P-ISSN 2586-9000
E-ISSN 2586-9027
วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี Homepage : http://li01.tci-thaijo.org/index.php/tstj
ปีที่ 30 ฉบับที่ 1 (มกราคม-กุมภาพันธ์ 2565) หน้า [97-108]

การศึกษาประสิทธิภาพของการจัดเก็บตัวอย่างเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มด้วยก้านสำลีสำหรับการเพิ่มปริมาณพีซีอาร์โดยตรงเพื่อการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

Study of Efficiency Buccal Cell Sampling Using Cotton Bud for Direct PCR and Human Identification DNA Testing

วิทยา วงษ์ตรี*
ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อุบลราชธานี 34190
Wittaya Wongtri*
Department of Biological Science, Faculty of Science, Ubonratchathani University, Ubon Ratchathani 34190

Received 2 May 2021; Received in revised 7 August 2021; Accepted 17 September 2021

บทคัดย่อ

งานวิจัยชิ้นนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการใช้ก้านสำลี cotton bud ที่วางจำหน่ายทั่วไปตามท้องตลาด ทดแทนการใช้ก้านสำลีสำหรับจัดเก็บวัตถุพยานซึ่งมีราคาสูงในการจัดเก็บดีเอ็นเอจากเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้ม การสกัดดีเอ็นเอด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ทดแทนการใช้ชุดน้ำยาสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับการทำพีซีอาร์โดยตรง และศึกษาผลของปริมาณดีเอ็นเอที่ได้เมื่อลดปริมาณน้ำยาสำเร็จรูป ผลการวิจัยชี้ให้เห็นว่า การจัดเก็บเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มด้วยก้านสำลี cotton bud เพียงหนึ่งรอบ การสกัดดีเอ็นเอด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 50 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที มีปริมาณดีเอ็นเอเหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตรง โดยไม่ต้องเจือจาง และยังสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอจากการลดปริมาตรของชุดน้ำยาได้ ¼ ของปริมาณที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต และให้ผลเทียบเท่ากับดีเอ็นเอที่สกัดโดยวิธีปรกติ ดังนั้น จึงเป็นทางเลือกสำหรับห้องปฏิบัติการที่มีข้อจำกัดในเรื่องงบประมาณ อุปกรณ์และสารเคมีได้ รวมถึงสถานการณ์ภัยพิบัติ ที่มีข้อจำกัดด้านอุปกรณ์และสารเคมี

คำสำคัญ: เซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้ม; พีซีอาร์โดยตรง; การทดสอบเอกลักษณ์บุคคล

***ผู้รับผิดชอบบทความ:** wid_da_ya@hotmail.com doi:

Abstract

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

Keywords: Buccal cell sampling; Direct PCR; Human identification testing

1. บทนำ

การเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มด้วยก้านสำลี [1-4] เพื่อทำการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และเป็นที่นิยม เนื่องจากทำได้ง่ายสามารถจัดเก็บได้ด้วยตนเองโดยไม่ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการจัดเก็บ ทั้งยังเก็บรักษาเพื่อส่งตรวจได้ง่าย

กระบวนการการตรวจดีเอ็นเอ ประกอบไปด้วยหลายขั้นตอน โดยเริ่มตั้งแต่ การเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอ การเก็บรักษาตัวอย่างก่อนถึงห้องปฏิบัติการ การสกัดดีเอ็นเอ การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ การแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ และการแปลผลดีเอ็นเอ ซึ่งในการตรวจวิเคราะห์แต่ละขั้นตอน มีการใช้อุปกรณ์เครื่องมือที่ทันสมัยและสารเคมีที่มีราคาสูง หลายห้องปฏิบัติการนิยมใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำเร็จรูปซึ่งมีความสะดวกรวดเร็วในการใช้งาน แต่มีราคาสูงเช่นกัน อีกทั้งยังใช้กำลังผู้ปฏิบัติงานมาก และใช้ระยะเวลาการปฏิบัติการยาวนาน ซึ่งในปัจจุบันมีความต้องการผลการตรวจวิเคราะห์ที่ถูกต้องและรวดเร็ว เพื่อตอบสนองต่อสภาวการณ์ได้อย่างทันท่วงที เช่น การใช้ผลตรวจเปรียบเทียบในการสืบสวนจับกุมผู้กระทำความผิดที่กำลังจะหลบหนี เหตุการณ์ที่มีผลกระทบต่อชีวิตและทรัพย์สินของประชาชน หรือการก่อวินาศกรรม เป็นต้น

มีความพยายามที่จะลดขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ผลดีเอ็นเอให้เหลือเวลาสั้นลง เช่น การใช้วิธีการ Direct PCR [5-8] ซึ่งเป็นวิธีการนำตัวอย่างมาสกัดและนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้เข้าสู่กระบวนการเพิ่มปริมาณ

ดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์โดยที่ไม่ต้องผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์และตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอก่อน ซึ่งช่วยลดขั้นตอนและระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอลง จากเดิมที่ใช้ระยะเวลาประมาณ 6 - 8 ชั่วโมง เหลือไม่เกิน 3 - 4 ชั่วโมง ในขั้นตอนการปฏิบัติงานจริงผู้วิจัยพบว่าก้านสำลีที่ใช้เก็บตัวอย่างเพื่อส่งตรวจวิเคราะห์มีทั้งการใช้ก้านสำลีชนิดพลาสติกที่มีสิ่งห่อหุ้ม หรือเกรดทางการแพทย์ ซึ่งมีราคาสูง ประกอบกับสถานการณ์โรคติดเชื้อไวรัส COVID 19 ที่มีความต้องการใช้ก้านสำลีปริมาณสูง อาจทำให้ราคาสูงและขาดแคลนได้ และยังพบว่าการเก็บเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มด้วยก้านสำลีพันปลายไม้ขนาดต่างๆ กันสามารถเก็บดีเอ็นเอได้ปริมาณมากน้อยต่างกัน และวิธี Direct PCR นั้นจะไม่ทราบความเข้มข้นของดีเอ็นเอ จึงทำให้เกิดความล้มเหลวในการวิเคราะห์ เช่น มีปริมาณผลผลิตพีซีอาร์มากหรือปริมาณน้อยเกินไป ทำให้ต้องมีการทำซ้ำทำให้สิ้นเปลืองเวลาและสารเคมีมากขึ้น ซึ่งปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณ STRs ที่วางจำหน่ายโดยทั่วไปคือประมาณ 0.5 - 2.5 นาโนกรัม ต่อไมโครลิตร [2] เพื่อให้ได้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่มีคุณภาพ และผลผลิต PCR ที่ต้องใช้ในการวิเคราะห์นั้นใช้เพียง 1 ไมโครลิตร ทำให้มีปริมาณสารเคมีเหลือทิ้งเป็นจำนวนมาก

ค่าใช้จ่ายที่มีราคาสูงในแต่ละตัวอย่างที่ทำการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอเป็นอุปสรรคสำคัญของห้องปฏิบัติการต่างๆ โดยเฉพาะหน่วยงานราชการซึ่งมีข้อจำกัดในเรื่องของงบประมาณ แต่แนวโน้มความต้องการหรือปริมาณงานตรวจพิสูจน์มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นในทุกปี ข้อจำกัดดังกล่าวทำให้ประชาชนไม่สามารถเข้าถึงการตรวจพิสูจน์ที่จำเป็นได้อย่างทันท่วงที เช่น การตรวจเปรียบเทียบดีเอ็นเอศพนิรนามกับญาติในกรณีภัยพิบัติร้ายแรงขนาดใหญ่ หรือสถานการณ์โรคติดเชื้อ COVID 19 ในปัจจุบันเป็นสิ่งสะท้อนให้เห็นปัญหาถึงความต้องการใช้อุปกรณ์เช่น ก้านสำลี หรือชุดน้ำยา PCR ซึ่งทั่วโลกมีความต้องการใช้ และระยะเวลาการตรวจที่นานประชาชนไม่สามารถเข้าถึงบริการได้ อาจส่งผลเสียต่อป้องกันและควบคุมโรคได้ซึ่งสร้างความเสียหายอย่างร้ายแรงเป็นวงกว้าง

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

2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

2.1 เพื่อศึกษาวิธีการจัดเก็บเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มโดยใช้ก้านสำลี (cotton bud) เพื่อให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสม

2.2 เพื่อศึกษาการสกัดดีเอ็นเอด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 50 มิลลิโมลาร์ แทนการใช้ชุดน้ำยาสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป

2.3 เพื่อศึกษาคุณภาพของดีเอ็นเอเมื่อลดปริมาณชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus ลง 1/2 1/4 และ 1/8 ของปริมาตรที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต

2.4 เพื่อศึกษาคุณภาพของดีเอ็นเอโปรไฟล์ที่ได้จากการทำ Direct PCR

3. อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 การเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอจากเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้ม

ทำการเก็บเยื่อบุกระพุ้งแก้มจากอาสาสมัครที่มีสุขภาพแข็งแรง โดยใช้อาสาสมัครจำนวนหนึ่งราย โดยใช้ก้านสำลี cotton bud ขนาดกลาง (M) โดยให้อาสาสมัครบ้วนปากด้วยน้ำเปล่า แล้วใช้ก้านสำลีหมุนเป็นจำนวนหนึ่งรอบภายในเยื่อบุกระพุ้งแก้ม ทำการเก็บจากบริเวณที่ต่างกันโดยไม่ซ้ำจุดเดิม หลังจากนั้นนำไปผึ่งที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ก้านสำลีแห้งสนิท จากนั้นเก็บใส่ซองกระดาษระบุรายละเอียดเพื่อทำการทดลองต่อไป โดยทำการเก็บตัวอย่าง 3 ก้าน สำหรับการสกัดด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ และ 2 ก้านสำหรับชุดน้ำยา IQ™ หลีกเลี่ยงการเก็บดีเอ็นเอซ้ำตำแหน่งเดิมเพราะจะทำให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอน้อยลง โดยสามารถเว้นระยะเวลาในการเก็บได้

