2247						
E5	STD5	Quantifiler	Standard	29.819		0.62				
E6	STD6	IPC	Unknown	26.3535						
E6	STD6	Quantifiler	Standard	31.3802		0.21				
E7	STD7	IPC	Unknown	26.2967						
E7	STD7	Quantifiler	Standard	32.8584		0.068				
E8	STD8	IPC	Unknown	26.3532						
E8	STD8	Quantifiler	Standard	33.8147		0.023				
E9	pos	Quantifiler	Unknown	31.0254		0.205908				
E9	pos	IPC	Unknown	26.3122						
F1	BS-1	Quantifiler	Unknown	32.4942		0.0797412				
F1	BS-1	IPC	Unknown	26.52						
F2	BS-2	Quantifiler	Unknown	30.1703		0.357702				
F2	BS-2	IPC	Unknown	26.4179						
F3	BS-3	Quantifiler	Unknown	31.2126		0.18246				
F3	BS-3	IPC	Unknown	26.4283						
F4	BS-4	Quantifiler	Unknown	31.1306		0.192377				
F4	BS-4	IPC	Unknown	26.5526						
F5	BS-5	Quantifiler	Unknown	30.2903		0.331015				
F5	BS-5	IPC	Unknown	26.3289						
F6	BS-6	Quantifiler	Unknown	31.0853		0.198093				

F6	BS-6	IPC	Unknown	26.4298	
F7	BS-7	Quantifiler	Unknown	30.4427	0.300002
F7	BS-7	IPC	Unknown	26.4391	
F8	BS-8	Quantifiler	Unknown	29.7443	0.470987
F8	BS-8	IPC	Unknown	26.3188	
F9	BS-9	Quantifiler	Unknown	30.3181	0.32513
F9	BS-9	IPC	Unknown	26.3344	
F10	BS-10	Quantifiler	Unknown	28.9552	0.784046
F10	BS-10	IPC	Unknown	26.433	
G1	IS-1	Quantifiler	Unknown	29.8115	0.450987
G1	IS-1	IPC	Unknown	26.872	
G2	IS-2	Quantifiler	Unknown	31.8183	0.123385
G2	IS-2	IPC	Unknown	26.7136	
G3	IS-3	Quantifiler	Unknown	28.4666	1.07495
G3	IS-3	IPC	Unknown	26.596	
G4	IS-4	Quantifiler	Unknown	32.8605	0.0629431
G4	IS-4	IPC	Unknown	26.7516	
G5	IS-5	Quantifiler	Unknown	27.8265	1.62528
G5	IS-5	IPC	Unknown	26.6534	
G6	IS-6	Quantifiler	Unknown	26.0149	5.2369
G6	IS-6	IPC	Unknown	26.7014	
G7	IS-7	Quantifiler	Unknown	31.2339	0.179962
G7	IS-7	IPC	Unknown	26.5229	
G8	IS-8	Quantifiler	Unknown	29.8508	0.439681
G8	IS-8	IPC	Unknown	26.5257	
G9	IS-9	Quantifiler	Unknown	32.342	0.0879785
G9	IS-9	IPC	Unknown	26.5381	
G10	IS-10	Quantifiler	Unknown	30.2564	0.338358
G10	IS-10	IPC	Unknown	26.4244	
H1	TS-1	Quantifiler	Unknown	32.366	0.0866224
H1	TS-1	IPC	Unknown	27.0902	
H2	TS-2	Quantifiler	Unknown	31.0966	0.196658
H2	TS-2	IPC	Unknown	27.1145	
H3	TS-3	Quantifiler	Unknown	29.435	0.57514
H3	TS-3	IPC	Unknown	27.0552	
H4	TS-4	Quantifiler	Unknown	33.0431	0.055938
H4	TS-4	IPC	Unknown	27.1548	
H5	TS-5	Quantifiler	Unknown	28.1907	1.28463
H5	TS-5	IPC	Unknown	26.8106	
H6	TS-6	Quantifiler	Unknown	29.4991	0.551822
H6	TS-6	IPC	Unknown	26.9503	

H7	TS-7	Quantifiler	Unknown	30.1567	0.36085
H7	TS-7	IPC	Unknown	26.9731	
H8	TS-8	Quantifiler	Unknown	31.1403	0.191182
H8	TS-8	IPC	Unknown	27.0917	
H9	TS-9	Quantifiler	Unknown	31.7493	0.129012
H9	TS-9	IPC	Unknown	26.9955	
H10	TS-10	Quantifiler	Unknown	31.212	0.182528
H10	TS-10	IPC	Unknown	26.9125	

Standard Curve Information

Detector Name	Slope	Intercept	R2	Standards	Unknowns
Quantifiler	-3.053556	29.935783	0.996393	8	18

Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Quantity	Mean Qty	StdDev Qty	Filtered	User Defined #1 Tm
A1	STD1	Quantifiler	Standard	24.598		50				
A1	STD1	IPC	Unknown	Undet.						
A2	STD2	Quantifiler	Standard	26.1845		16.7				
A2	STD2	IPC	Unknown	Undet.						
A3	STD3	Quantifiler	Standard	27.6577		5.56				
A3	STD3	IPC	Unknown	36.3644						
A4	STD4	Quantifiler	Standard	29.5585		1.85				
A4	STD4	IPC	Unknown	34.2948						
A5	STD5	Quantifiler	Standard	30.5258		0.62				
A5	STD5	IPC	Unknown	32.3204						
A6	STD6	Quantifiler	Standard	31.7168		0.21				
A6	STD6	IPC	Unknown	31.6087						
A7	STD7	Quantifiler	Standard	33.6327		0.068				
A7	STD7	IPC	Unknown	30.8342						
A8	STD8	Quantifiler	Standard	34.8708		0.023				
A8	STD8	IPC	Unknown	30.6164						
B3	LLS 1	Quantifiler	Unknown	33.8636		0.0517241				
B3	LLS 1	IPC	Unknown	31.9941						
B4	LLS 2	Quantifiler	Unknown	37.2078		0.00415434				
B4	LLS 2	IPC	Unknown	31.0606						
B5	LLS 3	Quantifiler	Unknown	35.0646		0.020911				
B5	LLS 3	IPC	Unknown	30.8095						
B6	LLS 4	Quantifiler	Unknown	36.0154		0.0102096				
B6	LLS 4	IPC	Unknown	30.3481						
B7	LLS 5	Quantifiler	Unknown	33.0279		0.0971333				
B7	LLS 5	IPC	Unknown	30.2614						
B8	LLS 6	Quantifiler	Unknown	34.3207		0.0366445				
B8	LLS 6	IPC	Unknown	29.806						
B9	LLS 7	Quantifiler	Unknown	Undet.						

