การทดสอบประสิทธิภาพและตรวจเปรียบเทียบชุดน้ำยา AmpFISTR® Identifiler® Plus PCR Amplification กับ QIAGEN® Investigator IDplex Plus

Comparative Performance of AmpFISTR® Identifiler® Plus PCR Amplification Kit and QIAGEN® Investigator IDplex Plus Kit

ดาลัด มัธยัสถ์

Dalad Matthayat

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
2560

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การทดสอบประสิทธิภาพและตรวจเปรียบเทียบชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus PCR Amplification กับ QIAGEN® Investigator IDplex Plus

ผู้เขียน นางสาวดาลัด มัธยัสถ์

สาขาวิชา นิติวิทยาศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐิติกา กิจพิพิธ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภูวดล ธนะเกียรติไกร)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฏฐินี พันธ์วิศวาส)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐิติกา กิจพิพิธ)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภูวดล ธนะเกียรติไกร)

.....กรรมการ

(ดร.วงศ์กฎ ภู่ภูมิรัตน์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

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

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

ลงชื่อ .....
(นางสาวดาลัด มัธยัสถ์)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ .....
(นางสาวดาลัด มัธยัสถ์)
นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ การทดสอบประสิทธิภาพและตรวจเปรียบเทียบชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus PCR Amplification กับ QIAGEN® Investigator IDplex Plus

ผู้เขียน นางสาวดาลัด มัธยัสถ์

สาขาวิชา นิติวิทยาศาสตร์

ปีการศึกษา 2559

บทคัดย่อ

การตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลในห้องปฏิบัติการทางนิติวิทยาศาสตร์ทั่วโลกนั้นจะต้องใช้ชุดน้ำยา STR สำเร็จรูปในการจัดทำลายพิมพ์ STR และหน่วยงานทางนิติวิทยาศาสตร์ในประเทศไทยซึ่งได้แก่ ศูนย์ชีววิทยาและดีเอ็นเอ ศูนย์พิสูจน์หลักฐาน 10 สำนักงานตำรวจแห่งชาติและสถาบันนิติวิทยาศาสตร์ กระทรวงยุติธรรม ก็มีการใช้ชุดน้ำยา STR สำเร็จรูปซึ่งชุดน้ำยาหลักที่ใช้ก็คือ AmpFLSTR® Identifiler® Plus ต่อมาบริษัท QIAGEN® ได้ผลิตชุดน้ำยาชุดใหม่คือ ชุด QIAGEN® Investigator® IDplex Plus ซึ่งเป็นชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่สามารถตรวจ STR ได้ทั้งหมด 15 ตำแหน่งที่เหมือนกันกับชุดน้ำยาเดิมแต่มีราคาถูกกว่าและใช้เวลาในการตรวจพิสูจน์น้อยกว่า งานวิจัยนี้จึงมีความประสงค์เพื่อทดสอบและเปรียบประสิทธิภาพของชุดน้ำยาทั้งสอง โดยพิจารณาเปรียบเทียบพารามิเตอร์ที่ได้จากโพรไฟล์ STR ได้แก่ peak height, percent profile, intra-locus balance, inter-locus balance, allelic drop-in, allelic drop-out และ stutter ratio โดยที่งานวิจัยนี้ทำการทดลองกับตัวอย่างตัวอย่างวัตถุพยานจริงและตัวอย่างดีเอ็นเอควบคุมเพื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในด้านต่าง ๆได้แก่ ความไววิเคราะห์ ความคงทนต่อตัวยับยั้งกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและประสิทธิภาพในการตรวจพิสูจน์กับวัตถุพยานจริง จากผลการศึกษาพบว่า ชุดน้ำยา IDplex Plus มีประสิทธิภาพที่ดีในด้านความไววิเคราะห์และความคงทนต่อตัวยับยั้งกระบวนการ PCR ที่ดีกว่าชุดน้ำยา Identifiler® Plus อย่างไรก็ตามชุดน้ำยา Identifiler® Plus ให้ผลจำนวนอัลลีลเฉลี่ยที่ตรวจวัดได้มากกว่าชุดน้ำยา IDplex Plus จากการตรวจพิสูจน์วัตถุพยานจริง ในส่วนของอัตราส่วนความสูงของพีคสตัตเตอร์พบว่าชุดน้ำยาทั้งสองให้ผลความสูงที่ไม่เกินอัตราส่วนที่เหมาะสมคือ 0.15 จึงสรุปได้ว่าชุดน้ำยา IDplex Plus นั้นเป็นชุดน้ำยาที่มีประสิทธิภาพที่ดี ที่สามารถใช้แทนชุดน้ำยาเดิมได้จริงโดยไม่ต้องมีการปรับเปลี่ยนเครื่องมือและขั้นตอนการทำงานภายในองค์กร

Thesis Title Comparison of AmpFlSTR® Identifiler® Plus PCR Amplification Kit and QIAGEN® Investigator IDplex Plus Kit

Author Miss Dalad Matthayat

Major Program Forensic Science

Academic Year 2016

ABSTRACT

Commercial STR typing kits are used by forensic laboratories worldwide. DNA Analysis Center, Scientific Crime Detection Division 10, Royal Thai Police, employs the AmpFLSTR® Identifiler® Plus kit. Later on QIAGEN® commercialized another STR kit that targets the same 15 loci. If the performance of the two kits are on par, switching to the QIAGEN® Investigator® IDplex Plus could reduce cost and investigation time. This study compared the performance of the AmpFLSTR® Identifiler® Plus PCR Amplification kit and the QIAGEN® Investigator® IDplex Plus kit. We evaluated peak height, percent profile, intra-locus balance, inter-locus balance, stutter ratio, allelic drop-out and allelic drop-in using both control DNA samples and casework samples. Sensitivity test with different amounts of 9947A and 9948 DNA was performed. Three common PCR inhibitors, including humic acid, hematin and calcium, were spiked into PCR reactions to test for inhibitor tolerance. Casework samples were also used. The findings of this study demonstrate that the IDplex Plus kit is more sensitive than the Identifiler® Plus. However, the higher success rate of STR typing was obtained in Identifiler® Plus judging by the average number of allele detected. The IDplex Plus kit was more tolerant to inhibitors tested. Stutter values for all loci were within the expected range of less than 0.15 by both kit. Our result suggested that IDplex Plus kit has the ability to replace the current STR kit in the current workflow, without the need to replace or upgrade instrument and database.

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลือ ความร่วมมือ ความกรุณาและความสนับสนุนจากบุคคลหลายท่านด้วยกัน ผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐิติกา กิจพิพิธ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภูวดล ธนะเกียรติไกร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษา ตรวจสอบติดตามตลอดการศึกษาวิจัย และช่วยแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ขอขอบคุณร้อยตำรวจเอกหญิงสุกัญญา เพชรเพ็ง นักวิทยาศาสตร์ สบ.2 กลุ่มงานตรวจชีววิทยาและดีเอ็นเอศูนย์พิสูจน์หลักฐาน 10 ที่เมตตาให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำ อำนวยความสะดวกในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ตลอดจนคำแนะนำต่างๆ

ขอขอบคุณกลุ่มงานตรวจชีววิทยาและดีเอ็นเอ ศูนย์พิสูจน์หลักฐาน 10 และบุคลากรในศูนย์ทุกท่าน ทั้งผู้เชี่ยวชาญและผู้ช่วยนักวิทยาศาสตร์ทุกคน ที่ยินยอมให้ผู้วิจัยเข้าไปศึกษาการทำงานวิจัยนี้ และได้ให้ความอนุเคราะห์ใช้เครื่องมือต่างๆตลอดการศึกษาวิจัย และที่สำคัญต้องขอบพระคุณอย่างยิ่งที่อนุเคราะห์ตัวอย่างวัตถุพยานจริงที่ใช้ในการวิเคราะห์และเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดน้ำยาทั้งสองชุด

ขอขอบคุณพันตำรวจเอกวาที อัศวุตมางกุร นักวิทยาศาสตร์ สบ.4 กลุ่มงานตรวจเลือดชีวเคมีและเขม่าดินปืน สถาบันนิติเวชวิทยาโรงพยาบาลตำรวจ ที่อนุเคราะห์เครื่องวิเคราะห์ดีเอ็นเอ (ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer)

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวก รวมทั้งขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์สำหรับทุนผู้ช่วยวิจัย ปี พ.ศ.2556

ท้ายที่สุดนี้ ขอบคุณหลักสูตรนิติวิทยาศาสตร์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้การสนับสนุนการศึกษาวิจัยครั้งนี้ตลอดมา

ดาลัด มัธยัสถ์

สารบัญ

	หน้า
เอกสารอนุมัติ	(2)
เอกสารรับรอง	(4)
บทคัดย่อ	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
สารบัญแผนภูมิ	(10)
สารบัญตาราง	(12)
สารบัญรูปภาพ	(13)
รายการผลงานที่ตีพิมพ์และการประชุมวิชาการ	(14)
สำเนาต้นฉบับที่ได้รับการยินยอมจากผู้ตีพิมพ์ผลงาน	(15)
เนื้อหาและผลการศึกษาวิจัย	
1.1 บทนำ	1
1.2 วัตถุประสงค์	4
1.3 ผลการศึกษาวิจัย	
1.3.1 ผลการศึกษาความไววิเคราะห์ (Sensitivity study)	5
1.3.2 ความสมดุลของความสูงของอัลลีลใน STR ตำแหน่งเดียวกัน (Intra-locus balance)	7
1.3.3 ความสมดุลความสูงของอัลลีลระหว่างตำแหน่ง STR (Inter-locus balance)	8
1.3.4 ความคงทนต่อตัวยับยั้งกระบวนการพีซีอาร์ (Inhibitor tolerance study)	10
1.3.5 ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการใช้ชุดน้ำยา กับตัวอย่างวัตถุพยานจริง (Real case performance)	13
1.3.6 ความไม่สอดคล้องของลายพิมพ์ STR (Non-concordance study)	15
1.3.7 การเกิดพีคสตัตเตอร์	16
1.4 วิจารณ์ผลการศึกษา	19