3.2 การสกัดดีเอ็นเอ

3.2.1 การสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยา DNA IQ™

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

3.2.2 การสกัดดีเอ็นเอด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์

ตัดก้านสำสีใส่หลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 3 หลอด เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 250 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที เติม Tris - HCL ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 นาที

3.3 การหาปริมาณดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอที่สกัดได้ในแต่ละกลุ่มการทดลองจะถูกนำมาวัดปริมาณโดยใช้ชุดน้ำยา Quantifiler Human Plus (Applied Biosystems) โดยใช้เครื่อง Realtime PCR 7500 โดยเตรียมน้ำยา ประกอบด้วย Quantifiler THP PCR reaction mix ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และ Quantifiler THP primermix 5 ไมโครลิตร เตรียมตามจำนวนตัวอย่างดังนี้ ดีเอ็นเอมาตรฐาน ความเข้มข้น 50, 5, 0.5, 0.05 และ 0.005 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรจำนวน 2 ซ้ำ ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดด้วยชุดน้ำยา DNA IQ™ และกลุ่มที่สกัดด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ดูดน้ำยา PCR master mix ใส่ในหลอด strip ซึ่งในแต่ละหลอดประกอบไปด้วย น้ำยา PCR master mix ปริมาตร 9 ไมโครลิตร และตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง 7500 Fast Real - Time PCR System ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต

3.4 การศึกษาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีการ Direct PCR และการลดปริมาณน้ำยา PCR Mastermix

ใช้ก้านสำลีเช็ดเก็บภายในเยื่อบุกระพุ้งแก้ม จำนวน 1 รอบ ตัดก้านสำสีใส่หลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 15 วินาที จากนั้น เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 250 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที เติม Tris - HCL ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 นาที เตรียมสารละลาย AmpFLSTR™ Identifiler™ PCR Amplification Kit (Applied Biosystems) master mix โดยใช้ปริมาตร 15, 7.5, 3.75, 1.875 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอที่สกัดได้จากทั้งสองกลุ่มตัวอย่าง ปริมาตร 10, 5, 2.5 และ 1.25 ไมโครลิตรตามลำดับ เขย่าให้เข้ากันและนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้สารละลายตกสู่ก้นหลอด นำไปเพิ่มปริมาณด้วยเครื่อง Gene Amp® PCR System 9700 โดยใช้อุณหภูมิประกอบไปด้วย melting temperature ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 11 นาที จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที annealing step ที่อุณหภูมิ 59 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 นาที (ขั้นตอนนี้ ทำซ้ำจำนวน 28 รอบ) และขั้นตอน final extension steps ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และเก็บผลผลิต PCR ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.5 การวิเคราะห์ผลดีเอ็นเอ

นำผลผลิต PCR ที่ผ่านขั้นตอนการเพิ่มปริมาณไปแยกโดยวิธี Capillary electrophoresis ด้วยเครื่อง 3500 Genetic Analyzer System (Applied Biosystems) โดยการเตรียม Hi - Di™ Formamide (Applied Biosystems™) 10 ไมโครลิตร และ GeneScan™ 600 LIZ® Size Standard 0.025 ไมโครลิตร และ PCR product 1 ไมโครลิตร ใส่ในถาดหลุมสำหรับการวิเคราะห์ชนิด 98 หลุม นำไป denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที จากนั้นนำไปลดอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส 3 นาที นำเข้าเครื่อง ทำการวิเคราะห์ผลที่ได้ด้วยโปรแกรม Data Collection Software 2 (Applied Biosystems) และวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม Gene Mapper IDX v.1.4 software (Applied Biosystems) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต

4. สรุปผลการวิจัย

4.1 การจัดเก็บดีเอ็นเอด้วยก้านสำลี cotton bud เพื่อให้มีปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสม และการสกัดดีเอ็นเอด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์

การเก็บเยื่อบุกระพุ้งแก้มด้วยก้านสำลีขนาดกลาง (M) โดยการเช็ดเก็บโดยการหมุนก้านสำลีหนึ่งรอบ หลังจากนั้นนำไปสกัดดีเอ็นเอด้วยการชุดน้ำยาสกัดสำเร็จรูป IQ และสกัดด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อนำไปวัดปริมาณด้วยวิธี qPCR โดยใช้ชุดน้ำยา Quantifiler Human Plus (Applied Biosystems) พบว่ากลุ่มทดลองที่สกัดด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่อุณหภูมิห้อง มีปริมาณดีเอ็นเอ 0.11, 0.02, 0.05 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และปริมาณดีเอ็นเอของชุดที่สกัดด้วยชุดน้ำยา IQ™ มีปริมาณ 0.99 และ 2.11 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ

4.2 การศึกษาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีการ Direct PCR และการลดปริมาณน้ำยา PCR Mastermix

กลุ่มตัวอย่างที่สกัดที่อุณหภูมิห้องถูกเลือกมาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยา AmpFLSTR® Identifiler® Plus PCR amplification kit โดยการลดปริมาณน้ำยาลง 1/2 1/4 และ 1/8 โดยจะศึกษาคุณภาพของผลดีเอ็นเอที่วิเคราะห์ได้ เช่น การให้ผลดีเอ็นเอครบทั้ง 16 ตำแหน่งตามมาตรฐานของชุดน้ำยา (full profile) และการเกิด peak แปลกปลอม (artifact) เช่น peak

