การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่เกิดจากการสัมผัสบนหลักฐานระเบิดแสวงเครื่อง ด้วยเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์

Amplification of Touch DNA on Improvised Explosive Device Using Direct PCR

สุนิษา แดงศรีวัลย์

Sunisa Dangsriwan

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Forensic Science Prince of Songkla University

2561

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่เกิดจากการสัมผัสบนหลักฐานระเบิดแสวงเครื่อง ด้วยเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์

Amplification of Touch DNA on Improvised Explosive Device Using Direct PCR

สุนิษา แดงศรีวัลย์

Sunisa Dangsriwan

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Forensic Science
Prince of Songkla University
2561

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่เกิดจากการสัมผัสบนหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องด้วยเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์

ผู้เขียน นางสาวสุนิษา แดงศรีวัลย์

สาขาวิชา นิติวิทยาศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐิติกา กิจพิพิธ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....

(ผู้ช่วยศาตราจารย์ ดร.ภูวดล ธนะเกียรติไกร)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.บุษบา ฤกษ์อำนวยโชค)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐิติกา กิจพิพิธ)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาตราจารย์ ดร.ภูวดล ธนะเกียรติไกร)

.....กรรมการ

(ดร.เครือวัลย์ ยุนรัมย์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

.....

(ศาสตราจารย์ ดร.ดำรงศักดิ์ ฟ้ารุ่งสาง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐิติกา กิจพิพิธ)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ ....
(ผู้ช่วยศาตราจารย์ ดร.ภูวดล ธนะเกียรติไกร)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลงชื่อ .....
(นางสาวสุนิษา แดงศรีวัลย์)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ .....
(นางสาวสุนิษา แดงศรีวัลย์)
นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่เกิดจากการสัมผัสบนหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องด้วยเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์
ผู้เขียน นางสาวสุนิษา แดงศรีวัลย์
สาขาวิชา นิติวิทยาศาสตร์
ปีการศึกษา 2561

บทคัดย่อ

การตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลจากหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องมีอัตราความสำเร็จต่ำ เนื่องจากตัวอย่างดังกล่าวมีดีเอ็นเอปริมาณน้อยเหลืออยู่และเสื่อมสภาพจากความร้อนภายหลังการระเบิด รวมถึงขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอทำให้สูญเสียดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นกว่าร้อยละ 30-70 ปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้เทคนิคไดเร็คพีซีอาร์ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างโดยตรง โดยไม่ผ่านการสกัดดีเอ็นเอ ซึ่งทำให้เกิดความสำเร็จในการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอจากวัตถุพยานชีวภาพหลายประเภท พบว่าช่วยเพิ่มประสิทธิภาพและได้รับผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ งานวิจัยนี้จึงต้องการเพิ่มอัตราความสำเร็จในการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีจากหลักฐานระเบิดแสวงเครื่อง โดยศึกษาวิธีการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระที่มีประสิทธิภาพสำหรับวัสดุดังกล่าว ร่วมกับการพัฒนากระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์ ผลการศึกษาพบว่าสามารถพัฒนากระบวนการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์จากหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องได้สำเร็จ โดยใช้โพรโทคอลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากวัสดุโดยตรง อีกทั้งพบว่าวิธีการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระที่มีประสิทธิภาพที่สุดนั้นขึ้นกับประเภทของวัสดุหลักฐาน โดยวัสดุหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องที่ไม่ดูดซับและเทปกาวพันสายไฟนั้นควรเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระด้วยไม้พันสำลีชนิดคอตตอนร่วมกับสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) ในขณะที่การเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุดูดซับควรใช้วิธีเทปยึด รวมทั้งพบว่าชุดน้ำยา Identifiler® Plus มีประสิทธิภาพสูงสุดในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเซลล์และดีเอ็นเออิสระด้วยเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้น นอกจากนี้กระบวนการตรวจพิสูจน์ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้มีความสำเร็จในการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องจำลองสูงกว่าวิธีมาตรฐานของศูนย์พิสูจน์หลักฐานตำรวจอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยจำนวนอัลลีลของอาสาสมัครมากกว่าถึง 1.6 เท่า ผลการศึกษาครั้งนี้เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อหน่วยงานนิติพันธุศาสตร์ทั้งสถาบันนิติวิทยาศาสตร์ กระทรวงยุติธรรมและศูนย์พิสูจน์หลักฐานทั่วประเทศ

Thesis Title	Amplification of Touch DNA on Improvised Explosive Device Using Direct PCR
Author	Miss Sunisa Dangsriwan
Major Program	Forensic Science
Academic Year	2018

Abstract

STR profiling from improvised explosive device (IED) evidence results in low success rates due to trace amount of DNA available and DNA degradation. Moreover, 30-70 percent of DNA is lost during extraction process. To overcome these problems, direct PCR, which omits the DNA extraction process, can be used to increase the efficiency and success rates of STR typing from trace biological evidences. In this study, we developed a direct PCR protocol combined with optimal collection methods for touch DNA analysis from IED evidence. The result showed that direct amplification protocol successfully amplified touch DNA on all IED substrates. However, the optimal touch DNA collection method depended on substrate types. Cotton swab with phosphate buffer saline (PBS) was most suitable for non-absorbent substrates and electrical tape (3M tape), while tapelifting was most suitable for absorbent substrates. Identifiler® Plus kit had higher efficiency compared to IDplex® Plus kit in amplifying touch DNA by direct protocol. Furthermore, the developed process provided higher STR profiling success rates, which was 1.6 times higher for donor alleles compared to the conventional process. The developed method could be beneficial for the Central Institute of Forensic Science, Police Forensic Science Centers, and forensic-related institutes worldwide.

กิตติกรรมประกาศ

ดิฉันขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ฐิติกา กิจพิพิธ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่คอยเป็นกำลังใจตลอดการศึกษาและคอยให้คำแนะนำแนวทางในการศึกษาหาความรู้และช่วยปรับปรุงแก้ไขเล่มวิทยานิพนธ์เพื่อให้ออกมาสมบูรณ์

ดิฉันขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภูวดล ธนะเกียรติไกร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่คอยให้คำแนะนำเรื่องการวิเคราะห์ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ การวิเคราะห์ทางสถิติที่เกี่ยวข้อง ตลอดจนแนะนำแนวทางการเขียนเพื่อให้วิทยานิพนธ์มีความสมบูรณ์

ดิฉันขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร. บุษบา ฤกษ์อำนวยโชค และ ดร. เครือวัลย์ ยุนรัมย์ ที่เสียสละเวลามาเป็นประธานและกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ รวมทั้งแนะนำ ชี้แนะเนื้อหาเพิ่มเติมเพื่อให้วิทยานิพนธ์มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ดิฉันขอขอบคุณชุดโครงการอุตสาหกรรมความมั่นคงและเทคโนโลยีอวกาศ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สัญญาเลขที่ RDG6050130) ที่สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย

ดิฉันขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ ขอขอบคุณภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์และสถานวิจัยจีโนมและชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาวิจัย รวมถึงสนับสนุนทุนการศึกษาเป็นผู้ช่วยสอน (Teaching Assistantship) เพื่อให้ผู้วิจัยได้ใช้ความรู้ความสามารถที่เป็นประโยชน์ต่อการเรียนการสอน

ดิฉันขอขอบพันตำรวจตรีหญิงสุกัญญา เพชรเพ็ง นักวิทยาศาสตร์ สบ. 2 กลุ่มงานตรวจชีววิทยาและดีเอ็นเอ ศูนย์พิสูจน์หลักฐาน 10 สำนักงานตำรวจแห่งชาติ ที่คอยให้คำแนะนำและเสียสละเวลาร่วมตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอในการทดลองด้วยวิธีมาตรฐานของศูนย์พิสูจน์หลักฐานตำรวจ รวมถึงให้คำแนะนำและแนวทางการปฏิบัติการทดลอง

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณครอบครัว ญาติ ที่คอยเป็นกำลังใจและสนับสนุนการศึกษาตลอดมา ขอบคุณคณะจารย์ เพื่อนๆ นักศึกษาปริญญาโท สาขานิติวิทยาศาสตร์ และสมาชิกกลุ่มวิจัยนิติพันธุศาสตร์ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ แนะนำ ชี้แนะ และเป็นกำลังใจตลอดระยะเวลาในการวิจัยในครั้งนี้

สุนิษา แดงศรีวัลย์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย) (5)

บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ) (6)

กิตติกรรมประกาศ (7)

สารบัญ (8)

รายการภาพประกอบ (10)

รายการผลการตีพิมพ์ (14)

List of permissions (15)

บทที่ 1 บทนำ

1. บทนำต้นเรื่อง 1
2. การตรวจเอกสาร 4
3. วัตถุประสงค์ 18

บทที่ 2 วิธีการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างดีเอ็นเออาสาสมัคร 19
2. ชนิดและวิธีการเตรียมวัสดุหลักฐานในการทดลอง 19
3. การเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระ 22
4. การสกัดดีเอ็นเอ 25
5. การวัดปริมาณดีเอ็นเอ 25
6. การเตรียมตัวอย่างก่อนเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์ 26
7. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยาทางการค้า 27

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

8. การแยกและการตรวจสอบดีเอ็นเอ 29

9. การวิเคราะห์ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 30

10. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ 30

บทที่ 3 ผลและวิเคราะห์ผล

1. การศึกษาโปรโตคอลที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบไดเร็คพีซีอาร์จากหลักฐานระเบิดแสวงเครื่อง 31
2. การศึกษาวิธีการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระที่เหมาะสมบนหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องสำหรับการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์ 36
3. การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดน้ำยาทางการค้าสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องด้วยเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์ 45
4. การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระและกระบวนการที่พัฒนาขึ้นกับวิธีมาตรฐานในการตรวจพิสูจน์เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนระเบิดแสวงเครื่องจำลอง (Mock casework) 53

บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง 58

บรรณานุกรม 59

ภาคผนวก

ต้นฉบับสำหรับตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ 67

ประวัติผู้เขียน 71

รายการรูปประกอบ

หน้า

รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างของดีเอ็นเอ 6

รูปที่ 2 แสดงขั้นตอนของปฏิกิริยาพีซีอาร์ 9

รูปที่ 3 แสดงถึงหลักการของวิธีแคปปิลลารีอิเลคโทรโฟรีสิส (capillary electrophoresis, CE) 11

รูปที่ 4 แสดงถึงลักษณะของอิเลคโทรฟิโรแกรมของตำแหน่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 12

รูปที่ 5 แสดงภาพวัสดุเสื้อผ้า (ก) ปลอกหุ้มแฮนด์รถมอเตอร์ไซค์ (ข) และเทปกาวพันสายไฟยี่ห้อ 3M (ค) ที่ใช้ในการทดลอง 20

รูปที่ 6 แสดงภาพวัสดุท่อพีวีซี (ก) แผงวงจรไฟฟ้า (ข) สายไฟ (ค) สวิซไฟ (ง) และแบตเตอรี่ (จ) ที่ใช้ในการทดลอง 21

รูปที่ 7 แสดงตัวอย่างระเบิดแสวงเครื่องจำลองประกอบด้วยวัสดุท่อพีวีซี แผงวงจรไฟฟ้า แบตเตอรี่ สายไฟ เทปกาวพันสายไฟและสวิทซ์ไฟ 22

รูปที่ 8 แสดงภาพการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องที่ไม่ดูดซับด้วยวิธีเทปยึด (Tapelifting) ตามวิธีการของ Verheij และคณะ 23

รูปที่ 9 แสดงภาพการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องที่ไม่ดูดซับด้วยวิธีไม้พันสำลีร่วมกับสารละลายให้ความชุ่มชื้น (Swabbing) 24

รูปที่ 10 แสดงภาพการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องที่ดูดซับด้วยวิธีการตัดวัสดุขนาดเล็ก (Cutting method) 24

รูปที่ 11 แผนการศึกษาโพรโทคอลที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเซลล์และดีเอ็นเออิสระบนหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องด้วยเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์ 32

รายการรูปประกอบ (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 12 จำนวนอัลลีลและความสูงของพีคบนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับจากโปรโตคอลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากวัสดุโดยตรง (Direct amplification protocol) และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากสารละลายตัวอย่าง (Pre-PCR solution amplification protocol) โดยจุดที่ปรากฏจะแสดงถึงจำนวนอัลลีลทั้งหมดและความสูงของแต่ละพีคที่ได้รับในหนึ่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และแถบเส้นตรงแสดงถึงค่าเฉลี่ยและกล่องสี่เหลี่ยมจะแสดงค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ของ Bayesian credible intervals 33

รูปที่ 13 แผนภาพฮีทแมพแสดงอัตราความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและลักษณะรูปแบบการเสื่อมสภาพของดีเอ็นเอ (Degradation and inhibition pattern) ที่ได้รับจากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์สองโปรโตคอลคือการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากวัสดุโดยตรง (Direct protocol) และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากสารละลายตัวอย่าง (Pre-PCR solution protocol) แกน x แสดงตำแหน่ง STR โดยเรียงลำดับจากSTR ที่มีขนาดเล็กไปจนถึงขนาดใหญ่จากด้านซ้ายไปขวา ตามลำดับ แกน y แสดงจำนวนอัลลีลที่ได้รับในแต่ละตัวอย่าง โดยเรียงจากความสมบูรณ์ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอมากไปหาน้อยจากบนลงล่าง 35

รูปที่ 14 แผนการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระที่เหมาะสมบนหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องสำหรับการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์ 37

รูปที่ 15 จำนวนอัลลีล (ก) และความสูงของพีคเฉลี่ย (ข) ที่ได้รับจากการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพวิธีการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุที่ดูดซับ (เสื้อผ้าและปลอกหุ้มแฮนด์รถมอเตอร์ไซค์) ร่วมกับการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์ โดยจุดที่ปรากฏจะแสดงถึงจำนวนอัลลีลทั้งหมดและความสูงของแต่ละพีคที่ได้รับในหนึ่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และแถบเส้นตรงแสดงถึงค่าเฉลี่ยข้อมูล (Solid color lines) และกล่องสี่เหลี่ยม (Solid color blocks) แสดงค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ของ Bayesian credible intervals 39

รายการรูปประกอบ (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 16 จำนวนอัลลีล (ก) และความสูงของพีคเฉลี่ย (ข) เฉลี่ยที่ได้รับจากการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพวิธีการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุไม่ดูดซับร่วมกับการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์ โดยจุดที่ปรากฏจะแสดงถึงจำนวนอัลลีลทั้งหมดและความสูงของแต่ละพีคที่ได้รับในหนึ่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และแถบเส้นตรงแสดงถึงค่าเฉลี่ยข้อมูล (Solid color lines) และกล่องสี่เหลี่ยม (Solid color blocks) แสดงค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ของ Bayesian credible intervals 42

รูปที่ 17 จำนวนอัลลีล (ก) และความสูงของพีคเฉลี่ย (ข) ที่ได้รับจากการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพวิธีการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุอื่นๆ (เทปกาวพันสายไฟ) ร่วมกับการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์ โดยจุดที่ปรากฏจะแสดงถึงจำนวนอัลลีลทั้งหมดและความสูงของแต่ละพีคที่ได้รับในหนึ่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และแถบเส้นตรงแสดงถึงค่าเฉลี่ยข้อมูล (Solid color lines) และกล่องสี่เหลี่ยม (Solid color blocks) แสดงค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ของ Bayesian credible intervals 44

รูปที่ 18 แผนการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 4 ชุด ได้แก่ ชุดน้ำยา Identifiler® Plus, ชุดน้ำยา Identifiler® Direct, ชุดน้ำยา IDplex® Plus และ ชุดน้ำยา IDplex® GO! สำหรับการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุหลักฐานระเบิดแสวงเครื่อง (ปลอกหุ้มแฮนด์รถมอเตอร์ไซค์และท่อพีวีซี) ด้วยเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์ 46

รายการรูปประกอบ (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 19 จำนวนอัลลีล (ก) และความสูงของพีคเฉลี่ย (ข) จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับจากโพรโทคอลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์ด้วยชุดน้ำยาต่าง ๆ จากการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุหลักฐานระเบิดแสวงเครื่อง โดยจุดที่ปรากฏจะแสดงถึงจำนวนอัลลีลทั้งหมดและความสูงของแต่ละพีคที่ได้รับในหนึ่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และแถบเส้นตรงแสดงถึงค่าเฉลี่ยข้อมูล (Solid color lines) และกล่องสี่เหลี่ยม (Solid color blocks) แสดงค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ของ Bayesian credible intervals 48

รูปที่ 20 แสดงตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ปรากฏผลพีคปลอมดรอปอินส์ (Drop-ins) 49

รูปที่ 21 แสดงตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ปรากฏผลพีคปลอมสตัตเตอร์ (Stutter) 50

รูปที่ 22 แสดงตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ปรากฏผลพีคปลอมดายบล็อบ (Dye blobs) 51

รูปที่ 23 แสดงตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ปรากฏผลพีคปลอมสปลิตพีค (Split peak) 52

รูปที่ 24 แสดงตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ปรากฏผลผลพีคปลอมพูลอัพ (Pull up) 52

รูปที่ 25 ตัวอย่างระเบิดแสวงเครื่องจำลองประกอบด้วยวัสดุท่อพีวีซี แผงวงจรไฟฟ้า, แบตเตอรี่ สายไฟ เทปกาวพันสายไฟและสวิทซ์ไฟ 53

รูปที่ 26 แผนการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระและกระบวนการที่พัฒนาขึ้นกับวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอบนระเบิดแสวงเครื่องจำลอง 54

รายการรูปประกอบ (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 27 จำนวนอัลลีล (ก) และความสูงของพีคเฉลี่ย (ข) จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับจากการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระและกระบวนการที่พัฒนาขึ้นกับวิธีมาตรฐานในการตรวจพิสูจน์เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนระเบิดแสวงเครื่องจำลอง (Mock casework) โดยจุดที่ปรากฏจะแสดงถึงจำนวนอัลลีลทั้งหมดและความสูงของแต่ละพีคที่ได้รับในหนึ่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และแถบเส้นตรงแสดงถึงค่าเฉลี่ยข้อมูล (Solid color lines) และกล่องสี่เหลี่ยม (Solid color blocks) แสดงค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ของ Bayesian credible intervals 56

รูปที่ 28 จำนวนอัลลีลที่ไม่ใช่ของอาสาสมัครเฉลี่ย (Non-donor allele) จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับจากการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระและกระบวนการที่พัฒนาขึ้นกับวิธีมาตรฐานในการตรวจพิสูจน์เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนระเบิดแสวงเครื่องจำลอง (Mock casework) 57

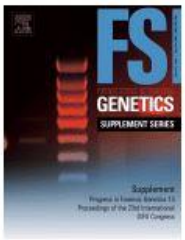
รายงานผลการตีพิมพ์

Dangsriwan, S., Thanakiatkrai, P., Asawutmangkul, W., Phetpeng, S. and Kitpipit, T. Direct PCR improves STR profiles from substrate of improvised explosive device. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser*. 2017. 6: p. 507-509. doi:https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2017.09.180

List of permissions

Copyright Clearance Center RightsLink®

Home | Account Info | Help



Title: Direct PCR improves STR profiles from substrate of improvised explosive device

Author: S. Dangsriwan,P. Thanakiatkrai,W. Asawutmangkul,S. Phetpeng,T. Kitpipit

Publication: Forensic Science International: Genetics Supplement Series

Publisher: Elsevier

Date: December 2017

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

Logged in as:
Sunisa Dangsriwan
Account #:
3001361720
LOGOUT

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights

BACK | CLOSE WINDOW

Copyright © 2018 Copyright Clearance Center, Inc. All Rights Reserved. Privacy statement. Terms and Conditions.
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

Copyright

Describes the rights related to the publication and distribution of research. It governs how authors (as well as their employers or funders), publishers and the wider general public can use, publish and distribute articles or books.

Journal author rights | Government employees | Elsevier's rights | Protecting author rights | Open access

Journal author rights

In order for Elsevier to publish and disseminate research articles, we need publishing rights. This is determined by a publishing agreement between the author and Elsevier. This agreement deals with the transfer or license of the copyright to Elsevier and authors retain significant rights to use and share their own published articles. Elsevier supports the need for authors to share, disseminate and maximize the impact of their research and these rights, in Elsevier proprietary journals* are defined below:

For subscription articles	For open access articles
Authors transfer copyright to the publisher as part of a journal publishing agreement, but have the right to: • Share their article for Personal Use, Internal Institutional Use and Scholarly Sharing purposes, with a DOI link to the version of record on ScienceDirect (and with the Creative Commons CC-BY-NC- ND license for author manuscript versions) • Retain patent, trademark and other intellectual property rights (including research data). • Proper attribution and credit for the published work.	Authors sign an exclusive license agreement, where authors have copyright but license exclusive rights in their article to the publisher**. In this case authors have the right to: • Share their article in the same ways permitted to third parties under the relevant user license (together with Personal Use rights) so long as it contains a CrossMark logo, the end user license, and a DOI link to the version of record on ScienceDirect. • Retain patent, trademark and other intellectual property rights (including research data). • Proper attribution and credit for the published work.

***Please note that society or third party owned journals may have different publishing agreements. Please see the journal's guide for authors for journal specific copyright information.**

****This includes the right for the publisher to make and authorize commercial use, please see "Rights granted to Elsevier" for more details.**

Help and Support

- Download a sample publishing agreement for subscription articles in ↓ English and ↓ French.
- Download a sample publishing agreement for open access articles for authors choosing a ↓ commercial user license and ↓ non-commercial user license.
- For authors who wish to self-archive see our sharing guidelines
- See our author pages for further details about how to promote your article.
- For use of Elsevier material not defined below please see our permissions page or FAQs ↗ or email us at the ✉ permissions help desk.

Government employees

Elsevier has specific publishing agreements with certain government and inter-governmental organizations for their employee authors. These agreements enable authors to retain substantially the same rights as detailed in the "Author Rights section" but are specifically tailored for employees from the relevant organizations, including:

- World Bank
- World Health Organization
- For US government employees, works created within the scope of their employment are considered to be public domain and Elsevier's publishing agreements do not require a transfer or license of rights for such works.
- In the UK and certain commonwealth countries, a work created by a government employee is copyrightable but the government may own the copyright (Crown copyright). Click here for information about UK government employees publishing open access

Rights granted to Elsevier

For both subscription and open access articles, published in proprietary titles, Elsevier is granted the following rights:

- The exclusive right to publish and distribute an article, and to grant rights to others, including for commercial purposes.
- For open access articles, Elsevier will apply the relevant third party user license where Elsevier publishes the article on its online platforms.
- The right to provide the article in all forms and media so the article can be used on the latest technology even after publication.
- The authority to enforce the rights in the article, on behalf of an author, against third parties, for example in the case of plagiarism or copyright infringement.

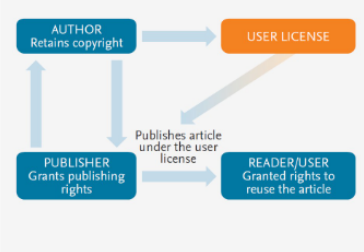
Protecting author rights

Copyright aims to protect the specific way the article has been written to describe an experiment and the results. Elsevier is committed to its authors to protect and defend their work and their reputation and takes allegations of infringement, plagiarism, ethic disputes and fraud very seriously.

If an author becomes aware of a possible plagiarism, fraud or infringement we recommend contacting their Elsevier publishing contact who can then liaise with our in-house legal department. Note that certain open access user licenses may permit quite broad re-use that might otherwise be counted as copyright infringement. For details about how to seek permission to use an article see our permission page.

Open access

How copyright works with open access licenses



For Elsevier proprietary journals the following steps apply:

1. Authors sign a publishing agreement where they will have copyright but grant broad publishing and distribution rights to the publisher, including the right to publish the article on Elsevier's online platforms.
2. The author chooses an end user license under which readers can use and share the article.
3. The publisher makes the article available online with the author's choice of end user license.