B9	LLS 7	IPC	Unknown	29.9197	
B10	LLS 8	Quantifiler	Unknown	37.468	0.00341439
B10	LLS 8	IPC	Unknown	29.7957	
B11	LLS 9	Quantifiler	Unknown	35.2786	0.0177946
B11	LLS 9	IPC	Unknown	29.7174	
B12	LLT 1	Quantifiler	Unknown	Undet.	
B12	LLT 1	IPC	Unknown	30.0625	
C1	LLT 2	Quantifiler	Unknown	Undet.	
C1	LLT 2	IPC	Unknown	31.9514	
C2	LLT 3	Quantifiler	Unknown	Undet.	
C2	LLT 3	IPC	Unknown	30.8591	
C3	LLT 4	Quantifiler	Unknown	Undet.	
C3	LLT 4	IPC	Unknown	30.9062	
C4	LLT 5	Quantifiler	Unknown	35.2503	0.0181782
C4	LLT 5	IPC	Unknown	30.0393	
C5	LLT 6	Quantifiler	Unknown	Undet.	
C5	LLT 6	IPC	Unknown	29.9813	
C6	LLT 7	Quantifiler	Unknown	38.0994	0.00212089
C6	LLT 7	IPC	Unknown	29.5359	
C7	LLT 8	Quantifiler	Unknown	Undet.	
C7	LLT 8	IPC	Unknown	29.4987	
C8	LLT 9	Quantifiler	Unknown	34.773	0.0260532
C8	LLT 9	IPC	Unknown	29.389	
C9	RRS 1	Quantifiler	Unknown	36.8725	0.00534971
C9	RRS 1	IPC	Unknown	29.2587	
C10	RRS 2	Quantifiler	Unknown	37.5478	0.00321484
C10	RRS 2	IPC	Unknown	29.5244	
C11	RRS 3	Quantifiler	Unknown	Undet.	
C11	RRS 3	IPC	Unknown	29.5368	
C12	RRS 4	Quantifiler	Unknown	Undet.	
C12	RRS 4	IPC	Unknown	34.3903	
D1	RRS 5	Quantifiler	Unknown	Undet.	
D1	RRS 5	IPC	Unknown	32.3404	
D2	RRS 6	Quantifiler	Unknown	Undet.	
D2	RRS 6	IPC	Unknown	30.3086	
D3	RRS 7	Quantifiler	Unknown	37.3399	0.00376043
D3	RRS 7	IPC	Unknown	30.1843	
D4	RRS 8	Quantifiler	Unknown	Undet.	
D4	RRS 8	IPC	Unknown	29.5483	
D5	RRS 9	Quantifiler	Unknown	Undet.	
D5	RRS 9	IPC	Unknown	29.6056	

D6	RRT 1	Quantifiler	Unknown	Undet.	
D6	RRT 1	IPC	Unknown	31.4232	
D7	RRT 2	Quantifiler	Unknown	Undet.	
D7	RRT 2	IPC	Unknown	29.0293	
D8	RRT 3	Quantifiler	Unknown	Undet.	
D8	RRT 3	IPC	Unknown	29.8004	
D9	RRT 4	Quantifiler	Unknown	37.7798	0.00269894
D9	RRT 4	IPC	Unknown	29.4591	
D10	RRT 5	Quantifiler	Unknown	Undet.	
D10	RRT 5	IPC	Unknown	29.0855	
D11	RRT 6	Quantifiler	Unknown	Undet.	
D11	RRT 6	IPC	Unknown	29.1794	
D12	RRT 7	Quantifiler	Unknown	Undet.	
D12	RRT 7	IPC	Unknown	29.4771	
E1	RRT 8	Quantifiler	Unknown	37.6414	0.00299576
E1	RRT 8	IPC	Unknown	30.4962	
E2	RRT 9	Quantifiler	Unknown	Undet.	
E2	RRT 9	IPC	Unknown	29.9882	
E3	POS Cont.	Quantifiler	Unknown	31.7236	0.259726
E3	POS Cont.	IPC	Unknown	29.7814	

Standard Curve Information

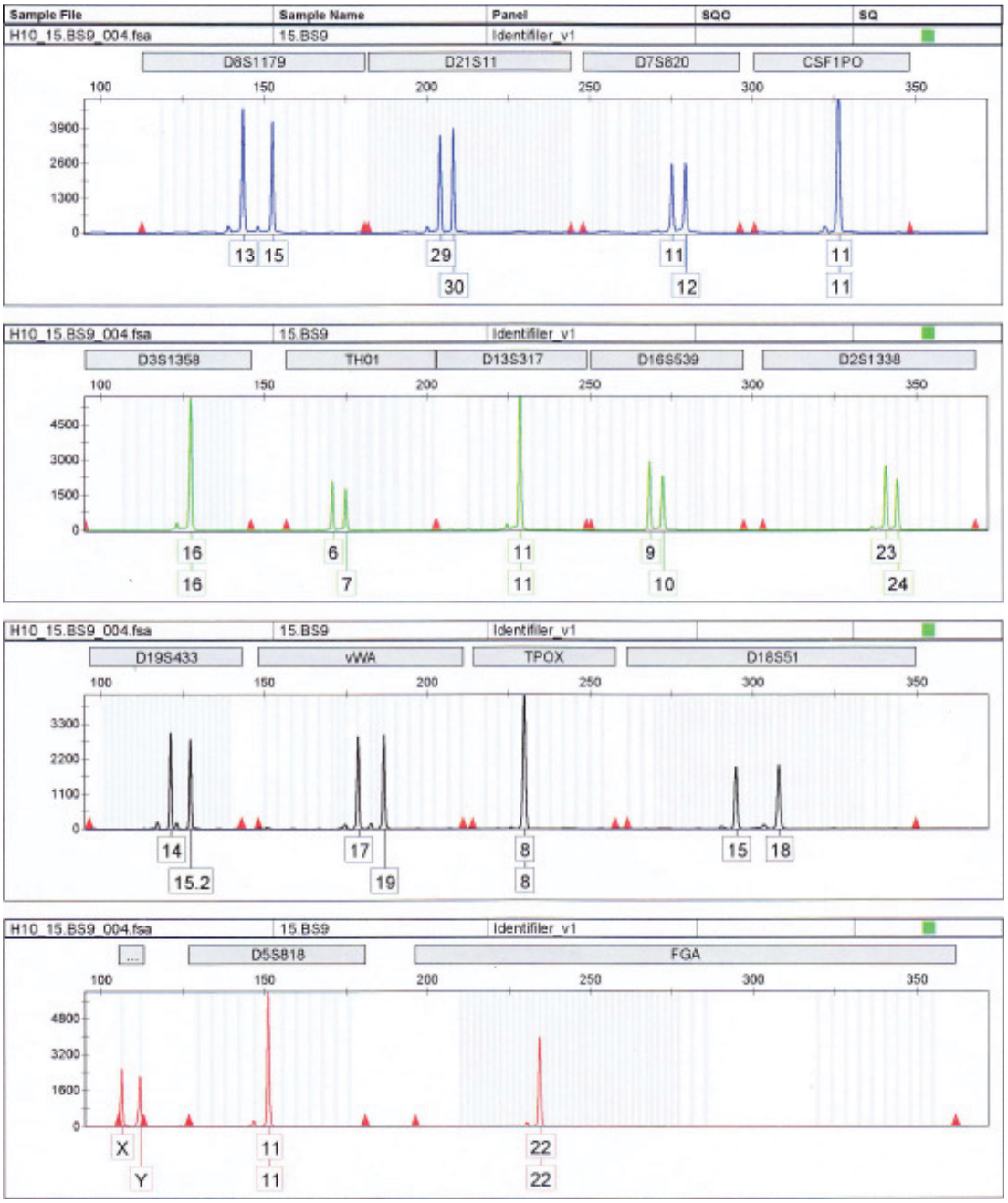
Detector Name	Slope	Intercept	R2	Standards	Unknowns
Quantifiler	-3.064582	26.034729	0.995228	8	23