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
1.5 สรุปผลการศึกษา	24
เอกสารอ้างอิง	25
ภาคผนวก	30
ก รายงานการวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์	31
ข รายงานการวิจัยที่นำเสนอแบบบรรยายในการประชุมวิชาการ ระดับชาติ	39
ประวัติผู้เขียน	48

สารบัญแผนภูมิ

		หน้า
แผนภูมิที่ 1	แสดงผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความสูงของอัลลีลระหว่างชุดน้ำยา AmpFLISTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus ในแต่ละปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นในช่วง 500 – 31.25 พิโคกรัม	6
แผนภูมิที่ 2	แสดงผลการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นโพรไฟล์ ระหว่างชุดน้ำยา AmpFISTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus ที่ปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้น 5 ความเข้มข้น คือ 500, 250, 125, 62.5 และ 31.25 พิโคกรัม	7
แผนภูมิที่ 3	แสดงผลการศึกษาค่า Intra-locus balance ที่ปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้น 500 – 31.25 พิโคกรัม โดยเปรียบเทียบระหว่างชุดน้ำยา AmpFISTR® Identifiler®Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus	8
แผนภูมิที่ 4	แสดงผลการศึกษาค่า Inter-locus balance เรียงตามฉลากสีและขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของชุดน้ำยา AmpFISTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus	9
แผนภูมิที่ 5	แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความสูงของอัลลีลและเปอร์เซ็นต์โพรไฟล์ระหว่างชุดน้ำยา AmpFISTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus ที่มีการเติมแคลเซียมความเข้มข้นในช่วง 1 – 3 มิลลิโมลาร์ ในปฏิกิริยาพีซีอาร์	11
แผนภูมิที่ 6	แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความสูงของอัลลีลและเปอร์เซ็นต์โพรไฟล์ ระหว่างชุดน้ำยา AmpFISTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus ที่มีการเติมฮิวมิคแอซิดความเข้มข้นในช่วง 75 – 225 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร	12
แผนภูมิที่ 7	แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความสูงของอัลลีลและเปอร์เซ็นต์โพรไฟล์ ระหว่างชุดน้ำยา AmpFISTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus จากการเติมเฮมาตินในช่วงความเข้มข้น 300 – 900 ไมโครโมลาร์	13

สารบัญแผนภูมิ (ต่อ)

หน้า

แผนภูมิที่ 8	แสดงอัตราส่วนความสูงของพีคสตัตเตอร์ของอัลลีลต่างๆ ในลายพิมพ์ STR 15 ตำแหน่ง	17
แผนภูมิที่ 9	แสดงค่าเฉลี่ยอัตราส่วนความสูงของพีคสตัตเตอร์จากตัวอย่างดีเอ็นเอคุมที่มีปริมาณตั้งต้นอยู่ในช่วง 500 – 31.25 พิโคกรัม ของชุดน้ำยา AmpFISTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus	18

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	แสดงจำนวนอัลลีลจากผลการศึกษาเปรียบเทียบที่ตรวจวัดได้จากตัวอย่างวัตถุพยานจริงทั้งหมด 45 ตัวอย่าง ระหว่างชุดน้ำยา AmpFISTR® Identifiler® Plus และQIAGEN® Investigator IDplex Plus	14

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	แสดงความไม่สอดคล้องของอัลลีลในตำแหน่ง TPOX ของชุดน้ำยา Identifiler® Plus และอัลลีลจากชุดน้ำยา IDplex Plus ของตัวอย่างเลือดหมายเลข 2475	16

รายการผลงานที่ตีพิมพ์และการประชุมวิชาการ

1 Mattayat, D., Kitpipit, T., Phetpeng, S., Asawutmangkul, W., and Thanakiatkrai, P. 2016. Comparative performance of AmpFLSTR® Identifiler® Plus PCR amplification kit and QIAGEN® Investigator® IDplex Plus kit. Science & Justice, 56(6),468-474

สำเนาต้นฉบับที่ได้รับการยินยอมจากผู้ตีพิมพ์ผลงาน

ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Jun 09, 2017

This Agreement between Miss. Dalad Matthayat ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4124620480213
License date	Jun 09, 2017
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Science & Justice
Licensed Content Title	Comparative performance of AmpFLSTR® Identifiler® Plus PCR amplification kit and QIAGEN® Investigator® IDplex Plus kit
Licensed Content Author	Dalad Mattayat,Thitika Kitpipit,Sukanya Phetpeng,Watee Asawutmangkul,Phuvadol Thanakiatkrai
Licensed Content Date	Dec 1, 2016
Licensed Content Volume	56
Licensed Content Issue	6
Licensed Content Pages	7
Start Page	468
End Page	474
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Intended publisher of new work	other
Portion	full article
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	Yes
Will you be translating?	No
Order reference number	
Title of your thesis/dissertation	Comparative performance of AmpFLSTR® Identifiler® Plus PCR amplification kit and QIAGEN® Investigator® IDplex Plus kit
Expected completion date	Jul 2017
Estimated size (number of pages)	7
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Requestor Location	Miss. Dalad Matthayat 86 Bankok, Bankok 10900 Thailand Attn: Miss. Dalad Matthayat

Customer VAT ID	TH0840631469
Total	0.00 USD

Terms and Conditions

INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at http://myaccount.copyright.com).

GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier at permissions@elsevier.com). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.
11. No Transfer of License: This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.
12. No Amendment Except in Writing: This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).
13. Objection to Contrary Terms: Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.
14. Revocation: Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:
15. Translation: This permission is granted for non-exclusive world English rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.
16. Posting licensed content on any Website: The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx or the Elsevier homepage for books at http://www.elsevier.com; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.
Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at http://www.elsevier.com . All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

Posting licensed content on Electronic reserve: In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only.
You may obtain a new license for future website posting.
17. For journal authors: the following clauses are applicable in addition to the above:
Preprints:

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peerreviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).
Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).
If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.
Accepted Author Manuscripts: An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes authorincorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.
Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately via their non-commercial person
  - homepage or blog
  - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript via
  - their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
  - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
  - for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- After the embargo period via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository via commercial sites with which Elsevier has an agreement In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI bear a
- CC-BY-NC-ND license - this is easy to do
- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

Published journal article (JPA): A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.
Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:
Subscription Articles: If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.
If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes. Gold

Open Access Articles: May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a CrossMark logo, the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.
Please refer to Elsevier's posting policy for further information.
18. For book authors the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. Posting to a repository: Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.
19. Thesis/Dissertation: If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

Elsevier Open Access Terms and Conditions
You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our open access license policy for more information.
Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier: Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated. The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.
If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.
Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license: CC BY: The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at http://creativecommons.org/licenses/by/4.0.
CC BY NC SA: The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0. CC BY NC ND: The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is

not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee. Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

20. Other Conditions:

v1.9

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

เนื้อหาและผลการศึกษาวิจัย

1.1 บทนำ

การตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลเป็นเครื่องมือสำคัญในการสืบสวนสอบสวนทางนิติวิทยาศาสตร์ เพื่อนำไปใช้เป็นหลักฐานจับกุมผู้กระทำความผิดในกระบวนการยุติธรรม การตรวจพิสูจน์สารพันธุกรรมดีเอ็นเอนับเป็นหนึ่งในวิธีการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลที่มีความถูกต้องสูงและน่าเชื่อถือ มีการกำหนดมาตรฐานเพื่อนำไปใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์ทั่วโลก (Butler, 2012) โดยนิยมใช้เครื่องหมายพันธุกรรมบริเวณ Short Tandem Repeat (STR) หรือเรียกอีกอย่างว่า ไมโครแซทเทิลไลท์ (Microsatellite) ซึ่งเป็นส่วนของสารพันธุกรรมที่ประกอบไปด้วยลำดับเบสซ้ำเป็นชุดๆแบบต่อเนื่อง โดยมีลำดับเบสแกนกลางจำนวนตั้งแต่สองถึงสิบคู่เบส ในแต่ละบุคคลจะมีจำนวนซ้ำของชุดเบสดังกล่าวแตกต่างกัน ทำให้เกิดเป็นลักษณะที่จำเพาะในแต่ละบุคคลที่สามารถนำมาใช้ระบุบุคคลเพื่อเชื่อมโยงสู่ตัวผู้กระทำความผิดได้ (Butler, 2006) ในปัจจุบันสำนักงานสอบสวนกลางแห่งสหรัฐอเมริกา (Federal Bureau of Investigation, FBI) ได้กำหนดระบบ Combined DNA Index System (CODIS) ที่ประกอบด้วยตำแหน่ง STR เป้าหมายทั้งสิ้น 20 ตำแหน่งเพื่อใช้เป็นมาตรฐานในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลในประเทศสหรัฐอเมริกา (Hares, 2012a, 2012b) ซึ่งต่อมาหลายประเทศทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทยก็ยึดถือระบบดังกล่าวเป็นมาตรฐานในการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลภายในประเทศด้วยเช่นกัน (Butler, 2012; Hares, 2012b)

กระบวนการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอเพื่อระบุบุคคลนั้นประกอบไปด้วยการเก็บวัตถุ-พยานชีวภาพจากสถานที่เกิดเหตุ การสกัดดีเอ็นเอ การหาปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีการเรียลไทม์ (Real-time PCR) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่ง STR เป้าหมายและการตรวจสอบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณขึ้นด้วยเทคนิคแคพิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Capillary electrophoresis) ในปัจจุบันมีการพัฒนาชุดน้ำยาสำเร็จรูปทางการค้าจำนวนมากเพื่อใช้ในแต่ละขั้นตอนของการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอรวมถึงขั้นตอนการเพิ่มปริมาณตำแหน่งดีเอ็นเอเป้าหมาย ทั้งนี้ก็เพื่อเป็นการควบคุมมาตรฐานเป็นประโยชน์ในการสร้างฐานข้อมูลดีเอ็นเอและแลกเปลี่ยนข้อมูลดีเอ็นเอระหว่างพื้นที่ทั้งภายในและระหว่างประเทศสำหรับชุดน้ำยาทางการค้าเพื่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายนั้นได้มีการพัฒนาคุณภาพอย่างต่อเนื่องเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพที่ดีในการนำไปใช้ตรวจพิสูจน์วัตถุพยานชีวภาพที่มีปริมาณน้อยมาก เสื่อมสภาพหรือมีอายุมากซึ่งมักพบบ่อยในงานนิติวิทยาศาสตร์ (Butler, 2006) โดยมีการเติมสารเคมีบางชนิดในสารละลายพีซีอาร์ (PCR

buffer) หรือพัฒนาเอ็นไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (DNA polymerase) ให้ทนทานต่อตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์มากขึ้น ทำให้เพิ่มโอกาสในการได้ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์จากวัตถุพยานที่เสื่อมสภาพมากขึ้นด้วย (Myers *et al*., 2012) นอกจากนี้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปชุดใหม่ๆ จะมีการเพิ่มตำแหน่ง STR เป้าหมายเพื่อเพิ่มขีดความสามารถหรือความน่าเชื่อถือในการจำแนกบุคคล (Discrimination power) (Butler, 2005) ตัวอย่างชุดน้ำยาสำเร็จรูปในปัจจุบัน ได้แก่ ชุดน้ำยา Identifiler® Plus, NGM® และ GlobalFiler® จากบริษัท Applied Biosystems (Foster City, CA); PowerPlex® ESX/ESI 17 และ PowerPlex® Fusion จากบริษัท Promega Corporation (Madison, WI); ESSplex และ IDplex Plus จากบริษัท Qiagen (Hilden, Germany) (Barbaro *et al*., 2011; Ensenberger *et al*., 2010; Flores *et al*., 2014; Hill *et al*., 2011; McLaren *et al*., 2014; Thanakiatkrai and Kitpipit, 2013; Tucker *et al*., 2011)

ชุดน้ำยาทางการค้า AmpFlSTR® Identifiler® Plus เป็นชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ผลิตและจำหน่ายขึ้นในปี ค.ศ. 2010 เป็นชุดน้ำยาหลักที่สำนักงานพิสูจน์หลักฐานตำรวจ สำนักงานตำรวจแห่งชาติ และสถาบันนิติวิทยาศาสตร์ กระทรวงยุติธรรม เลือกใช้ในการตรวจพิสูจน์ ดีเอ็นเอโดยใช้เพิ่มปริมาณ STR เป้าหมายจำนวน 15 ตำแหน่ง ได้แก่ D8S1179 D21S11 D7S820 CSF1PO D3S1358 TH01 D13S317 D16S539 D2S1338 D19S433 vWA TPOX D18S51 D5S818 FGA และตำแหน่งระบุเพศบนยีน Amelogenin (Biosystems, 2012; Thanakiatkrai and Kitpipit, 2013) ชุดน้ำยาดังกล่าวได้ถูกนำมาตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอจากวัตถุพยานทางชีวภาพมากกว่า 42,000 รายการต่อปี (ข้อมูลจากการสื่อสารส่วนตัวกับทางเจ้าหน้าที่ของสำนักงานตำรวจแห่งชาติ) คิดเป็นจำนวนเงินกว่า 50.4 ล้านบาทต่อปีงบประมาณ (Central Institute for Forensic Science, 2014) และในต่อมาเมื่อปี ค.ศ. 2012 บริษัท Qiagen ได้ผลิตชุดน้ำยาสำเร็จรูปชื่อว่า Qiagen® Investigator IDplex Plus ซึ่งใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเป้าหมายเหมือนกับชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus ทุกตำแหน่ง (Odriozola *et al*., 2013; Thanakiatkrai and Kitpipit, 2013) ทางผู้ผลิตได้รายงานผลการทดสอบชุดน้ำยาดังกล่าวว่าสามารถตรวจพิสูจน์วัตถุพยานทางนิติวิทยาศาสตร์หลากหลายประเภทได้อย่างมีประสิทธิภาพมีความคงทนสูงต่อตัวยับยั้งกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ มีความไวในการวิเคราะห์สูง รวมทั้งใช้เวลาในการตรวจพิสูจน์น้อยกว่าชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus (Builes *et al*., 2011) นอกจากนี้ค่าใช้จ่ายในการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยาดังกล่าวยังน้อยกว่าชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus ถึง 350 บาท ต่อหนึ่งตัวอย่าง ซึ่งอาจทำให้ประหยัดงบประมาณได้มากกว่า 18 ล้านบาทต่อปีและลดเวลาในการตรวจวิเคราะห์ได้มาก อย่างไรก็ตาม การตัดสินใจเปลี่ยนชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นเรื่องที่ต้องศึกษาให้ถี่ถ้วน

ทั้งในด้านประสิทธิภาพของชุดน้ำยา ความไวในการวิเคราะห์ การศึกษาความคงทนต่อตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ ความสอดคล้องของผลดีเอ็นเอ (STR Concordance) ความซับซ้อนของกระบวนการดำเนินงาน เป็นต้น (Hill *et al*., 2011; Melo *et al*, 2014; Tvedebrink *et al*., 2012) ทั้งนี้เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจส่งผลกระทบต่อขั้นตอนการปฏิบัติงานมาตรฐาน (Standard operating protocols) ภายในองค์กรและมีผลกระทบต่อรูปคดีและการพิจารณาคดีความในกระบวนการยุติธรรมได้

อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus ซึ่งเป็นที่สนใจของหน่วยงานภาครัฐในประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาในวัตถุพยานชีวภาพจากคดีจริง ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดน้ำยาทั้งสองในทุกด้านที่กล่าวมาข้างต้น โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอมาตรฐานเป็นตัวอย่างควบคุมและตัวอย่างวัตถุพยานจริงหลากหลายประเภทที่พบบ่อยในงานนิติวิทยาศาสตร์ โดยศึกษาเปรียบเทียบจากพารามิเตอร์ที่สำคัญในการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ ได้แก่ peak heights, percent profile, intra-locus balance, inter-locus balance, stutter ratio, allelic drop-in, allelic drop-out และ STR concordance เป็นต้น (Butler, 2011)

1.2 วัตถุประสงค์

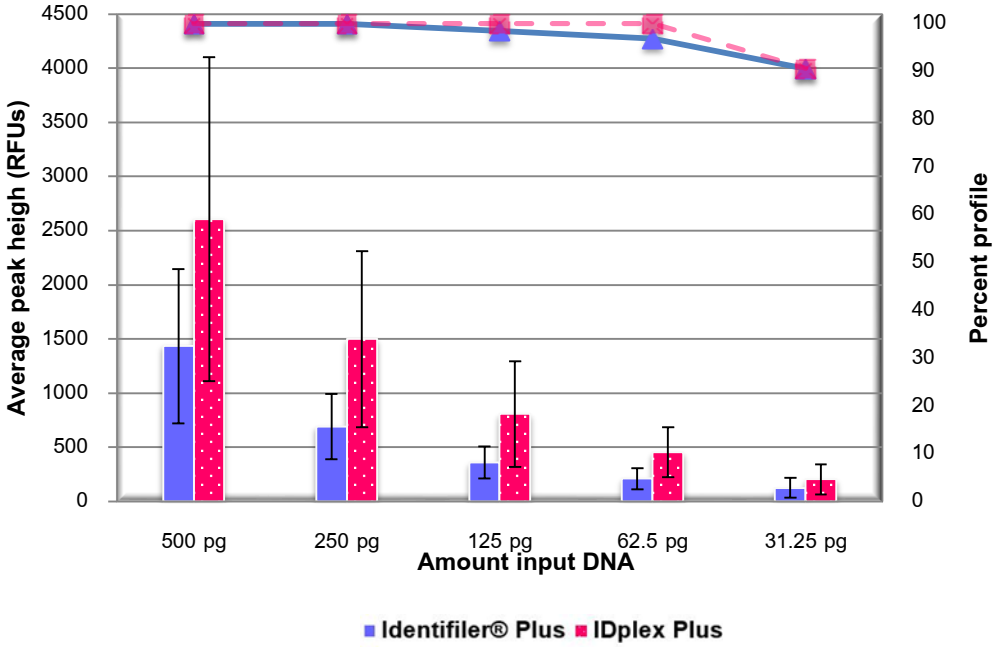
งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus กับ QIAGEN® Investigator IDplex Plus โดยใช้ตัวอย่างควบคุม (DNA control) และทดสอบกับตัวอย่างวัตถุพยานชีวภาพในคดีจริงทำการทดสอบความไวในการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอที่ปริมาณต่างๆ และศึกษาความคงทนต่อตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์จำนวน 3 ชนิดได้แก่ ฮิวมิคแอซิด (Humic acid) เฮมาติน (Hematin) และแคลเซียม (Ca_{2+}) (Faber *et al*, 2013; Mulero *et al*., 2008; Opel *et al*., 2010; Wang *et al*., 2012) โดยพิจารณาจากพารามิเตอร์ทางนิติวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องทั้งหมดจำนวน 7 ประเภท ได้แก่ Peak heights, Percent profiles, Intra-locus balance, Inter-locus balance, Stutter ratio, Allelic drop-in และ Allelic drop-out