Solutions
Scopus
ScienceDirect
Mendeley
Evolve
Knovel
Reaxys
ClinicalKey

Researchers
Submit your paper
Find books & journals
Visit Author Hub
Visit Editor Hub
Visit Librarian Hub
Visit Reviewer Hub

About Elsevier
About
Careers
Newsroom
Events
Publisher relations
Advertising, reprints and supplements

How can we help?
Support and Contact

Follow Elsevier

Select location/language
Global - English

ELSEVIER

Copyright © 2018 Elsevier, except certain content provided by third parties
Cookies are used by this site. To decline or learn more, visit our Cookies page.
Terms and Conditions Privacy Policy Sitemap

RELX Group™

บทที่ 1

บทนำ

1.บทนำต้นเรื่อง

ประเทศไทยนับเป็นประเทศที่มีคดีก่อการร้ายติดอันดับหนึ่งในยี่สิบของโลก [1] โดยมักเกิดเหตุการณ์ความไม่สงบในพื้นที่จังหวัดชายแดนภาคใต้ ซึ่งเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลากว่า 14 ปี ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2547 [2] นับวันยิ่งเพิ่มความรุนแรงและขยายพื้นที่มากขึ้น ส่งผลให้เกิดความสูญเสียอย่างมากทั้งทางด้านเศรษฐกิจ ชีวิตและทรัพย์สินของประชาชน รวมถึงความมั่นคงของประเทศ จากเหตุการณ์ความไม่สงบที่เกิดขึ้นนั้นทำให้มีผู้เสียชีวิตมากถึง 7,666 ราย และมีผู้ที่ได้รับบาดเจ็บจำนวนมากถึง 13,115 ราย [2] โดยการก่อความไม่สงบในพื้นที่จังหวัดชายแดนภาคใต้กลุ่มของผู้ก่อการร้ายนิยมใช้ยุทธวิธีการก่อเหตุในหลายรูปแบบ เช่น การวางเพลิง การลอบสังหารบุคคลเป้าหมาย การเข้าโจมตีฐานที่ตั้งทหาร การซุ่มโจมตี รวมถึงการวางระเบิด ซึ่งระเบิดที่นิยมใช้ในการก่อการร้ายในพื้นที่จังหวัดชายแดนภาคใต้ คือ ระเบิดประกอบเฉพาะกิจหรือระเบิดแสวงเครื่อง (Improvised Explosive Devices, IEDs) เนื่องจากวัสดุที่นำมาประกอบระเบิดมีราคาถูก สามารถหาซื้อได้ง่ายในท้องถิ่น และจัดทำเองได้ง่าย อีกทั้งสามารถปรับรูปแบบและขนาดให้เหมาะสมต่อเป้าหมาย พกพาได้สะดวก และไม่เป็นที่สังเกตอีกด้วย [3] โดยวัสดุที่นิยมนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของระเบิดแสวงเครื่องและเป็นวัสดุหลักฐานที่สามารถตรวจพบได้บ่อยภายหลังการระเบิด ได้แก่ เทปกาวพันสายไฟ สายไฟฟ้า แบตเตอรี่ นาฬิกา และโทรศัพท์มือถือ รวมทั้งกระเป๋าและถังแก๊ส [4]

การตรวจดีเอ็นเอเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลจากวัสดุหลักฐานในคดีระเบิดส่วนมากมักตรวจวิเคราะห์เซลล์และดีเอ็นเออิสระของผู้ประกอบระเบิด เนื่องจากในขั้นตอนการประกอบนั้นผู้ประกอบมักใช้มือเปล่าในการหยิบจับชิ้นส่วนดังกล่าว ทำให้เซลล์เยื่อบุผิวหนังหรือ Cell-free DNA บริเวณมือและนิ้วมือของผู้สัมผัสหลุดลอกแล้วถ่ายโอนไปยังวัตถุที่ถูกสัมผัสได้ (Touch DNA) [5] ปัจจุบันจึงมีการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุหลักฐานหลายแบบซึ่งนิยมใช้วิธีเทปยึด (Tapelifting) และไม้พันสำลี (Swabbing) ชนิดต่างๆ งานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าวิธีการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระที่มีประสิทธิภาพขึ้นอยู่กับชนิดของวัสดุหลักฐาน [6, 7] โดย

การเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระด้วยวิธีเทปยึดเหมาะสำหรับวัสดุหลักฐานประเภทดูดซับ เช่น เสื้อผ้า กันบุหรี่ และพลาสเตอร์ปิดแผล เป็นต้น ซึ่งได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ (Full profile) มากถึงร้อยละ 46 [8] ในขณะที่มีการนำไม้พันสำลีมาใช้เก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุหลักฐานที่ไม่ดูดซับ เช่น แก้ว นาฬิกา [8] โทรศัพท์มือถือ [9] ถุงมือยาง [10] พวงมาลัยรถยนต์ [11] เป็นต้น อย่างไรก็ตามการศึกษาวิธีเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุหลักฐานในคดีระเบิดมีค่อนข้างน้อย ทำให้ความสำเร็จในการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากวัสดุหลักฐานดังกล่าวมีเพียงร้อยละ 12 [12] หรือได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอแค่บางส่วน (Partial profile) [13] ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเมื่อวัตถุระเบิดทำงานจะเกิดความร้อนขึ้นซึ่งเป็นสาเหตุที่ดีเอ็นเอนั้นเสียสภาพได้ จึงส่งผลให้ความสำเร็จในการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอลดลง [14, 15]

วิธีไดเร็คพีซีอาร์เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างโดยตรง โดยไม่ผ่านกระบวนการสกัดและวัดปริมาณดีเอ็นเอ ทั้งนี้การสกัดดีเอ็นเอทำให้มีโอกาสสูญเสียดีเอ็นเอมากถึงร้อยละ 76 ของดีเอ็นเอเริ่มต้นบนวัสดุหลักฐาน [16] อีกทั้งใช้เวลานานในการสกัดและชุดน้ำยาสกัดมีราคาค่อนข้างแพง วิธีไดเร็คพีซีอาร์จึงช่วยให้ได้รับปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นและได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอสมบูรณ์กว่าการสกัด แม้ว่าในตัวอย่างมีปริมาณดีเอ็นเอน้อย [17, 18] รวมทั้งช่วยลดระยะเวลาในการวิเคราะห์และประหยัดค่าใช้จ่าย ทั้งนี้วิธีดังกล่าวได้เริ่มนำมาใช้ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1989 ในงานทางจุลชีววิทยา [19] และปัจจุบันได้ประยุกต์ใช้ในงานนิติพันธุศาสตร์สำหรับการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอจากวัตถุพยานชีวภาพประเภทอสุจิ รากผม [17] น้ำลาย [20] เลือด [21] รวมถึงนำมาใช้ตรวจพิสูจน์เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุหลักฐานต่างๆ เช่น เสื้อผ้า เทปกาว [17] กระจกสไลด์ เซรามิก พลาสติก แสตนเลส [18] แผงวงจรไฟฟ้า ปลอกหุ้มกระสุนปืน [22] เป็นต้น ผลการวิจัยพบความสำเร็จในการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอประมาณร้อยละ 25 [8] อีกทั้งมีการพัฒนาวิธีไดเร็คพีซีอาร์โดยการเตรียมตัวอย่างร่วมกับสารละลายเพื่อเจือจางตัวรบกวนปฏิกิริยา เพิ่มความสำเร็จในการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอและเพิ่มคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ [23] ทั้งนี้เทคนิคดังกล่าวยังไม่มีการศึกษาในตัวอย่างเซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุหลักฐานระเบิดแสวงเครื่อง

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนากระบวนการตรวจพิสูจน์เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องด้วยเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์ รวมทั้งศึกษาวิธีการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระที่เหมาะสมสำหรับวัสดุหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องแต่ละประเภทและชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทางการค้าที่มีประสิทธิภาพสูงสุดเพื่อใช้ร่วมกับกระบวนการ

ไดเร็คพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้น นอกจากนี้ยังมุ่งหวังทวนสอบเปรียบเทียบกระบวนการที่พัฒนาขึ้นทั้งระบบกับวิธีตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอมาตรฐานของศูนย์พิสูจน์หลักฐาน สำนักงานตำรวจแห่งชาติ โดยใช้ระเบิดแสวงเครื่องจำลอง ผลงานวิจัยนี้เป็นประโยชน์ต่อหลายหน่วยงานนิติพันธุศาสตร์ทั้งสถาบันนิติวิทยาศาสตร์ กระทรวงยุติธรรมและศูนย์พิสูจน์หลักฐานทั่วประเทศ

2.การตรวจเอกสาร

2.1 วัตถุระเบิดแสวงเครื่อง

ระเบิดแสวงเครื่องหรือ Improvised Explosive Devices (IEDs) เป็นระเบิดรูปแบบหนึ่งที่มีการนำเอาวัสดุที่มีอยู่หรือวัสดุหาได้ง่ายในท้องถิ่นนำมาประดิษฐ์ขึ้น เพื่อต้องการสร้างสถานการณ์ ปัจจุบันเทคโนโลยีก้าวหน้าขึ้นก็ส่งผลให้ระเบิดแสวงเครื่องนั้นมีความซับซ้อนมากขึ้นเช่นกันและยังสามารถควบคุมการทำงานง่ายขึ้น โดยการควบคุมระยะไกลเรียกว่า Remote control คือใช้โทรศัพท์ในการจุดชนวน [3] เนื่องจากระเบิดแสวงเครื่องสามารถประดิษฐ์จากวัสดุที่มีอยู่โดยทั่วไปได้ ทำให้ระเบิดแสวงเครื่องมีหลายรูปแบบและมีลักษณะที่ไม่แน่นอน เช่น รูปแบบของกล่อง มือถือ ถังขยะ รถจักรยานยนต์ เป็นต้น ซึ่งง่ายต่อการซุกซ่อนพกพาและนำมาใช้ ทำให้เจ้าหน้าที่ยากต่อการตรวจค้นและเก็บกู้วัตถุระเบิด

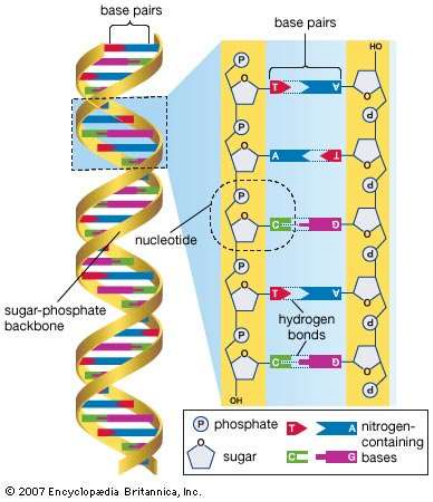
ระเบิดแสวงเครื่องสามารถแบ่งประเภทตามลักษณะของการทำงานได้ 3 ระบบ คือระบบสารเคมีเป็นการใช้สารเคมีทำให้เกิดปฏิกิริยาและระเบิด ระบบนี้ไม่เป็นที่นิยมมากนักเพราะขั้นตอนการประดิษฐ์ยุ่งยาก ไม่สามารถควบคุมเวลาที่จะทำให้เกิดการระเบิดได้แน่นอน และที่สำคัญคือเป็นอันตรายต่อผู้ประดิษฐ์ ระบบที่สองคือระบบกลไกเป็นการใช้อุปกรณ์ทางกลต่างๆ ทำให้เกิดการทำงานของระเบิดแสวงเครื่อง ระบบนี้ส่วนใหญ่จะต้องอาศัยสิ่งอื่นๆมากระทำต่ออุปกรณ์ระเบิด ระเบิดจึงจะเริ่มทำงาน เช่น การใช้ระบบนาฬิกาเป็นกลไก ระเบิดวิธีนี้นิยมใช้ข่มขู่หรือการประสงค์ให้ตายเฉพาะบุคคล และระบบสุดท้ายคือระบบไฟฟ้าเป็นการใช้อุปกรณ์ทางไฟฟ้า หรืออุปกรณ์ทางอิเล็คทรอนิกส์มาควบคุมการจุดระเบิด เช่น การใช้โทรศัพท์มือถือ เพจเจอร์ โทรศัพท์ไร้สาย รีโมทคอนโทรลรถยนต์ หรือเครื่องบินวิทยุบังคับจะนำมาประกอบเชื้อปะทุไฟฟ้าและวัตถุระเบิด ระเบิดแสวงเครื่องแบบนี้เป็นที่นิยมกันมากและมีการใช้ในสามจังหวัดชายแดนใต้ของประเทศไทย เนื่องจากสามารถประดิษฐ์ได้ง่าย สามารถกำหนดเวลาและควบคุมจังหวะการทำงานได้แน่นอน อีกทั้งสามารถควบคุมการทำงานได้ในระยะไกลได้ ทั้งนี้ความซับซ้อนของระเบิดแสวงเครื่องจะขึ้นอยู่กับความรู้ความสามารถของผู้ประดิษฐ์ด้วย [3, 24]

ระเบิดแสวงเครื่องมีระบบการทำงานหลายประเภท เช่น 1) ทำงานจากการกระทำของเหยื่อคือเป็นระเบิดแสวงเครื่องที่ต้องอาศัยบุคคลหรือสิ่งอื่นๆมากระทำเพื่อให้เกิดการระเบิด เช่น การยกระเบิด เปิดระเบิด เอียงระเบิด 2) การทำงานแบบบังคับซึ่งจะเป็นระเบิด

แสวงเครื่องที่สามารถควบคุมการทำงานได้จากระยะไกล (Remote control) เช่น วิทยุรับ-ส่ง โทรศัพท์มือถือ ซึ่งผู้ที่ประดิษฐ์ระเบิดแบบนี้จะต้องมีความรู้พื้นฐานทางด้านไฟฟ้าและอิเล็กทรอนิกส์เป็นอย่างดี ทั้งนี้โทรศัพท์ที่นิยมใช้ในการทำระเบิดคือมือถือยี่ห้อโนเกีย รุ่น 3310 เนื่องจากแผงวงจรสามารถทำระเบิดได้ง่ายไม่ต้องใช้อุปกรณ์อย่างอื่นมาพ่วง แต่มือถือรุ่นอื่นสามารถใช้ในการประกอบระเบิดได้เช่นกันแต่ต้องหาอุปกรณ์พ่วง 3) ทำงานแบบถ่วงเวลาซึ่งจะใช้อุปกรณ์ตั้งเวลา เช่น นาฬิกาหรือวงจรนับแบบอิเล็กทรอนิกส์ และ 4) การทำงานแบบอาศัยสภาพแวดล้อม เช่น เมื่อโดนแสงสว่างหรือมีเสียงดังระเบิดจะทำงาน [25]

2.2 ดีเอ็นเอ

สารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอ (DNA) หรือกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (Deoxyribonucleic Acid) คือสารจำพวกกรดนิวคลีอิก ส่วนใหญ่บรรจุอยู่ในนิวเคลียสของเซลล์ สามารถพบได้ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตเกือบทุกประเภท ยกเว้นเซลล์เม็ดเลือดแดงของมนุษย์ เนื่องจากไม่มีนิวเคลียส ดีเอ็นเอเป็นแหล่งเก็บข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่ง ๆมีลักษณะผสมผสานมาจากสิ่งมีชีวิตรุ่นก่อนและสามารถถ่ายทอดลักษณะไปยังสิ่งมีชีวิตรุ่นถัดไปได้ โครงสร้างของดีเอ็นเอมีลักษณะเป็นเกลียวคู่ (Double helix) โดยมีพอลินิวคลีโอไทด์ 2 สายเรียงตัวในทิศทางตรงกันข้ามกัน พอลินิวคลีโอไทด์สายหนึ่งเรียงตัวในทิศทางจาก 3’ ไป 5’ ส่วนพอลินิวคลีโอไทด์อีกสายหนึ่งเรียงตัวในทิศทาง 5’ ไป 3’ โดยสายพอลินิวคลีโอไทด์จะยื่นส่วนของน้ำตาลดีออกซีไรโบส (Deoxyribose sugar) ไว้ด้านนอกแล้วหันส่วนที่เป็นเบสเข้าหากันเพื่อเชื่อมต่อกัน โดยเบสที่อยู่ตรงข้ามกันต้องเป็นเบสที่เข้าคู่กันได้ (Complementary) ทำให้ดีเอ็นเอมีลักษณะคล้ายบันไดเวียนขวา นิวคลีโอไทด์เป็นโมเลกุลที่ประกอบด้วยน้ำตาลดีออกซีไรโบส หมู่ฟอสเฟตและไนโตรจีนัสเบส มีอยู่ 4 ชนิด ได้แก่ อะดีนีน (Adenine, A) ไทมีน (Thymine, T) ไซโทซีน (Cytosine, C) และกัวนีน (Guanine, G) สำหรับโครงสร้างทางเคมีของอะดินีนและกัวนีนนั้นประกอบด้วยวงคาร์บอนสองวงที่มีชื่อเรียกว่า พิวรีน (Purine) ในขณะที่โครงสร้างทางเคมีของไซโทซีนและไทมีนประกอบด้วยวงคาร์บอนเดี่ยวที่มีชื่อเรียกว่า ไพริมิดีน (Pyrimidine) โดยที่เบสอะดีนีนจะเชื่อมกับเบสไทมีนด้วยพันธะไฮโดรเจนแบบพันธะคู่ หรือ Double bonds และเบสไซโทซีนจะเชื่อมกับเบสกัวนีนด้วยพันธะไฮโดรเจนแบบพันธะสาม หรือ Triple bonds ทำให้ปรากฏร่อง 2 ลักษณะ คือร่องขนาดใหญ่ (Major groove) และร่องขนาดเล็ก (Minor groove) ระหว่างเกลียวคู่ (ดังแสดงในรูปที่ 1)



รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างของดีเอ็นเอ [26]

2.3 เซลล์และดีเอ็นเออิสระจากการสัมผัส (Touch DNA)

เซลล์และดีเอ็นเออิสระจากการสัมผัสเป็นหลักฐานชิ้นหนึ่งในงานนิติวิทยาศาสตร์ที่สามารถใช้ในการระบุบุคคลได้ [9] เนื่องจากเซลล์และดีเอ็นเออิสระจากการสัมผัสนั้นมาจากการถ่ายโอน cell-free DNA หรือดีเอ็นเอภายในเซลล์ผ่านการสัมผัส โดยการหลุดลอกออกของเซลล์ผิวหนัง (Epithelial cell) ของผู้ที่สัมผัสถ่ายโอนไปให้กับวัตถุที่ถูกสัมผัส [27] ซึ่งเป็นไปตาม Locard's exchange principle หรือ Locard's theory จึงมีการนำหลักการดังกล่าวมาใช้ในกระบวนการทางนิติวิทยาศาสตร์ ตัวอย่างของหลักฐานที่สามารถนำมาตรวจสอบเซลล์และดีเอ็นเออิสระจากการสัมผัสได้ เช่น เสื้อผ้าที่สวมใส่ อาวุธ หรือวัตถุอื่นๆ ที่คาดว่าผ่านการสัมผัส โดยปกติในแต่ละวันเซลล์ผิวหนังจะหลุดประมาณ 400,000 เซลล์ต่อวัน ทั้งนี้จำนวนของเซลล์ผิวหนังที่หลุดออกมานั้นในแต่ละบุคคลต่างกันขึ้นอยู่กับความสามารถในการปลดปล่อยเซลล์ผิวหนัง [28] แรงที่สัมผัสหรือชนิดของวัตถุที่สัมผัสด้วย จากงานวิจัยของ Cristina และคณะ [29] ศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของการปลดปล่อยเซลล์ผิวหนังของอาสาสมัครระหว่างอาสาสมัครมีการล้างมือและไม่ล้างมือก่อนการสัมผัส พบว่าอาสาสมัครที่มีการมือล้างมือ 20 วินาที ด้วยสบู่และไม่ล้างมือก่อนสัมผัสสามารถปลดปล่อยเซลล์ประมาณ $5x10^3$ ถึง $1x10^5$ และ $1x10^3$ ถึง $8x10^4$ เซลล์ ตามลำดับ หรือมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $2.5x10^4$ และ $8.6x10^3$ ตามลำดับ และเมื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอพบว่าปริมาณดีเอ็นเอจากอาสาสมัครที่ล้างมือและไม่ล้างมือก่อนสัมผัสเท่ากับ 0.242 และ 4.646 นาโนกรัม ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากการล้างมือเป็นการชะล้างเซลล์ผิวหนังให้

หลุดลอกออกบางส่วน เป็นผลให้ปริมาณ cell-free DNA หรือเซลล์ผิวหนังที่สัมผัสกับวัตถุลดลงเช่นเดียวกัน และจากการศึกษาของ Phipps และ Petricevic [30] พบว่าแต่ละบุคคลมีการปลดปล่อยเซลล์ผิวหนังไม่เท่ากันและการปลดปล่อยเซลล์ผิวหนังนั้นไม่ขึ้นกับเวลาในการสัมผัสด้วยเช่นกัน [9] นอกจากนี้ปริมาณเซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุต่างๆมีความแตกต่างกัน โดยพบว่าวัสดุที่มีผิวขรุขระจะพบดีเอ็นเอปริมาณมากกว่า [31]

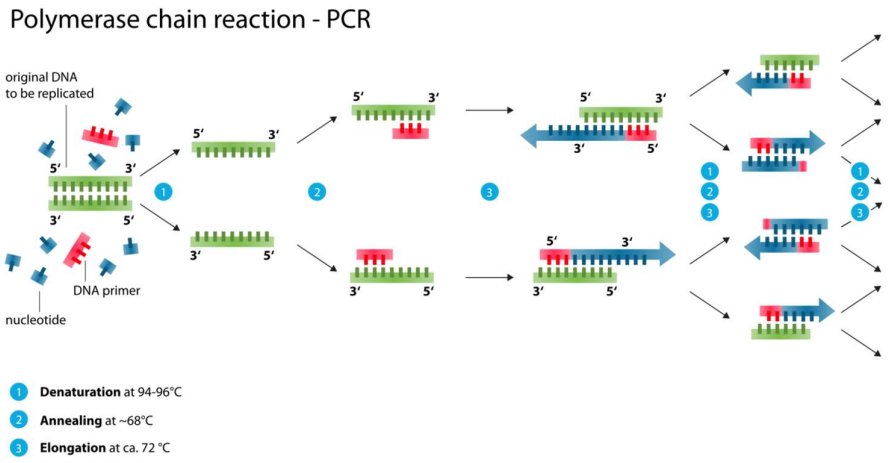
2.4 ปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction)

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction, PCR) เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในหลอดทดลอง จึงมีการนำมาใช้ในงานด้านนิติพันธุศาสตร์เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่เก็บได้จากสถานที่เกิดเหตุ โดยในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำเป็นต้องอาศัยองค์ประกอบต่างๆ ได้แก่ ดีเอ็นเอต้นแบบ (Template DNA) ดีเอ็นเอพอลีเมอร์เรส (DNA polymerase) ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอตเฟท (Deoxyribonucleotide triphosphates, dNTPs) ทั้งสี่ชนิด ไพรเมอร์ และบัฟเฟอร์ ปฏิกิริยาการสังเคราะห์จะเกิดขึ้นต่อเนื่องซ้ำกันเป็นลูกโซ่ในแต่ละรอบ ปฏิกิริยาพีซีอาร์จะประกอบด้วย 3 ขั้นตอน (ดังแสดงในรูปที่ 2) คือ

1) ขั้นตอน Denaturation เป็นขั้นตอนการแยกสายพอลีนิวคลีโอไทด์จากสายคู่เป็นสายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 90-95 °C

2) ขั้นตอน Annealing เป็นขั้นตอนลดอุณหภูมิลงมาที่ 50-55 °C เพื่อให้ไพรเมอร์ สามารถเกาะติดกับดีเอ็นเอต้นแบบที่เป็นสายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สม

3) ขั้นตอน Extension เป็นขั้นตอนการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ต่อออกจากไพรเมอร์ในทิศทางจาก 5′ ไป 3′ อุณหภูมิในขั้นนี้จะอยู่ในช่วง 70-75 °C การสังเคราะห์จะดำเนินตามลำดับ 3 ขั้นตอน ซ้ำกันเป็นจำนวน 25-32 รอบ ทำให้ได้ผลผลิตดีเอ็นเอ (PCR product) เป็นดีเอ็นเอสายใหม่เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก



รูปที่ 2 แสดงขั้นตอนของปฏิกิริยาพีซีอาร์ [32]

โดยในงานนิติวิทยาศาสตร์จะทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณตำแหน่ง Short tandem repeat (STR) หรือ Simple sequence repeat (SSR) ซึ่งคือส่วนหนึ่งของสารพันธุกรรมที่ประกอบด้วยลำดับเบสซ้ำแบบต่อเนื่อง โดยมีลำดับเบสแกนกลางจำนวน 1-6 คู่เบส โดย STR สามารถบอกความแตกต่างระหว่างบุคคลได้โดยใช้ข้อมูลจำนวนซ้ำของหน่วยซ้ำ จึงนำมาใช้ในงานนิติพันธุศาสตร์กันอย่างแพร่หลาย โดยตำแหน่งของ STR ที่นำมาใช้ในการจำแนกบุคคลจำเป็นต้องมีลักษณะและคุณสมบัติ ดังนี้ 1) ขนาดของ STR ควรมีขนาดประมาณ 100-500 คู่เบส เนื่องจากวัตถุพยานชีวภาพที่รวบรวมได้ในสถานที่เกิดเหตุนั้นมักมีปริมาณน้อยหรือเสื่อมสภาพ 2) อัลลีลที่ปรากฏในแต่ละตำแหน่งจะต้องมีความแตกต่างกันและสามารถแยกออกจากกันได้อย่างชัดเจน เพื่อให้สามารถแปลผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอในตำแหน่งต่างๆได้ 3) ตำแหน่ง STR ดังกล่าวต้องสามารถใช้ในการจำแนกระหว่างบุคคลสูงและร้อยละของประชากรที่มีอัลลีลในคู่โครโมโซมที่แตกต่างกันมากกว่าร้อยละ 70 ในประชากร 4) ต้องเป็นดีเอ็นเอที่ไม่มีความเชื่อมโยงกับตำแหน่ง STR อื่นๆในการถ่ายทอดลักษณะ และ 5) ต้องมีอัตราการกลายพันธุ์ต่ำ เป็นต้น [33]

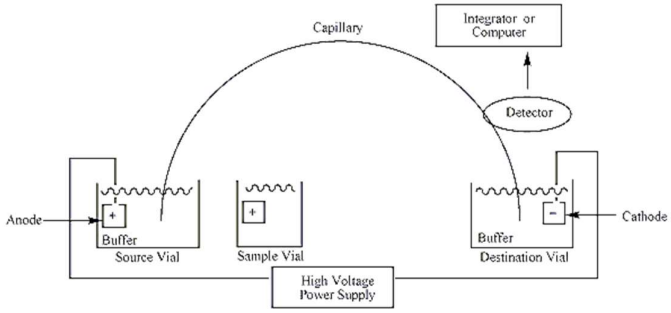
ตำแหน่ง STR มาตรฐานที่ใช้ในการระบุเอกลักษณ์บุคคลของระบบ Combined DNA Index System (CODIS) ของหน่วยสืบสวนสหรัฐอเมริกามีทั้งหมด 20 ตำแหน่ง ได้แก่ CSF1PO, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, FGA, TH01, TPOX, vWA, D1S1656, D2S441, D2S1338, D10S1248, D12S391, D19S433 และ D22S1045 [34]

2.5 ไดเร็คพีซีอาร์ (Direct PCR)

วิธีไดเร็คพีซีอาร์เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากวัตถุพยานโดยตรง ซึ่งไม่ผ่านขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ เนื่องจากการสกัดดีเอ็นเอทำให้มีการสูญเสียดีเอ็นเอระหว่างการสกัดถึงร้อยละ 30-70 [35, 36] จึงต้องมีการปรับปรุงเอ็นไซม์ดีเอ็นเอพอลีเมอร์เรสให้มีความทนทานตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่อาจปนเปื้อนมาพร้อมกับวัตถุพยานที่ตรวจสอบ [37] เพื่อเพิ่มโอกาสของการตรวจพบลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น วิธีไดเร็คพีซีอาร์ได้เริ่มนำมาใช้ในงานจุลชีววิทยา [19] และปัจจุบันได้ประยุกต์ใช้ในงานนิติพันธุศาสตร์สำหรับการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอจากวัตถุพยานชีวภาพประเภทอสุจิ รากผม [17] น้ำลาย [20] เลือด [21] รวมถึงเซลล์และดีเอ็นเออิสระจากการสัมผัสบนวัสดุหลักฐานต่างๆ เช่น เสื้อผ้า เทปกาว [17] กระจกสไลด์ เซรามิก พลาสติก แสตนเลส [18] แผงวงจรไฟฟ้า ปลอกหุ้มกระสุนปืน [22] ลูกบิดประตู อุปกรณ์ต่างๆในรถยนต์ แก้วน้ำ กระป๋อง นาฬิกา และรองเท้า [8] เป็นต้น