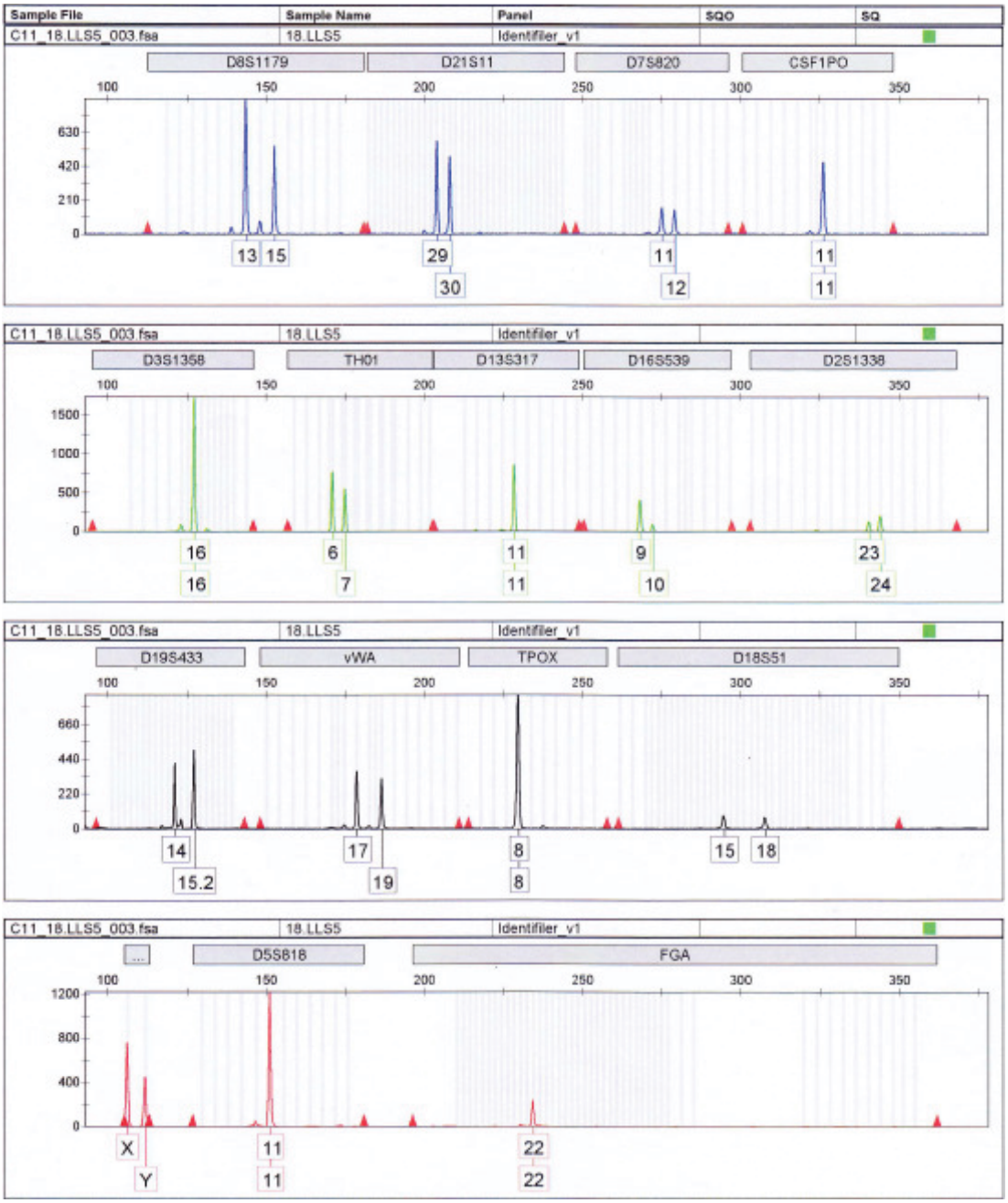
Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Quantity	Mean Qty	StdDev Qty	Filtered	User Defined #1 Tm
A1	STD1	Quantifiler	Standard	20.9281		50				
A1	STD1	IPC	Unknown	31.8339						
A2	STD2	Quantifiler	Standard	22.1633		16.7				
A2	STD2	IPC	Unknown	25.0199						
A3	STD3	Quantifiler	Standard	23.5916		5.56				
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						
C5	RS1	Quantifiler	Unknown	Undet.						
C5	RS1	IPC	Unknown	26.1682						
C6	RS2	Quantifiler	Unknown	Undet.						
C6	RS2	IPC	Unknown	23.9301						
C7	RS3	Quantifiler	Unknown	Undet.						
C7	RS3	IPC	Unknown	23.9066						
C8	RS5	Quantifiler	Unknown	Undet.						
C8	RS5	IPC	Unknown	25.3122						
C9	RS6	Quantifiler	Unknown	Undet.						
C9	RS6	IPC	Unknown	23.8989						
C10	RS7	Quantifiler	Unknown	33.7826		0.00296354				
C10	RS7	IPC	Unknown	24.0497						
C11	RS8	Quantifiler	Unknown	35.0694		0.00112692				