1.3 ผลการศึกษาวิจัย

1.3.1 ผลการศึกษาความไววิเคราะห์ (Sensitivity study)

ในการพิจารณาประสิทธิภาพของชุดน้ำยาสำเร็จรูปสำหรับการจัดทำลายพิมพ์ STR นั้น ความไววิเคราะห์เป็นหนึ่งในคุณสมบัติสำคัญซึ่งแสดงปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นที่น้อยที่สุดที่ชุดน้ำยาจะสามารถเพิ่มปริมาณและให้ผลลายพิมพ์ STR ที่สมบูรณ์และไม่เกิดพีคแปลกปลอมที่อาจรบกวนต่อการแปลผล (Artefact) โดยในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบความไววิเคราะห์โดยเจือจางตัวอย่างดีเอ็นเอควบคุมสองชนิดได้แก่ 9947A และ 9948 ให้ได้ความเข้มข้น 500, 250, 125, 62.5 และ 31.25 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร โดยทำการศึกษาชุดการทดลองละ 4 ซ้ำ รวมทั้งหมด 20 ตัวอย่าง จากนั้นเปรียบเทียบคุณภาพลายพิมพ์ STR ที่ได้รับในแต่ละตัวอย่างที่ใช้ปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นเท่ากัน จากชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus โดยพารามิเตอร์ที่วัดในการศึกษานี้ได้แก่ ค่าความสูงของพีคหรืออัลลีล (Peak height) มีหน่วยเป็น RFUs (Relative fluorescence units) บอกถึงปริมาณของการเรืองแสงซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เป้าหมาย (Butler, 2005)

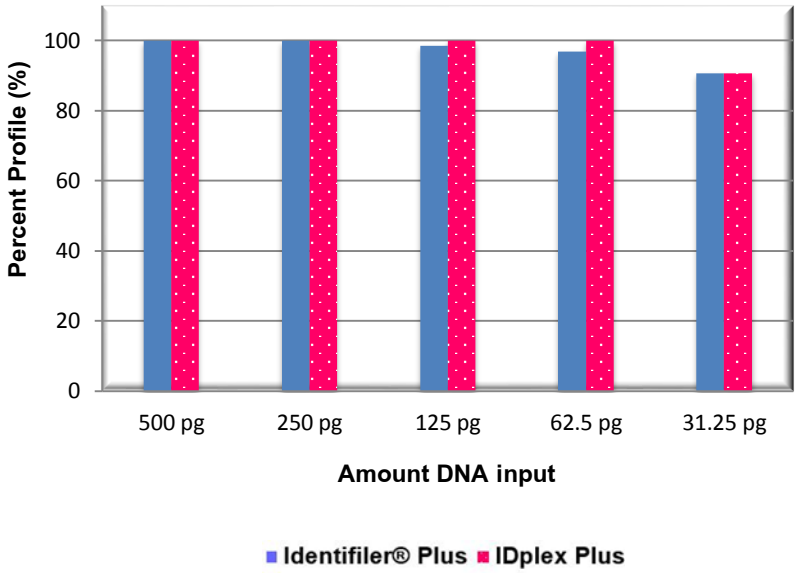
ผลการศึกษาเปรียบเทียบความไววิเคราะห์ระหว่างชุดน้ำยาทั้งสองแสดงในแผนภูมิที่ 1 ทั้งนี้ค่าเฉลี่ยความสูงของอัลลีลในแต่ละปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นระหว่างชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus แสดงผลตามลำดับดังนี้คือ ที่ปริมาณดีเอ็นเอ 500 พิโคกรัม ความสูงเฉลี่ยของอัลลีลเท่ากับ 1,432 และ 2,606 RFUs ที่ปริมาณดีเอ็นเอ 250 พิโคกรัม ค่าเฉลี่ยความสูงของอัลลีลเท่ากับ 689 และ 1498 RFUs ปริมาณดีเอ็นเอ 125 พิโคกรัม ค่าเฉลี่ยความสูงของอัลลีลเท่ากับ 360 และ 807 RFUs ปริมาณดีเอ็นเอ 62.5 พิโคกรัมค่าเฉลี่ยความสูงของอัลลีลเท่ากับ 208 และ 452 RFUs และที่ปริมาณดีเอ็นเอ 31.25 พิโคกรัม ค่าเฉลี่ยความสูงของอัลลีลเท่ากับ 123 และ 203 RFUs ซึ่งพบว่าชุดน้ำยา QIAGEN®Investigator IDplex Plus ให้ลายพิมพ์ STR ที่มีค่าเฉลี่ยความสูงของอัลลีลสูงกว่าเป็นเท่าตัวเมื่อเปรียบเทียบกับชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus ในทุกๆปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้น



แผนภูมิที่ 1 แสดงผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความสูงของอัลลีล ระหว่างชุดน้ำยา AmpFLISTR® Identifiler® Plus (สีฟ้า) และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus (สีชมพู) ในแต่ละปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นในช่วง 31.25 - 500 พิโคกรัม (n=20)

นอกจากค่าความสูงของอัลลีลแล้วการศึกษาคุณภาพของลายพิมพ์ STR ก็มีความสำคัญเช่นกัน ในการศึกษานี้จะใช้ค่าเปอร์เซ็นต์โพรไฟล์ซึ่งแสดงถึงร้อยละจำนวนอัลลีลที่ตรวจวัดได้ในแต่ละลายพิมพ์ STR ทั้งนี้เนื่องด้วยชุดน้ำยา AmpFISTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus เป็นชุดน้ำยาที่ตรวจพิสูจน์ STR จำนวน 15 ตำแหน่งเช่นเดียวกัน นั่นหมายถึงในแต่ละลายพิมพ์ STR สามารถตรวจพบอัลลีล ได้สูงสุดจำนวน 32 อัลลีล หรือเทียบเท่ากับเปอร์เซ็นต์โพรไฟล์ 100 เปอร์เซ็นต์ (Full profile) ในกรณีตรวจวัด STR ได้ไม่ครบทุกตำแหน่ง หรือ มีอัลลีลในบางตำแหน่งหายไปหรือเกิด Allelic dropout กลายเป็นลายพิมพ์ STR ที่ไม่สมบูรณ์ (Partial profile) จะส่งผลให้เปอร์เซ็นต์โพรไฟล์ต่ำกว่า 100 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์โพรไฟล์ในแต่ละปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นของชุดน้ำยา AmpFISTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus พบว่าที่ปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้น 250 - 500 พิโคกรัม สามารถตรวจวัดเปอร์เซนต์โพรไฟล์ของทั้งสองชุดน้ำยาเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ปริมาณดีเอ็นเอ 62.5-125 พิโคกรัม ชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus สามารถตรวจวัดอัลลีลได้ครบทั้ง 32 อัลลีล คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ชุดน้ำยา AmpFISTR® Identifiler® Plus สามารถตรวจวัดอัลลีลได้ 31 อัลลีล คิดเป็นเปอร์เซ็นต์โพรไฟล์เท่ากับ 97 เปอร์เซ็นต์ และที่ปริมาณดีเอ็นเอ 31.25 พิโคกรัม ทั้งสองชุด

น้ำยาให้ผลเป็นโพรไฟล์ที่ไม่สมบูรณ์ นั่นคือตรวจวัดได้ 29 อัลลีล คิดเป็น 91 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในแผนภูมิที่ 2



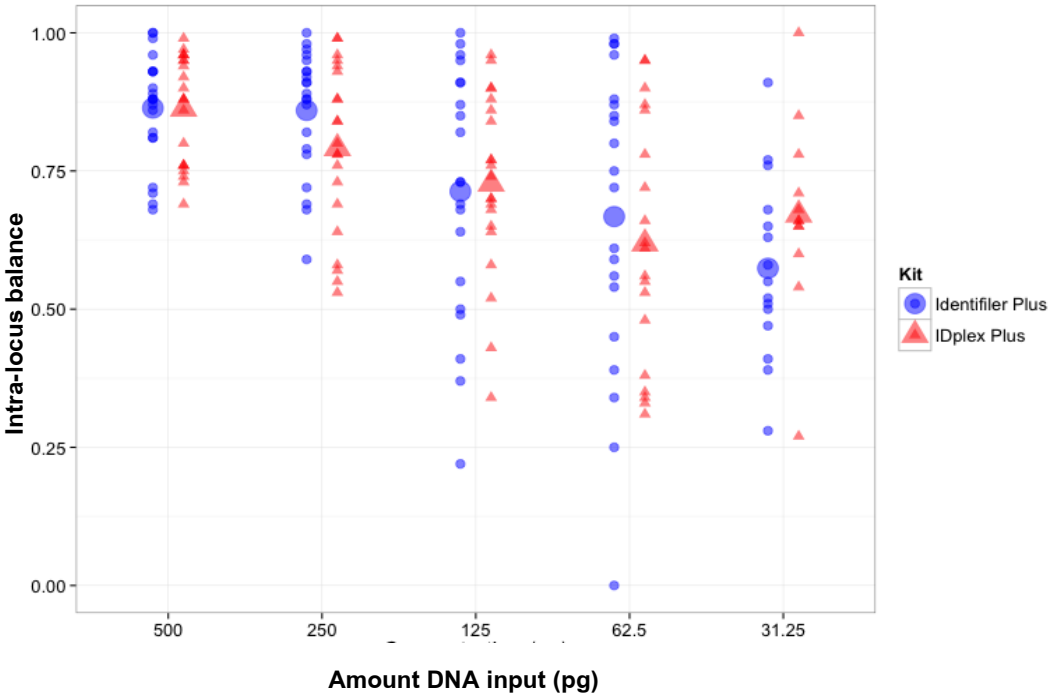
แผนภูมิที่ 2 แสดงผลการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นโพรไฟล์ ระหว่างชุดน้ำยา AmpFISTR® Identifiler® Plus (สีฟ้า) และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus (สีชมพู) ที่ปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้น 5 ความเข้มข้น คือ 500, 250, 125, 62.5 และ 31.25 พิโคกรัม (n=20)