ขนาดเล็กๆ โดยปกติมีขนาด 15 - 20 เปอร์เซ็นต์ ที่ปรากฏในตำแหน่งต่างๆ ของพีคหลักในแต่ละตำแหน่ง (stutter) การขาดหายไปของ peak บางตำแหน่ง (allele drop out) การซ้อนทับกันของสีในตำแหน่งเดียวกัน เนื่องจากดีเอ็นเอมีปริมาณมากเกินไปในปฏิกิริยา (pull up) เป็นต้น ผลการศึกษาพบว่าทุกตัวอย่างสามารถให้ผลโปรไฟล์ดีเอ็นเอได้ทั้ง 8 ตัวอย่าง เช่นเดียวกับตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดด้วยชุดน้ำยา IQ วิธีปกติ โดยกลุ่มตัวอย่างที่สกัดด้วยชุดน้ำยา IQ ตัวอย่างที่ 1 - 8 พบการเกิด stutter 9, 1, 3, 10, 5, 11, 10 และ 7 ตำแหน่งตามลำดับ และยังพบการเกิด allele dropout 1 ตำแหน่งที่ CSF1PO ตัวอย่างที่พบ artifact มากที่สุดคือตัวอย่างที่ 6 พบ 11 ตำแหน่งจาก 16 ตำแหน่ง โดยที่ตัวอย่างที่ 2 (รูปที่ 1) ที่พบการเกิด artifact น้อยที่สุด เกิด artifact ชนิด stutter ที่ตำแหน่ง D49S433 เพียง 1 ตำแหน่ง ทำให้อ่านค่าได้เป็น homozygous 12 เมื่อเทียบกับดีเอ็นเออ้างอิงซึ่งอ่านค่าได้เป็น heterozygous 12, 13

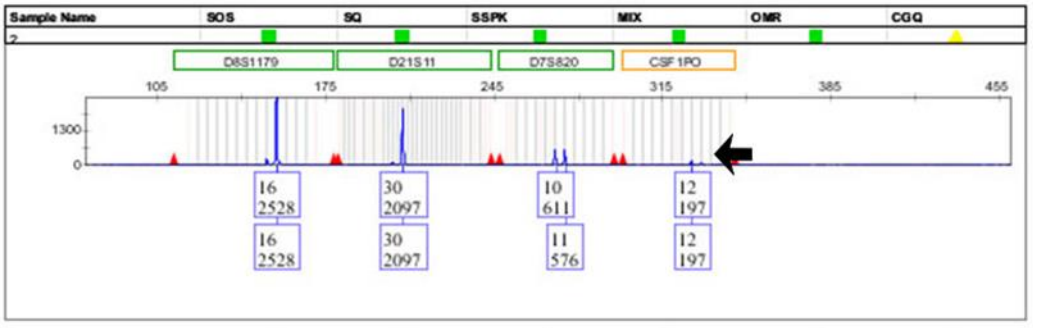

Figure 1 Allele drop out of sample 2 at CSF1PO

ตัวอย่างที่ 8 (รูปที่ 2) พบการเกิด Allele drop out จำนวน 3 ตำแหน่ง ได้แก่ CSF1PO, D2S1338 และ D18S51 ทำให้ไม่สามารถอ่านค่าที่ตำแหน่งดังกล่าวได้ โดยอ่านค่าได้ 13 ตำแหน่ง จากทั้งหมด 16 ตำแหน่ง เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

กลุ่มตัวอย่างที่สกัดด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ตัวอย่างที่ 9 - 16 พบ artifact จำนวน 12, 12, 12, 15, 10, 14, 10 และ 5 ตามลำดับ โดยที่ตัวอย่างที่ 16 (รูปที่ 5) ที่พบการเกิด artifact น้อยที่สุด เกิด artifact ชนิด stutter จำนวน 6 ตำแหน่งที่ตำแหน่ง D2S1338, D49S433, vWA, Ameloginine, D5S818 และ FGA และยังพบการเกิด allele dropout 1 ตำแหน่งที่ D16S539 ตัวอย่างที่พบ artifact มากที่สุดคือตัวอย่างที่ 12 (รูปที่ 3) โดยพบ artifact จำนวน 15 ตำแหน่งจาก 16 ตำแหน่ง ตำแหน่งที่เกิด artifact มากที่สุดคือ D49S433 พบปรากฏในทุกตัวอย่าง vWA พบ 15 ตัวอย่างจากทั้งหมด 16 ตัวอย่าง และ D5S818 พบ 14 ตัวอย่างจากทั้งหมด 16 ตัวอย่าง โดยที่ตัวอย่างที่ 12 เกิด pull up ทำให้ไม่สามารถอ่านค่าตำแหน่ง FGA ได้ และตัวอย่างที่ 14 (รูปที่ 4) เกิด pull up ที่ตำแหน่ง D5S818 อ่านค่าได้เป็น partial allele 9,- ซึ่ง DNA อ้างอิงอ่านค่าได้เป็น 9, 12 และ FGA อ่านค่าได้เป็น -,24 ซึ่งดีเอ็นเออ้างอิงอ่านค่าได้เป็น 23, 24