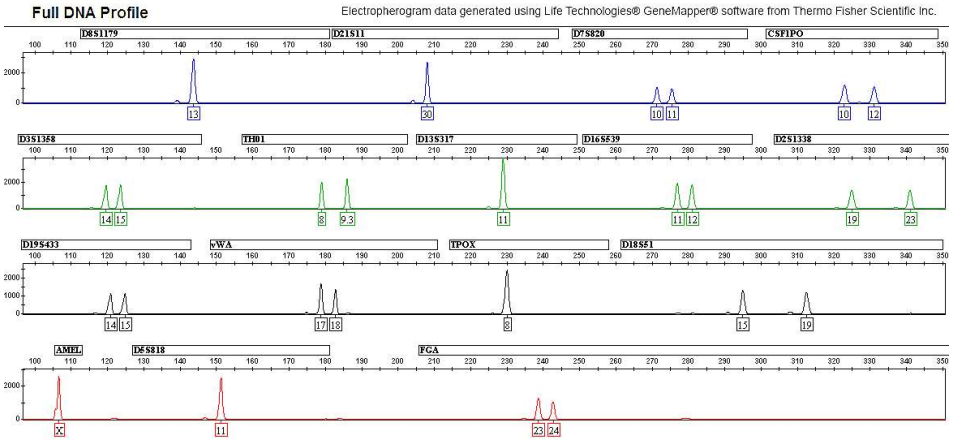
2.6 การแยกและตรวจสอบดีเอ็นเอ

การแยกแถบดีเอ็นเอหรือผลิตภัณฑ์พีซีอาร์สำหรับตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอดีเอ็นเอใช้เทคนิคแคปิลลารีอิเลคโทรโฟรีสิส (Capillary electrophoresis, CE) ซึ่งข้อดีของวิธีนี้คือสามารถแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกันเพียงหนึ่งเบสได้ โดยหลักการของวิธีแคปิลลารีอิเลคโทรโฟรีสิสเกี่ยวข้องกับการให้ศักย์ไฟฟ้าสูงตั้งแต่ 10-30 กิโลโวลต์ แก่แคปิลลารี (Capillary tube) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 25-100 ไมโครเมตร ซึ่งภายในหลอดมีการบรรจุสารพอลิเมอร์ โดยที่ปลายทั้ง 2 ข้าง ของแคปิลลารีจะจุ่มอยู่ในภาชนะบรรจุสารละลายอิเล็กโทรไลต์ เมื่อมีการให้ศักย์ไฟฟ้าจะทำให้ไอออนในตัวอย่างวิ่งไปที่ขั้วไฟฟ้าแต่ละขั้ว และใช้ตัววัดสัญญาณซึ่งส่วนใหญ่เป็นแบบยูวี จะให้รูปแบบการตอบสนองเป็นสัญญาณต่อเวลาเรียกว่า Electropherogram ส่วนการไหลของอิเล็กโทรไลต์ไปตามแคปิลลารีนี้เป็นไป ตามรูปแบบ Electroendosmotic flow หรือ EOF [38] (ดังแสดงในรูปที่ 3)



รูปที่ 3 แสดงถึงหลักการของวิธีแคปปิลลารีอิเลคโทรโฟรีสิส (capillary electrophoresis, CE) [39]

Electroendosmotic flow (EOF) คือ การที่ผนังภายในของแคปิลลารีซึ่งเคลือบด้วยซิลิกา ประกอบด้วยซิลานอลซึ่งจะแตกตัวเป็นไอออน เมื่อมี pH มากกว่า 2.0 โดยทำให้ผนังของแคปิลลารีมีประจุลบ ไอออนของโลหะซึ่งมีประจุเป็นบวกจึงเข้าไปเกาะติด เมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าเข้าสู่แคปิลลารีแคตไอออน (ประจุบวก) และโมเลกุลของน้ำที่ล้อมรอบจึงเคลื่อนที่ไปสู่ขั้วแคโทด ทำให้สารละลายเคลื่อนที่ไปยังตัววัดสัญญาณ คือเป็นการผลักดันไอออนไปตามแคปิลลารีผ่านตัววัดสัญญาณ ทำการตรวจวัดการเรืองแสงของสีย้อมที่ติดฉลากบนดีเอ็นเอ โดยการเคลื่อนที่ผ่านแคปิลลารีนั้นสามารถแบ่งออกเป็น 2 รูปแบบ คือ ดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ผ่านช่องว่างระหว่างโมเลกุลของพอลิเมอร์เป็นแบบกลุ่มก้อน หรือ Ogston sieving และถ้าดีเอ็นเอมีขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ช้าการเคลื่อนที่จึงคล้ายการเลื้อยของงู หรือ Reptation ดังนั้นทำให้ดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กสามารถเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าจึงทำให้ไปถึงขั้วแคโทดก่อน จากนั้นเมื่อผ่านการแปลงสัญญาณและแปลผลจะได้ผลออกมาในรูปของอิเลคโทรฟิโรแกรม (ดังแสดงในรูปที่ 4) เพื่อนำไปวิเคราะห์ผลต่อไป [40, 41]



รูปที่ 4 แสดงถึงลักษณะของอิเลคโทรฟิโรแกรมของตำแหน่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอ [13]

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยที่ผ่านมามีการศึกษาเกี่ยวกับเซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุต่างๆ โดยศึกษาวิธีการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระและปริมาณดีเอ็นเอที่ได้รับ รวมทั้งศึกษาคุณภาพและความสำเร็จในการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ดังนี้

จากงานวิจัยของ Brigh และ Petricevic (2004) ได้ศึกษาการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเซลล์และดีเอ็นเออิสระบนรองเท้าประเภทต่างๆ เช่น รองเท้าแตะ รองเท้าวิ่ง และรองเท้าหนัง โดยให้อาสาสมัครสวมรองเท้าจากนั้นเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระด้วยไม้พันสำลี การชะล้าง และเทปยึด ผลการทดลองพบว่าการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระด้วยวิธีเทปยึดสามารถเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระได้มากกว่าวิธีไม้พันสำลีและการชะล้าง และพบว่าการสวมรองเท้าด้วยเท้าข้างซ้ายและข้างขวาได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าการได้รับเซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุนั้นขึ้นอยู่กับวิธีการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระและการปลดปล่อยดีเอ็นเอในแต่ละบุคคล [42]

Esslinger และคณะ (2004) ศึกษาความเป็นไปได้ในการได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุท่อสำหรับบรรจุระเบิด ได้แก่ ท่อโลหะและท่อพีวีซี (Polyvinyl chloride, PVC) โดยเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับจากการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระจากชิ้นส่วนวัสดุ ภายหลังการระเบิด จากนั้นเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระด้วยไม้พันสำลีและตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอโดยวิธีมาตรฐาน ผลการศึกษาพบว่าการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุระเบิดท่อได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพียงไม่กี่ตำแหน่ง (Partial profile) และไม่ได้รับลายพิมพ์

ดีเอ็นเอ (No profile) คิดเป็นร้อยละ 35 และ 65 ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเมื่อวัตถุระเบิดทำงานจะเกิดความร้อนขึ้นทำให้ดีเอ็นเอนั้นเสียสภาพ [43]

Pang และ Cheung (2007) ได้ศึกษาวิธีการใช้ไม้พันสำลีเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุสำนักงานต่างๆ เช่น คอมพิวเตอร์ คีย์การ์ด ไฟฉาย แฟ้มเอกสาร และเครื่องเย็บกระดาษ เป็นต้น พบว่าการเก็บกู้ด้วยไม้พันสำลีแบบแห้งและแบบเปียกได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอคิดเป็นร้อยละ 16 และ 12 แสดงให้เห็นว่าการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระด้วยไม้พันสำลีแบบแห้งช่วยให้ได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น ทั้งนี้ความสำเร็จในการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอขึ้นอยู่กับความสามารถในการปลดปล่อยดีเอ็นเอของแต่ละบุคคลและวัสดุที่สัมผัสด้วยเช่นกัน [44]

Tobe และคณะ (2011) ได้ศึกษาการได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเซลล์และดีเอ็นเออิสระของมนุษย์บนตัวอย่างกวาง โดยให้อาสาสมัครจับบริเวณส่วนหัว ขาและอวัยวะภายในของกวาง จากนั้นเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระด้วยวิธีเทปยึด นำไปสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยาสกัด QIAamp® DNA Investigator Kit (QIAGEN, UK) แล้วนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ พบว่าสามารถเก็บกู้ดีเอ็นเอได้ปริมาณสูงสุดถึง 3.86 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.946±1.07 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร และพบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับจะมีรูปแบบเป็น Low template profile แสดงให้เห็นว่าผลการศึกษางานวิจัยนี้สามารถตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากตัวอย่างซากสัตว์ได้และสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับสัตว์ป่าชนิดอื่นๆ [45]

Berti และคณะ (2011) ได้ศึกษาการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากน้ำลายและเหงื่อบนวัตถุหลังการระเบิด โดยนำเหงื่อและน้ำลายของอาสาสมัครปริมาตร 5, 10 และ 20 ไมโครลิตร หยดลงบนเทปพลาสติกแล้วนำไปติดไว้กับวงจรระเบิด โดยจะศึกษาร่วมกับสารระเบิด 3 ชนิด ได้แก่ อาร์ดีเอ็กซ์ (RDX) ดินดำ (Black powder) และทีเอ็นที (TNT) หลังจากการระเบิดจะเก็บชิ้นส่วนระเบิดต่างๆนำไปตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ พบว่าตัวอย่างน้ำลายและเหงื่อได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ร้อยละ 48 และ 12 ตามลำดับ เนื่องจากน้ำลายมีความเข้มข้นของดีเอ็นเอมากกว่าเหงื่อในตัวอย่างที่มีปริมาตรเท่ากัน อีกทั้งพบว่าสารระเบิดอาร์ดีเอ็กซ์ทำลายดีเอ็นเอมากที่สุด เนื่องจากแรงระเบิด อุณหภูมิ และปริมาตรในการเคลื่อนที่มากกว่าดินดำและทีเอ็นที ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าความสำเร็จในการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอหลังการระเบิดขึ้นอยู่กับชนิดของสารระเบิดและชนิดของสารคัดหลั่งทางชีวภาพ [12]

Daly และคณะ (2012) ศึกษาความสามารถของการถ่ายโอนเซลล์และดีเอ็นเออิสระจากการสัมผัสไปยังวัสดุต่างๆ เช่น แก้ว เสื้อผ้า และไม้ ให้อาสาสมัครเพศหญิงและเพศชาย ถือวัสดุให้แน่นเป็นเวลา 60 วินาที ด้วยมือข้างเดียว จากนั้นเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุด้วยวิธีเทปยึด แล้ววัดปริมาณดีเอ็นเอและตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ พบว่าปริมาณดีเอ็นเอที่วัดได้โดยเฉลี่ยในตัวอย่างวัสดุไม้ เสื้อผ้า และแก้ว เท่ากับ 5.85, 1.23 และ 0.52 นาโนกรัม ตามลำดับ และความสำเร็จในการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอมากที่สุดจากวัสดุไม้ เสื้อผ้า และแก้ว คิดเป็นร้อยละ 36, 23 และ 9 ตามลำดับ อีกทั้งความสามารถการถ่ายโอนเซลล์และดีเอ็นเออิสระไปยังวัสดุในเพศหญิงและเพศชายไม่แตกต่างกัน [31]

Swaran และ Welch (2012) ได้ศึกษาเปรียบเทียบคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอระหว่างวิธีไดเร็คพีซีอาร์กับการสกัดดีเอ็นเอจากวัสดุ ได้แก่ แผ่นสไลด์แก้ว พลาสติก แผ่นเซรามิก และสแตนเลส จากนั้นใช้ดีเอ็นเอ (Human male placental DNA (Cambio Ltd.)) ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1.0, 0.75, 0.5, 0.25 และ 0.1 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ป้ายบนวัสดุข้างต้นแล้วเก็บกู้ดีเอ็นเอด้วยไม้พันสำลี นำไปสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีไดเร็คพีซีอาร์ พบว่าร้อยละของค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลีลที่ได้รับในลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีไดเร็คพีซีอาร์สูงกว่าวิธีการการสกัดดีเอ็นเอ โดยพบว่าการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้น 0.75 และ 1.0 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ด้วยวิธีไดเร็คพีซีอาร์ได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์สำหรับวัสดุแผ่นสไลด์แก้ว แผ่นเซรามิก และสแตนเลส ยกเว้นวัสดุพลาสติก นอกจากนี้พบว่าวิธีดังกล่าวได้รับความสูงพีคสูงกว่าวิธีการสกัดเช่นกัน ทั้งนี้ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าวิธีไดเร็คพีซีอาร์ช่วยเพิ่มอัตราความสำเร็จในการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอปริมาณน้อยได้ เนื่องจากวิธีดังกล่าวช่วยลดปัญหาการสูญเสียไประหว่างกระบวนการสกัด [18]

Verheij และคณะ (2012) ศึกษาวิธีมัลติเพล็กไดเร็คพีซีอาร์สำหรับตัวอย่างที่เกี่ยวข้องในงานนิติวิทยาศาสตร์ ทั้งสารคัดหลั่งชีวภาพและเซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุต่างๆ เช่น ลูกบิดประตู อุปกรณ์ต่างๆในรถยนต์ เสื้อผ้า แก้วน้ำ กระป๋อง นาฬิกา และรองเท้า เป็นต้น ทำการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระด้วยวิธีไม้พันสำลีและเทปยึด (Tapelifting) ใช้ร่วมกับ SEM stub จากตัวอย่างเซลล์และดีเอ็นเออิสระทั้งหมด 54 ตัวอย่าง พบว่าได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ (Full profile) คิดเป็นร้อยละ 20 ได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอบางส่วน (Partial profile) คิดเป็นร้อยละ 20 และไม่ได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอคิดเป็นร้อยละ 60 ในขณะที่การได้รับลายพิมพ์

ดีเอ็นเอจากสารคัดหลั่งชีวภาพอื่นทั้งหมด 95 ตัวอย่าง ได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์คิดเป็นร้อยละ 60 ได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอบางส่วนคิดเป็นร้อยละ 24 และไม่ได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอคิดเป็นร้อยละ 16 [8]

Hoffmann และคณะ (2012) ได้ศึกษาการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุระเบิดแสวงเครื่อง โดยให้อาสาสมัครทั้งหมด 8 คน สะพายกระเป๋าเป้ใช้ในชีวิตประจำวันเป็นเวลา 11 วัน จากนั้นบรรจุระเบิดแสวงเครื่องแบบใช้ท่อพีวีซีในกระเป๋าดังกล่าวก่อนทำการระเบิด และใช้ไม้พันสำลีเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระจากชิ้นส่วนกระเป๋าเป้ดังกล่าวจาก ซิปกระเป๋า หูจับกระเป๋า สายสะพายกระเป๋า ส่วนกลางและส่วนบนของกระเป๋า ผลการศึกษาพบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับจากตำแหน่งบริเวณต่างๆของกระเป๋าเป้มีความแตกต่างกันอย่างมาก กล่าวคือ การเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระบริเวณชิ้นส่วนหูจับกระเป๋าได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ (Full profile) ในขณะที่การเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระจากชิ้นส่วนกระเป๋าเป้บริเวณตำแหน่งอื่นๆมีปรากฏผลพีคปลอมดรอปอินส์และดรอปเอาท์ (Drop-ins and drop-out) นอกจากนี้พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอปรากฏความสูงพีคอัลลีลไม่มีความสมดุลกัน (Peak imbalance) และเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอแบบผสม (Mixture profile) หรือปรากฏดีเอ็นเอของมนุษย์มากกว่าหนึ่งคน [15]

Thomasma และคณะ (2013) ได้ศึกษาชนิดของสารละลายสำหรับให้ความชุ่มชื้นกับไม้พันสำลีเพื่อเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระ โดยสารละลายที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ Sodium dodecyl sulfate (SDS), Triton X-100, Tween 20, Formula 409® และ Simple Green® โดยให้อาสาสมัครใช้มือถูบนวัสดุ ได้แก่ เสื้อกาวน์ แขนเสื้อ ผ้าปิดปาก และถุงมือ จากนั้นใช้ไม้พันสำลีจุ่มในสารละลายข้างต้น แล้วนำสกัดดีเอ็นเอและตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ พบว่าการใช้ไม้พันสำลีจุ่มสารละลาย Sodium dodecyl sulfate (SDS) และ Triton X-100 สามารถเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระได้มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายชนิดอื่นที่ศึกษา แสดงให้เห็นว่าสารละลายทั้งสองชนิดนี้สามารถช่วยเพิ่มโอกาสในการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุได้ [10]

Templeton และคณะ (2013) ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเซลล์และดีเอ็นเออิสระด้วยวิธีไดเร็คพีซีอาร์ โดยให้อาสาสมัครล้างมือเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนใช้นิ้วชี้มือข้างถนัดกดบนแผ่นสไลด์ ทำการเก็บตัวอย่างด้วยไม้พันสำลีชนิด 3 ชนิด ได้แก่ ไม้พันสำลีชนิดโฟม (Whatman, USA) ไม้พันสำลีชนิดไนลอน (Copan Industries, Australia) และไม้พันสำลีชนิด

ฝ้าย (Livingstone, NSW) ผลการศึกษาพบว่าการใช้ไม้พันสำลีชนิดไนลอนมีประสิทธิภาพดีที่สุดและให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ (Full profile) คิดเป็นร้อยละ 100 อีกทั้งพบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับไม่ปรากฏผลพีคปลอมดรอปอินส์และดรอปเอาท์ (Drop-ins and drop-out) อย่างไรก็ตามอัตราความสำเร็จและคุณภาพของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับขึ้นอยู่กับเซลล์เยื่อบุผิวหนังและตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ [46]

Ottens และคณะ (2013) ได้ศึกษาวิธีไดเร็คพีซีอาร์สำหรับวัสดุหลักฐานและวัตถุพยานประเภท ผม เสื้อผ้า เส้นใย ถุงมือยาง และเทปพลาสติก ทดสอบเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีไดเร็คพีซีอาร์ ผลการทดลองพบว่าการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างผม เสื้อผ้า เส้นใยและเทปพลาสติกด้วยวิธีไดเร็คพีซีอาร์ได้รับจำนวนอัลลีลที่บนลายพิมพ์ดีเอ็นเอมากกว่า 12 อัลลีล ยกเว้นในตัวอย่างถุงมือยางได้อีลลีลน้อยกว่า 12 อัลลีล แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มปริมาณด้วยวิธีไดเร็คพีซีอาร์สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์ [17]

Verdon และคณะ (2014) ศึกษาวิธีการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระด้วยวิธีเทปยึด โดยในการทดลองใช้เทปกาว 2 ชนิด ได้แก่ Scotch® Magic™ และ Scenesafe FAST™ tape จากนั้นนำเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุประเภทผ้าชนิดต่างๆ เช่น สายรัด โพลีเอสเตอร์ ผ้าฝ้าย ผ้าฝ้ายใยสังเคราะห์ และผ้าโพลีเอสเตอร์สังเคราะห์ นำไปสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยา DNA IQ™ (Promega, USA) ผลการทดลองพบว่าเทปกาวชนิด Scenesafe FAST™ สามารถเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระได้ดีกว่าเทป Scotch® Magic™ สำหรับผ้าทุกชนิดที่ใช้ทดสอบ และพบว่าได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ตรงกับลายพิมพ์ดีเอ็นเออ้างอิง แสดงให้เห็นว่าเทป Scenesafe FAST™ มีความสามารถในการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนเสื้อผ้า เนื่องจากเทป Scenesafe FAST™ มีแรงดึงมากกว่าจึงเพิ่มประสิทธิภาพในการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระเพิ่มขึ้นและส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนอัลลีลในลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเช่นกัน [47]

Lui (2015) ได้ศึกษาวิธีการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระด้วย PE-Swab ซึ่งเป็นอุปกรณ์สำหรับเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระที่พัฒนาขึ้น จากนั้นเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระแล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีไดเร็คพีซีอาร์ โดยในการศึกษาจะเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดดีเอ็นเอ ผลการศึกษาพบว่าการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระด้วย PE-Swab สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีไดเร็คพีซีอาร์ได้สำเร็จ กล่าวคือได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ร้อยละ 100 สำหรับวัสดุแก้วกาแฟ เมาส์คอมพิวเตอร์ โทรศัพท์ไอโฟน พวงมาลัยรถยนต์และหมวกแก๊ป นอกจากนี้พบว่าการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีดังกล่าวได้รับจำนวนอัลลีลสูงกว่าวิธีการสกัดเช่นกัน [48]

Tasker และคณะ (2017) ได้ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับจากวัตถุหลังการระเบิดเพื่อใช้ในการระบุเอกลักษณ์บุคคลและบรรพบุรุษ ในการทดลองนี้ใช้ตัวอย่างเลือดและเซลล์และดีเอ็นเออิสระ โดยผู้วิจัยเลือกใช้เซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มทดแทนตัวอย่างเซลล์และดีเอ็นเออิสระเพื่อควบคุมปริมาณดีเอ็นเอ จากนั้นหยดตัวอย่างดังกล่าวที่ทราบปริมาณเซลล์บนวัสดุระเบิด สำหรับตัวอย่างเลือดหยดบริเวณปลายสายไฟฟ้าและเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มหยดบนท่อพีวีซี ทำการระเบิดวัตถุดังกล่าว จากนั้นเก็บดีเอ็นเอด้วยไม้พันสำลีและตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอโดยวิธีมาตรฐาน ผลการศึกษาพบว่าการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระด้วยไม้พันสำลีจากชิ้นส่วนวัสดุระเบิดท่อหลังการระเบิดได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์เพียงร้อยละ 4 ทั้งนี้อัตราความสำเร็จในการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอต่ำ เนื่องจากการดีเอ็นเอนั้นมีปริมาณน้อยหรือเสื่อมสภาพ [49]

Martin และคณะ (2018) ได้ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับจากเซลล์และดีเอ็นเออิสระ โดยให้อาสาสมัครสัมผัสบนวัสดุต่างๆ เป็นเวลา 15 วินาที แล้วนำไปสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีไดเร็คพีซีอาร์ด้วยชุดน้ำยาทางการค้า 2 ชุด คือ ชุดน้ำยา GlobalFiler™ PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) และชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific, USA.) ผลการศึกษาพบว่าการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีไดเร็คพีซีอาร์มีอัตราความสำเร็จในการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอสูงกว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอสำหรับวัสดุปลอกหุ้มกระสุนปืนอะลูมิเนียมลวดหุ้มฉนวน แผงวงจรไฟฟ้าและถุงซิปล็อค นอกจากนี้พบว่าชุดน้ำยา Identifiler® Plus มีประสิทธิภาพเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสูงกว่าชุดน้ำยา GlobalFiler® สำหรับทุกวัสดุที่ทดลองเช่นกัน [22]

Ambers และคณะ (2018) ได้ศึกษาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากไม้พันสำลีชนิด microFLOQ® (Copan, French Gendarmerie Forensic Research Institute) สำหรับเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระ เลือด และน้ำลาย ด้วยวิธีไดเร็คพีซีอาร์ โดยเจือจางเลือดและน้ำลายให้มีความเข้มข้นร้อยละ 1, 5 และ 10 หยดบนสไลด์แก้ว สำหรับเซลล์และดีเอ็นเออิสระให้อาสาสมัครสัมผัสวัสดุต่างๆ ได้แก่ แป้นพิมพ์คอมพิวเตอร์ ลูกบิดประตู เมาส์คอมพิวเตอร์ โทรศัพท์มือถือและสร้อยคอ จากนั้นเก็บกู้ดีเอ็นเอด้วยไม้พันสำลีชนิด microFLOQ® แล้วนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีไดเร็คพีซีอาร์และสกัดดีเอ็นเอ ผลการศึกษาพบว่าการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดที่มีความเข้มข้นร้อยละ 5 ด้วยวิธีไดเร็คพีซีอาร์ได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์

28 ใน 30 ตัวอย่าง นอกจากนี้พบว่าการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีไดเร็คพีซีอาร์ให้ความสูงของพีคอัลลีลที่ได้รับในลายพิมพ์ดีเอ็นเอสูงกว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอทั้งตัวอย่างเลือดและน้ำลาย ในขณะที่การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเซลล์และดีเอ็นเออิสระด้วยวิธีไดเร็คพีซีอาร์ได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพียงไม่กี่ตำแหน่ง (Partial profile) และพบว่าได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอแบบผสม (Mixture profile) ในทุกวัสดุทดลอง [50]

3.วัตถุประสงค์

3.1 เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์มาใช้ในการตรวจพิสูจน์เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุหลักฐานระเบิดแสวงเครื่อง

3.2 เพื่อเปรียบเทียบวิธีการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์

3.3 เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดน้ำยาทางการค้าสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องด้วยเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์

3.4 เพื่อทวนสอบวิธีการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระและกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้และเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานของศูนย์พิสูจน์หลักฐานตำรวจ สำนักงานตำรวจแห่งชาติ ในการตรวจพิสูจน์เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนระเบิดแสวงเครื่องจำลอง

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างดีเอ็นเออาสาสมัคร

ทำการเก็บตัวอย่างเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้ม (Buccal swab) จากอาสาสมัครจำนวน 10 คน และตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเออ้างอิงของอาสาสมัครดังกล่าว สำหรับใช้ตรวจสอบความถูกต้องของผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ กำหนดให้อาสาสมัครต้องไม่รับประทานอาหารหรือดื่มน้ำอย่างน้อย 30 นาที จากนั้นใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อป้ายขึ้นลงบริเวณเยื่อบุกระพุ้งแก้มข้างปากด้านในทั้งสองข้างของอาสาสมัครจำนวนข้างละ 10 ครั้ง หักส่วนปลายของไม้พันสำลีใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปสกัดดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส ดังอธิบายในวิธีการวิจัยข้อ 4. และข้อ 7.- 9.