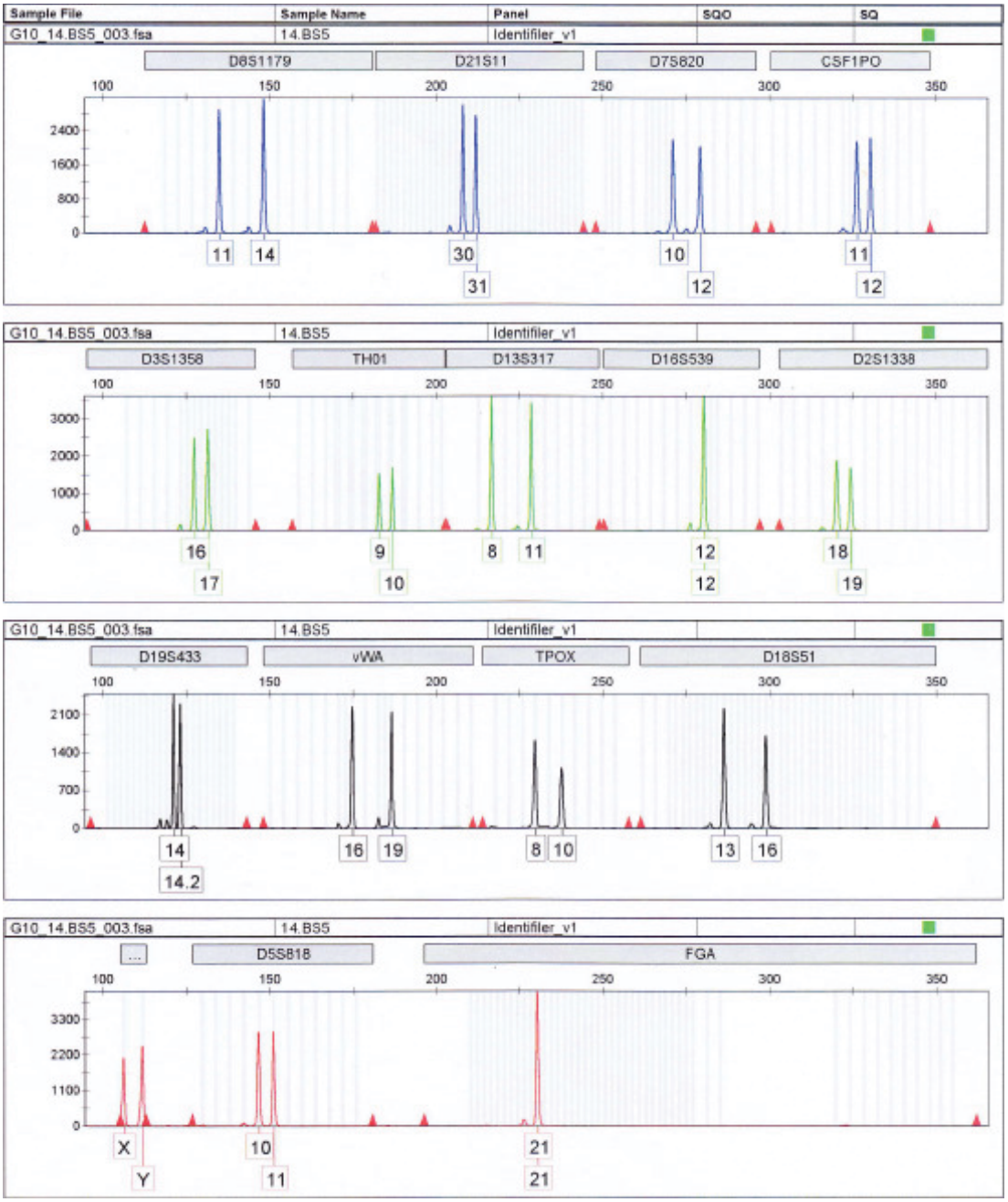
C11	RS8	IPC	Unknown	24.064	
C12	RS9	Quantifiler	Unknown	34.3018	0.00200626
C12	RS9	IPC	Unknown	24.183	
D1	RS10	Quantifiler	Unknown	32.1205	0.0103311
D1	RS10	IPC	Unknown	24.3749	
D2	RT1	Quantifiler	Unknown	Undet.	
D2	RT1	IPC	Unknown	24.1134	
D3	RT2	Quantifiler	Unknown	Undet.	
D3	RT2	IPC	Unknown	24.025	
D4	RT3	Quantifiler	Unknown	Undet.	
D4	RT3	IPC	Unknown	23.8039	
D5	RT5	Quantifiler	Unknown	Undet.	
D5	RT5	IPC	Unknown	23.9996	
D6	RT6	Quantifiler	Unknown	32.3426	0.00874353
D6	RT6	IPC	Unknown	23.7017	
D7	RT7	Quantifiler	Unknown	Undet.	
D7	RT7	IPC	Unknown	23.6329	
D8	RT8	Quantifiler	Unknown	Undet.	
D8	RT8	IPC	Unknown	23.9532	
D9	RT9	Quantifiler	Unknown	Undet.	
D9	RT9	IPC	Unknown	23.7825	
D10	RT10	Quantifiler	Unknown	Undet.	
D10	RT10	IPC	Unknown	23.7713	
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	