ตัวอย่างที่ 16 ปรากฏ artifact น้อยที่สุดแต่พบ allele drop out ที่ตำแหน่ง D2S1338 ทำให้ไม่สามารถอ่านค่าตำแหน่งดังกล่าวได้ โดยสามารถอ่านค่าได้เป็น partial คือ -,19 เมื่อเทียบกับดีเอ็นเออ้างอิงที่อ่านค่าได้เป็น 17, 19 ทำให้อ่านค่าดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 15 ตำแหน่ง จากทั้งหมด 16 ตำแหน่งเมื่อเทียบกับดีเอ็นเออ้างอิง (รูปที่ 6)

Figure 2 Allele drop out of sample 8 at CSF1PO, D2S1338 and D18S51

5. วิจารณ์และข้อเสนอแนะ

การเก็บดีเอ็นเอด้วยก้านสำลีชนิดธรรมดาสามารถจัดเก็บดีเอ็นเอได้เช่นเดียวกับก้านสำลีทางการแพทย์ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้เป็นทางเลือกได้โดยเฉพาะในสถานการณ์โรคติดเชื้อ COVID 19 ในปัจจุบันที่ทั่วโลกมีความต้องการใช้ก้านสำลีปริมาณสูง อาจส่งผลให้เกิดความขาดแคลนและราคาอาจสูงขึ้น ซึ่งเราสามารถประยุกต์ใช้ก้านสำลี cotton bud เพื่อทดแทนโดยให้ผลได้เทียบเท่าสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Ruiz และคณะ (2018) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าก้านสำลีชนิดธรรมดาใช้เก็บดีเอ็นเอจากเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มได้ในปริมาณไม่แตกต่างก้านสำลีทางการแพทย์แต่มีราคาถูกกว่า [3]

จากผลการทดลองพบว่าปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ในแต่ละตัวอย่างมีปริมาณดีเอ็นเอแตกต่างกัน จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในปริมาณตัวอย่างที่มากขึ้น และพบว่าทุกตัวอย่างสามารถให้ผลดีเอ็นเอได้เช่นเดียวกัน แต่พบอัตราการเกิด artifact peak ในปริมาณมาก การเกิด pull up แสดงให้เห็นถึงปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบมีความเข้มข้นสูง การเกิด allele drop out ในหลายๆ ตัวอย่าง อาจเกิดจากปริมาณดีเอ็นเอเสื่อมสภาพหรือดีเอ็นเอต้นแบบมีปริมาณน้อย ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Connon และคณะ (2016) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสามารถลดการใช้ PCR reaction mix ของชุดน้ำยาลงเหลือเพียง 3-6 ไมโครลิตร โดยที่ยังสามารถแปรผลดีเอ็นเอได้เมื่อเทียบกับวิธีปกติ [5] แต่ตัวอย่างที่ 8 ซึ่งใช้