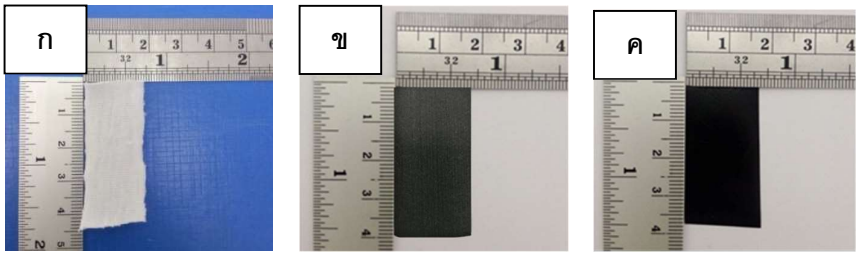
งานวิจัยนี้ได้ศึกษาวิจัยตัวอย่างที่มาจากมนุษย์ คือ เยื่อบุกระพุ้งแก้ม และเซลล์และดีเอ็นเออิสระ ดังนั้นจึงได้ดำเนินการขออนุมัติจริยธรรมการทำวิจัยในมนุษย์ สาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยยึดหลักจริยธรรมของประเทศเฮลซิงกิ (Declaration of Helsinki) และแนวทางการปฏิบัติการวิจัยทางคลินิกที่ดี (The International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice) โดยมีเอกสารอนุมัติรหัสโครงการ HSc-HREC-61-005-02-1

2. ชนิดและวิธีการเตรียมวัสดุหลักฐานในการทดลอง

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาวัสดุหลักฐานระเบิดแสวงเครื่อง 3 ประเภท ได้แก่ วัสดุดูดซับ (เสื้อผ้าและปลอกหุ้มแฮนด์รถมอเตอร์ไซค์) วัสดุไม่ดูดซับ (ท่อพีวีซีและแผงวงจรไฟฟ้า) และวัสดุอื่นๆ (เทปกาวพันสายไฟ) โดยทำความสะอาดวัสดุดังกล่าว ดังนี้

2.1 การเตรียมวัสดุเสื้อผ้า ปลอกหุ้มแฮนด์รถมอเตอร์ไซค์ และเทปกาวพันสายไฟ

สำหรับการเตรียมวัสดุทดลองประเภทเสื้อผ้า ปลอกหุ้มแฮนด์รถมอเตอร์ไซค์ และเทปกาวพันสายไฟ ทำโดยใช้กรรไกรที่ปราศจากเชื้อและดีเอ็นเอตัดวัสดุดังกล่าวให้มีขนาด 1.5 x 4.0 เซนติเมตร จากนั้นนำไปวางภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อทำให้ดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนเสียสภาพ (ดังแสดงในรูปที่ 5)

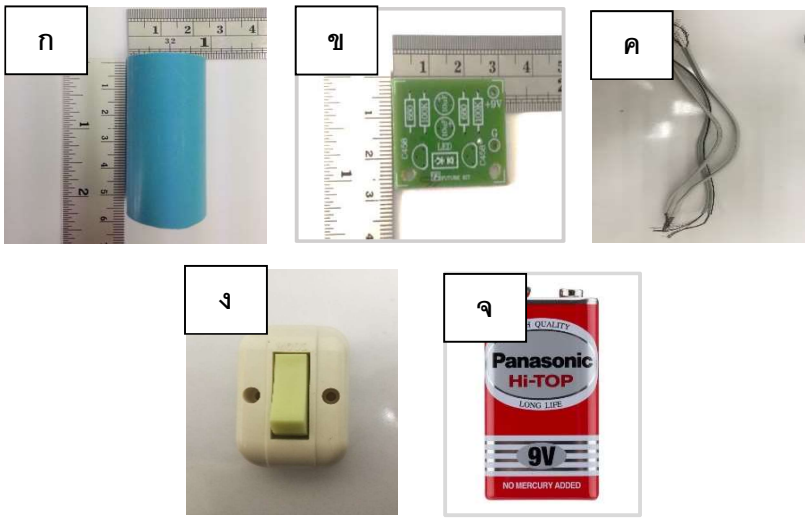


รูปที่ 5 แสดงภาพวัสดุเสื้อผ้า (ก), ปลอกหุ้มแฮนด์รถมอเตอร์ไซค์ (ข) และเทปกาวพันสายไฟยี่ห้อ 3M (ค) ที่ใช้ในการทดลอง

2.2 การเตรียมวัสดุท่อพีวีซี แผงวงจรไฟฟ้า สายไฟ สวิทซ์ไฟ และแบตเตอรี่

สำหรับการเตรียมวัสดุทดลองประเภทท่อพีวีซีและแผงวงจรไฟฟ้า ทำโดยตัดท่อพีวีซีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.3 เซนติเมตร ความยาว 5.0 เซนติเมตร และแผงวงจรไฟฟ้าขนาดประมาณ 3.0 x 3.0 เซนติเมตร จากนั้นนำมาทำความสะอาดด้วยน้ำยาล้างจานพร้อมใช้แปรงขัด หลังจากนั้นแช่ด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ (Clorox) ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 10 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเช็ดด้วยเอทานอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 70 ก่อนนำไปวางภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อทำให้ดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนเสียสภาพ (ดังแสดงในรูปที่ 6)

สำหรับการเตรียมวัสดุทดลองประเภทสายไฟ สวิทซ์ไฟ และแบตเตอรี่ ทำโดยนำวัสดุดังกล่าวเช็ดด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ (Clorox) ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 10 แล้วเช็ดเอทานอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 70 ก่อนนำไปวางภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อทำให้ดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนเสียสภาพเช่นเดียวกัน (ดังแสดงในรูปที่ 6)

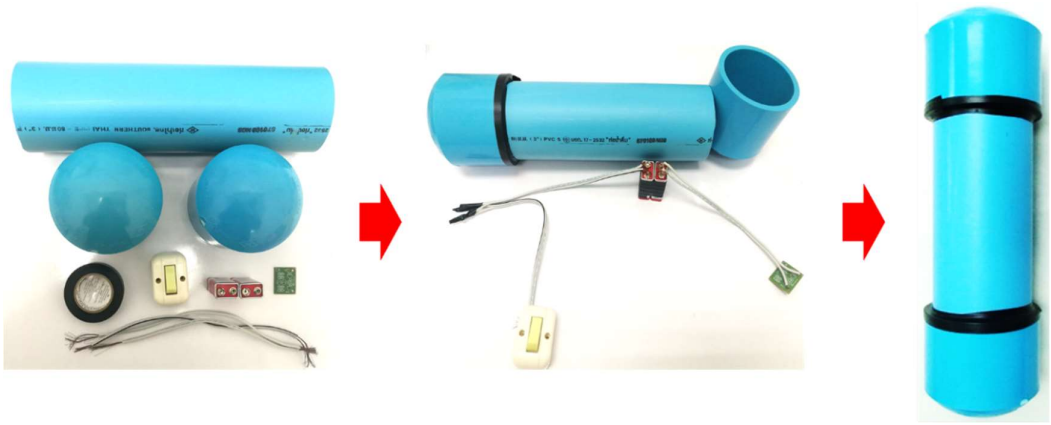


รูปที่ 6 แสดงภาพวัสดุท่อพีวีซี (ก) แผงวงจรไฟฟ้า (ข) สายไฟ (ค) สวิทซ์ไฟ (ง) และแบตเตอรี่ (จ) ที่ใช้ในการทดลอง

2.3 การเตรียมวัสดุสำหรับประกอบระเบิดแสวงเครื่องจำลอง

ระเบิดแสวงเครื่องจำลองที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นวัสดุที่ตรวจพบได้บ่อยในสถานที่เกิดเหตุคดีก่อการร้ายจังหวัดชายแดนใต้ซึ่งแบ่งเป็น 6 ชนิด ได้แก่ ท่อพีวีซี แผงวงจรไฟฟ้า แบตเตอรี่ สายไฟ เทปกาวพันสายไฟและสวิทซ์ไฟ

การประกอบระเบิดแสวงเครื่องจำลอง เริ่มต้นจากให้อาสาสมัครจำนวน 5 คน ล้างมือเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนประกอบระเบิดแสวงเครื่องคนละ 2 ชุด (รวมระเบิดแสวงเครื่องจำลองทั้งหมด 10 ชุด) ทั้งนี้ก่อนการประกอบระเบิดแสวงเครื่องทางผู้วิจัยจะชี้แจงข้อมูลเกี่ยวกับขั้นตอนการประกอบระเบิดพร้อมทั้งให้อาสาสมัครทดลองประกอบจนกระทั่งเกิดความชำนาญ สำหรับขั้นตอนการประกอบระเบิดแสวงเครื่องจำลองมีดังนี้ เริ่มจากใช้เทปกาวพันสายไฟพันแบตเตอรี่ 2 ก้อน เข้าด้วยกัน จากนั้นนำสายไฟ 2 เส้น เชื่อมกับขั้วบวกและขั้วลบของแบตเตอรี่ทั้งสองก้อน นำสายแรกต่อเข้ากับแผงวงจรไฟฟ้า และสายที่สองต่อกับสายไฟอีกเส้นหนึ่งแล้วพันปมด้วยเทปกาว จากนั้นนำปลายสายไฟเส้นสุดท้ายไปต่อเข้ากับสวิทซ์ไฟ นำชิ้นส่วนที่ประกอบข้างต้นใส่ในท่อพีวีซีแล้วปิดฝาท่อพีวีซีทั้งสองด้าน ใช้เทปกาวพันท่อพีวีซีบริเวณรอยต่อ 2 รอบ จะได้ระเบิดแสวงเครื่องจำลอง 1 ชุด (ดังแสดงในรูปที่ 7)



รูปที่ 7 แสดงตัวอย่างระเบิดแสวงเครื่องจำลองประกอบด้วยวัสดุท่อพีวีซี แผงวงจรไฟฟ้า แบตเตอรี่ สายไฟ เทปกาวพันสายไฟและสวิทซ์ไฟ

2.4 การเตรียมตัวอย่างเซลล์และดีเอ็นเออิสระ

อาสาสมัครในงานวิจัยนี้จำนวน 10 คน คัดเลือกจากประชาชนทั่วไปที่มีอายุในช่วง 20 ถึง 50 ปี และมีสุขภาพแข็งแรงสมบูรณ์ จากนั้นให้อาสาสมัครทุกคนล้างมือเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนใช้นิ้วหัวแม่มือสัมผัสกดและถูไปมาบนวัสดุทดลองที่ได้เตรียมไว้เป็นเวลาประมาณ 30 วินาที จากนั้นนำวัสดุเหล่านี้ไปใช้ทดลองในขั้นตอนถัดไป

3. การเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระ

งานวิจัยนี้ทำการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระจำนวน 3 วิธี คือ 1) วิธีเทปยึด (Tapelifting) 2) วิธีไม้พันสำลีร่วมกับสารละลายให้ความชุ่มชื้น (Swabbing) 3) วิธีการตัดวัสดุขนาดเล็กเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตรง (Cutting method) โดยมีรายละเอียด ดังนี้

3.1 วิธีเทปยึด

การเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระด้วยวิธีเทปยึด ทำตามวิธีของ Verheij และคณะ [8] โดยใช้ SEM stub ซึ่งเป็นแผ่นอะลูมิเนียมลักษณะกลมแบน ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12.5 มิลลิเมตร เชื่อมด้วยด้ามจับแล้วคาดด้วยเทปกาว Officeworks tape (Officeworks, Australia) โดยให้ด้านเหนียวของเทปกาวออก นำกดขึ้นลงบนวัสดุจนเทปกาวหายเหนียว (ประมาณ 50 ครั้ง) เพื่อสำหรับนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีไดเร็คพีซีอาร์ต่อไป (ดังแสดงในรูปที่ 8)

รูปที่ 8 แสดงภาพการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องที่ไม่ดูดซับด้วยวิธีเทปยึด (Tapelifting) ตามวิธีการของ Verheij และคณะ [8]

3.2 วิธีไม้พันสำลีร่วมกับสารละลายให้ความชุ่มชื้น

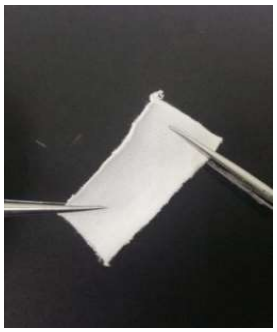
การเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระด้วยวิธีไม้พันสำลีร่วมกับสารละลายให้ความชุ่มชื้นนั้น ได้ทำการศึกษาไม้พันสำลีจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ ไม้พันสำลีชนิดคอตตอน (Thai Gauze Co., Ltd., Thailand) และไม้พันสำลีชนิดไนลอน (Puritan Medical, USA) โดยทดลองจุ่มในสารละลายให้ความชุ่มชื้นจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ 1X phosphate buffer saline (PBS), triton X-100 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และน้ำกลั่นสะอาดปราศจากเชื้อ จากนั้นนำไม้พันสำลีดังกล่าวป้ายบนวัสดุหลักฐานจนทั่วบริเวณ โดยให้ส่วนปลายของไม้พันสำลีตั้งฉากกับวัสดุ แล้ว

หักส่วนปลายของไม้พันสำลีเก็บในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เพื่อสำหรับนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีไดเร็คพีซีอาร์ต่อไป (ดังแสดงในรูปที่ 9)

รูปที่ 9 แสดงภาพการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องที่ไม่ดูดซับด้วยวิธีไม้พันสำลีร่วมกับสารละลายให้ความชุ่มชื้น (Swabbing)

3.3 วิธีการตัดวัสดุขนาดเล็กเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตรง

สำหรับวิธีการตัดวัสดุขนาดเล็ก (Cutting method) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตรงได้ใช้กรรไกรที่สะอาดปราศจากเชื้อตัดวัสดุบริเวณที่คาดว่าจะปรากฏเซลล์และดีเอ็นเออิสระให้มีขนาดชิ้นละ 1.0 x 1.0 มิลลิเมตร จำนวนประมาณ 10 ชิ้น จากนั้นนำไปใส่หลอดพีซีอาร์ก่อนเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีไดเร็คพีซีอาร์ต่อไป (ดังแสดงในรูปที่ 10)



รูปที่ 10 แสดงภาพการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องที่ดูดซับด้วยวิธีการตัดวัสดุขนาดเล็ก (Cutting method)

4. การสกัดดีเอ็นเอ

งานวิจัยนี้สกัดดีเอ็นเอในการทดลองตรวจพิสูจน์เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องจำลองด้วยวิธีมาตรฐานของศูนย์พิสูจน์หลักฐานตำรวจ สำนักงานตำรวจแห่งชาติ เพื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบวิธีไดเร็คพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ ทั้งนี้ได้ทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยา QIAamp® DNA Investigator kit (Qiagen, Germany) ตามคู่มือปฏิบัติการ โดยการเติม proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และบัฟเฟอร์ ATL ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองที่บรรจุตัวอย่าง ก่อนจะนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 10 วินาที และบ่มที่อุณหภูมิ 56 ˚C พร้อมเขย่าอัตโนมัติด้วยความเร็ว 900 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงเติมบัฟเฟอร์ AL ปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง 15 วินาที และบ่มที่อุณหภูมิ 70 ˚C พร้อมเขย่าอัตโนมัติด้วยความเร็ว 900 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 96 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงอีก 15 วินาที แล้วเทสารละลายที่ได้ลงในคอลัมน์ซึ่งอยู่ในหลอดทดลองขนาด 2 มิลลิลิตร หลอดใหม่ นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วย้ายคอลัมน์ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 2 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติมบัฟเฟอร์ AW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วย้ายคอลัมน์ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 2 มิลลิลิตร หลอดใหม่อีกครั้ง เติมบัฟเฟอร์ AW2 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 1 นาที ก่อนจะย้ายคอลัมน์ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 2 มิลลิลิตร หลอดใหม่ แล้วเติมเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 96 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร แล้วหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นหมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 3 นาที ก่อนจะบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงย้ายคอลัมน์มาใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลตร แล้วเติมบัฟเฟอร์ ATE ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อวินาทีเป็นเวลา 1 นาที จะได้สารละลายดีเอ็นเอสกัดในหลอดทดลองดังกล่าว เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 ˚C ก่อนจะนำไปใช้ในการทดลองถัดไป

5. การวัดปริมาณดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอสกัดจะถูกนำมาวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยา Quantifiler® Human DNA Quantification Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) โดยการเติมน้ำยา Quantifiler® PCR Reaction mix ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร และ Primer mix ปริมาตร 10.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วบรรจุลงในหลอดทดลองหลอดละ 23 ไมโครลิตร จากนั้นใส่ตัวอย่างดีเอ็นเอสกัดปริมาตร 2 ไมโครลิตร ก่อนเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Thermo Fisher Scientific® 7500 Real-Time PCR Systems โดยตัวอย่างจะถูกวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นด้วยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นด้วยการเจือจางดีเอ็นเอควบคุมอย่างเป็นลำดับส่วน (serial dilution) ตั้งแต่ความเข้มข้น 50 ถึง 0.0122 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามวิธีการที่ระบุในคู่มือของชุดน้ำยา

6. การเตรียมตัวอย่างก่อนเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์

งานวิจัยนี้ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 2 โพรโทคอล ได้แก่ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากวัสดุหลักฐานระเบิดโดยตรง (Direct amplification protocol) และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยสารละลายตัวอย่างจากวัสดุหลักฐานระเบิด (Pre-PCR solution amplification protocol) ซึ่งมีรายละเอียดการเตรียมตัวอย่างก่อนเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังนี้

การเตรียมตัวอย่างก่อนเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากวัสดุโดยตรง ทำได้โดยนำเทปไม้พันสำลีที่ผ่านการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระหรือวัสดุหลักฐานระเบิดที่สามารถตัดเป็นชิ้นเล็กได้ เช่น เทปกาวพันสายไฟและเสื้อผ้า ขนาดชิ้นละ 1.0 x 1.0 มิลลิเมตร จำนวนประมาณ 10 ชิ้น บรรจุในหลอดพีซีอาร์ จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยาทางการค้า ดังอธิบายในข้อ 7

การเตรียมตัวอย่างก่อนเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยสารละลายตัวอย่าง ทำได้โดยนำเทป ไม้พันสำลีที่ผ่านการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระหรือวัสดุหลักฐานระเบิดที่สามารถตัดเป็นชิ้นเล็กได้ เช่น เทปกาวพันสายไฟและเสื้อผ้า ขนาดชิ้นละ 1.0 x 1.0 มิลลิเมตร จำนวนประมาณ 10 ชิ้น บรรจุในหลอดทดลอง เติมสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยาทางการค้า ดังอธิบายในข้อ 7

7. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยาทางการค้า

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาเปรียบเทียบชุดน้ำยาทางการค้าสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 4 ชุดน้ำยา ได้แก่ ชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific, USA.), ชุดน้ำยา AmpFℓSTR® Identifiler® Direct PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific, USA.), ชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex® Plus Kit (Qiagen, UK) และชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex® GO! Kit (Qiagen, UK) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

7.1 ชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific, USA.)

ใช้วิธีการตามขั้นตอนที่ระบุในคู่มือชุดน้ำยา โดยทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอปริมาตรรวม 12.5 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยน้ำยา DNA AmpFlSTR® Identifiler® Plus Master Mix ปริมาตร 5.0 ไมโครลิตร AmpFlSTR® Identifiler® Plus Primer Set ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร ชิ้นส่วนวัสดุหรือสารละลายตัวอย่างปริมาตร 5 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรด้วย Deionized water จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง T100™ Bio-Rad thermal cycle โดยมีสภาวะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดังนี้คือขั้นตอน initial denaturation ที่ 95 °C เป็นเวลา 11 นาที ตามด้วย denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 20 วินาที annealing/extension ที่ 59 °C เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 32 รอบ และ final extension ที่ 60 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำผลผลิตปฏิกิริยา พีซีอาร์ (PCR product) เก็บรักษาไว้ภายใต้อุณหภูมิ -20 °C ก่อนการตรวจวิเคราะห์ต่อไป

7.2 ชุดน้ำยา AmpFℓSTR® Identifiler® Direct PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific, USA.)

ใช้วิธีการตามขั้นตอนที่ระบุในคู่มือชุดน้ำยา โดยทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอปริมาตรรวม 12.5 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยน้ำยา Master Mix ปริมาตร 6.25 ไมโครลิตร Primer Set ปริมาตร 6.25 ไมโครลิตร และชิ้นส่วนวัสดุ จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง T100™ Bio-Rad thermal cycle โดยมีสภาวะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดังนี้คือขั้นตอน

initial incubation step ที่ 95 °C เป็นเวลา 11 นาที ตามด้วย denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 20 วินาที annealing ที่ 59 °C เป็นเวลา 2 นาที extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 32 cycles และ final extension ที่ 60 °C เป็นเวลา 25 นาที จากนั้นนำผลผลิตปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR product) เก็บรักษาไว้ภายใต้อุณหภูมิ -20 °C ก่อนการตรวจวิเคราะห์ต่อไป

7.3 ชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex® Plus Kit (Qiagen, UK)

ใช้วิธีการตามขั้นตอนที่ระบุในคู่มือชุดน้ำยา โดยทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอปริมาตรรวม 12.5 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยน้ำยา Fast Reaction Mix ปริมาตร 3.75 ไมโครลิตร Primer Mix ปริมาตร 1.25 ไมโครลิตร ชิ้นส่วนวัสดุและปรับปริมาตรด้วย Deionized water จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง T100™ Bio-Rad thermal cycle โดยมีสภาวะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดังนี้คือขั้นตอน initial denaturation ที่ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วย denaturation ที่ 96 °C เป็นเวลา 10 วินาที และ annealing/extension ที่ 61 °C เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 32 cycles จากนั้นนำผลผลิตปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR product) เก็บรักษาไว้ภายใต้อุณหภูมิ -20 °C ก่อนการตรวจวิเคราะห์ต่อไป

7.4 ชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex® GO! Kit (Qiagen, UK)

ใช้วิธีการตามขั้นตอนที่ระบุในคู่มือชุดน้ำยา โดยทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอปริมาตรรวม 13.5 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยน้ำยา Fast Reaction Mix ปริมาตร 3.75 ไมโครลิตร Primer Mix ปริมาตร 8.75 ไมโครลิตร และชิ้นส่วนวัสดุ จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง T100™ Bio-Rad thermal cycle โดยมีสภาวะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดังนี้คือขั้นตอน initial denaturation ที่ 95 °C เป็นเวลา 8 นาที ตามด้วย denaturation ที่ 96 °C เป็นเวลา 10 วินาที annealing/extension ที่ 61 °C เป็นเวลา 38 วินาที จำนวน 32 cycles และ final extension ที่ 68 °C เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำผลผลิตปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR product) เก็บรักษาไว้ภายใต้อุณหภูมิ -20 °C ก่อนการตรวจวิเคราะห์ต่อไป

8. การแยกและการตรวจสอบดีเอ็นเอ

ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Capillary electrophoresis) สำหรับชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus PCR Amplification Kit และชุดน้ำยา Identifiler® Direct PCR Amplification ทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ โดยนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ดังกล่าวปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร ผสมกับ Hi-Di™ Formamide ปริมาตร 24.5 ไมโครลิตร และ GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร จากนั้นบรรจุในหลอดทดลองขนาด 500 ไมโครลิตร แล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 3 นาที และให้แช่เย็นทันทีที่ 4 °C เป็นเวลา 3 นาที ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) ซึ่งภายในหลอดแคปิลลารีที่บรรจุด้วยพอลิเมอร์ชนิด POP-4® และมีความยาวของหลอด 47 เซนติเมตร และจะใช้เวลาในการฉีดตัวอย่าง 15 กิโลโวลต์ (kV) นาน 5 วินาที โดยใช้เวลาในการแยกแถบดีเอ็นเอนาน 28 นาที ที่อุณหภูมิ 60 °C ในแต่ละตัวอย่าง จากนั้นนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอต่อไป

สำหรับชุดน้ำยา Investigator® IDplex Plus และชุดน้ำยา Investigator® IDplex GO! ทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์โดยนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ดังกล่าวปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมกับ Hi-Di™ Formamide ปริมาตร 12.0 ไมโครลิตร และ DNA Size Standard 550 (BTO) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร จากนั้นบรรจุในหลอดทดลองขนาด 500 ไมโครลิตร แล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 3 นาที และให้แช่เย็นทันทีที่ 4 °C เป็นเวลา 3 นาที ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) ซึ่งภายในหลอดแคปิลลารีที่บรรจุด้วยพอลิเมอร์ชนิด POP-4® และมีความยาวของหลอด 47 เซนติเมตร และจะใช้เวลาในการฉีดตัวอย่าง 15 กิโลโวลต์ (kV) นาน 5 วินาที โดยใช้เวลาในการแยกแถบดีเอ็นเอนาน 24 นาที ที่อุณหภูมิ 60 °C ในแต่ละตัวอย่าง จากนั้นนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอต่อไป

9. การวิเคราะห์ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

วิเคราะห์ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม GeneMapper v3.2.1 โดยตั้งค่าพารามิเตอร์สำหรับการวิเคราะห์ผลในโปรแกรมดังต่อไปนี้ สำหรับชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus PCR Amplification Kit และ Identifiler® Direct PCR Amplification ตั้งค่าดังนี้ Sample Type: Sample, Analysis method: Identifiler_Plus_Analysis Method_v1, Panel: Identifiler_Plus_Panels_v, Size standard: GS500(-250)_LIZ, และ Instrument ID: ABI PRISM 310 สำหรับชุดน้ำยา Investigator® IDplex Plus และ Investigator® IDplex GO! ตั้งค่าพารามิเตอร์ ดังนี้ Sample Type: Sample, Analysis method: Analysis_HID_310_50rfu, Panel: IDplex_Plus_Panels, Sizestandard: SST-BTO_60–500bp และ Instrument ID: ABI PRISM 310 จากนั้นนำผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้มาเปรียบเทียบคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ จำนวนอัลลีล ความสูงของพีค และพีคปลอม

10. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

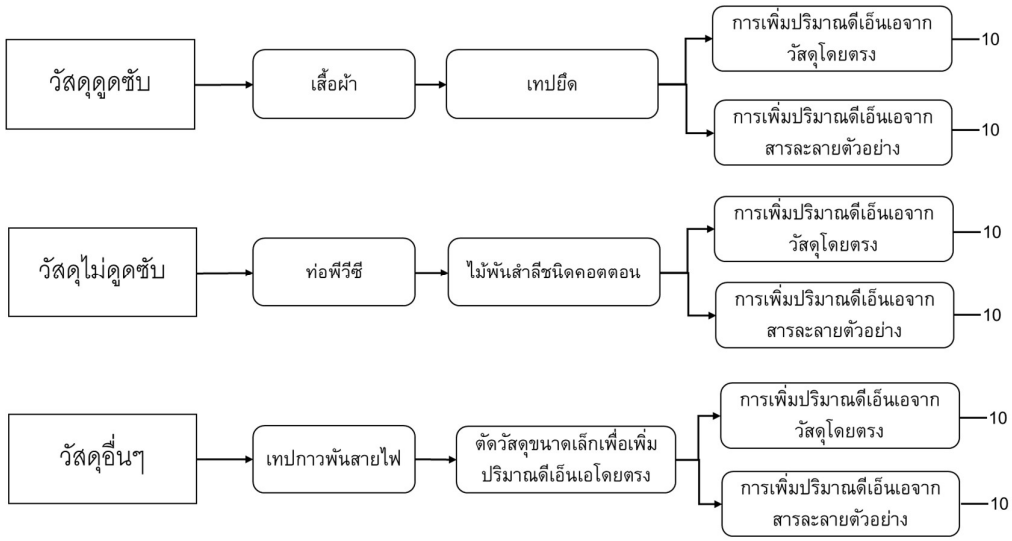
วิเคราะห์ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับทั้งหมดจากการศึกษาในงานวิจัยนี้ โดยทำการเปรียบเทียบจำนวนอัลลีลและความสูงของพีคที่ได้รับในแต่ละการทดลอง ด้วยการวิเคราะห์ช่วงความน่าเชื่อถือที่ร้อยละ 95 ของ Bayesian credible intervals ทำโดยนำชุดข้อมูลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์กับ yarrr ในโปรแกรมอาร์ (R) ซึ่งโปรแกรมดังกล่าวจะทำการสุ่มข้อมูลจำนวน 2,000 ซ้ำ เพื่อนำมาวิเคราะห์หาช่วงความน่าเชื่อถือที่ร้อยละ 95 ทั้งนี้หากช่วงความน่าเชื่อถือที่ร้อยละ 95 ของข้อมูลทั้งสองกลุ่มไม่ซ้อนทับกัน แสดงว่าข้อมูลสองกลุ่มนี้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 3