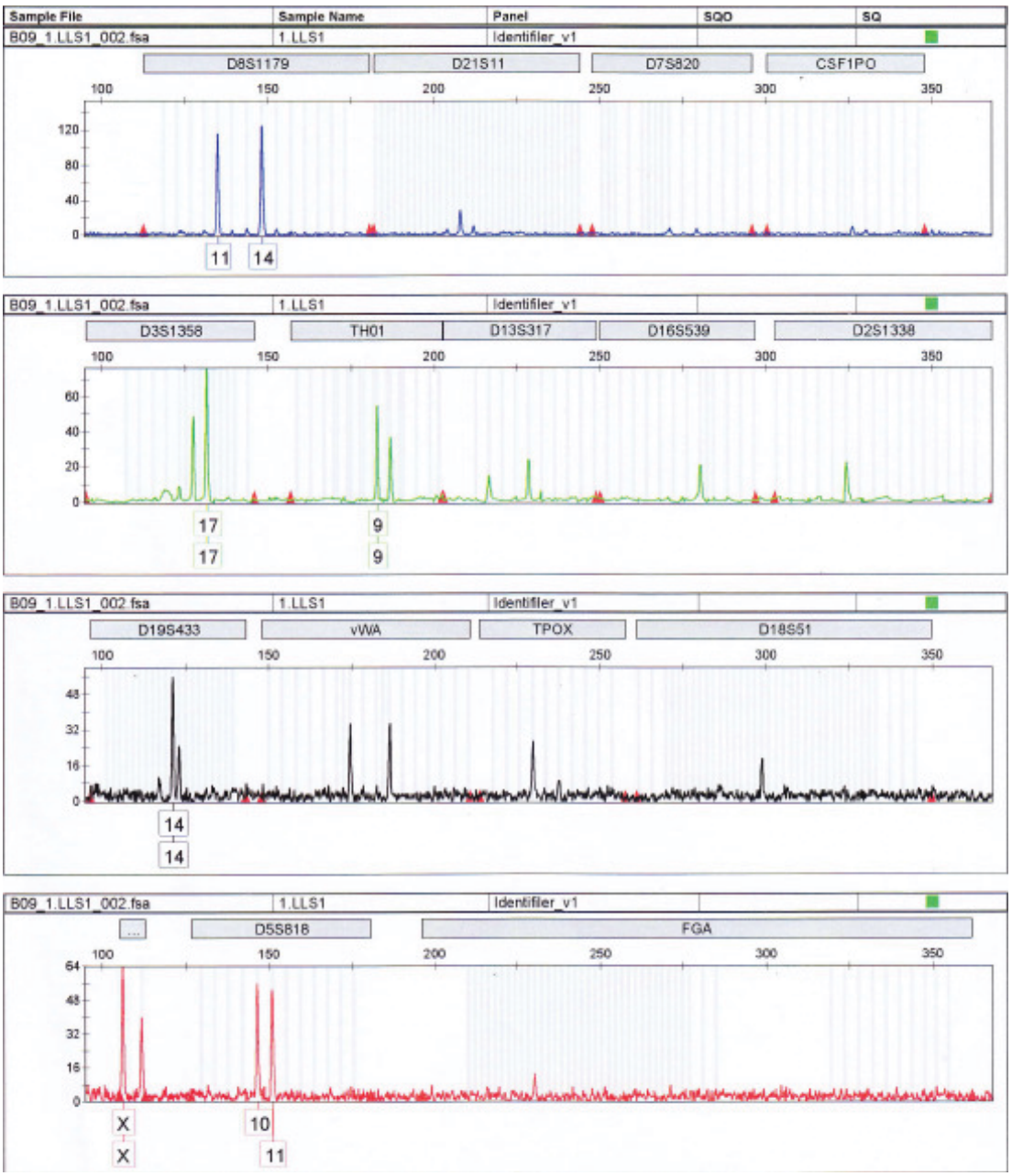
ภาคผนวก ค

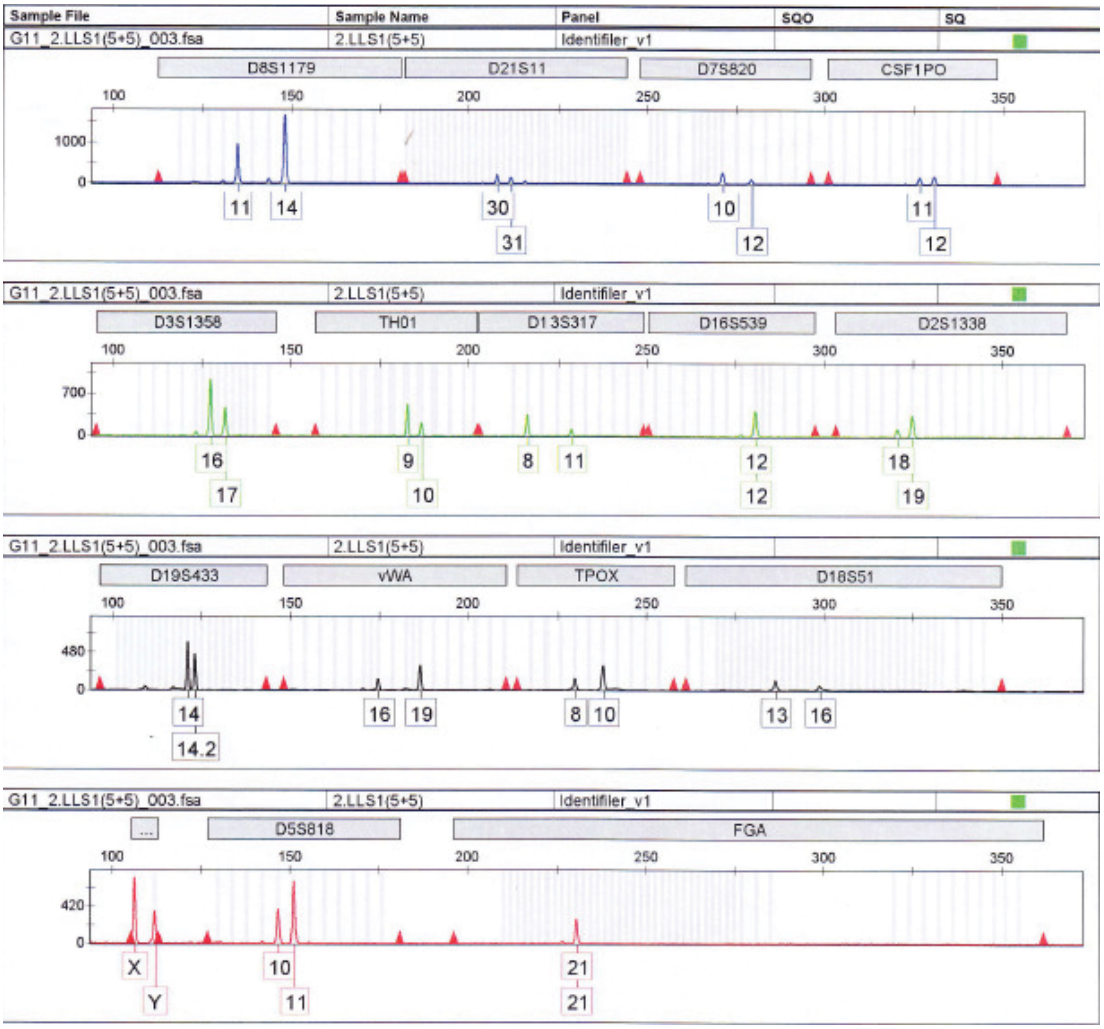
การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