1.3.2 ความสมดุลของพีคระหว่างตำแหน่งในลายพิมพ์ STR (Intra-locus balance)

ความสมดุลของอัลลีล หรือ Intra-locus balance เป็นอัตราส่วนความสูงของอัลลีลระหว่างสองอัลลีลในตำแหน่ง STR เดียวกัน คำนวณได้จากความสูงของอัลลีลที่มีค่ามากจากอัลลีลหนึ่งหารด้วยความสูงของอัลลีลจากอีกอัลลีล ดังนั้นสำหรับตำแหน่งที่เป็น Heterozygous จะมีค่า Intra-locus balance สูงสุดเท่ากับ 1 ซึ่งหมายถึงอัลลีลทั้งสองของอัลลีลใน STR ตำแหน่งเดียวกันมีความสูงเท่ากัน (Debernardi *et al*., 2011) การศึกษานี้ทำการทดลองโดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและจัดทำลายพิมพ์ STR ที่ความเข้มข้น 500, 250, 125, 62.5 และ 31.25 พิโคกรัม ด้วยชุดน้ำยา AmpFISTR® Identifiler® Plus และชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus จากนั้นเปรียบเทียบความสูงของอัลลีลระหว่างตำแหน่ง STR ในโพรไฟล์เดียวกัน

ผลการศึกษาเปรียบเทียบอัตราส่วนความสูงของอัลลีลในแต่ละตำแหน่ง STR (Intra-locus balance) ระหว่างชุดน้ำยาทั้งสองแสดงในแผนภูมิที่ 3 เมื่อเปรียบเทียบอัตราส่วนความสูงของสองอัลลีลในแต่ละตำแหน่ง (Heterozygous alleles) ระหว่างชุดน้ำยา AmpFISTR®

Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus พบว่ามีค่าใกล้เคียงกันมากอีกทั้งยังมีแนวโน้มที่เหมือนกันคือเมื่อปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นน้อยลง Intra-locus balance ทั้งสองชุดน้ำยามีแนวโน้มลดลงด้วย โดยที่ปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้น 500 พิโคกรัม ชุดน้ำยา AmpFISTR® Identifiler® Plus และชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus มีค่าเฉลี่ย Intra-locus balance ที่เท่ากัน คือ 0.91 สำหรับที่ปริมาณดีเอ็นเอ 250 พิโคกรัมมีค่า Intra-locus balance เท่ากับ 0.91 และ 0.86 ตามลำดับ ที่ปริมาณ ดีเอ็นเอ 125 พิโคกรัม มีค่าเฉลี่ย Intra-locus balance เท่ากับ 0.79 และ 0.82 ที่ปริมาณดีเอ็นเอ 62.5 พิโคกรัม เท่ากับ 0.76 และ 0.74 และที่ปริมาณดีเอ็นเอ 31.25 พิโคกรัม ค่าเฉลี่ยน้อยที่สุด คือ 0.71 และ 0.80 ตามลำดับ



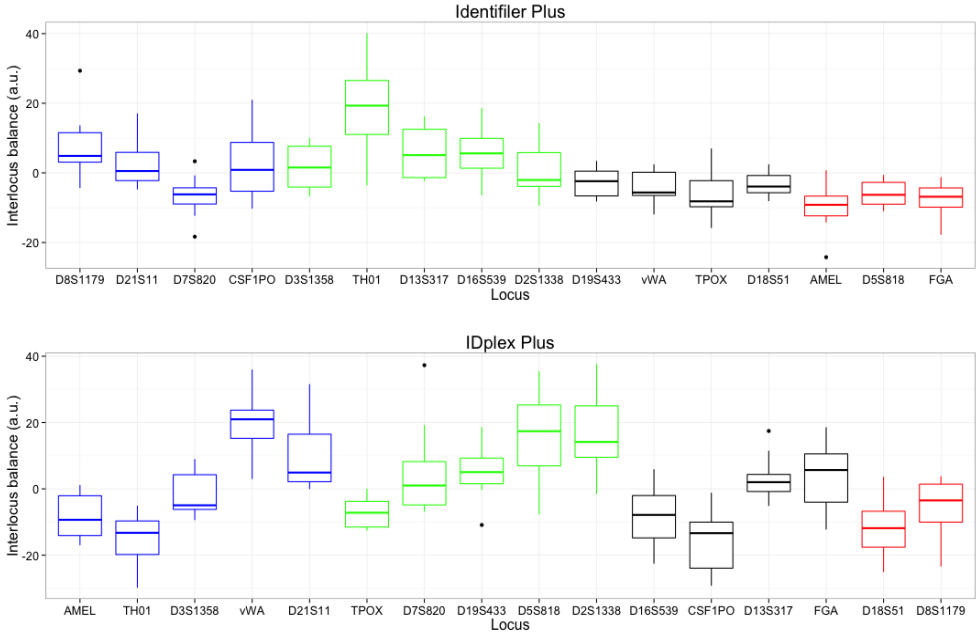
แผนภูมิที่ 3 แสดงผลการศึกษาค่า Intra-locus balance ที่ปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้น 500 – 31.25 พิโคกรัม โดยเปรียบเทียบระหว่าง ชุดน้ำยา AmpFISTR® Identifiler® Plus (สีฟ้า) และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus (สีชมพู)

1.3.3 ความสมดุลความสูงของอัลลีลระหว่างตำแหน่ง STR (Inter-locus balance)

Inter-locus balance คืออัตราส่วนของความสูงของอัลลีลตำแหน่ง STR หนึ่งเปรียบเทียบกับตำแหน่งอื่นๆในลายพิมพ์ดีเอ็นเอเดียวกันซึ่งควรมีค่าที่ใกล้เคียงกัน สามารถบ่งบอกถึงประสิทธิภาพของมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์และความเหมาะสมของปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยา

ในการศึกษา Inter-locus balance ได้ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยตัวอย่างดีเอ็นเอควบคุม โดยใช้ความเข้มข้นในช่วง 500 – 31.25 พิโคกรัม แล้วนำข้อมูลความสูงของอัลลีลมาคำนวณทางสถิติและเปรียบเทียบข้อมูลตามวิธีการซึ่งศึกษาและรายงานโดย Tvedebrink และคณะ (Tvedebrink *et al*., 2012) ทั้งนี้ค่า Inter-locus balance ที่ดีจะต้องมีค่าเข้าใกล้ศูนย์หรือเท่ากับศูนย์นั่นหมายถึง ค่าความสูงของอัลลีลในตำแหน่ง STR นั้นๆ มีค่าเท่ากับค่าเฉลี่ยของความสูงของพีคในลายพิมพ์นั้นๆ (Tvedebrink *et al*., 2012)

ผลการศึกษาเปรียบเทียบ Inter-locus balance ระหว่างชุดน้ำยาทั้งสองพบว่าชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus มีความสมดุลของค่าความสูงของอัลลีลระหว่างตำแหน่ง STR ที่ดีกว่าชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus ดังแสดงในแผนภูมิที่ 4 ซึ่งจากผลการศึกษาเรียงตามฉลากสีโดยชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus ได้แก่ FAM (สีน้ำเงิน) VIC (สีเขียว) NED (สีดำ) และ PET (สีแดง) พบว่าชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus ให้ค่า Inter-locus balance ที่ใกล้เคียงกัน ในขณะที่ข้อมูลจากชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus ได้แก่สี 6-FAM™ (สีน้ำเงิน) BTG (สีเขียว) BTY (สีเหลือง) และ BTR (สีแดง) มีค่าดังกล่าวที่แตกต่างกันมากกว่า โดยตำแหน่ง STR ที่มีขนาดใหญ่จะมีค่า Inter-locus balance สูงกว่าตำแหน่ง STR ที่มีขนาดเล็ก



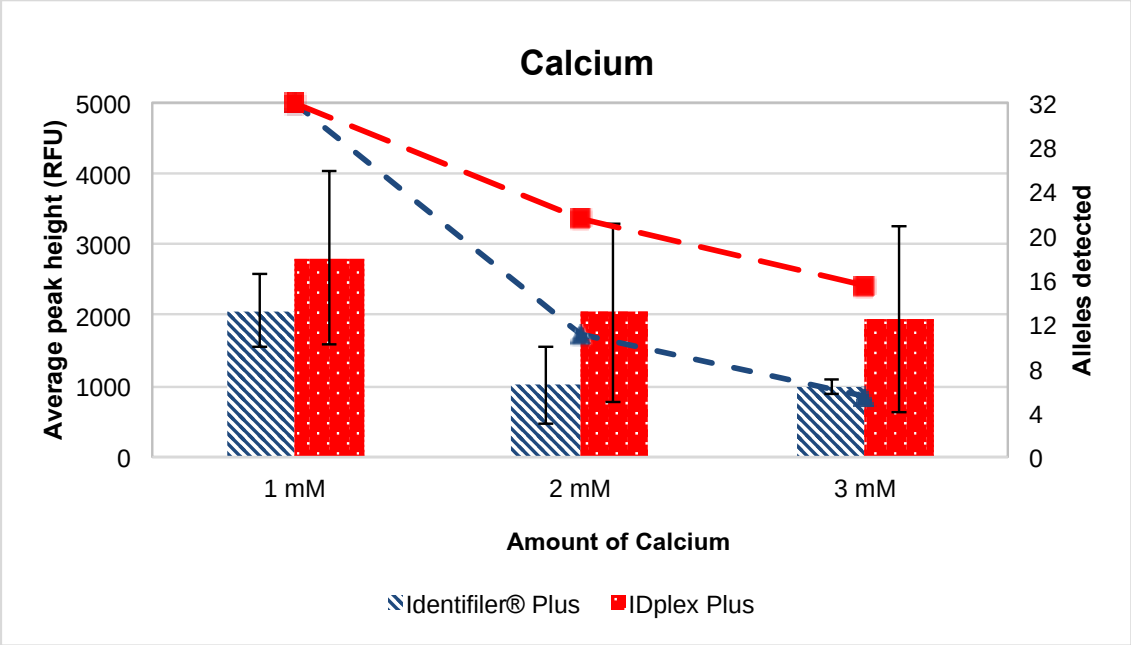
แผนภูมิที่ 4 แสดงผลการศึกษาค่า Inter-locus balance เรียงตามฉลากสีและขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus (รูปบน) และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus (รูปล่าง)