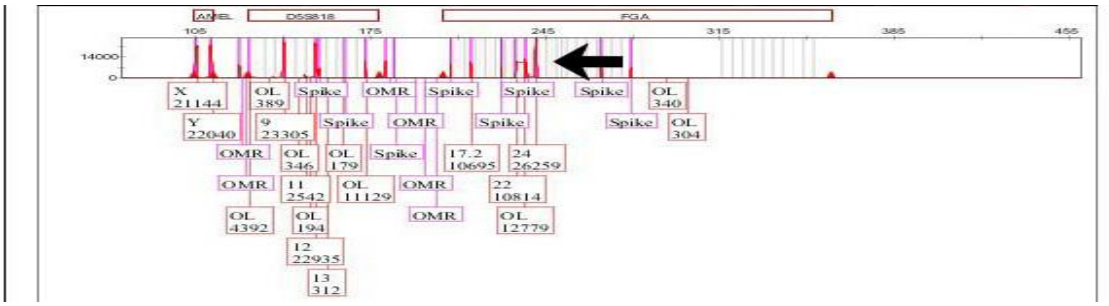

Figure 3 Pull-up of example 12 at the position of FGA

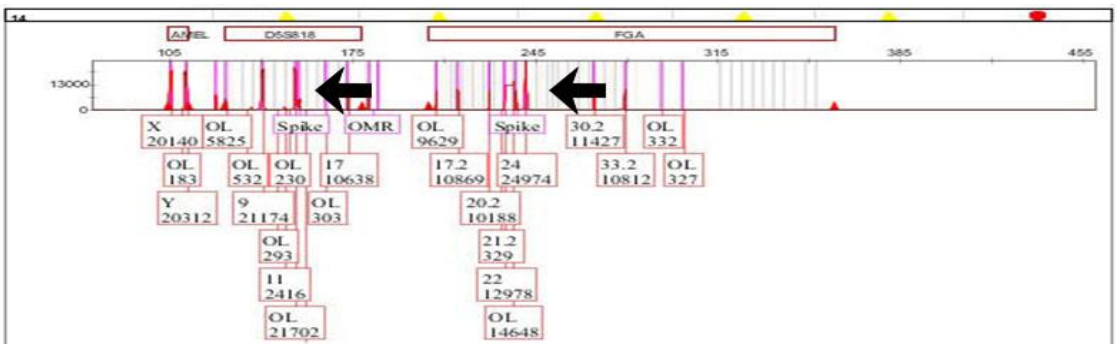

Figure 4 Pull-up of example 14 at position D5S818 and FGA

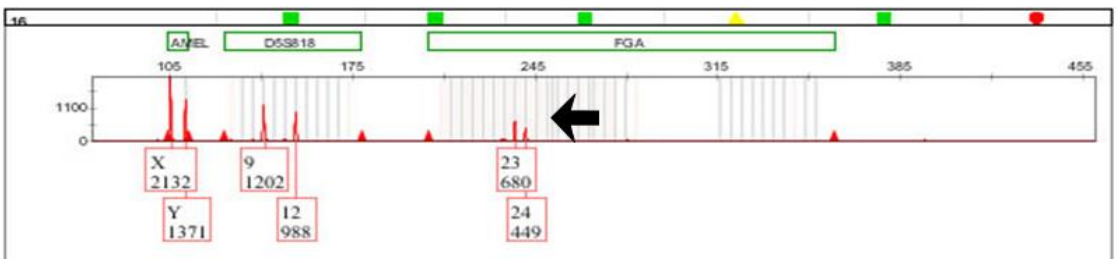

Figure 5 Allele drop out of sample 16 at position D2S1338

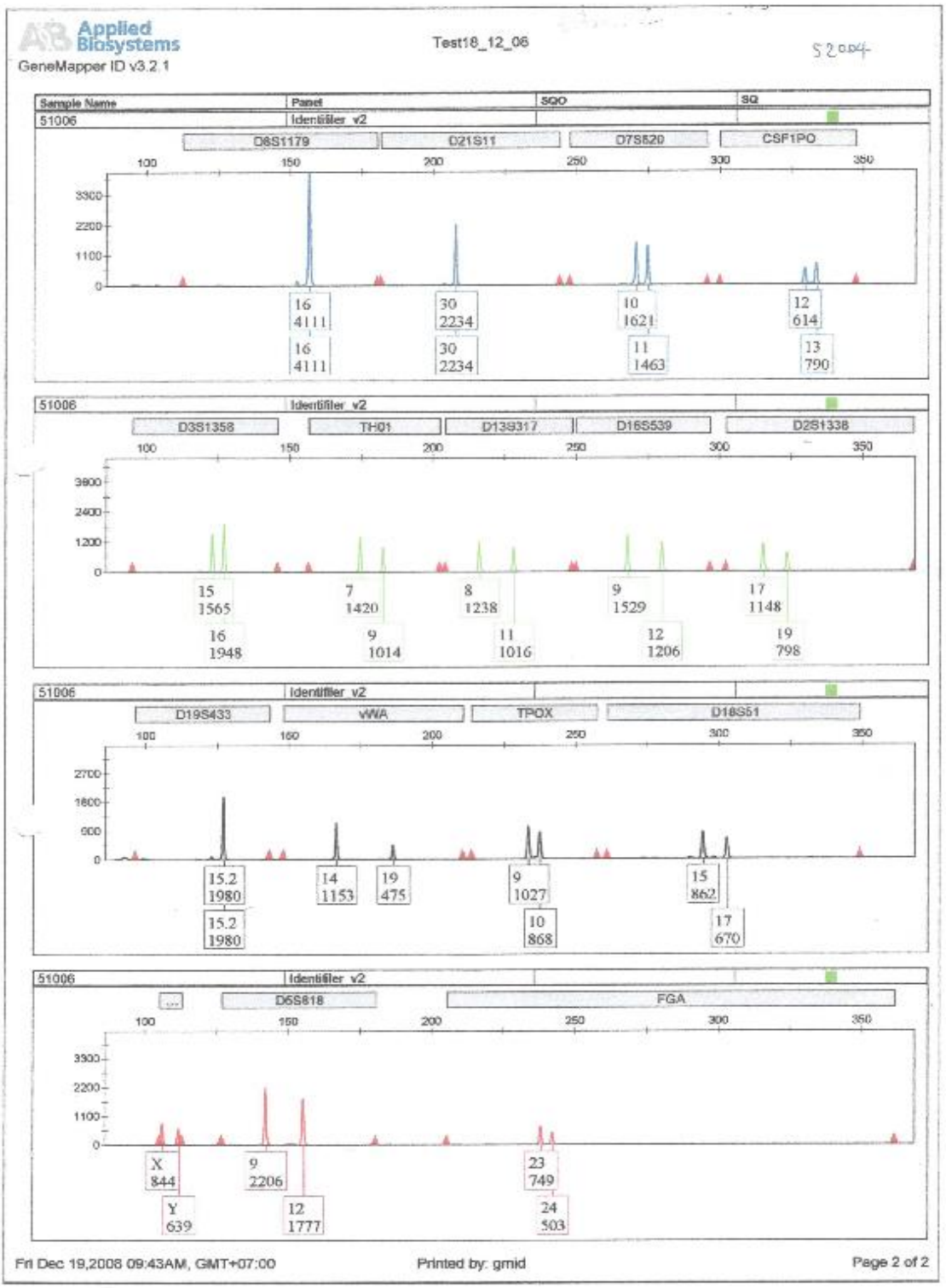

Figure 6 DNA profile of reference

PCR master mix 1.875 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอต้นแบบ 1.25 ไมโครลิตร นั้นให้ผลดีเอ็นเอ เพียง 13 ตำแหน่ง ซึ่งเกิด allele drop out ในตำแหน่ง CSFPO D2S1358 และ D18SS1 แต่เมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ 7 ซึ่งให้ผลดีเอ็นเอสมบูรณ์ทั้ง 16 ตำแหน่ง สาเหตุอาจเกิดได้จากในขั้นตอนการดูดสารละลายซึ่งสารละลายที่ใช้มีปริมาณน้อยมากเพียง 1.2 ไมโครลิตร การผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันมากที่สุดโดยการใช้เครื่องเขย่าสารละลายประมาณ 15 วินาที แล้วปั่นเหวี่ยงช่วยลดปัญหาดังกล่าวลงได้ และการดูดสารละลายจะต้องตรวจดูที่ปลายหลอดทุกครั้งว่าสามารถดูดได้ตามปริมาณหรือไม่ เพราะพบว่าทิปที่ใช้ดูดจ่ายสารละลายที่มีการเคลือบสารบางชนิดเพื่อกันน้ำเกาะส่งผลทำให้ปริมาณสารละลายที่ดูดจ่ายได้น้อยหรือมากกว่าปริมาตรที่ต้องการ

และในตัวอย่างที่ 10, 12 และ 14 ซึ่งเป็นดีเอ็นเอชุดเดียวกัน แต่ใช้ปริมาณดีเอ็นเอต่างกัน พบว่าเกิดการ pull - up แต่ยังสามารถวิเคราะห์ผลได้ แต่ในตำแหน่ง D5S818 และ FGA เกิดการ pull - up จนทำให้ไม่สามารถอ่านค่าได้ในตำแหน่งดังกล่าว การเกิด artifact เช่น pull up, split peak, stutter out of ladder เป็นจำนวนมากในกลุ่มตัวอย่างที่ 9 - 16 ชี้ให้เห็นว่ามีปริมาณ DNA template ในปฏิกิริยามากจึงจำเป็นต้องศึกษาปริมาณสารละลายที่ใช้ในการสกัดเพื่อให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมเพื่อลดการเกิด artifact ให้น้อยลง ทำให้แปรผลได้ง่ายขึ้น