ผลและวิเคราะห์ผล

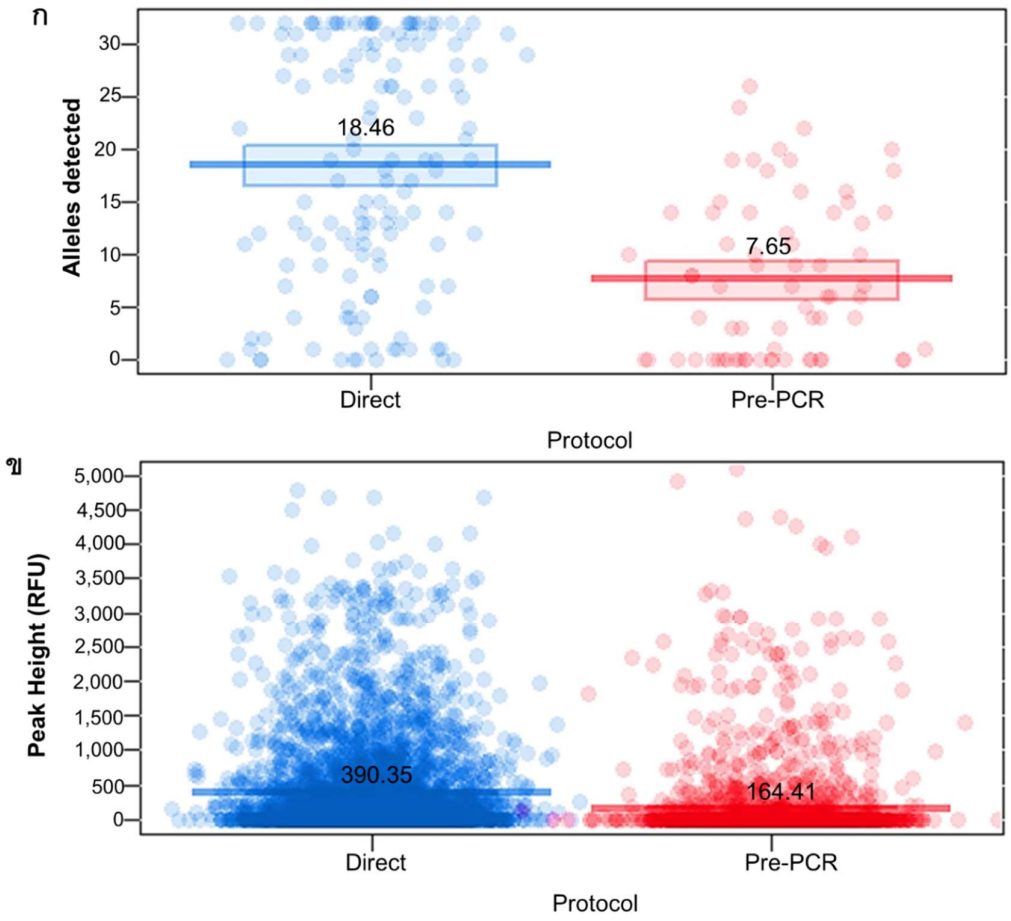
3.1 การศึกษาโพรโทคอลที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์จากหลักฐานระเบิดแสวงเครื่อง

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการเพิ่มปริมาณเซลล์และดีเอ็นเออิสระบนหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องด้วยเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์จำนวน 2 โพรโทคอล คือ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากวัสดุโดยตรง (Direct amplification protocol) และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากสารละลายตัวอย่าง (Pre-PCR solution amplification protocol) โดยไม่ผ่านการสกัดดีเอ็นเอ ทำการศึกษาเซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุหลักฐานระเบิดแสวงเครื่อง 3 ประเภท ได้แก่ วัสดุดูดซับ (เสื้อผ้า) วัสดุไม่ดูดซับ (ท่อพีวีซี) และวัสดุที่มีคุณสมบัติอื่นๆ (เทปกาวพันสายไฟ) จากนั้นเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระ โดยวิธีเทปยึดสำหรับวัสดุดูดซับ ส่วนวัสดุไม่ดูดซับเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระด้วยไม้พันสำลีชนิดคอตตอนจุ่มสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) สำหรับเทปกาวพันสายไฟใช้วิธีการตัดวัสดุลงในหลอดทดลองเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตรง การทดลองนี้ใช้อาสาสมัครจำนวน 10 คน แต่ละคนสัมผัสวัสดุทดลองทั้งหมด 2 ชุด โดยชุดแรกนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากวัสดุโดยตรง (Direct amplification protocol) และอีกชุดการทดลองหนึ่งนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยการเตรียมสารละลายตัวอย่าง (Pre-PCR solution amplification protocol) ดังอธิบายในหัวข้อ 6. ของวิธีการวิจัย ทำการทดลอง 10 ซ้ำในทุกชุดการทดลอง จากนั้นเปรียบเทียบผลคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ จำนวนอัลลีล ความสูงของพีค พีคปลอมและลักษณะรูปแบบการเสื่อมสภาพของดีเอ็นเอ เป็นต้น ทั้งนี้แผนการทดลองนี้แสดงดังรูปที่ 11



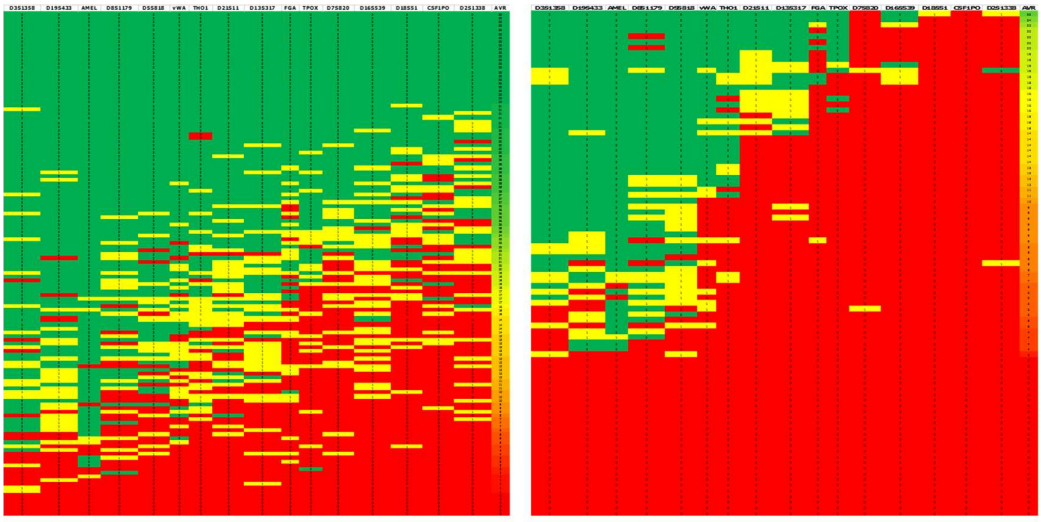
รูปที่ 11 แผนการศึกษาโพรโทคอลที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเซลล์และดีเอ็นเออิสระบนหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องด้วยเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์

ผลการศึกษาในภาพรวมพบว่าการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเซลล์และดีเอ็นเออิสระจากวัสดุหลักฐานโดยตรง (Direct amplification protocol) มีโอกาสให้ผลคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ดีกว่าโพรโทคอลการใช้สารละลายตัวอย่าง (Pre-PCR solution amplification protocol) มากกว่าร้อยละ 99.9999 โดยโพรโทคอลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากวัสดุโดยตรงมีจำนวนอัลลีลที่ได้รับเฉลี่ยมากถึง 18.46 อัลลีล จากจำนวนอัลลีลทั้งหมด 32 อัลลีล ในขณะที่การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากสารละลายตัวอย่าง มีจำนวนอัลลีลที่ได้รับเฉลี่ยเพียงแค่ 7.65 อัลลีล (ดังแสดงในรูปที่ 12ก) อีกทั้งพบว่าความสูงของพีคที่ได้รับจากโพรโทคอลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากวัสดุโดยตรงมีค่ามากกว่าอีกวิธีหนึ่งที่โอกาสมากกว่าร้อยละ 99.9999 เช่นเดียวกัน ดังแสดงในรูปที่ 12ข



รูปที่ 12 จำนวนอัลลีล (ก) และความสูงของพีค (ข) บนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับจากโพรโทคอลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากวัสดุโดยตรง (Direct amplification protocol) และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากสารละลายตัวอย่าง (Pre-PCR solution amplification protocol) โดยจุดที่ปรากฏจะแสดงถึงจำนวนอัลลีลทั้งหมดและความสูงของแต่ละพีคที่ได้รับในหนึ่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และแถบเส้นตรงแสดงถึงค่าเฉลี่ยและกล่องสี่เหลี่ยมจะแสดงค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ของ Bayesian credible intervals

เพื่อเปรียบเทียบอัตราความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและลักษณะรูปแบบการเสื่อมสภาพของดีเอ็นเอ (Degradation and inhibition pattern) ที่ได้รับจากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์ทั้งสองโพรโทคอล จึงได้นำจำนวนอัลลีลทั้งหมดที่ได้รับในแต่ละโพรโทคอลวิเคราะห์ด้วยแผนภาพฮีทแมพ (Heatmap) ดังแสดงในรูปที่ 13 โดยแกน x แสดงตำแหน่ง STR โดยเรียงลำดับจาก STR ที่มีขนาดเล็กไปจนถึงขนาดใหญ่จากด้านซ้ายไปขวา ตามลำดับ แกน y แสดงจำนวนอัลลีลที่ได้รับในแต่ละตัวอย่าง โดยเรียงจากความสมบูรณ์ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอมากไปหาน้อยจากบนลงล่าง ทั้งนี้แถบสีเขียวในฮีทแมพแสดงถึงการปรากฏของจำนวนอัลลีล 2 อัลลีล ในตำแหน่ง STR หนึ่งๆ แถบสีเหลืองแสดงการปรากฏจำนวนอัลลีล 1 อัลลีล และแถบสีแดงแสดงการไม่ปรากฏอัลลีล ผลการศึกษาพบว่าโพรโทคอลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากวัสดุโดยตรงมีอัตราความสำเร็จในการได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอสูงกว่าโพรโทคอลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากสารละลายตัวอย่าง โดยสังเกตจากปริมาณแถบสีเขียวที่ได้รับมีมากกว่าอีกโพรโทคอลหนึ่ง (ดังแสดงในรูปที่ 13ก) ในทำนองเดียวกันฮีทแมพของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากสารละลายตัวอย่างปรากฏแถบสีแดงจำนวนมาก แสดงให้เห็นว่าโพรโทคอลดังกล่าวไม่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเซลล์และดีเอ็นเออิสระจากวัสดุเป้าหมาย จึงไม่สามารถให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอหรือจำนวนอัลลีลที่คาดหวังได้ (ดังแสดงรูปที่ 13ข) นอกจากนี้ยังพบว่าโพรโทคอลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากวัสดุโดยตรงสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจาก STR ที่มีขนาดใหญ่ได้มากกว่าอีกโพรโทคอลหนึ่ง ในทางกลับกันโพรโทคอลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากสารละลายตัวอย่างมีแนวโน้มได้รับอัลลีลจากตำแหน่ง STR ที่มีขนาดเล็กเป็นส่วนใหญ่หรือปรากฏรูปแบบการเสื่อมสภาพของดีเอ็นเอ (Inhibition pattern) นั่นเอง



(ก) direct PCR protocol (ข) Pre-PCR solution

รูปที่ 13 แผนภาพฮีทแมพแสดงอัตราความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและลักษณะรูปแบบการเสื่อมสภาพของดีเอ็นเอ (Degradation and inhibition pattern) ที่ได้รับจากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์สองโพรโทคอล คือ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากวัสดุโดยตรง (Direct amplification protocol) และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากสารละลายตัวอย่าง (Pre-PCR solution amplification protocol) แกน x แสดงตำแหน่ง STR โดยเรียงลำดับจาก STR ที่มีขนาดเล็กไปจนถึงขนาดใหญ่จากด้านซ้ายไปขวา ตามลำดับ แกน y แสดงจำนวนอัลลีลที่ได้รับในแต่ละตัวอย่าง โดยเรียงจากความสมบูรณ์ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอมากไปหาน้อยจากบนลงล่าง

ผลการศึกษาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบไดเร็คพีซีอาร์ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเซลล์และดีเอ็นเออิสระบนหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องได้สำเร็จ ทั้งนี้อาจเนื่องจาก 1) เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบไดเร็คพีซีอาร์สามารถลดการสูญเสียดีเอ็นเออันเนื่องจากกระบวนการสกัดดีเอ็นเอได้ จึงเพิ่มความสำเร็จในการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอปริมาณน้อย [16-18] 2) ชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้ในการศึกษานี้คือชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) ซึ่งมีการพัฒนาเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลีเมอร์เรสให้ทนทานต่อตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนั้นจึงยังสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่อาจปนเปื้อนตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้สำเร็จ 3) สารละลายพีซีอาร์บัฟเฟอร์ที่ใช้ในชุดน้ำยาดังกล่าวอาจมีการเติมสารคีเลต (Chelating agents) เช่น Bovine serum albumin

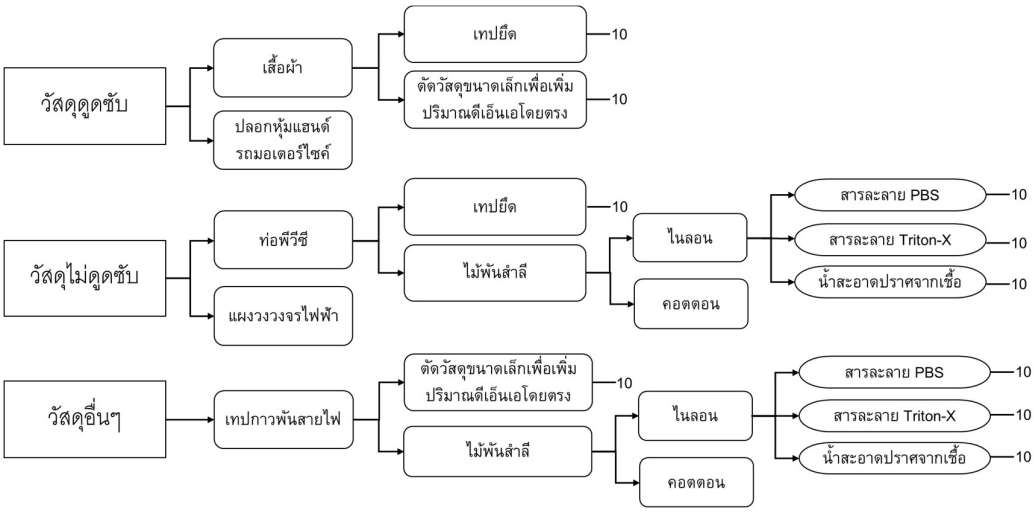
(BSA) หรือ Ethylene-diaminetetraacetic acid (EDTA) ซึ่งมีความสามารถในการช่วยจับไอออนของโลหะที่ปนเปื้อนในตัวอย่างและอาจเป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ [51, 52]

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของโพรโทคอลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบไดเร็คพีซีอาร์ พบว่าโพรโทคอลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากวัสดุโดยตรงมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าโพรโทคอลการใช้สารละลายตัวอย่างเพื่อตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเซลล์และดีเอ็นเออิสระบนหลักฐานระเบิดแสวงเครื่อง ทั้งนี้อาจเนื่องจากโพรโทคอลดังกล่าวไม่มีการเติมสารละลาย PBS ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับอีกโพรโทคอลหนึ่ง จึงทำให้ดีเอ็นเอในหลอดทดลองไม่ถูกเจือจางลงและมีปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นเพียงพอต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังนั้นโพรโทคอลดังกล่าวนี้จึงประสบความสำเร็จในการได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีกว่าอีกโพรโทคอลหนึ่ง

3.2 การศึกษาวิธีการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระที่เหมาะสมบนหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องสำหรับการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระที่มีประสิทธิภาพสูงสุดสำหรับการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องด้วยโพรโทคอลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากวัสดุโดยตรง (Direct amplification protocol) โดยศึกษาวิธีการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระ 3 วิธี ที่นิยมใช้ในงานนิติพันธุศาสตร์ทั้งในประเทศและสากล ได้แก่ วิธีไม้พันสำลี (Swabbing) วิธีเทปยึด (Tapelifting) และวิธีการตัดวัสดุขนาดเล็กเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตรง (Cutting method) ทั้งนี้ได้ศึกษาประสิทธิภาพการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระจากไม้พันสำลีจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ ไม้พันสำลีชนิดคอตตอนและไม้พันสำลีชนิดไนลอน และศึกษาสารละลายที่นิยมใช้หรือมีรายงานประสิทธิภาพดีสำหรับใช้ให้ความชุ่มชื้นแก่สำลีพันปลายก่อนการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ สารละลาย phosphate buffer saline (PBS), triton X-100 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และน้ำกลั่นสะอาดปราศจากเชื้อ โดยศึกษาวิธีการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระที่เหมาะสมบนวัสดุหลักฐานระเบิดแสวงเครื่อง 3 ประเภท ได้แก่ วัสดุดูดซับ (เสื้อผ้าและปลอกหุ้มแฮนด์รถมอเตอร์ไซค์) วัสดุไม่ดูดซับ (ท่อพีวีซีและแผงวงจรไฟฟ้า) และวัสดุอื่นๆ (เทปกาวพันสายไฟ) ทั้งนี้วิธีการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระที่ทำการศึกษานั้นขึ้นอยู่กับประเภทของวัสดุหลักฐาน กล่าวคือ การเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุดูดซับจะใช้วิธีเทปยึดและวิธีการตัดวัสดุขนาดเล็กเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตรง การเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุไม่ดูดซับจะใช้วิธีเทปยึดและไม้พันสำลี และการเก็บกู้

เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุที่มีคุณสมบัติอื่นๆ เช่น เทปกาวพันสายไฟ จะใช้วิธีการตัดวัสดุขนาดเล็กเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตรงและไม้พันสำลี ดังแสดงในรูปที่ 14



รูปที่ 14 แผนการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระที่เหมาะสมบนหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องสำหรับการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์

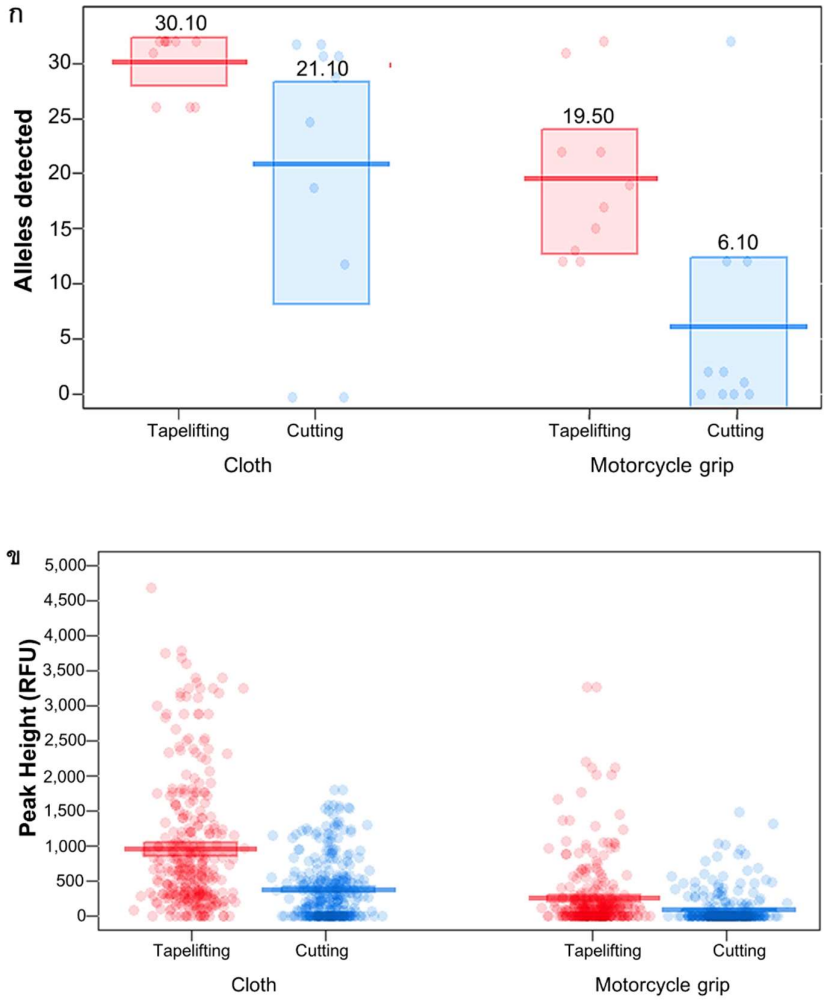
3.2.1 วิธีเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระที่เหมาะสมสำหรับวัสดุที่ดูดซับ

การทดลองนี้ได้ศึกษาวิธีการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระจากการสัมผัสบนวัสดุหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องที่ดูดซับจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ เสื้อผ้าและปลอกหุ้มแฮนด์รถมอเตอร์ไซค์ โดยเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุดังกล่าวด้วยวิธีเทปยึดและวิธีการตัดวัสดุขนาดเล็กเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตรง ทำการทดลอง 10 ซ้ำ และเปรียบเทียบคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ จำนวนอัลลีล ความสูงของพีค และพีคปลอม

ผลการศึกษาพบว่าจำนวนอัลลีลเฉลี่ยที่ได้รับจากวิธีการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระแบบเทปยึดและวิธีการตัดวัสดุขนาดเล็กเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตรงบนวัสดุดูดซับมีความแตกต่างกัน โดยพบว่าวิธีเทปยึดเป็นวิธีที่ให้ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีที่สุดในทุกวัสดุทดลอง ซึ่งมีจำนวนอัลลีลที่ได้รับเฉลี่ยมากถึง 30.10 และ 19.50 อัลลีล สำหรับวัสดุเสื้อผ้าและปลอกหุ้มแฮนด์รถมอเตอร์ไซค์ ตามลำดับ (ดังแสดงในรูปที่ 15ก) โดยโอกาสที่วิธีเทปยึดจะเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระได้รับจำนวนอัลลีลสูงกว่าอีกวิธีหนึ่งสูงถึงร้อยละ 96.2 และ 99.4

สำหรับวัสดุเสื้อผ้าและปลอกหุ้มแฮนด์รถมอเตอร์ไซค์ ตามลำดับ ในทำนองเดียวกันยังพบว่าความสูงของพีคอัลลีลที่ได้รับจากการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระด้วยวิธีเทปยึดบนวัสดุทั้งสองชนิดมีค่ามากกว่าอีกวิธีหนึ่งเช่นกันที่โอกาสมากกว่าร้อยละ 99.9999 ในขณะที่จำนวนอัลลีลเฉลี่ยที่ได้รับจากวิธีการตัดวัสดุขนาดเล็กเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตรงเท่ากับ 21.10 และ 6.10 อัลลีล (ดังแสดงในรูปที่ 15ก) และมีความสูงของพีคอัลลีลเฉลี่ยเท่ากับ 368.85 และ 77.78 RFU สำหรับวัสดุเสื้อผ้าและปลอกหุ้มแฮนด์รถมอเตอร์ไซค์ ตามลำดับ (ดังแสดงในรูปที่ 15ข)

ทั้งนี้สาเหตุที่วิธีการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระแบบเทปยึดมีประสิทธิภาพสูงสุดสำหรับเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุที่มีคุณสมบัติดูดซับนั้น อาจเนื่องจากเทปยึดมีส่วนประกอบของกาวเหนียวด้านหนึ่ง เมื่อใช้แรงกดทับด้านดังกล่าวลงบนวัสดุหลักฐานจะทำให้เซลล์และดีเอ็นเออิสระรวมถึงเส้นใยของวัสดุดูดซับที่มีดีเอ็นเออิสระหลุดลอกออกจากวัสดุหลักฐานและติดอยู่บนกาวเหนียว วิธีดังกล่าวนี้จึงสามารถเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุดูดซับได้ดีกว่าวิธีอื่นๆ ทั้งนี้ผลการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าที่รายงานว่าการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระด้วยวิธีเทปยึดมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าวิธีไม้พันสำลีสำหรับวัสดุดูดซับประเภท เสื้อผ้าชนิดผ้าฝ้าย [53, 54] เสื้อผ้าเส้นใยธรรมชาติ เสื้อผ้าเส้นใยสังเคราะห์ เสื้อผ้ายีนส์ [55] ผ้าฝ้ายใยสังเคราะห์และผ้าโพลีเอสเตอร์สังเคราะห์ [47] และวัสดุไม้ [31] เป็นต้น



รูปที่ 15 จำนวนอัลลีล (ก) และความสูงของพีคเฉลี่ย (ข) ที่ได้รับจากการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพวิธีการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุที่ดูดซับ (เสื้อผ้าและปลอกหุ้มแฮนด์รถมอเตอร์ไซค์) ร่วมกับการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์ โดยจุดที่ปรากฏจะแสดงถึงจำนวนอัลลีลทั้งหมดและความสูงของแต่ละพีคที่ได้รับในหนึ่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และแถบเส้นตรงแสดงถึงค่าเฉลี่ยข้อมูล (Solid color lines) และกล่องสี่เหลี่ยม (Solid color blocks) แสดงค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ของ Bayesian credible intervals