1.3.4 ความคงทนต่อตัวยับยั้งกระบวนการพีซีอาร์ (Inhibitor tolerance study)

ในการศึกษาเปรียบเทียบความคงทนต่อตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ระหว่างชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus กับ QIAGEN® Investigator IDplex Plus ทำโดยการเติมตัวยับยั้งกระบวนการพีซีอาร์ 3 ชนิด ที่พบบ่อยในวัตถุพยานทางชีวภาพได้แก่ ฮิวมิคแอซิด (Humic acid) เฮมาติน (Hematin) และแคลเซียม ($CaCl_2$) ลงในสารละลายพีซีอาร์ซึ่งมีดีเอ็นเอควบคุมปริมาณ 500 พิโคกรัม โดยในแต่ละหลอดทดลองนั้นได้เติมตัวยับยั้งกระบวนการพีซีอาร์ในปริมาณที่แตกต่างกันซึ่งเป็นช่วงปริมาณของสารที่พบในหลักฐานทางนิติวิทยาศาสตร์ ทั้งนี้การทดลองนี้ได้เติมฮิวมิคแอซิดความเข้มข้นที่ 75, 150 และ 225 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เติมเฮมาตินที่ความเข้มข้น 300, 600 และ 900 ไมโครโมลาร์ และแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 มิลลิโมลาร์ หลังจากนั้นนำตัวอย่างเข้าสู่ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus และเปรียบเทียบข้อมูลจากลายพิมพ์ STR ที่ได้ระหว่างชุดน้ำยาทั้งสองชนิด ในด้านความสูงของอัลลีลเฉลี่ยและความสมบูรณ์ของลายพิมพ์ STR

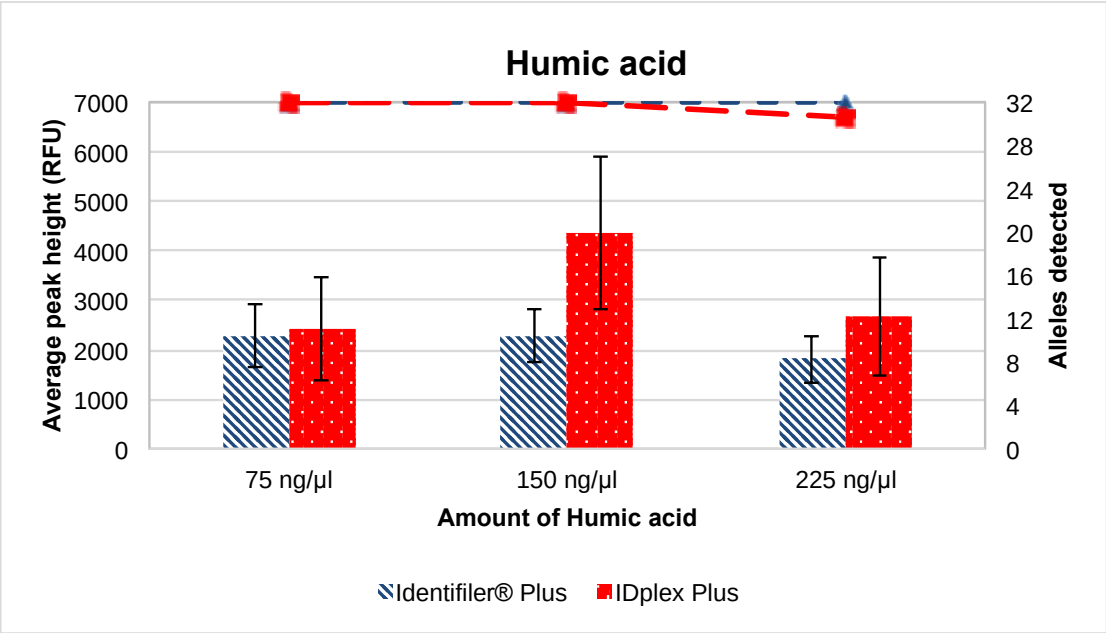
ผลการศึกษาสำหรับชุดการทดลองเติมแคลเซียม พบว่าการเติมแคลเซียมคลอไรด์ลงไปในสารละลายพีซีอาร์ปริมาณ 1 มิลลิโมลาร์ ไม่พบความแตกต่างกันของคุณภาพลายพิมพ์ STR ระหว่างชุดน้ำยาทั้งสอง ซึ่งได้ผลลายพิมพ์ STR ที่สมบูรณ์ครบทุกตำแหน่งเช่นเดียวกันกับตัวอย่างควบคุมบวกที่ไม่ได้เติมแคลเซียมคลอไรด์ และเมื่อปริมาณแคลเซียมในสารละลายพีซีอาร์เพิ่มขึ้นพบว่าส่งผลให้จำนวนอัลลีลที่ตรวจวัดได้ลดลงในทั้งสองชุดน้ำยาเมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์โพรไฟล์ที่ปริมาณแคลเซียมเท่ากันระหว่างชุดน้ำยาทั้งสองพบความแตกต่างกันคือชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus สามารถตรวจวัดอัลลีลได้จำนวนมากกว่าอีกชุดหนึ่ง โดยที่ปริมาณแคลเซียม 2 มิลลิโมลาร์ พบว่าชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus สามารถตรวจวัดจำนวนอัลลีลเฉลี่ยได้ 11 อัลลีล ในขณะที่ชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus ตรวจวัดจำนวนอัลลีลเฉลี่ยได้ 21.5 อัลลีล และที่ปริมาณแคลเซียม 3 มิลลิโมลาร์ ชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus ตรวจวัดจำนวนอัลลีลเฉลี่ยได้ 5.5 และ 15.5 อัลลีลตามลำดับ อีกทั้งชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus ให้ค่าเฉลี่ยความสูงของอัลลีลที่สูงกว่าชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus นั่นแสดงให้เห็นว่าชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus ในทุกชุดการทดลองทั้งสามที่เติมแคลเซียมลงไปในสารละลายพีซีอาร์ในช่วง 1 – 3 มิลลิโมลาร์ มีความคงทนต่อการยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ดีกว่า ชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus อย่างไรก็ตามค่าเฉลี่ยความสูง

ของพีคทั้งสองชุดน้ำยามีแนวโน้มลดลงเหมือนกันเมื่อปริมาณแคลเซียมในสารละลายพีซีอาร์ผสมเพิ่มขึ้น ดังแสดงในแผนภูมิที่ 5



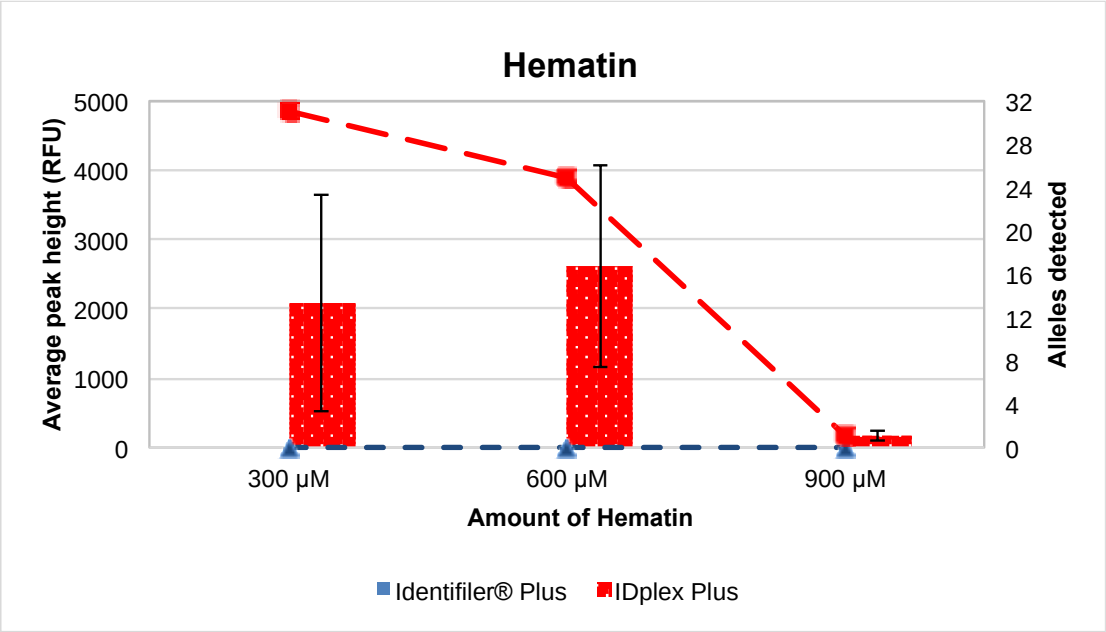
แผนภูมิที่ 5 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความสูงของอัลลีลและเปอร์เซ็นต์โพรไฟล์ ระหว่างชุดน้ำยา AmpFISTR® Identifiler® Plus (สีฟ้า) และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus (สีชมพู) ที่มีการเติมแคลเซียมความเข้มข้นในช่วง 1 – 3 มิลลิโมลาร์ ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