การเปรียบเทียบคุณภาพของ peak ในทั้งสองกลุ่มตัวอย่างทดลอง พบว่าทุกตัวอย่างมีการเกิด stutter, spike, pull - up การเกิดปรากฏการณ์เหล่านี้ส่งผลทำให้เสียเวลาในการวิเคราะห์ผล หากเจือจางดีเอ็นเอได้เหมาะสมระหว่าง 0.1 - 0.21 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จะลดโอกาสเกิด artifact เหล่านี้ลงไปได้ และ stutter peak จะทำให้เกิดความยุ่งยากในการแปรผลในกรณีที่ดีเอ็นเอมีคุณภาพต่ำ หรือปริมาณน้อย เพราะค่าความสูงของ peak จริงกับ stutter peak ใกล้เคียงกัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Godwin ที่ได้แสดงให้เห็นว่า การเกิด artifact เช่น stutter ต่างๆ นั้นพบได้บ่อยในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ ถึงแม้ว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับ PCR สำหรับชุด STRs ที่วางขายในปัจจุบันคือ 0.05 -.2 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร แต่ในการปฏิบัติงานจริงพบว่าการเตรียมดีเอ็นเอให้ได้ปริมาณดังกล่าวเป็นไปได้ยากเนื่องจากหลายปัจจัย [2]

วิธีการสกัดด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ สามารถทำได้ง่าย วิธีการเตรียมและการใช้งานไม่ยุ่งยากซับซ้อน ประยุกต์ใช้กับตัวอย่างได้หลายชนิด [8-9] สามารถลดขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ การหาปริมาณดีเอ็นเอ การเตรียมดีเอ็นเอได้ และมีราคาที่ถูกสามารถใช้สกัดดีเอ็นเอได้ในจำนวนที่มากกว่า ชุดน้ำยาสำเร็จรูป และยังเก็บไว้ได้นานในอุณหภูมิห้องปกติ และพบว่าลดระยะเวลาการปฏิบัติเหลือเพียงประมาณ 2.30 ชั่วโมง และยังสามารถลดการใช้เครื่องมือและวัสดุสิ้นเปลือง เช่น เครื่องทำอุณหภูมิแบบแห้ง หลอด microcentrifuge tube spin basket tips สำหรับเครื่องดูดจ่ายสารละลาย (pipette) ลงไปได้เป็นอย่างมากสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Rudbeck และ Dissing (1998) ซึ่งสามารถสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสโดยใช้เวลาเพียง 5-6 นาที [9]