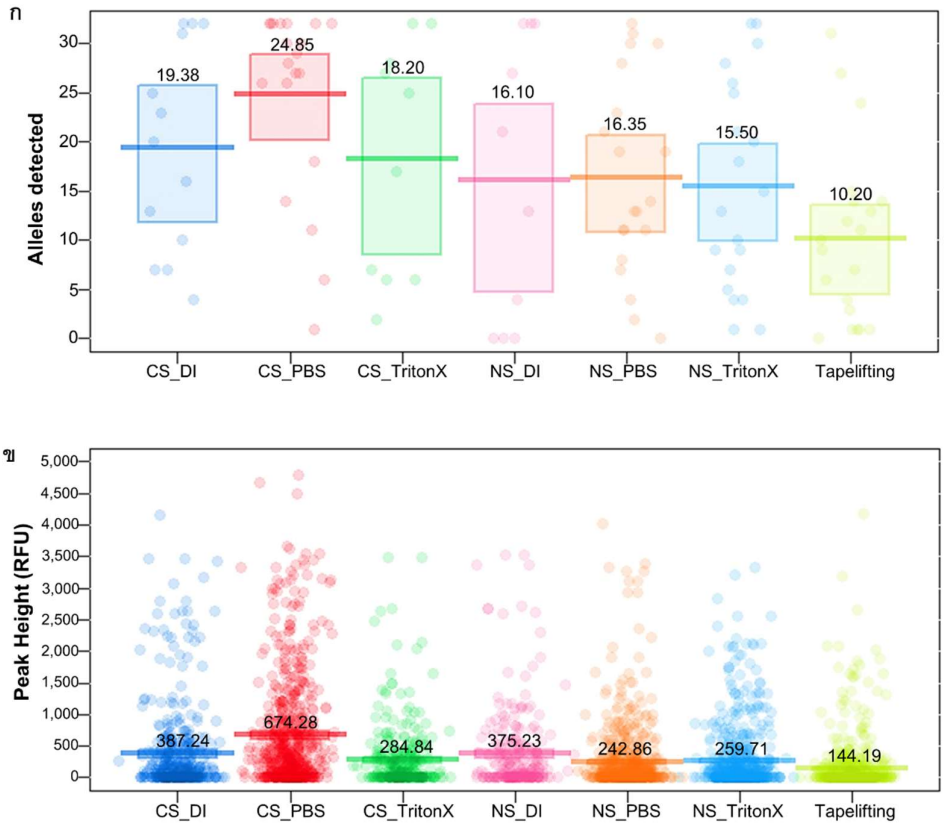
3.2.2 วิธีเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระที่เหมาะสมสำหรับวัสดุที่ไม่ดูดซับ

การทดลองนี้ได้ศึกษาวิธีการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องที่ไม่ดูดซับจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ ท่อพีวีซีและแผงวงจรไฟฟ้า โดยเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุดังกล่าวด้วยวิธีเทปยึดและวิธีไม้พันสำลีชนิดต่างๆร่วมกับสารละลายที่ให้ความชุ่มชื้นจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ 1X phosphate buffer saline (PBS), triton X-100 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และน้ำกลั่นสะอาดปราศจากเชื้อ ทั้งนี้ได้ทำการทดลอง 10 ซ้ำ และเปรียบเทียบคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ จำนวนอัลลีล ความสูงของพีค และพีคปลอม

ผลการศึกษาพบว่าจำนวนอัลลีลเฉลี่ยที่ได้รับจากการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระด้วยวิธีเทปยึดและวิธีไม้พันสำลีร่วมกับสารละลายที่ให้ความชุ่มชื้นต่างๆมีความแตกต่างกัน โดยจำนวนอัลลีลเฉลี่ยที่ได้รับจากการทดลองอยู่ในช่วง 10.20 - 24.85 อัลลีล (ดังแสดงในรูปที่ 16ก) และความสูงของพีคอยู่ในช่วง 144.19 - 674.28 RFU (ดังแสดงในรูปที่ 16ข) ทั้งนี้ในภาพรวมพบว่าวิธีการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระด้วยไม้พันสำลีร่วมกับสารละลายให้ความชุ่มชื้นมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าวิธีเทปยึด ดังแสดงในรูปที่ 16 ทั้งนี้อาจเนื่องจากสารละลายให้ความชุ่มชื้น (Moistening agents) ทำให้เซลล์หรือดีเอ็นเออิสระที่ติดอยู่บนวัสดุ rehydrate และสามารถเก็บกู้ได้ดีขึ้นด้วยไม้พันสำลี [44, 56, 57] ผลการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าที่พบว่าการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระด้วยวิธีไม้พันสำลีมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าวิธีเทปยึดสำหรับวัสดุหลักฐานที่ไม่ดูดซับประเภท พวงมาลัยรถยนต์ [11] รวมถึงวัสดุสำนักงานต่างๆ เช่น คอมพิวเตอร์ คีย์การ์ด ไฟฉาย แฟ้มเอกสาร และเครื่องเย็บกระดาษ เป็นต้น [44]

ผลการศึกษายังพบว่าการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระด้วยไม้พันสำลีชนิดคอตตอนจุ่มสารละลาย 1X phosphate buffer saline (CS_PBS) ให้จำนวนอัลลีลสูงที่สุดคือ 24.85 อัลลีล (ดังแสดงในรูปที่ 16) ซึ่งวิธีการดังกล่าวนี้มีโอกาสที่จะให้จำนวนอัลลีลเฉลี่ยสูงกว่าวิธีการใช้ไม้พันสำลีชนิดไนลอนจุ่ม สารละลาย PBS (NS_PBS), triton X-100 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (NS_TritonX), น้ำกลั่นสะอาดปราศจากเชื้อ (NS_DI) และวิธีเทปยึด (Tapelifting) เท่ากับร้อยละ 99.6, 99.6, 94.3 และ 99.9999 ตามลำดับ ในขณะที่วิธีการใช้ไม้พันสำลีชนิดคอตตอนจุ่มสารละลาย PBS (CS_PBS) ให้จำนวนอัลลีลเฉลี่ยสูงกว่าวิธีการใช้ไม้พันสำลีชนิดเดียวกันที่จุ่มในสารละลาย triton X-100 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (CS_TritonX) และน้ำกลั่นสะอาดปราศจากเชื้อ (CS_DI) ร้อยละ 92.4 และ 93.2 ตามลำดับ สาเหตุที่ไม้พันสำลีชนิดคอตตอนมีประสิทธิภาพในการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุไม่ดูดซับดีกว่าไม้พันสำลี

ชนิดไนลอนนั้น อาจเนื่องจากเส้นใยสำลีชนิดคอตตอนสร้างจากเส้นใยเซลลูโลส (Cellulose) และมีไดอะโซไทซ์ แอริล เอมีน (Diazotized aryl amine) เป็นองค์ประกอบทำให้มีคุณสมบัติในการจับกับเบสกัวนีนและไทมีนบนสายดีเอ็นเอด้วยพันธะไฮโดรเจนได้ [58, 59] นอกจากนี้เซลลูโลสยังมีคุณสมบัติความเป็นขั้วจึงส่งเสริมความสามารถในการจับกับดีเอ็นเอได้เนื่องจากดีเอ็นเอมีความเป็นขั้วเช่นเดียวกัน [60] เหล่านี้จึงเป็นเหตุผลให้ไม้พันสำลีชนิดคอตตอนมีประสิทธิภาพในการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระได้ดีกว่าไม้พันสำลีชนิดไนลอน อย่างไรก็ตามพบว่าผลการศึกษาจากงานวิจัยนี้ไม่สอดคล้องกับงานวิจัยของ Templeton และคณะ ที่พบว่าวิธีการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระด้วยไม้พันสำลีชนิดไนลอนร่วมกับสารละลาย triton X-100 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 มีประสิทธิภาพสูงสุดสำหรับวัสดุไม่ดูดซับเมื่อเปรียบเทียบกับการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระด้วยไม้พันสำลีชนิดคอตตอนและไม้พันสำลีชนิดโฟม [46] นอกจากนี้การใช้ไม้พันสำลีชนิดคอตตอนร่วมสารละลาย PBS นั้นพบว่าช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระได้เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายให้ความชุ่มชื้นอื่นๆ ทั้งนี้อาจเนื่องจากสารละลาย PBS มีคุณสมบัติในการรักษาพีเอช (pH) ของสารละลายและลดการสูญเสียดีเอ็นเอได้โดยช่วยคงสภาพเซลล์ไม่ให้แตก ทำให้ดีเอ็นเอคงสภาพอยู่ภายในเซลล์และไม่ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ดีเอ็นเอส (DNase) [61, 62] ดังนั้นวิธีการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระดังกล่าวจึงเพิ่มโอกาสในการได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีได้จากวัสดุไม่ดูดซับ



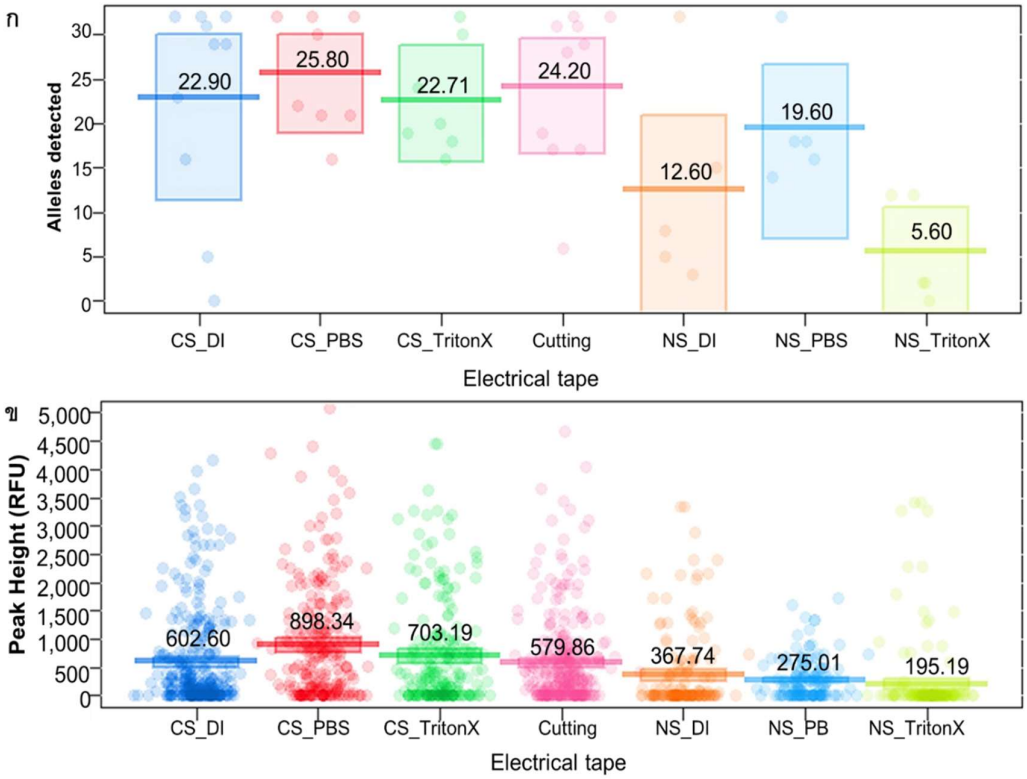
คำย่อ	คำอธิบาย
CS_DI	ไม้พันสำลีชนิดคอตตอนจุ่มน้ำกลั่นสะอาดปราศจากเชื้อ
CS_PBS	ไม้พันสำลีชนิดคอตตอนจุ่มสารละลาย PBS
CS_TritonX	ไม้พันสำลีชนิดคอตตอนจุ่มสารละลาย Triton-X
NS_DI	ไม้พันสำลีชนิดไนลอนจุ่มน้ำกลั่นสะอาดปราศจากเชื้อ
NS_PBS	ไม้พันสำลีชนิดไนลอนจุ่มสารละลาย PBS
NS_TritonX	ไม้พันสำลีชนิดไนลอนจุ่มสารละลาย Triton-X
Tapelifting	เทปยึด

รูปที่ 16 จำนวนอัลลีล (ก) และความสูงของพีคเฉลี่ย (ข) เฉลี่ยที่ได้รับจากการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพวิธีการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุไม่ดูดซับ ร่วมกับการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์ โดยจุดที่ปรากฏจะแสดงถึงจำนวนอัลลีลทั้งหมดและความสูงของแต่ละพีคที่ได้รับในหนึ่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และแถบเส้นตรงแสดงถึงค่าเฉลี่ยข้อมูล (Solid color lines) และกล่องสี่เหลี่ยม (Solid color blocks) แสดงค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ของ Bayesian credible intervals

3.2.3 วิธีเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระที่เหมาะสมสำหรับวัสดุอื่น ๆ

การทดลองนี้ได้ศึกษาวิธีการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องที่มีคุณสมบัติอื่นๆ เช่น เทปกาวพันสายไฟ ซึ่งด้านทั้งสองของวัสดุดังกล่าวมีคุณสมบัติไม่เหมือนกัน โดยด้านหนึ่งนั้นมีการเคลือบด้วยกาวเหนียว จากนั้นให้อาสาสมัครสัมผัสวัสดุดังกล่าวและทำการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระด้วยวิธีตัดวัสดุขนาดเล็กเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตรง และการใช้ไม้พันสำลีร่วมกับสารละลายที่ให้ความชุ่มชื้น ได้แก่ 1X phosphate buffer saline, triton X-100 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และน้ำกลั่นสะอาดปราศจากเชื้อ โดยทำการทดลอง 10 ซ้ำ และเปรียบเทียบผลคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ จำนวนอัลลีล ความสูงของพีค และพีคปลอม

ผลการศึกษาพบว่าจำนวนอัลลีลเฉลี่ยที่ได้รับจากการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระด้วยวิธีการตัดวัสดุขนาดเล็กเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตรงและการใช้ไม้พันสำลีชนิดคอตตอนร่วมกับสารละลายต่าง ๆมีความแตกต่างกัน โดยจำนวนอัลลีลเฉลี่ยที่ได้รับจากการทดลองอยู่ในช่วง 5.60 – 25.80 อัลลีล (ดังแสดงในรูปที่ 17ก) และความสูงของพีคอยู่ในช่วง 195.19 – 898.34 RFU (ดังแสดงในรูปที่ 17ข) ทั้งนี้พบว่าวิธีการใช้ไม้พันสำลีชนิดคอตตอนจุ่มสารละลาย PBS (CS_PBS) ให้ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอคุณภาพดีที่สุดและมีจำนวนอัลลีลที่ได้รับเฉลี่ยเท่ากับ 25.80 อัลลีล และมีค่าความสูงของพีคอัลลีลที่ได้รับเฉลี่ย 898.34 RFU ซึ่งวิธีการดังกล่าวนั้นมีโอกาสที่จะให้จำนวนอัลลีลเฉลี่ยสูงกว่าวิธีการใช้ไม้พันสำลีชนิดไนลอนจุ่มสารละลาย triton X-100 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (NS_TritonX) สูงถึงร้อยละ 99.6 ในขณะที่วิธีนี้ให้จำนวนอัลลีลเฉลี่ยสูงกว่าวิธีการใช้ไม้พันสำลีชนิดเดียวกันที่จุ่มในสารละลาย triton X-100 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (CS_TritonX), น้ำกลั่นสะอาดปราศจากเชื้อ (CS_DI) และวิธีการตัดวัสดุขนาดเล็กเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตรง (Cutting) เท่ากับร้อยละ 79.4, 65.2 และ 61.7 ตามลำดับ



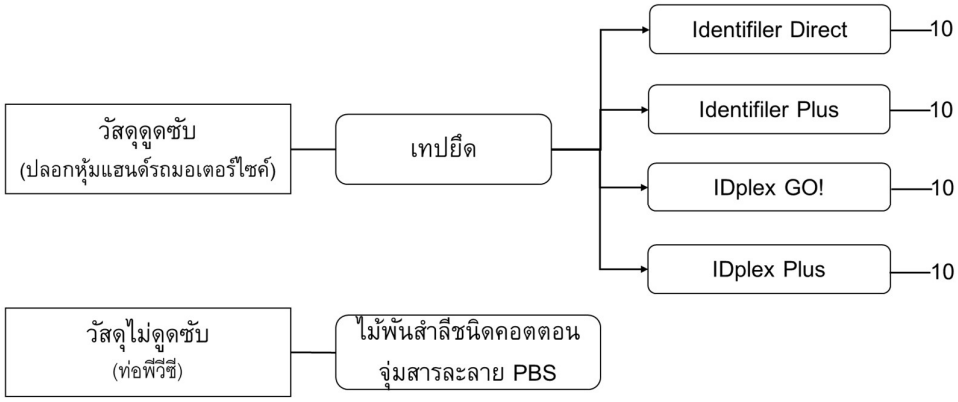
คำย่อ	คำอธิบาย
CS_DI	ไม้พันสำลีชนิดคอตตอนจุ่มน้ำกลั่นสะอาดปราศจากเชื้อ
CS_PBS	ไม้พันสำลีชนิดคอตตอนจุ่มสารละลาย PBS
CS_TritonX	ไม้พันสำลีชนิดคอตตอนจุ่มสารละลาย Triton-X
NS_DI	ไม้พันสำลีชนิดไนลอนจุ่มน้ำกลั่นสะอาดปราศจากเชื้อ
NS_PBS	ไม้พันสำลีชนิดไนลอนจุ่มสารละลาย PBS
NS_TritonX	ไม้พันสำลีชนิดไนลอนจุ่มสารละลาย Triton-X
Cutting	วิธีการตัดวัสดุขนาดเล็กเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตรง

รูปที่ 17 จำนวนอัลลีล (ก) และความสูงของพีคเฉลี่ย (ข) ที่ได้รับจากการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพวิธีการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุอื่นๆ (เทปกาวพันสายไฟ) ร่วมกับการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์ โดยจุดที่ปรากฏจะแสดงถึงจำนวนอัลลีลทั้งหมดและความสูงของแต่ละพีคที่ได้รับในหนึ่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และแถบเส้นตรงแสดงถึงค่าเฉลี่ยข้อมูล (Solid color lines) และกล่องสี่เหลี่ยม (Solid color blocks) แสดงค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ของ Bayesian credible intervals

จากผลการศึกษาข้างต้นทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่าวิธีการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระที่มีประสิทธิภาพที่สุดนั้นขึ้นอยู่กับประเภทของวัสดุหลักฐาน สำหรับวัสดุหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องที่ไม่ดูดซับและเทปกาวพันสายไฟนั้นควรเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระด้วยไม้พันสำลีชนิดคอตตอนร่วมกับสารละลาย PBS ในขณะที่การเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุดูดซับควรใช้วิธีเทปยึดเพื่อเพิ่มโอกาสในการได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดี

3.3 การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดน้ำยาทางการค้าสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องด้วยเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดน้ำยาทางการค้าจำนวน 4 ชุด ที่ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณและการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเซลล์และดีเอ็นเออิสระด้วยกระบวนการไดเร็คพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นจากงานวิจัยนี้ ชุดน้ำยาทางการค้าสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อระบุบุคคลดังกล่าว ได้แก่ ชุดน้ำยา AmpFℓSTR® Identifiler® Plus PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific, USA), ชุดน้ำยา AmpFℓSTR® Identifiler® Direct PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific, USA), ชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex® Plus Kit (Qiagen, UK) และ ชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex® GO! Kit (Qiagen, UK) เหล่านี้เป็นชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่นิยมใช้โดยทั่วไปในห้องปฏิบัติการนิติพันธุศาสตร์ทั่วโลกรวมถึงประเทศไทย ทั้งนี้ทำการทดลองโดยกำหนดให้อาสาสมัครจำนวน 10 คน ใช้มือสัมผัสบนวัสดุ 2 ชนิด ได้แก่ ปลอกหุ้มแฮนด์รถมอเตอร์ไซค์และท่อพีวีซี ซึ่งเป็นตัวแทนวัสดุหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องแบบดูดซับและแบบไม่ดูดซับ ตามลำดับ จากนั้นเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุท่อพีวีซีด้วยวิธีการใช้ไม้พันสำลีชนิดคอตตอนร่วมกับสารละลาย PBS และเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระจากวัสดุปลอกหุ้มแฮนด์รถมอเตอร์ไซค์ด้วยวิธีเทปยึด ซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดจากผลการทดลองข้างต้นร่วมกับการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเซลล์และดีเอ็นเออิสระด้วยโพรโทคอลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากวัสดุโดยตรง (Direct amplification protocol) ทำการทดลอง 10 ซ้ำ ในแต่ละชุดการทดลองและเปรียบเทียบคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ จำนวนอัลลีล ความสูงของพีค และพีคปลอม ทั้งนี้แผนผังภาพรวมการทดลองนี้แสดงดังรูปที่ 18



รูปที่ 18 แผนการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 4 ชุด ได้แก่ ชุดน้ำยา Identifiler® Plus, ชุดน้ำยา Identifiler® Direct, ชุดน้ำยา IDplex® Plus และชุดน้ำยา IDplex® GO! สำหรับการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุหลักฐานระเบิดแสวงเครื่อง (ปลอกหุ้มแฮนด์รถมอเตอร์ไซค์และท่อพีวีซี) ด้วยเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์

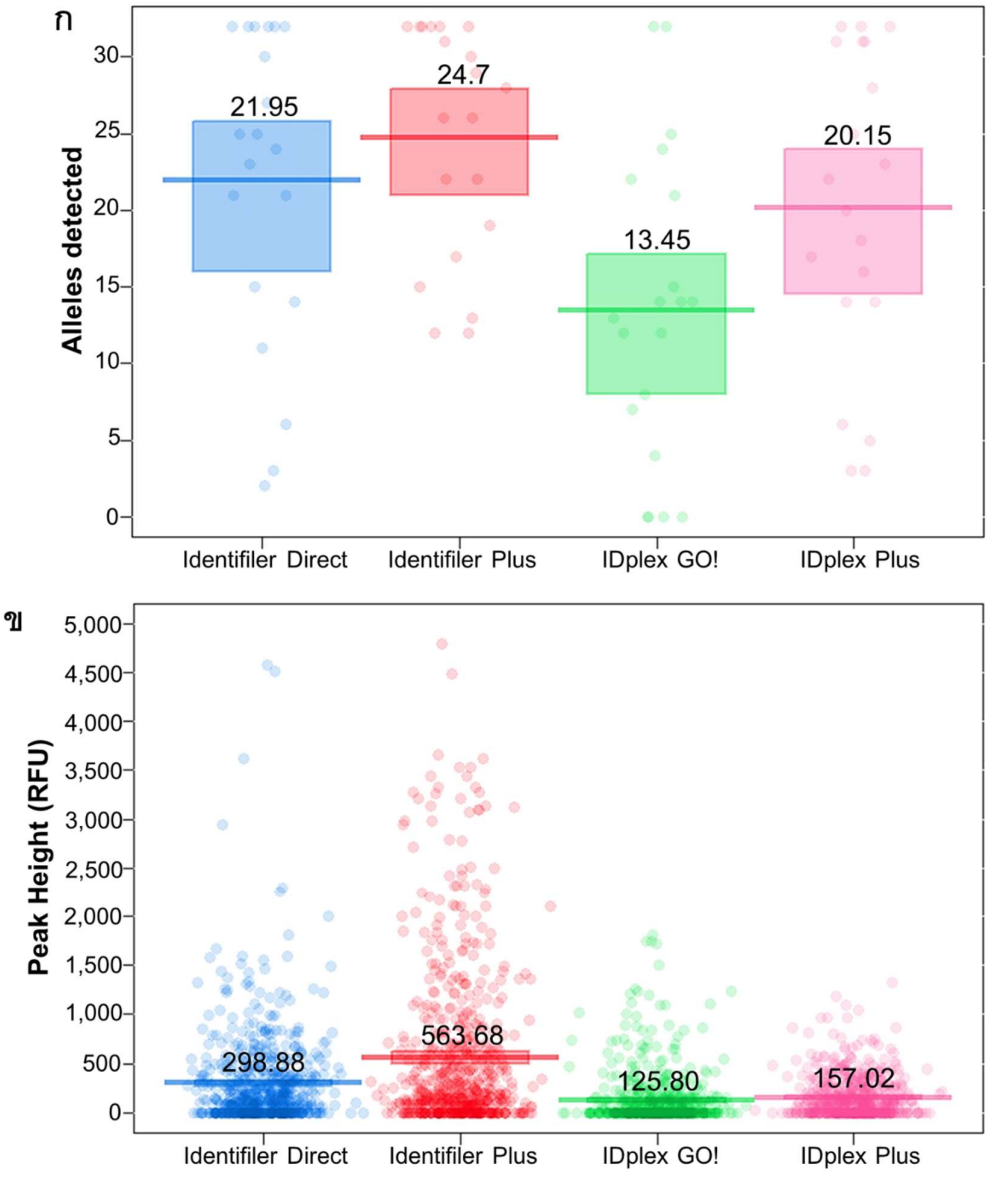
3.3.1 จำนวนอัลลีลและความสูงของพีคเฉลี่ย

ผลการศึกษาพบว่าจำนวนอัลลีลเฉลี่ยที่ได้รับจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยาทั้ง 4 ชุดที่ศึกษามีความแตกต่างกัน โดยชุดน้ำยา Identifiler® Plus ให้จำนวนอัลลีลเฉลี่ยสูงที่สุดคือ 24.7 อัลลีล จากจำนวนอัลลีลทั้งหมด 32 อัลลีล (ดังแสดงในรูปที่ 19ก) ในทำนองเดียวกันยังพบว่าความสูงของพีคอัลลีลที่ได้รับจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยา Identifiler® Plus นี้มีค่ามากกว่าทั้งสามชุดน้ำยาที่ศึกษาเช่นกัน โดยค่าความสูงของพีคอัลลีลที่ได้รับเท่ากับ 563.68 RFU (Relative fluorescent unit) (ดังแสดงในรูปที่ 19ข) ชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ให้จำนวนอัลลีลเฉลี่ยรองลงมาคือชุดน้ำยา Identifiler® Direct และ ชุดน้ำยา IDplex® Plus ซึ่งจำนวนอัลลีลที่ได้รับเฉลี่ยเท่ากับ 21.95 และ 20.15 อัลลีล ตามลำดับ และมีค่าความสูงของพีคอัลลีลที่ได้รับเฉลี่ยเท่ากับ 298.88 และ 157.02 RFU ตามลำดับ ทั้งนี้พบว่าโอกาสที่ชุดน้ำยา Identifiler® Plus จะให้ค่าจำนวนอัลลีลเฉลี่ยสูงกว่าชุดน้ำยา IDplex® GO! มากกว่าร้อยละ 99.9999 ในขณะที่โอกาสที่ชุดน้ำยา Identifiler® Plus จะให้จำนวนอัลลีลเฉลี่ยสูงกว่าชุดน้ำยา IDplex® Plus และ Identifiler® Direct เท่ากับร้อยละ 92.80 และ 81.4 ตามลำดับ

สาเหตุที่ชุดน้ำยา Identifiler® Plus มีประสิทธิภาพสูงสุดในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นในการศึกษานี้ อาจเนื่องจากชุดน้ำยาดังกล่าวได้มี