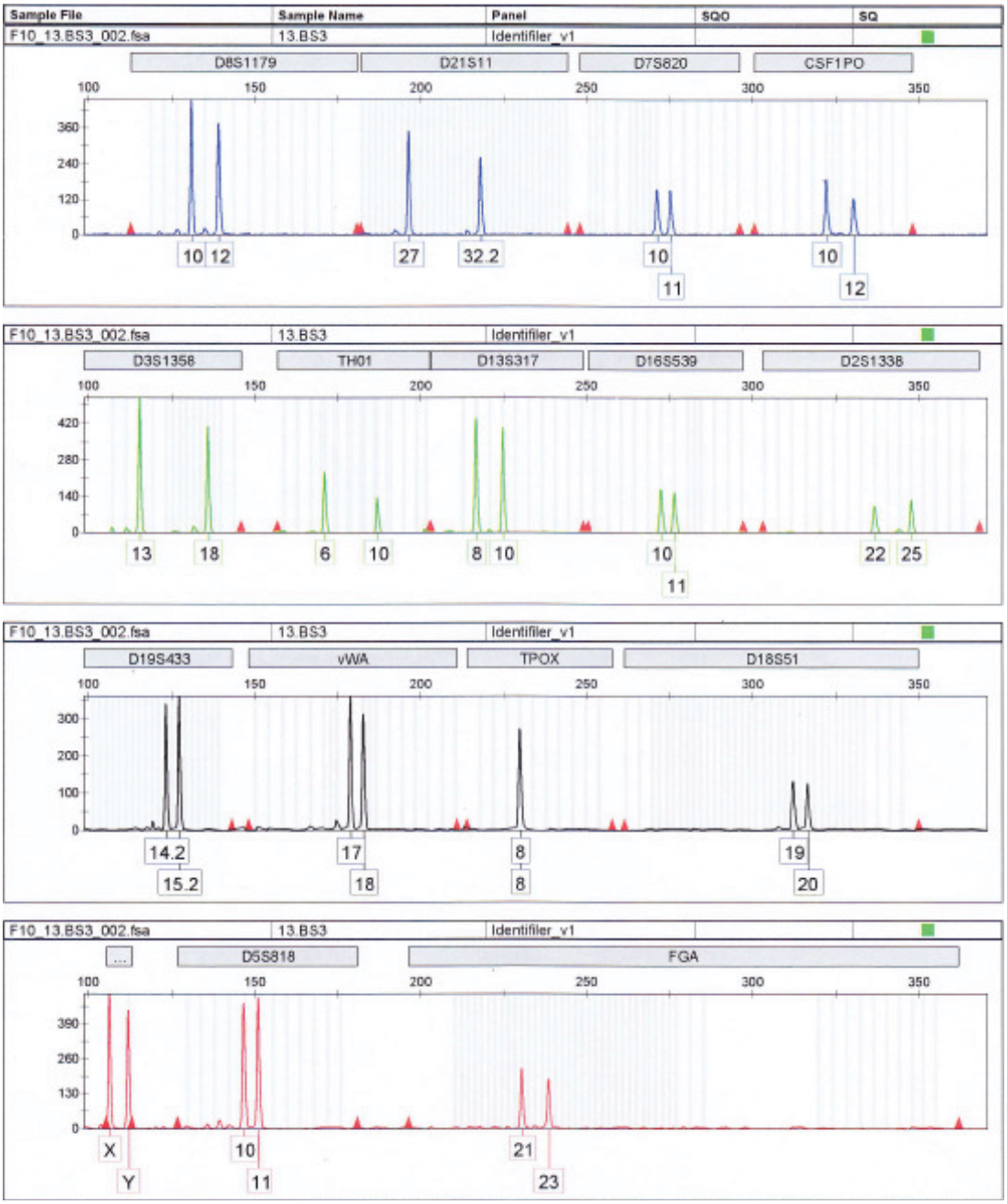

Sample File
Sample Name
Panel
SQO
SQ
H10_15.BS9_004.fsa
15.BS9
Identifiler_v1
D8S1179
D21S11
D7S820
CSF1PO
13 15
29
30
11
12
11
11
H10_15.BS9_004.fsa
15.BS9
Identifiler_v1
D3S1358
TH01
D13S317
D16S539
D2S1338
16
16
6
7
11
11
9
10
23
24
H10_15.BS9_004.fsa
15.BS9
Identifiler_v1
D19S433
vWA
TPOX
D18S51
14
15.2
17
19
8
8
15
18
H10_15.BS9_004.fsa
15.BS9
Identifiler_v1
D5S818
FGA
X
Y
11
11
22
22