ในขั้นตอนการสกัดบางวิธีใช้สารเคมีที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้ปฏิบัติงาน เช่น DTT phenol chloroform มีความระคายเคืองต่อระบบหายใจและเป็นพิษสูง การสกัดด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ยังช่วยลดของเสียและไอระเหยจากสารพิษที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้ปฏิบัติงานได้ [10]

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอนั้น ใช้ดีเอ็นเอที่สังเคราะห์แล้วเพียง 1 ไมโครลิตร จากปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร หากการตรวจวิเคราะห์ไม่ได้ผลเช่น มีดีเอ็นเอมากเกินไปจนไม่สามารถอ่านค่าได้ หรือมีดีเอ็นเอน้อยเกินไป เกิดการเสื่อมสภาพของดีเอ็นเอจน allele ขาดหายไปในบางตำแหน่ง ทำให้ต้องมีการทำซ้ำใหม่ ซึ่งการลดปริมาณการใช้ PCR mastermix ลงทำให้ลดการสิ้น

เปลืองการใช้สารเคมีลง สามารถตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างได้มากขึ้น โดยที่ยังให้ผลวิเคราะห์ดีเอ็นเอใกล้เคียงกับการใช้งานปกติ นอกจากนี้สำหรับห้องปฏิบัติการที่มีงบประมาณจำกัด จะช่วยให้ประหยัดค่าใช้จ่ายและมีงบประมาณเหลือสำหรับซื้ออุปกรณ์อื่นๆ ได้ การตรวจวิเคราะห์ที่มีค่าใช้จ่ายที่ถูกลง ระยะเวลาในการตรวจพิสูจน์สั้นลง ทำให้ประชาชนและผู้เกี่ยวข้องสามารถเข้าถึงบริการได้มากขึ้น

การศึกษานี้ จะต้องทำการมีการศึกษาในจำนวนตัวอย่างที่มากขึ้น ศึกษาการเสื่อมสภาพเมื่อเก็บรักษาในระยะเวลานาน และทำการศึกษาตัวอย่างดีเอ็นเอที่เป็นชนิดอื่น เช่น โลหิต เนื้อเยื่อ หรือปลายรากผมต่อไป

6. กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยเรื่อง “การศึกษาประสิทธิภาพของการจัดเก็บตัวอย่างเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มด้วยก้านสำลีสำหรับการเพิ่มปริมาณพีซีอาร์โดยตรงเพื่อการทดสอบเอกลักษณ์บุคคลโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ” สำเร็จลุล่วงไปด้วยความอนุเคราะห์และความเมตตากรุณาของ ดร.สุรสิทธิ์ สุทธิคำภา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร.วันเพ็ญ กาคำผุย ประธานกรรมการสอบ ศาสตราจารย์ ดร.พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ และรองศาสตราจารย์ ดร.ปาริชาติ พุ่มขจร กรรมการสอบ ผู้ศึกษาใคร่ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณครอบครัว พี่น้องภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ และตลอดจนผู้มีพระคุณที่มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่าน ที่ไม่สามารถกล่าวได้หมด ผู้ศึกษารู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและกำลังใจอันดียิ่งจากทุกท่าน จึงขอกราบขอบพระคุณ ณ โอกาสนี้

7. References

[1] John M. Butler, 2005, Forensic DNA Typing: biology, technology, and genetics of STR markers (2nd ed.) USA, Elsevier academic press, pp. 90-99.

[2] Goodwin, W., Linacre, A. and Hadi, S., 2007, An introduction to forensic genetics. (2nd ed.) England, John Wiley & Sons, p.68.

[3] Ruiz, C. A., Chaney, M. E. and Tosi, A. J., 2018, Medical-grade buccal swabs versus drugstore cotton swabs: no difference in DNA yield, MethodsX, 5, 39-42.

[4] Tredouw, S., Mfolozi, S. and Shires, K., 2015, Efficiency of buccal DNA sampling device in the mortuary, J Forensic Investigation. 3(2): 6.

[5] Connon, C. C., LeFebvre, A. K. and Benjamin, R. C., 2016, Validation of low volume, fast PCR amplification of STR loci for reference DNA samples. J Forensic Leg Investig Sci, 2(008)

[6] Wang, D. Y., Chang, C. W., Oldroyd, N. J. and Hennessy, L. K., 2009, Direct amplification of STRs from blood or buccal cell samples, Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Series, 2(1): 113-114.

[7] Romsos, E. L., and Vallone, P. M., 2015, Rapid PCR of STR markers: Applications to human Identification, Forensic Sci. Int. Genet. 18, 90-99.

[8] Hall, D. E. and Roy, R., 2014, An evaluation of direct PCR amplification, Croat Med J, 55(6): 655.

[9] Rudbeck, L. and Dissing, J., 1998, Rapid, simple alkaline extraction of human genomic DNA from whole blood, buccal epithelial cells, semen and forensic stains for PCR. Biotechniques, 25(4): 588-592.

[10] Faculty of Science and Technology Suan Dusit University, 2015, Chemical Safety Database, Retrieved April 20, 2020 from http://ohs.sci.dusit.ac.th/wp.