ผลการศึกษาความคงทนต่อฮิวมิคแอซิดในกระบวนการพีซีอาร์ พบว่าสามารถตรวจวัดอัลลีลได้ครบสมบูรณ์ทุกตำแหน่งในทุกความเข้มข้นของฮิวมิคแอซิดเมื่อใช้ชุดน้ำยา AmpFISTR® Identifiler® Plus แต่สำหรับผลจากชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus นั้นให้ผลลายพิมพ์ STR ที่สมบูรณ์ในตัวอย่างฮิวมิคแอซิดความเข้มข้น 150 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรเท่านั้น ส่วนในตัวอย่างที่มีฮิวมิคแอซิดความเข้มข้น 75 และ 225 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร พบว่าเกิด Allelic drop out จำนวน 1 - 2 อัลลีล นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบความสูงเฉลี่ยของอัลลีล ผลปรากฏว่าชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus ให้ค่าเฉลี่ยความสูงของอัลลีลที่สูงกว่าชุดน้ำยา AmpFISTR® Identifiler® Plus ในทุกตัวอย่างความเข้มข้นของฮิวมิคแอซิด ดังแสดงในแผนภูมิที่ 6



แผนภูมิที่ 6 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความสูงของอัลลีลและเปอร์เซ็นต์โพรไฟล์ ระหว่างชุดน้ำยา AmpFISTR® Identifiler® Plus (สีฟ้า) และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus (สีชมพู) ที่มีการเติมฮิวมิคแอซิดความเข้มข้นในช่วง 75 – 225 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

ผลการทดลองเติมเฮมาตินในปฏิกิริยาพีซีอาร์พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จากทุกตัวอย่างความเข้มข้นของเฮมาตินด้วยชุดน้ำยา AmpFISTR® Identifiler® Plus ในขณะที่ชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus สามารถตรวจวัดได้ 1, 25 และ 31 อัลลีลจากตัวอย่างเฮมาตินความเข้มข้น 300, 600 และ 900 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ทั้งนี้ผลการศึกษาแสดงให้เห็นถึงแนวโน้มจำนวนอัลลีลที่ตรวจวัดได้ลดลงเมื่อปริมาณเฮมาตินในสารละลายพีซีอาร์เพิ่มขึ้น โดยมีค่าความสูงของอัลลีลสูงสุดเท่ากับ 2,611 RFUs (จากตัวอย่างเฮมาตินความเข้มข้น 600 ไมโครโมลาร์) และค่าความสูงของอัลลีลต่ำที่สุดเท่ากับ 174 RFUs (จากตัวอย่างเฮมาตินความเข้มข้น 900 ไมโครโมลาร์) ผลการทดลองในส่วนนี้แสดงให้เห็นว่าชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus มีประสิทธิภาพความคงทนต่อเฮมาตินที่ดีกว่าชุดน้ำยา AmpFISTR® Identifiler® Plus อย่างชัดเจน



แผนภูมิที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความสูงของอัลลีลและเปอร์เซ็นต์โพรไฟล์ ระหว่างชุดน้ำยา AmpFISTR® Identifiler® Plus (สีน้ำเงิน) และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus (สีแดง) จากการเติม เฮมาตินในช่วงความเข้มข้น 300 – 900 ไมโครโมลาร์

1.3.5 ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการใช้ชุดน้ำยากับตัวอย่างวัตถุพยานจริง (Real case performance)

ผู้วิจัยได้ทำการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอจากวัตถุพยานจริงในคดีต่าง ๆทั้งหมด 64 ตัวอย่าง ซึ่งวัตถุพยานทั้งหมดได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มงานชีววิทยาและดีเอ็นเอ ศูนย์พิสูจน์หลักฐาน 10 สำนักงานตำรวจแห่งชาติ โดยใช้ชุดน้ำยา AmpFISTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus จากนั้นคัดเลือกตัวอย่างที่เป็นโพรไฟล์ผสม (Mixed DNA) และตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอต่ำกว่า 0.01 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรออกจากการศึกษา ผลการศึกษาลายพิมพ์ STR จากจำนวนตัวอย่างที่เหลือทั้งหมด 45 ตัวอย่างแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งพบว่าชุดน้ำยา AmpFISTR® Identifiler® Plus สามารถตรวจวัดได้จำนวนอัลลีลเฉลี่ย 27.07 อัลลีล ในขณะที่ค่าเฉลี่ยอัลลีลที่ตรวจวัดด้วยชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus มีค่าเท่ากับ 26.44 อัลลีล เมื่อทดสอบความแตกต่างของข้อมูลดังกล่าวทางสถิติ พบว่า ข้อมูลทั้งสองชุดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p> 0.05) จากการคำนวณทางสถิติด้วย Wilcoxon Signed - Rank Test

ตารางที่ 1 แสดงอัลลีลผลการศึกษาเปรียบเทียบที่ตรวจวัดได้จากตัวอย่างวัตถุพยานจริงทั้งหมด45 ตัวอย่างระหว่างชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus

ตัวอย่าง	ความเข้มข้น (ng/uL)	ปริมาณดีเอ็นเอ (ng)	Identifiler Plus	IDplex Plus
คราบเลือด 1	1.070	0.50	32	32
คราบเลือด 2	61.100	0.50	32	32
คราบเลือด 3	0.025	0.13	16	20
คราบเลือด 4	0.024	0.12	24	18
คราบเลือด 5	0.028	0.14	4	10
คราบเลือด 6	0.105	0.50	16	32
คราบเลือด 7	12.600	0.50	32	32
คราบเลือด 8	15.800	0.50	32	32
คราบเลือด 9	19.700	0.50	32	32
คราบเลือด 10	8.010	0.50	32	32
คราบเลือด 11	0.023	0.12	32	15
คราบเลือด 12	0.026	0.13	32	14
เยื่อบุกระพุ้งแก้ม 1	1.240	0.50	32	32
เยื่อบุกระพุ้งแก้ม 2	60.200	0.50	32	32
เยื่อบุกระพุ้งแก้ม 3	45.100	0.50	32	32
เยื่อบุกระพุ้งแก้ม 4	43.000	0.50	32	32
เยื่อบุกระพุ้งแก้ม 5	96.300	0.50	32	32
เยื่อบุกระพุ้งแก้ม 6	31.100	0.50	32	32
เยื่อบุกระพุ้งแก้ม 7	93.600	0.50	32	32
เยื่อบุกระพุ้งแก้ม 8	2.750	0.50	32	32
เยื่อบุกระพุ้งแก้ม 9	17.200	0.50	32	32
เยื่อบุกระพุ้งแก้ม 10	16.700	0.50	32	32
เยื่อบุกระพุ้งแก้ม 11	9.570	0.50	32	32
เยื่อบุกระพุ้งแก้ม 12	9.570	0.50	32	32
เยื่อบุกระพุ้งแก้ม 13	11.000	0.50	32	32

ตัวอย่าง	ความเข้มข้น (ng/uL)	ปริมาณดีเอ็นเอ (ng)	Identifiler Plus	IDplex Plus
ก้นกรองบุหรี่ 1	1.760	0.50	32	30
ก้นกรองบุหรี่ 2	0.011	0.06	2	12
ก้นกรองบุหรี่ 3	0.025	0.13	16	16
ก้นกรองบุหรี่ 4	0.024	0.12	32	32
ก้นกรองบุหรี่ 5	0.109	0.50	32	30
ก้นกรองบุหรี่ 6	10.500	0.50	32	32
ก้นกรองบุหรี่ 7	0.667	0.50	32	32
เทปพันสายไฟ 1	0.015	0.08	8	10
เทปพันสายไฟ 2	0.262	0.50	32	32
เทปพันสายไฟ 3	0.262	0.50	32	32
เทปพันสายไฟ 4	0.162	0.50	13	8
เทปพันสายไฟ 5	0.022	0.11	13	5
ผม	5.630	0.50	32	32
เสื้อผ้า	10.100	0.50	31	32
ก้านสำลี 1	5.520	0.50	32	32
ก้านสำลี 2	0.011	0.05	12	23
ก้านสำลี 3	0.011	0.05	28	8
ก้านสำลี 4	0.057	0.29	22	18
ก้านสำลี 5	0.121	0.50	32	29
เทปกาวเหนียว 1	0.050	0.25	21	28
เฉลี่ย (SD)	**13.14 (23.6)**	**0.37 (0.19)**	**27.07 (8.73)**	**26.44 (8.76)**

1.3.6 ความไม่สอดคล้องของลายพิมพ์ STR (Non-concordance study)

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความไม่สอดคล้องกันของอัลลีลที่ปรากฏในลายพิมพ์ STR (Non-concordance study) ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus และ ชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus โดยใช้ตัวอย่างที่ตรวจวัดได้จากวัตถุพยานจริงจำนวน 64 ตัวอย่างทั้งหมด 726 อัลลีล ผลการศึกษาพบว่ามีการรายงานผลอัลลีลไม่สอดคล้องกันระหว่างชุดน้ำยาทั้งสองจำนวน 2 อัลลีล คิดเป็น 0.275 เปอร์เซ็นต์ โดยอัลลีลดังกล่าวมาจากตำแหน่ง TPOX ซึ่งชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus ให้ผล