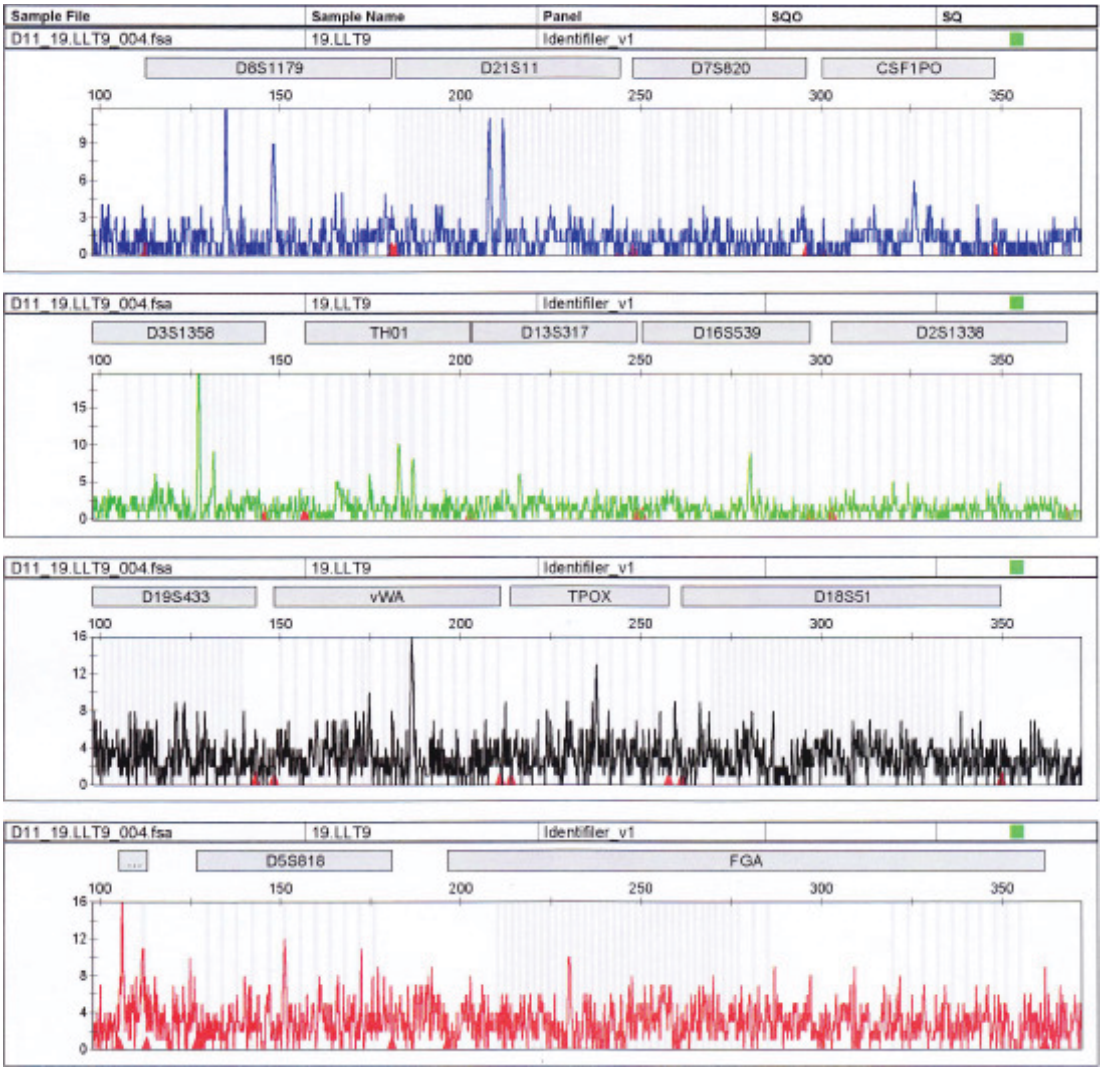

Sample File
Sample Name
Panel
SQO
SQ
C11_18.LLS5_003.fsa
18.LLS5
Identifiler_v1
D8S1179
D21S11
D7S820
CSF1PO
13 15
29
30
11
12
11
11
D3S1358
TH01
D13S317
D16S539
D2S1338
16
16
6
7
11
11
9
10
23
24
D19S433
vWA
TPOX
D18S51
14
15.2
17
19
8
8
15 18
D5S818
FGA
X
Y
11
11
22
22

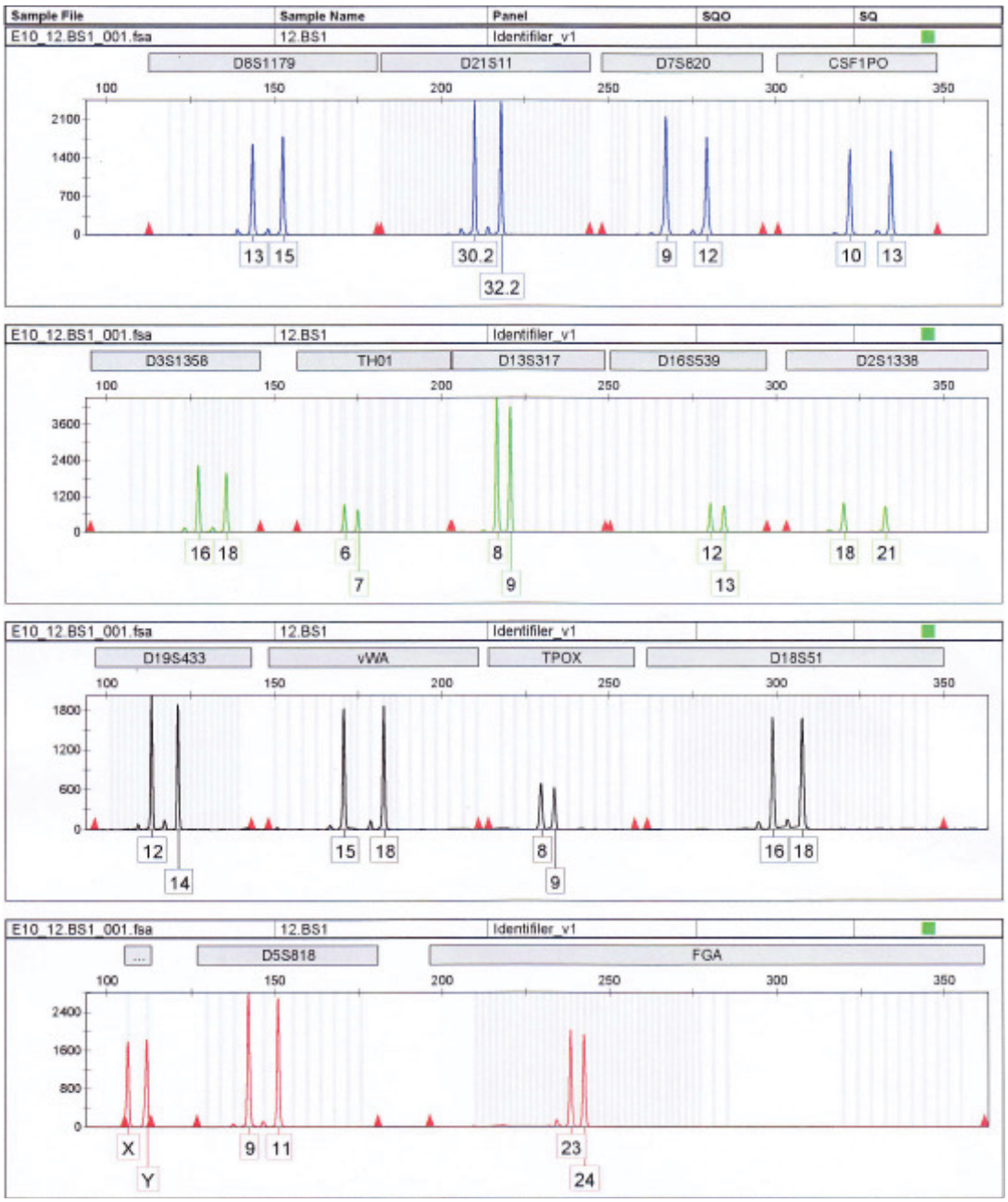

Sample File
Sample Name
Panel
SQO
SQ
G10_14.BS5_003.fsa
14.BS5
Identifiler_v1
D8S1179
D21S11
D7S820
CSF1PO
11
14
30
31
10
12
11
12
D3S1358
TH01
D13S317
D16S539
D2S1338
16
17
9
10
8
11
12
12
18
19
D19S433
vWA
TPOX
D18S51
14
14.2
16
19
8
10
13
16
...
D5S818
FGA
X
Y
10
11
21
21