การปรับปรุงพีซีอาร์บัฟเฟอร์และเอ็นไซม์ดีเอ็นเอพอลีเมอร์เรสเพื่อให้มีความไววิเคราะห์เพิ่มขึ้นและทนทานต่อตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์มากกว่าชุดน้ำยารุ่นก่อน [63] จึงทำให้มีประสิทธิภาพสูงในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างโดยตรงที่ไม่ผ่านการสกัดดีเอ็นเอ นอกจากนี้ยังพบว่าสภาวะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของชุดน้ำยา Identifiler® Plus อาจส่งเสริมประสิทธิภาพของชุดน้ำยาดังกล่าว โดยพบว่าระยะเวลาในการให้ความร้อนช่วงเริ่มต้น (Initial denaturation) ของชุดน้ำยาดังกล่าวใช้เวลานานถึง 11 นาที [63] ในขณะที่ชุดน้ำยาอื่นๆใช้เวลาสำหรับขั้นตอนดังกล่าวเพียง 5 - 8 นาทีเท่านั้น การให้ความร้อนก่อนเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นระยะเวลานานกว่าอาจทำให้เซลล์ของตัวอย่างที่ต้องการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแตกเพิ่มมากขึ้น เป็นผลให้ดีเอ็นเอถูกปลดปล่อยออกจากเซลล์และรวมอยู่ในหลอดทดลองมากขึ้น จึงเป็นผลให้ได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีสูงขึ้นเช่นกัน

นอกจากนี้ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าชุดน้ำยา IDplex® GO! มีประสิทธิภาพต่ำสุดในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยโพรโทคอลไดเร็คพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้น (ดังแสดงในรูปที่ 19ก) ทั้งนี้อาจเนื่องจากชุดน้ำยา IDplex® GO! มีปริมาณสารละลายทั้งหมดในหลอดพีซีอาร์ (Total volume) มากกว่าชุดน้ำยาอื่นๆ กล่าวคือ ปริมาตรสารละลายทั้งหมดในปฏิกิริยาของชุดน้ำยา IDplex® GO! มีปริมาตร 13.5 ไมโครลิตร ซึ่งมีปริมาตรสูงกว่าชุดน้ำยาอื่นๆที่ทำการศึกษาร้อยละ 8 [63-66] ดังนั้นความเข้มข้นสุดท้ายของดีเอ็นเอ (DNA final concentration) ในหลอดพีซีอาร์ของชุดน้ำยา IDplex® GO! จึงมีค่าน้อยที่สุด จึงอาจเป็นสาเหตุให้ชุดการทดลองดังกล่าวมีผลคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอต่ำที่สุด



รูปที่ 19 จำนวนอัลลีล (ก) และความสูงของพีคเฉลี่ย (ข) จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับจากโพรโทคอลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์ด้วยชุดน้ำยาต่างๆ จากการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุหลักฐานระเบิดแสวงเครื่อง โดยจุดที่ปรากฏจะแสดงถึงจำนวนอัลลีลทั้งหมดและความสูงของแต่ละพีคที่ได้รับในหนึ่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และแถบเส้นตรงแสดงถึงค่าเฉลี่ยข้อมูล (Solid color lines) และกล่องสี่เหลี่ยม (Solid color blocks) แสดงค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ของ Bayesian credible intervals

3.3.2 ผลพีคปลอมที่พบบนลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (Artifacts)

เมื่อศึกษาผลพีคปลอมบนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับจากงานวิจัยนี้จำนวนทั้งหมด 104 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ซึ่งมาจากตัวอย่างเซลล์และดีเอ็นเออิสระ 80 ตัวอย่าง ชุดควบคุมลบและชุดควบคุมบวกในปฏิกิริยาพีซีอาร์ทั้งหมด 24 ตัวอย่าง พบผลพีคปลอมทั้งหมด 68 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ คิดเป็นร้อยละ 65.38 โดยผลพีคปลอมที่พบในการศึกษานี้แบ่งเป็น 5 ประเภท คือ ดรอปอินส์ (Drop-ins) สตัตเตอร์ (Stutter) ดายบล็อบ (Dye blobs) สปลิตพีค (Split peak) และพูลอัพ (Pull up) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

ผลพีคปลอมดรอปอินส์ (Drop-ins) คือการปรากฏอัลลีลที่ไม่ใช่อัลลีลที่แท้จริงของอาสาสมัคร ซึ่งอาจมาจากการปนเปื้อนดีเอ็นเอของบุคคลอื่นบนมือของอาสาสมัครหรือบนวัสดุอุปกรณ์ที่ทำการทดลอง [67] โดยผลการศึกษาพบพีคปลอมดรอปอินส์จำนวนทั้งหมด 50 ใน 104 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ คิดเป็นร้อยละ 48.08 ซึ่งเป็นผลพีคปลอมที่พบมากที่สุดในการศึกษานี้ อาจเนื่องจากงานวิจัยนี้ทำการศึกษาเซลล์และดีเอ็นเออิสระซึ่งง่ายต่อการปนเปื้อนดีเอ็นเอจากสิ่งแวดล้อมหรือผู้ไม่เกี่ยวข้อง รวมทั้งใช้เทคนิคไดเร็คพีซีอาร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไววิเคราะห์สูงจึงเป็นสาเหตุให้พบผลพีคปลอมดังกล่าวในสัดส่วนมากที่สุด ทั้งนี้ตัวอย่างพีคปลอมดรอปอินส์ที่พบแสดงดังรูปที่ 20

รูปที่ 20 แสดงตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ปรากฏผลพีคปลอมดรอปอินส์ (Drop-ins)

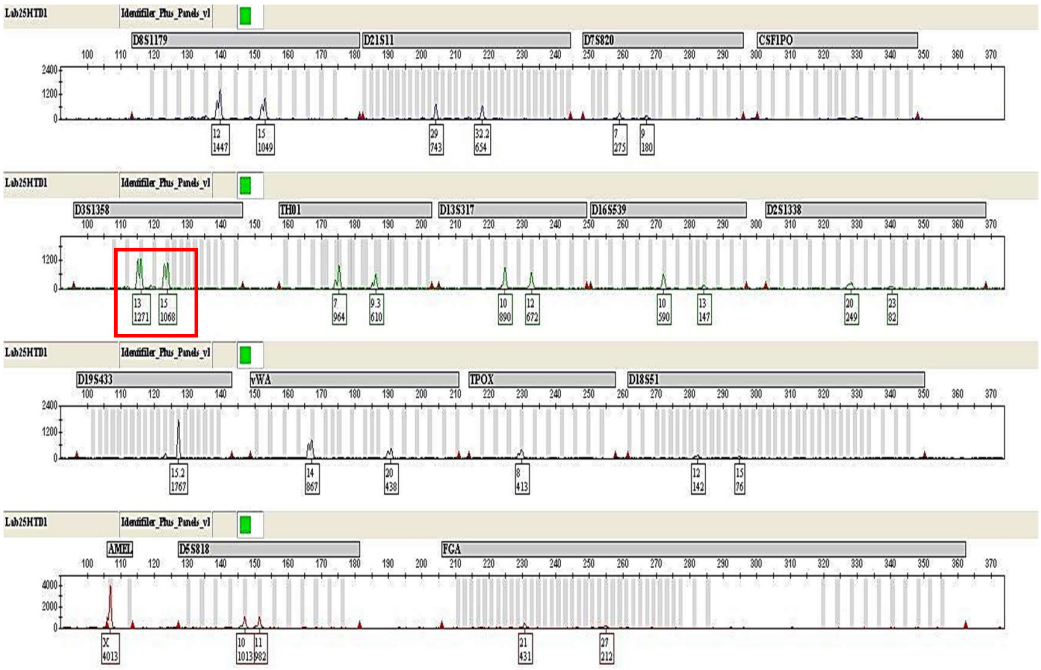
ผลพีคปลอมสตัตเตอร์ (Stutter) คือพีคอัลลีลที่มีหน่วยซ้ำมากกว่าหรือน้อยกว่าอัลลีลเป้าหมาย 1 หน่วยซ้ำ ซึ่งเกิดจากการเลื่อนหลุดของสายดีเอ็นเอต้นแบบหรือสายดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นในระหว่างกระบวนการพีซีอาร์ ทำให้เกิดการเพิ่มหรือลดจำนวนหน่วยซ้ำของดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ ทั้งนี้พีคปลอมสตัตเตอร์จะมีความสูงน้อยกว่าร้อยละ 15 - 20 ของความสูงพีคอัลลีลเป้าหมาย [67-69] ผลการศึกษาพบพีคปลอมสตัตเตอร์ทั้งหมด 44 ใน 104 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ คิดเป็นร้อยละ 42.31 ตัวอย่างพีคปลอมสตัตเตอร์แสดงดังรูปที่ 21

รูปที่ 21 แสดงตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ปรากฏผลพีคปลอมสตัตเตอร์ (Stutter)

ผลพีคปลอมดายบล็อบ (Dye blobs) คือพีคลักษณะฐานกว้างปลายยอดโค้งมนที่เกิดจากการหลุดออกของสีฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescent dye) ที่ติดอยู่กับไพรเมอร์ [70, 71] ผลการศึกษาพบพีคปลอมดายบล็อบทั้งหมด 19 ใน 104 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ คิดเป็นร้อยละ 18.27 ทั้งนี้ตัวอย่างพีคปลอมดายบล็อบแสดงดังรูปที่ 22

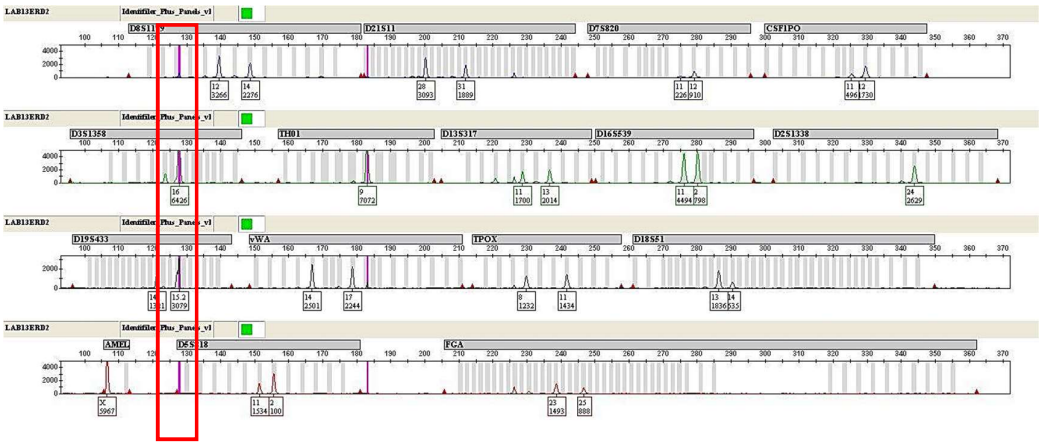
รูปที่ 22 แสดงตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ปรากฏผลพีคปลอมดายบล็อบ (Dye blobs)

ผลพีคปลอมสปลิตพีค (Split peak) คือพีคที่มีลักษณะปลายยอดแตกออก เกิดจากเอ็นไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสทำงานไม่เต็มประสิทธิภาพ หรือเกิดจากปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมากเกินไป [72] ผลการศึกษาพบพีคปลอมสปลิตพีคทั้งหมด 14 ใน 104 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ คิดเป็นร้อยละ 13.46 ทั้งนี้ตัวอย่างพีคปลอมสปลิตพีคแสดงดังรูปที่ 23



รูปที่ 23 แสดงตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ปรากฏผลพีคปลอมสปลิตพีค (Split peak)

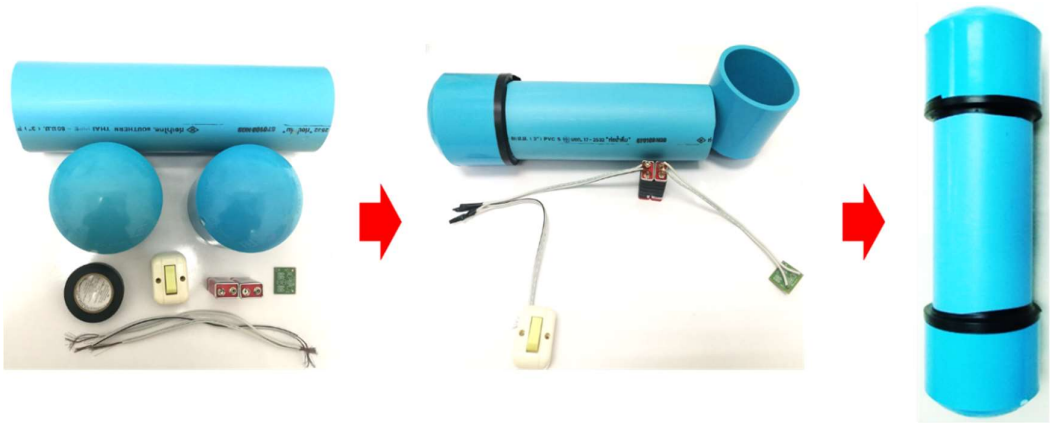
ผลพีคปลอมพูลอัพ (Pull up) คือแถบสีชมพูที่ปรากฏในลายพิมดีเอ็นเอ เกิดจากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ตรวจวิเคราะห์สูงเกินค่าที่วัดได้ [33] ผลการศึกษาพบพีคปลอมพูลอัพทั้งหมด 4 ใน 104 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ คิดเป็นร้อยละ 3.85 ทั้งนี้ตัวอย่างพีคปลอมพูลอัพแสดงดังรูปที่ 24



รูปที่ 24 แสดงตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ปรากฏผลผลพีคปลอมพูลอัพ (Pull up)

3.4 การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระและกระบวนการที่พัฒนาขึ้นกับวิธีมาตรฐานในการตรวจพิสูจน์เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนระเบิดแสวงเครื่องจำลอง (Mock casework)

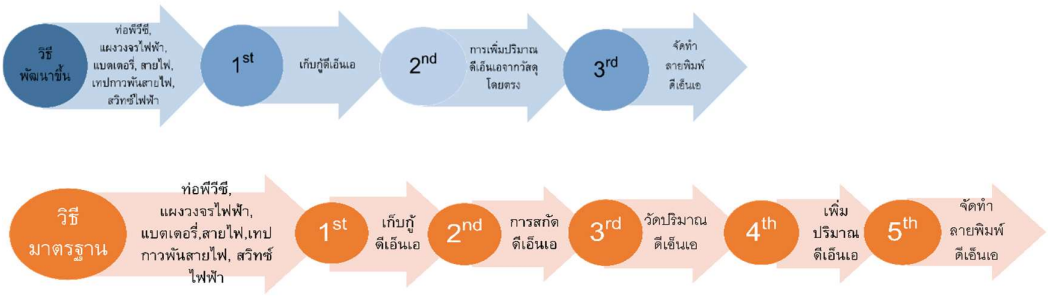
การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทวนสอบวิธีการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระและกระบวนการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานของตำรวจพิสูจน์หลักฐานในการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องจำลอง โดยให้อาสาสมัครจำนวน 5 คน ประกอบระเบิดแสวงเครื่องคนละ 2 ชุด (รวมระเบิดแสวงเครื่องจำลองทั้งหมด 10 ชุด) โดยวัสดุที่เลือกใช้เป็นส่วนประกอบของระเบิดแสวงเครื่องจำลองนั้นเป็นวัสดุที่ตรวจพบได้บ่อยในสถานที่เกิดเหตุคดีก่อการร้ายจังหวัดชายแดนใต้ซึ่งแบ่งเป็น 6 ชนิด ได้แก่ ท่อพีวีซี แผงวงจรไฟฟ้า แบตเตอรี่ สายไฟ เทปกาวพันสายไฟและสวิทซ์ไฟ ดังแสดงในรูปที่ 25



รูปที่ 25 ตัวอย่างระเบิดแสวงเครื่องจำลองประกอบด้วยวัสดุท่อพีวีซี แผงวงจรไฟฟ้า แบตเตอรี่ สายไฟ เทปกาวพันสายไฟและสวิทซ์ไฟ

ทั้งนี้ระเบิดแสวงเครื่อง 5 ชุดแรกจากอาสาสมัคร 5 คน จะนำมาเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระด้วยวิธีที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดตามผลการทดลองในข้อ 2 กล่าวคือ ใช้วิธีเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระด้วยไม้พันสำลีชนิดคอตตอนร่วมกับสารละลาย PBS สำหรับวัสดุไม่ดูดซับและเทปกาวพันสายไฟ ในขณะที่วัสดุดูดซับนั้นจะใช้วิธีการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระด้วยเทปยึด จากนั้นตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยโพรโทคอลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากวัสดุโดยตรง (Direct amplification protocol) ด้วยชุดน้ำยา AmpF*l*STR® Identifiler® Plus PCR

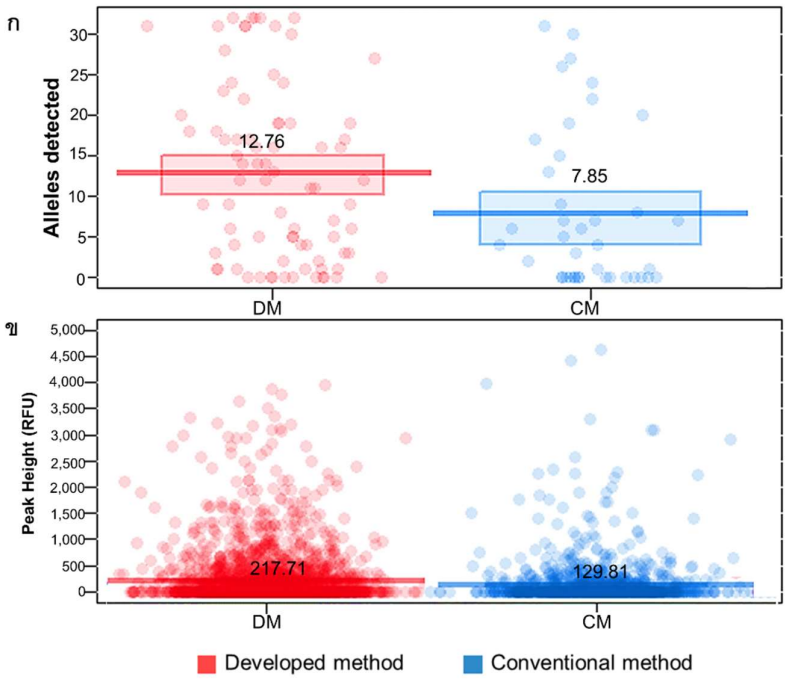
Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) ในขณะที่ระเบิดแสวงเครื่องจำลองอีก 5 ชุด ที่เหลือจะทำการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระด้วยวิธีมาตรฐานของศูนย์พิสูจน์หลักฐาน โดยให้เจ้าหน้าที่ของกลุ่มงานตรวจชีววิทยาและดีเอ็นเอศูนย์พิสูจน์หลักฐาน 10 ซึ่งเป็นผู้ที่มีความเชี่ยวชาญในการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอจากหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องเป็นผู้ดำเนินการทดลองในส่วนนี้ ทั้งนี้จะใช้วิธีดับเบิลสวอป (Double swab) หรือใช้ไม้พันสำลีชนิดคอตตอนร่วมกับน้ำกลั่นสะอาดปราศจากเชื้อแบบเปียกและแห้งในการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระก่อนนำตัวอย่างเข้าสู่กระบวนการมาตรฐาน ซึ่งประกอบด้วย การสกัดดีเอ็นเอจากไม้พันสำลี การวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคแคปิลลารีอิเลคโทรโฟลิซิส (ดังแสดงในรูปที่ 26) จากนั้นเปรียบเทียบผลคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับจากทั้งสองกระบวนการ โดยวัดค่าจากจากพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ จำนวนอัลลีล ความสูงของพีค และพีคปลอม เป็นต้น



รูปที่ 26 แผนการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระและกระบวนการที่พัฒนาขึ้นกับวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอบนระเบิดแสวงเครื่องจำลอง

ผลการศึกษาพบว่าจำนวนอัลลีลเฉลี่ยที่ได้รับจากการเก็บกู้และตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเซลล์และดีเอ็นเออิสระบนหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องจำลองด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นและวิธีมาตรฐานมีความแตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนอัลลีลอ้างอิงของอาสาสมัคร โดยวิธีการเก็บกู้และกระบวนการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นให้จำนวนอัลลีลเฉลี่ยเท่ากับ 12.76 อัลลีล (ดังแสดงในรูปที่ 27ก) ซึ่งมากกว่าวิธีมาตรฐานของตำรวจพิสูจน์หลักฐานที่ได้รับจำนวนอัลลีลเฉลี่ยเพียง 7.85 อัลลีล ในทำนองเดียวกันยังพบว่าความสูงของพีคอัลลีลที่ได้รับจากการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นมีค่า

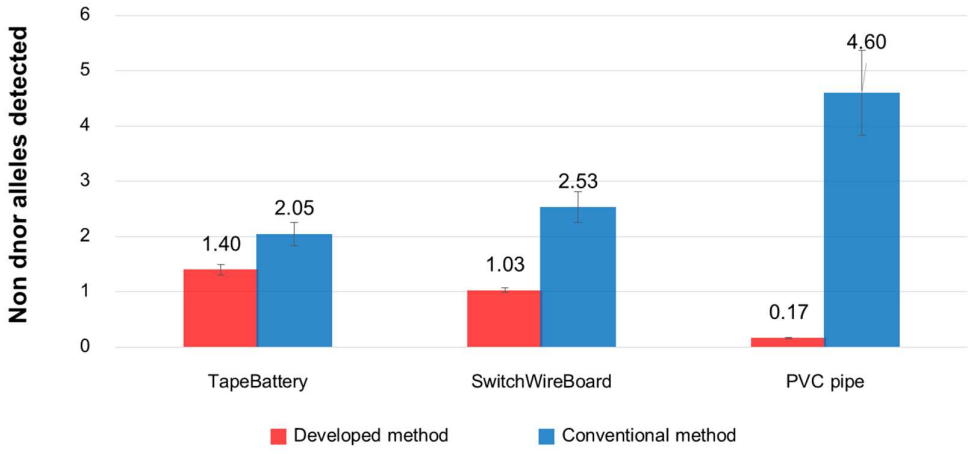
มากกว่าวิธีมาตรฐานเช่นกัน โดยค่าความสูงของพีคอัลลีลเฉลี่ยเท่ากับ 217.71 และ 129.81 RFU สำหรับวิธีที่พัฒนาขึ้นและวิธีมาตรฐาน ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 27ข ทั้งนี้พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีโอกาสให้จำนวนอัลลีลเฉลี่ยสูงกว่าอีกวิธีหนึ่งมากถึงร้อยละ 99.3 ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพในเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องสูงกว่าวิธีมาตรฐานของศูนย์พิสูจน์หลักฐาน อาจเนื่องจาก 1) วิธีที่พัฒนาขึ้นใช้เทคนิคไดเร็คพีซีอาร์ซึ่งลดการสูญเสียดีเอ็นเอจากกระบวนการสกัดดีเอ็นเอได้ [16-18] ในขณะที่วิธีมาตรฐานนั้นยังคงใช้กระบวนการสกัดดีเอ็นเอ 2) วิธีที่พัฒนาขึ้นใช้ไม้พันสำลีชนิดคอตตอนร่วมกับสารละลาย PBS ซึ่งสารละลาย PBS นี้ช่วยรักษา pH ของสารละลาย และลดการสูญเสียดีเอ็นเอโดยช่วยคงสภาพเซลล์ไม่ให้แตกทำให้ดีเอ็นเอคงสภาพอยู่ในเซลล์และไม่ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ดีเอ็นเอส (DNase) [61, 62] ในขณะที่วิธีมาตรฐานใช้น้ำกลั่นสะอาดปราศจากเชื้อให้ความชุ่มชื้นไม้พันสำลี จึงอาจทำให้เซลล์แตกและเกิดการสูญเสียดีเอ็นเอได้ 3) วิธีที่พัฒนาขึ้นทำการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระโดยให้ส่วนปลายของไม้พันสำลีตั้งฉากกับวัสดุทดลอง และเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระโดยใช้ส่วนปลายไม้พันสำลีนี้เพียงตำแหน่งเดียว จึงสามารถระบุตำแหน่งของเซลล์และดีเอ็นเออิสระบนไม้พันสำลีได้และเลือกตัดเฉพาะส่วนปลายนี้ไปตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอต่อไปจึงเพิ่มโอกาสในการได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอคุณภาพดีได้ อย่างไรก็ตามวิธีมาตรฐานใช้การสุ่มเก็บเซลล์และดีเอ็นเออิสระไปทั่วบริเวณวัสดุและเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระจากทุกด้านของไม้พันสำลี จึงอาจทำให้เกิดการสูญเสียดีเอ็นเอในขั้นตอนการเก็บกู้ได้



รูปที่ 27 จำนวนอัลลีล (ก) และความสูงของพีคเฉลี่ย (ข) จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับจากการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระและกระบวนการที่พัฒนาขึ้นกับวิธีมาตรฐานในการตรวจพิสูจน์เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนระเบิดแสวงเครื่องจำลอง (Mock casework) โดยจุดที่ปรากฏจะแสดงถึงจำนวนอัลลีลทั้งหมดและความสูงของแต่ละพีคที่ได้รับในหนึ่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และแถบเส้นตรงแสดงถึงค่าเฉลี่ยข้อมูล (Solid color lines) และกล่องสี่เหลี่ยม (Solid color blocks) แสดงค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ของ Bayesian credible intervals

อย่างไรก็ตามลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับจากวิธีการทั้งสองที่ทำการศึกษามีลักษณะเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอแบบผสม (Mixture profile) หรือปรากฏดีเอ็นเอของมนุษย์มากกว่าหนึ่งคน นั่นคือ ปรากฏอัลลีลเป้าหมายของอาสาสมัคร และอัลลีลปนเปื้อนจากมนุษย์คนอื่นที่อาจติดอยู่บนวัสดุทดลองหรือจาก Secondary transfer บนมือของอาสาสมัคร เมื่อวิเคราะห์จำนวนอัลลีลที่ไม่ใช่ของอาสาสมัคร (Non-donor allele) จากทั้งสองวิธี พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นให้จำนวนอัลลีลที่ไม่ใช่ของอาสาสมัครน้อยกว่าวิธีมาตรฐานของตำรวจพิสูจน์หลักฐาน กล่าวคือ สามารถลดจำนวนอัลลีลปนเปื้อนที่ไม่เกี่ยวข้องได้มากกว่านั่นเอง (ดังแสดงในรูปที่ 28) ทั้งนี้อาจเนื่องจากวิธีที่พัฒนาขึ้นได้แบ่งส่วนวัสดุทดลองที่มีขนาดใหญ่ เช่น ท่อพีวีซี ออกเป็น 6 ส่วนก่อนทำการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระโดยใช้ไม้พันสำลี 1 ก้านต่อพื้นที่ 1 ส่วนของวัสดุ

ตามวิธีการของ Ostojic และ Wurmbach [73] ผลการศึกษาพบว่าสามารถลดจำนวนอัลลีลที่ไม่ใช่ของอาสาสมัครหรือ Non-donor allele ได้



รูปที่ 28 จำนวนอัลลีลที่ไม่ใช่ของอาสาสมัครเฉลี่ย (Non-donor allele) จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับจากการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระและกระบวนการที่พัฒนาขึ้นกับวิธีมาตรฐานในการตรวจพิสูจน์เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนระเบิดแสวงเครื่องจำลอง (Mock casework)

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้สามารถพัฒนากระบวนการตรวจพิสูจน์เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องด้วยเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์ได้สำเร็จ โดยอาศัยโพรโทคอลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากวัสดุโดยตรง (Direct amplification protocol) ทั้งนี้วิธีการเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระที่มีประสิทธิภาพนั้นขึ้นอยู่กับประเภทของวัสดุหลักฐาน โดยวัสดุที่ไม่ดูดซับและเทปกาวพันสายไฟนั้นควรเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระด้วยไม้พันสำลีชนิดคอตตอนร่วมกับสารละลาย PBS ในขณะที่การเก็บกู้เซลล์และดีเอ็นเออิสระบนวัสดุดูดซับควรใช้วิธีเทปยึด นอกจากนี้พบว่าชุดน้ำยาทางการค้าสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่งผลต่อประสิทธิภาพของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับจากกระบวนการที่พัฒนาขึ้นเช่นกัน โดยชุดน้ำยา AmpFℓSTR® Identifiler® Plus PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) ให้ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพสูงสุด นอกจากนี้กระบวนการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้สามารถเพิ่มอัตราความสำเร็จในการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องจำลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานของศูนย์พิสูจน์หลักฐานตำรวจ สำนักงานตำรวจแห่งชาติ ดังนั้นผลผลิตจากงานวิจัยนี้จึงอาจเป็นประโยชน์ต่อหน่วยงานความมั่นคงทั้งภาครัฐและเอกชนที่เกี่ยวข้อง เนื่องจากสามารถลดระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ รวมทั้งสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจพิสูจน์เซลล์และดีเอ็นเออิสระจากหลักฐานระเบิดแสวงเครื่องได้ เหล่านี้อาจช่วยในการเป็นส่วนหนึ่งที่นำความสงบสุขกลับคืนสู่พื้นที่จังหวัดชายแดนภาคใต้ ลดความแบ่งแยกของประชากรในพื้นที่และทำให้เกิดความเข้าใจและเชื่อมั่นในการทำงานของเจ้าหน้าที่ภาครัฐมากขึ้น

บรรณานุกรม

1. The Institute for Economics and Peace. Global Terrorism Index 2017. 2017. (55): p. 10.

2. สำนักข่าวอิศรา. สถิติ 14 ปี เหตุการณ์ความไม่สงบ 3 จังหวัดชายแดนภาคใต้. 2561. [Accessed 2018 September, 2]; Available from: http://region6.prd.go.th/ewt_news.php?nid=16734&filename=index.