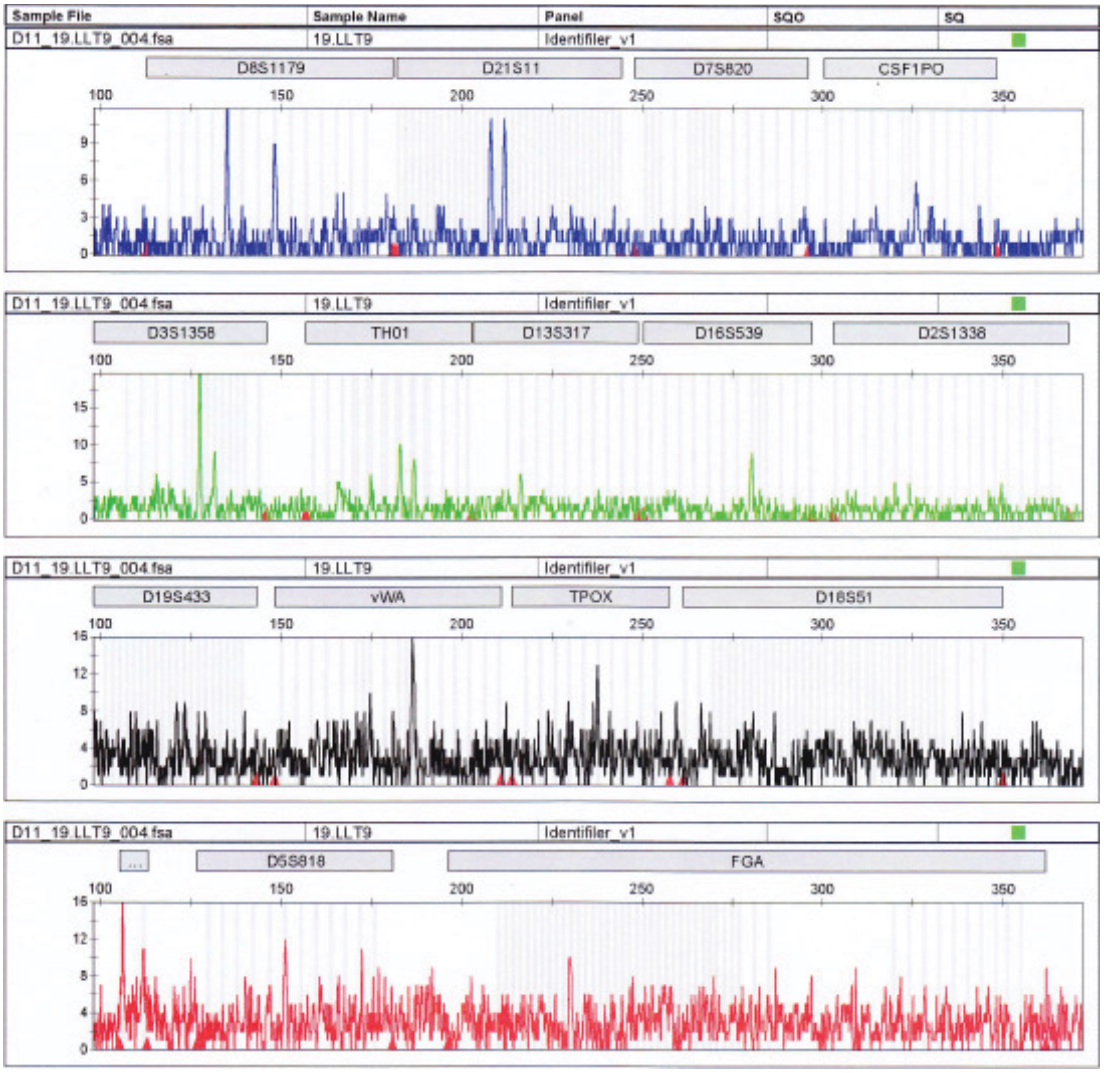

Sample File
Sample Name
Panel
SQO
SQ
B09_1.LLS1_002.fsa
1.LLS1
Identifiler_v1
D8S1179
D21S11
D7S820
CSF1PO
11
14
D3S1358
TH01
D13S317
D16S539
D2S1338
17
17
9
9
D19S433
vWA
TPOX
D18S51
14
14
D5S818
FGA
X
X
10
11


Sample File
Sample Name
Panel
SQO
SQ
G11_2.LLS1(5+5)_003.fsa
2.LLS1(5+5)
Identifiler_v1
D8S1179
D21S11
D7S820
CSF1PO
100
150
200
250
300
350
1000
0
11
14
30
31
10
12
11
12
G11_2.LLS1(5+5)_003.fsa
2.LLS1(5+5)
Identifiler_v1
D3S1358
TH01
D13S317
D16S539
D2S1338
100
150
200
250
300
350
700
0
16
17
9
10
8
11
12
12
18
19
G11_2.LLS1(5+5)_003.fsa
2.LLS1(5+5)
Identifiler_v1
D19S433
vWA
TPOX
D18S51
100
150
200
250
300
350
480
0
14
14.2
16
19
8
10
13
16
G11_2.LLS1(5+5)_003.fsa
2.LLS1(5+5)
Identifiler_v1
...
D5S818
FGA
100
150
200
250
300
350
420
0
X
Y
10
11
21
21


Sample File
Sample Name
Panel
SQO
SQ
F10_13.BS3_002.fsa
13.BS3
Identifiler_v1
D8S1179
D21S11
D7S820
CSF1PO
10 12
27
32.2
10
11
10
12
F10_13.BS3_002.fsa
13.BS3
Identifiler_v1
D3S1358
TH01
D13S317
D16S539
D2S1338
13
18
6
10
8 10
10
11
22 25
F10_13.BS3_002.fsa
13.BS3
Identifiler_v1
D19S433
vWA
TPOX
D18S51
14.2
15.2
17
18
8
8
19
20
F10_13.BS3_002.fsa
13.BS3
Identifiler_v1
...
D5S818
FGA
X
Y
10
11
21
23


Sample File
Sample Name
Panel
SQO
SQ
D11_19.LLT9_004.fsa
19.LLT9
Identifiler_v1
D8S1179
D21S11
D7S820
CSF1PO
D3S1358
TH01
D13S317
D16S539
D2S1338
D19S433
vWA
TPOX
D18S51
D5S818
FGA
100
150
200
250
300
350


Sample File
Sample Name
Panel
SQO
SQ
E10_12.BS1_001.fsa
12.BS1
Identifiler_v1
D8S1179
D21S11
D7S820
CSF1PO
13 15
30.2
32.2
9 12
10 13
E10_12.BS1_001.fsa
12.BS1
Identifiler_v1
D3S1358
TH01
D13S317
D16S539
D2S1338
16 18
6
7
8
9
12
13
18 21
E10_12.BS1_001.fsa
12.BS1
Identifiler_v1
D19S433
vWA
TPOX
D18S51
12
14
15 18
8
9
16 18
E10_12.BS1_001.fsa
12.BS1
Identifiler_v1
...
D5S818
FGA
X
Y
9 11
23
24


Sample File
Sample Name
Panel
SQO
SQ
D11_19.LLT9_004.fsa
19.LLT9
Identifiler_v1
D8S1179
D21S11
D7S820
CSF1PO
D3S1358
TH01
D13S317
D16S539
D2S1338
D19S433
vWA
TPOX
D18S51
D5S818
FGA
100
150
200
250
300
350

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ – สกุล สุภัทร ตันติวิทยมาศ
ที่อยู่ 132 / 1 ม. 10 ต. สำโรง อ.พระประแดง จ.สมุทรปราการ 10130

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2551	สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์
พ.ศ. 2552	ศึกษาต่อปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขานิติวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์