3. วราวุธ ประสานสิน. ระเบิดแสวงเครื่อง (Improvised Explosive Devices) IED ตอนที่ 2 การแบ่งประเภทของระเบิดแสวงเครื่อง. 2558. [Accessed 2017 July, 14]; Available from: http://mre-tmac.blogspot.com/2015/06/improvised-explosivedevicesied2.html.

4. Phetpeng, S., Kitpipit, T. and Thanakiatkrai, P. Systematic study for DNA recovery and profiling from common IED substrates: From laboratory to casework. *Forensic Sci Int Genet.* 2015. 17: p. 53-60.

5. Van Oorschot, R.A.H., Ballantyne, K.N. and Mitchell, R.J. Forensic trace DNA: a review. *Investig Genet*. 2010. 1(1): p. 1-14.

6. Linke, D., Burgess, R.R. and Deutscher, M.P. Chapter 34 Detergents: An Overview. *Methods Enzymol*. 2009. p. 603-617.

7. Williamson, A.L. Touch DNA: Forensic Collection and Application to Investigations. *J Assoc Crime Scene Reconstr*. 2012. 18(1). p. 1-6.

8. Verheij, S., Harteveld, J. and Sijen, T. A protocol for direct and rapid multiplex PCR amplification on forensically relevant samples. *Forensic Sci Int Genet*. 2012. 6(2): p. 167-175.

9. Ladd, C., Adamowicz, M.S., Bourke, M.T., Scherczinger, C.A. and Lee, H.C. A systematic analysis of secondary DNA transfer. *J Forensic Sci*. 1999. 44(6): p. 1270-1272.

10. Thomasma, S.M. and Foran, D.R. The influence of swabbing solutions on DNA recovery from touch samples. *J Forensic Sci*. 2013. 58(2): p. 465-469.

11. Kirgiz, I.A. and Calloway, C. Increased recovery of touch DNA evidence using FTA paper compared to conventional collection methods. *J Forensic Leg Med*. 2017. 47: p. 9-15.

12. Berti, A., Barni, F., Virgili, A., Colozza, C., Maiorino, F. and Tocca, M. The recovery of DNA profiles from saliva and touch evidences after postal bomb explosion. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser*. 2011. 3(1): p. 471-472.

13. A simplified guide to DNA evidence. 2013. [Accessed 2018 July, 20]; Available from: http://www.forensicsciencesimplified.org/dna/how.html.

14. Foran, D.R., Gehring, M.E. and Stallworth, S.E. The recovery and analysis of mitochondrial DNA from exploded pipe bombs. *J Forensic Sci.* 2009. 54(1): p. 90-94.

15. Hoffmann, S.G., Stallworth, S.E. and Foran, D.R. Investigative studies into the recovery of DNA from improvised explosive device containers. *J Forensic Sci*. 2012. 57(3): p. 602-609.

16. Van Oorschot, R.A.H., Phelan, D.G., Furlong, S., Scarfo, G.M., Holding, N.L. and Cummins, M.J. Are you collecting all the available DNA from touched objects?. *Int Cong Series*. 2003. 1239: p. 803-807.

17. Ottens, R. Templeton, J., Paradiso, V., Taylor, D., Abarno, D., and Linacre, A. Application of direct PCR in forensic casework. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser*. 2013. 4(1): p. 47-48.

18. Swaran, Y.C. and Welch, L. A comparison between direct PCR and extraction to generate DNA profiles from samples retrieved from various substrates. *Forensic Sci Int Genet.* 2012. 6(3): p. 407-412.

19. Zon, L.I., Dorman D.M., and Orkin S.H., The polymerase chain reaction colony miniprep. *Biotechniques*. 1989. 7: p. 696-698.

20. Wang, D.Y., Chang, C.W., Oldroyd, N.J. and Lori, K.H. Direct amplification of STRs from blood or buccal cell samples. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser*. 2009. 2(1): p. 113-114.

21. Yang, Y.G., Kim, J.Y., Song, Y.H. and Kim, D.S. A novel buffer system, AnyDirect, can improve polymerase chain reaction from whole blood without DNA isolation. *Clin Chim Acta*. 2007. 380(1-2): p. 112-117.

22. Martin, B., Blackiea, R., Taylorab, D. and Linacrea, A. DNA profiles generated from a range of touched sample types. *Forensic Sci Int Genet*. 2018. 36: p. 13-19.

23. Gauusterer, C., Fichtinger, M. and Stein, C., Forensic DNA profiling of human bone material by direct PCR. [Accessed 2018 July, 20]; Available from: http:// archaeometrie.sbg.ac.at/downloads/MMXposter/MMXposter_gausterer.pdf.

24. สุชาต จันทรวงศ์. ประเภทของระเบิดแสวงเครื่อง. *การปฏิบัติการทุ่นระเบิดเพื่อมนุษยธรรมในประเทศไทย*. 2558. [Accessed 2018 June, 22]; Available from: http://iedthailand.blogspot.com/2015/06/ied.html.

25. ทีมข่าวอิศรา. 5 ปีไฟใต้ (2) รู้ทันระเบิดแสวงเครื่องและแนวโน้มบึ้มปี 52. *สำนักข่าวอิศรา*. 2552. [Accessed 2018 June, 22]; Available from: https://wbns.oas.psu.ac.th /shownews.php?news_id=74056.

26. Griffiths, A.J.F. DNA molecule, in Encyclopaedia Britannica. 2007. [Accessed 2018 July, 20]; Available from: http://media-2.web.britannica.com/eb-media/64/47 664-004-7088EE3D.jpg.

27. Meakin, G. and Jamieson, A. DNA transfer: review and implications for casework. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser*. 2013. 7(4): p. 434-443.

28. Aditya, S., Bhattacharyya, C.N. and Chaudhuri, K. Generating STR profile from "Touch DNA". *J Forensic Leg Med*. 2011. 18(7): p. 295-298.

29. Cristina, E., Stanciu, M., Katherine, P., Kwon,Y.J., Bustamante, E.E. and Ehrhardt, C.J. Optical characterization of epidermal cells and their relationship to DNA recovery from touch samples [version 1; referees: 2 approved]. *F1000Research*. 2015. 4: p. 1360.

30. Phipps, M. and Petricevic, S. The tendency of individuals to transfer DNA to handled items. *Forensic Sci Int.* 2007. 168(2-3): p. 162-168.

31. Daly, D.J., Murphy, C. and McDermott, S.D. The transfer of touch DNA from hands to glass, fabric and wood. *Forensic Sci Int Genet.* 2012. 6(1): p. 41-46.

32. Polymerase chain reaction. 2007. [Accessed 2018 July, 20]; Available from: https: //en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction.

33. Butler, J.M., Forensic DNA typing. 2 ed. 2005. Elsevier Academic Press: USA.

34. Hares, D.R. Twenty CODIS Core Loci, in Combined DNA Index System (CODIS) 2017. 2018. [Accessed 2018 October, 20]; Available from:https://www.fbi.gov/ services/laboratory/biometric-analysis/codis.

35. Colussi, A., Viegas, M., Beltramo, J. and Lojo, M. Efficiency of DNA IQ System® in recovering semen DNA from cotton swabs. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser*. 2009. 2(1): p. 87-88.

36. Kishore, R., Hardy, W.R., Anderson, V.J., Sanchez, N.A. and Buoncristiani, M.R. Optimization of DNA extraction from low-yield and degraded samples using the BioRobot EZ1 and BioRobot M48. *J Forensic Sci*. 2006. 51(5): p. 1055-1061.

37. Zhang, Z., Kermekchiev, M.B. and Barnes, W.M. Direct DNA amplification from crude clinical samples using a PCR enhancer cocktail and novel mutants of Taq. *J Mol Diagn*. 2010. 12(2): p. 152-161.

38. กองการศึกษาเคมีปฏิบัติ. Capillary Electrophoresis Theory and Background. 2002. [Accessed 2018 October, 20]; Available from: http://www.ceandcec.com/cetheory. htm.

39. Diagram of capillary electrophoresis system. *Wikipedia*. 2004. [Accessed 2018 October, 20]; Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Capillary_electrophoresis.

40. Grossman, P.D. and Soane, D.S. Experimental and theoretical studies of DNA separations by capillary electrophoresis in entangled polymer solutions. *Biopolymer*s. 1991. 31(10): p. 1221-1228.

41. Viovy, J.L. and Duke, T. DNA electrophoresis in polymer solutions: Ogston sieving, reptation and constraint release. *Electrophoresis*. 1993. 14(4): p. 322-329.

42. Bright, J.A. and Petricevic, S.F. Recovery of trace DNA and its application to DNA profiling of shoe insoles. *Forensic Sci Int*. 2004. 145(1): p. 7-12.

43. Esslinger, K.J., Siegel, J.A., Spillane, H. and Stallworth, S. Using STR analysis to detect human DNA from exploded pipe bomb devices. *J Forensic Sci*. 2004. 49(3): p. 481-484.

44. Pang, B.C. and Cheung, B.K. Double swab technique for collecting touched evidence. *Leg Med (Tokyo)*. 2007. 9(4): p. 181-184.

45. Tobe, S.S., Govan, J. and Welch, L.A. Tackling poaching: Recovery of human DNA profiles from deer remains. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser*. 2011. 3(1): p. 265-266.

46. Templeton, J., Ottens R., Paradiso, V., Handt, O., Taylor, D. and Linacre, A. Genetic profiling from challenging samples: Direct PCR of touch DNA. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser*. 2013. 4(1): p. 224-225.

47. Verdon, T.J., Mitchell, R.J. and Van Oorschot, R.A.H. Evaluation of tapelifting as a collection method for touch DNA. *Forensic Sci Int Genet*. 2014. 8(1): p. 179-186.

48. Liu, J.Y. PE-Swab direct STR amplification of forensic touch DNA samples. *J Forensic Sci*. 2015. 60(3): p. 693-701.

49. Tasker, E., LaRue, B., Beherec, C., Gangitano, D. and Hughes-Stamm, S. Analysis of DNA from post-blast pipe bomb fragments for identification and determination of ancestry. *Forensic Sci Int Genet*. 2017. 28: p. 195-202.

50. Ambers, A., Wiley, R., Novroski, N. and Budowle, B. Direct PCR amplification of DNA from human bloodstains, saliva, and touch samples collected with microFLOQ® swabs. *Forensic Sci Int Genet*. 2018. 32: p. 80-87.

51. Kreader, C.A. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Appl Microbiol*. 1996. 62(3): p. 1102-1106.

52. Hedman, J., Nordgaard, A., Dufva, C., Rasmusson, B., Ansell, R. and Rådström, P. Synergy between DNA polymerases increases polymerase chain reaction inhibitor tolerance in forensic DNA analysis. *Anal Biochem*. 2010. 405(2): p. 192-200.

53. Hansson, O., Finnebraaten, M., Heitmann, K.I., Ramse, M. and Bouzga, M. Trace DNA collection-Performance of minitape and three different swabs. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser*. 2009. 2(1): p. 189-190.

54. Stoop, B., Defaux, P.M., Utz, S. and Zieger, M. Touch DNA sampling with SceneSafe Fast™ minitapes. *Leg Med*. 2017. 29: p. 68-71.

55. Hess, S. and Haas, C. Recovery of Trace DNA on Clothing: A Comparison of mini-tape lifting and three other forensic evidence collection techniques. *J Forensic Sci*. 2017. 62(1): p. 187-191.

56. Marrone, A. and Ballantyne, J. Hydrolysis of DNA and its molecular components in the dry state. *Forensic Sci Int Genet*. 2010. 4(3): p. 168-177.

57. Sweet, D., Lorente, M., Lorente, J.A., Valenzuela, A. and Villanueva, E. An improved method to recover saliva from human skin: the double swab technique. *J Forensic Sci*. 1997. 42(2): p. 320-322.

58. Linacre, A., Pekarek, V., Swaran, Y.C. and Tobe, S.S. Generation of DNA profiles from fabrics without DNA extraction. *Forensic Sci Int Genet*. 2010. 4(2): p. 137-141.

59. Noyes, B.E. and Stark, G.R. Nucleic acid hybridization using DNA covalently coupled to cellulose. *Cell*. 1975. 5(3): p. 301-310.

60. Mangalam, A.P., Simonsen, J. and Benight, A.S. Cellulose/DNA hybrid nano materials. *Biomacromolecules*. 2009. 10: p. 497-504.

61. Kitpipit, T., Chotigeat, W., Linacre, A. and Thanakiatkrai, P. Forensic animal DNA analysis using economical two-step direct PCR. *Forensic Sci Med Pathol*. 2014. 10(1): p. 29-38.

62. Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7.4 and 7.2. 2010. Aniara. [Accessed 2018 October, 20]; Available from: https://www.aniara.com/mm5/PDFs/IFU/PBS28-eng.

63. Thermo Fisher Scientific. AmpFlSTR® Identifiler® Plus PCR Amplification User Guide. *Life Technologies*. 2014.

64. QIAGEN®, Investigator® IDplex GO! Kit. 2015.

65. Thermo Fisher Scientific. AmpFlSTR® Identifiler® Direct PCR Amplification User Guide. *Applied Biosystems*. 2015.

66. QIAGEN®, Investigator® IDplex Plus Handbook. 2012.

67. Balding, D.J. and Buckleton, J. Interpreting low template DNA profiles. *Forensic Sci Int Genet*. 2009. 4(1): p. 1-10.

68. Brookes, C., Bright, J.A., Harbison, S. and Buckleton, J. Characterising stutter in forensic STR multiplexes. *Forensic Sci Int Genet*. 2012. 6(1): p. 58-63.

69. Taylor, D., Bright, J.A. and Buckleton, J. The interpretation of single source and mixed DNA profiles. *Forensic Sci Int Genet*. 2013. 7(5): p. 516-528.

70. Dugan, K.A., Lawrence, H.S., Hares, D.R., Fisher, C.L. and Budowle, B. An improved method for post-PCR purification for mtDNA sequence analysis. *J Forensic Sci*. 2002. 47(4): p. 811-818.

71. Smith, P.J. and Ballantyne, J. Simplified low-copy-number DNA analysis by post-PCR purification. *J Forensic Sci*. 2007. 52(4): p. 820-829.

72. Brownstein, M.J., Carpten, J.D. and Smith, J.R. Modulation of non-templated nucleotide addition by Taq DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping. *Biotechniques*. 1996. 20(6): p. 1004-1006, 1008-1010.

73. Ostojic, L. and Wurmbach, E. Analysis of fingerprint samples, testing various conditions, for forensic DNA identification. *Sci Justice*. 2017. 57(1): p. 35-40.

ภาคผนวก

ต้นฉบับสำหรับตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

Forensic Science International: Genetics Supplement Series 6 (2017) e507–e509

Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International: Genetics Supplement Series

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fsigss

Direct PCR improves STR profiles from substrate of improvised explosive device

S. Dangsriwan[a], P. Thanakiatkrai[a,*], W. Asawutmangkul[b], S. Phetpeng[c], T. Kitpipit[a]

[a] Forensic Science Program, Department of Applied Science, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Thailand
[b] Institute of Forensic Medicine, Royal Thai Police, Bangkok, Thailand
[c] DNA Analysis Center, Police Forensic Science Center 10, Royal Thai Police, Thailand

ARTICLE INFO

Keywords:
Touch DNA
Direct PCR
DNA collection
Improvised explosive device (IED)

ABSTRACT

STR profiling from both pre-blast and post-blast IED evidence are generally unsuccessful due to the low-level of DNA present and high level of degradation. Previous studies have improved the number of alleles recovered by focusing on both the DNA collection process and the downstream processes of DNA extraction and amplification; however, direct PCR has never been used with touch DNA on IED evidence. In this study, we optimized a direct PCR protocol for touch DNA profiling from two IED substrates (PVC pipe and circuit board). Two swab types with various moistening agents and one type of tapelift were compared as the collection methods Different amounts of cutting from swab heads and tapes were evaluated. Two direct PCR protocols – the direct protocol and the pre-PCR protocol – were performed. As expected, different substrates required different collection methods for optimal DNA recovery and amplification. The direct protocol recovered significantly more alleles than the pre-PCR protocol ($p < 0.05$). IED substrates collected using EO cotton swab with PBS yielded the best STR profiles. The findings of this study suggest that direct STR typing could be used for IED evidence, provided that an appropriate, optimal DNA collection method is used.

1. Introduction

According to the latest Global Terrorism Index, Thailand ranks in the top 15 for impact of terrorism. Bomb incidences are the second most frequent means of attack. Commonly found pre-blast and post-blast IED evidence include both IED components, such as circuit boards and containers (e.g. PVC pipe). Generally, forensic scientists use two methods to collect touch DNA. The problem lies in the low success rates or probability of getting a high quality STR profiles, as shown by previous studies from which only 10 to 20 percent of samples yielded full STR profiles [1]. In order to improve the profile quality, we can look at the most optimal DNA collection method for each substrate. Previous studies evaluated moistening agents and swab types for non-porous substrates and tapelifting for porous substrates [2–5]. However, they were limited to conventional PCR. Direct PCR has been shown to improve STR profiles from body fluids and touch DNA. As such, our aim was to optimize a direct PCR protocol for IED substrates by looking at the collection method and developing a direct PCR protocol to be used with these collection methods.

2. Materials and methods

We used two substrates commonly found in an IED incidence: PVC pipe and circuit board. Ten volunteers were asked to wash their hands and wait for an hour then touch the substrates for ten seconds. The substrates were both swabbed and tape-lifted. A cotton swab (EO cotton swab by Thai Gauze, Thailand) and a nylon swab (Puritan nylon flocked swab by Puritan, USA) were used with three moistening agents (phosphate buffered saline (PBS), DI water, and Triton-X). Two direct PCR protocols consisting of direct protocol and pre-PCR protocol were evaluated. Both were performed using the AmpFLSTR® Identifiler® Plus PCR Amplification Kit (Thermo Fisher, USA) following the manufacturer's protocol with the exception of half reaction volumes being used and 32 PCR cycles. PCR products were analyzed on an ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Thermo Fisher) using standard injection conditions.

3. Results and discussion

Comparison of STR profiles showed that the direct protocol yielded more complete STR profiles than pre-PCR protocol ($p < 0.05$; Fig. 1).

* Corresponding author at: 15 Karnjanavanich Road, Department of Applied Science, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90110, Thailand.
E-mail address: pthanakiatkrai@gmail.com (P. Thanakiatkrai).

http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigss.2017.09.180
Received 4 September 2017; Accepted 23 September 2017
Available online 25 September 2017
1875-1768/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

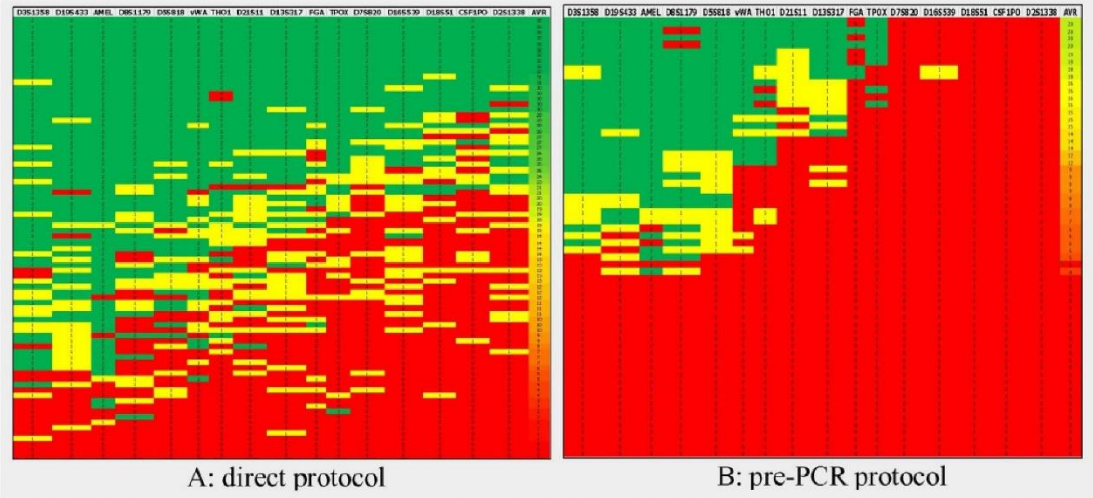


Fig. 1. Heat map for direct protocol (A) and pre-PCR protocol (B). Green means both alleles were typed at that locus, yellow means that only one allele was typed, and red means that there was a locus drop-out. Loci sorted by low molecular weight to high molecular weight from left to right. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

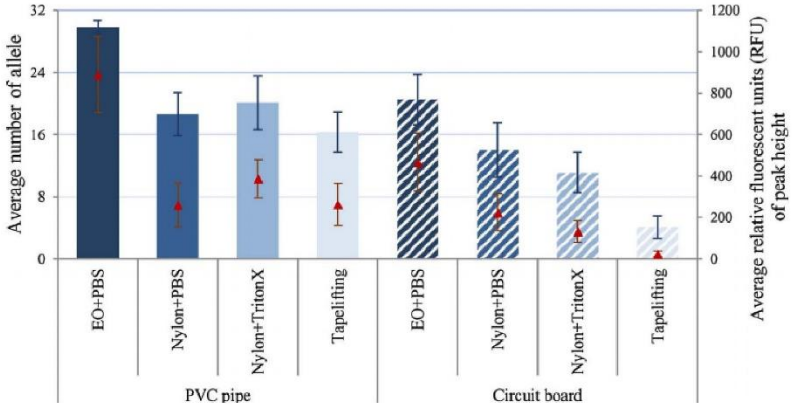


Fig. 2. Average number of allele and relative fluorescent units (RFU) of peaks obtained from two substrates using each collection method (N = 10 for each group).

This was expected, as touch DNA contains already low amount of DNA. In case of PVC, further investigation into the different collection methods for the direct protocol revealed that EO cotton swab with PBS yielded the best STR profiles followed by nylon swab with Triton-X, nylon swab with PBS, and tapelifting. (Fig. 2) Similar results were obtained with circuit board. One possible explanation for these differences is the properties of the swab themselves. The cotton swabs are made of cellulose polymer with hydroxyl group capable of forming strong hydrogen bonds with DNA or the hydrophobic cellular membrane [6]. Also, PBS could have rehydrated the cells and made them easier for the swabs to pick up.

4. Conclusion

The efficiency of DNA recovery depended on the collection method and the type of substrate. The direct protocol was better for touch DNA compared with the pre-PCR protocol. Further studies with various substrates, mock casework and real casework samples are ongoing.

Role of funding

Space Technology and Security Industry Program (SSIP), Industry Division, Thailand Research Fund (TRF) (Grant no. RDG6050130).

Conflict of interest

None.

Acknowledgements

We appreciate the Department of Applied Science, Faculty of Science, Prince of Songkla University; Center for Genomics and Bioinformatics Research, Faculty of Science, Prince of Songkla University; and the Institute of Forensic Medicine, Royal Thai Police.

References

[1] J.J. Raymond, et al., Trace DNA success rates relating to volume crime offences, Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser. 2 (2009) 136–137.

[2] S. Phetpeng, T. Kitpipit, P. Thanakiatkrai, Systematic study for DNA recovery and profiling from common IED substrates: from laboratory to casework, Forensic Sci. Int. Genet. 17 (2015) 53–60.
[3] S.M. Thomasma, D.R. Foran, The influence of swabbing solutions on DNA recovery from touch samples, J. Forensic Sci. 58 (2013) 465–469.
[4] J. Templeton, et al., Genetic profiling from challenging samples: direct PCR of touch DNA, Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser. 4 (2013) e224–e225.
[5] S. Verheij, J. Harteveld, T. Sijen, A protocol for direct and rapid multiplex PCR amplification on forensically relevant samples, Forensic Sci. Int. Genet. 6 (2012) 167–175.
[6] A. Linacre, et al., Generation of DNA profiles from fabrics without DNA extraction, Forensic Sci. Int. Genet. 4 (2010) 137–141.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวสุนิษา แดงศรีวัลย์

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5810220072

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2557

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

1. ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ประจำปีงบประมาณ 2559 มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
2. ทุนอุดหนุนการศึกษาเป็นผู้ช่วยสอน (Teaching Assistantship) ปีการศึกษา 2560 ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Dangsriwan S., Thanakiatkrai, P., Asawutmangkul, W., Phetpeng, S. and Kitpipit, T. Direct PCR improves STR profiles from substrate of improvised explosive device. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser*. 2017. 6: p. 507–509.