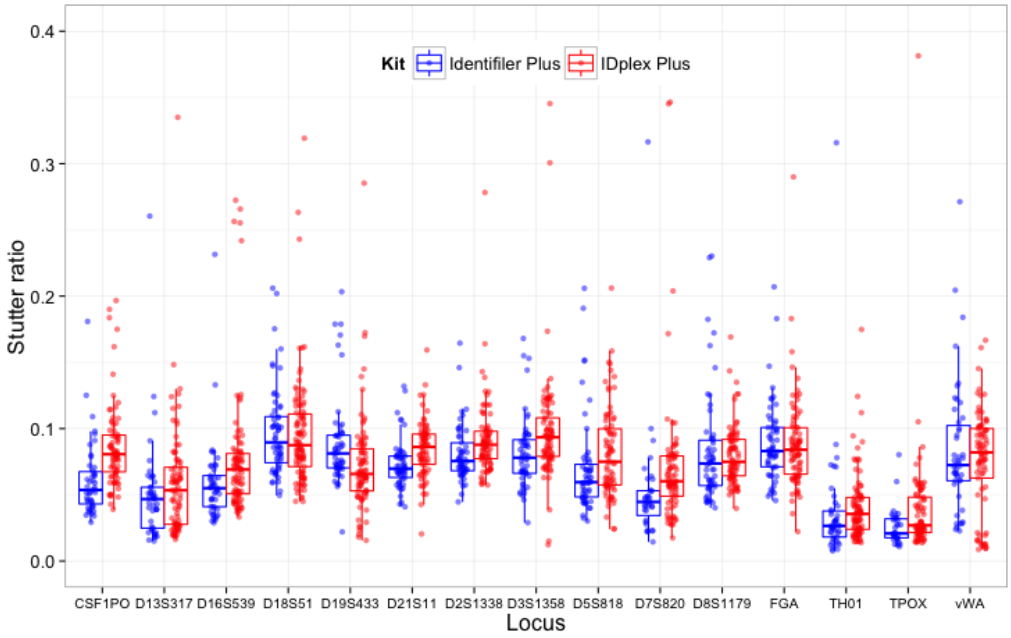
จีโนไทป์เป็นอัลลีล 7 และ 10 มีความสูงของอัลลีล 1104 และ 1262 RFUs ตามลำดับ ในขณะที่ข้อมูลจากชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus ให้ผลจีโนไทป์เป็น 8 และ 11 มีความสูงของอัลลีล 2623 และ 2855 RFUs ตามลำดับ จากการสังเกตพบว่าอัลลีลจากชุดน้ำยา AmpFISTR® Identifiler® Plus มีการเลื่อนขยับไปทางขวาของช่อง bin ดังแสดงในภาพที่ 1

ภาพที่ 1 แสดงความไม่สอดคล้องของอัลลีลในตำแหน่ง TPOX ของชุดน้ำยา Identifiler® Plus (ด้านบน) และอัลลีลจากชุดน้ำยา IDplex Plus (ด้านล่าง) ของตัวอย่างเลือดหมายเลข 2475

1.3.7 การเกิดพีคสตัตเตอร์

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอัตราส่วนความสูงของพีคสตัตเตอร์ ซึ่งคือพีคเล็กๆที่ปรากฏในตำแหน่งก่อนหน้าอัลลีลจริง 4 คู่เบสและมีความสูงไม่เกิน 15 เปอร์เซนต์ของความสูงของอัลลีลจริง โดยศึกษาจากวัตถุพยานจริง 45 ตัวอย่างดังแสดงในตารางที่ 1 จากนั้นนำมาจัดทำลายพิมพ์ STR ด้วยชุดน้ำยา AmpFISTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus และคำนวณอัตราส่วนของพีคสตัตเตอร์ได้โดยนำความสูงของพีคสตัตเตอร์หารด้วยความสูงของอัลลีลจริง โดยงานวิจัยนี้ได้จัดรูปแบบข้อมูลแยกตามตำแหน่ง STR ดังแสดงในแผนภูมิที่ 9

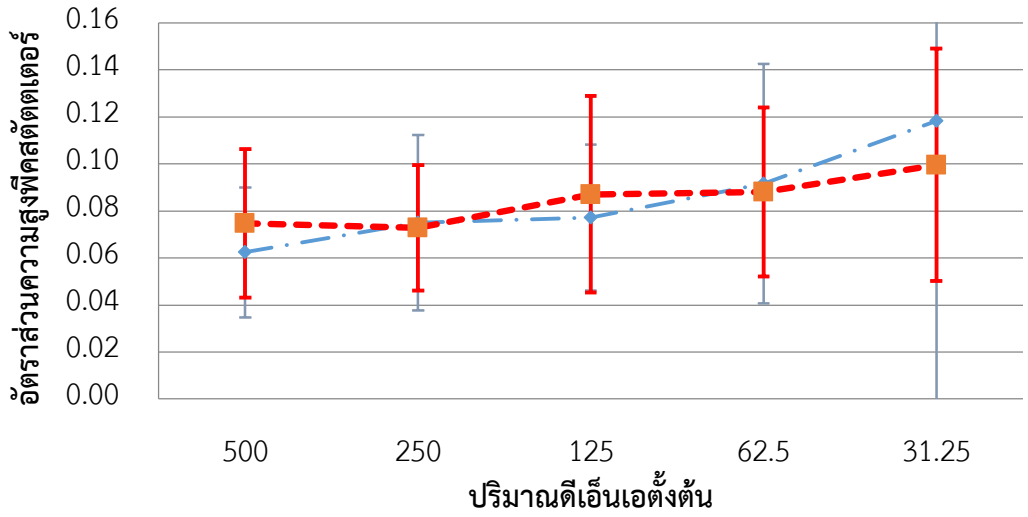
ผลการศึกษาพบว่าชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus มีค่ากลางของอัตราส่วนของพีคสตัตเตอร์ที่ใกล้เคียงกันมากเมื่อเปรียบเทียบกันในแต่ละตำแหน่ง STR ซึ่งอยู่ในช่วง 0.0 ถึง 0.1 อัตราส่วนดังกล่าวเป็นค่าอยู่ในช่วงที่เหมาะสม ซึ่งต้องไม่เกิน 0.15 (Balding and Buckleton, 2009)



แผนภูมิที่ 8 แสดงอัตราส่วนความสูงของพีคสตัตเตอร์ในลายพิมพ์ STR 15 ตำแหน่ง สีฟ้าคืออัตราส่วนความสูงของพีคสตัตเตอร์จากชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus และชมพูแสดงอัตราส่วนความสูงของพีคสตัตเตอร์ของชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus (n=45)

นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังได้ศึกษาผลของปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นต่ออัตราส่วนความสูงของพีคสตัตเตอร์ โดยคำนวณสัดส่วนของความสูงของสตัตเตอร์กับความสูงของอัลลีลจริงและเปรียบเทียบอัตราส่วนนี้ระหว่างทั้งสองชุดน้ำยาโดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอควบคุม 9947A และ 9948 ที่ปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นต่างกันในช่วง 31.25 – 500 พิโคกรัม ผลการศึกษาพบว่าสัดส่วนความสูงของพีคสตัตเตอร์ระหว่างชุดน้ำยาทั้งสองมีความใกล้เคียงกันจากในแต่ละตัวอย่างปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นที่เท่ากัน ชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus มีอัตราส่วนของสตัตเตอร์อยู่ในช่วง 6 – 11 เปอร์เซ็นต์ และ ชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus อยู่ในช่วง 7 – 9 เปอร์เซ็นต์ ความสูงของพีคสตัตเตอร์จากชุดน้ำยาทั้งสองชุดเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นในการเพิ่มปริมาณน้อยลง (แผนภูมิที่ 10) และเมื่อเปรียบเทียบค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานพบว่า ในช่วงความเข้มข้น 62.5 – 500 พิโคกรัมของทั้งสองชุดน้ำยามีความใกล้เคียง

กัน แต่พบความแตกต่างกันมากในตัวอย่างที่มีปริมาณดีเอ็นเอ 31.25 พิโคกรัม นั่นคือชุดน้ำยา AmpFISTR® Identifiler® Plus มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ 0.12 ในขณะที่ ชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานแค่เพียง 0.04 แต่อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาแสดงให้เห็นถึงอัตราส่วนความสูงของพีคสตัตเตอร์ของชุดน้ำยาทั้งสองยังอยู่ในช่วงที่เหมาะสม คือต่ำกว่า 15% ของอัลลีลจริง ตามข้อกำหนดสำหรับงานทางนิติวิทยาศาสตร์ (Brookes *et al*., 2012)



แผนภูมิที่ 9 แสดงค่าเฉลี่ยอัตราส่วนความสูงของพีคสตัตเตอร์จากตัวอย่างดีเอ็นเอคุมที่มีปริมาณตั้งต้นอยู่ในช่วง 500 – 31.25 พิโคกรัม สีฟ้าแสดงอัตราส่วนความสูงพีคสตัตเตอร์ของชุดน้ำยา AmpFISTR® Identifiler® Plus และชมพูแสดงอัตราส่วนความสูงของพีคสตัตเตอร์ของชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus

1.4 วิจารณ์ผลการศึกษา

ลายพิมพ์ STR ที่ดีที่สามารถนำไปใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์และมีผลทางกฎหมายได้นั้นจะต้องมาจากกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและมีการควบคุมให้เป็นไปตามมาตรฐาน เริ่มตั้งแต่ขั้นตอนการเก็บวัตถุพยาน การครอบครองวัตถุพยาน การดูแลรักษาวัตถุ-พยาน และเข้าสู่กระบวนการทางวิทยาศาสตร์ในห้องปฏิบัติการและการแปลผล โดยทุกขั้นตอนจะต้องมีการป้องกันการปนเปื้อน อีกทั้งปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จะต้องเพียงพอต่อการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ และต้องไม่มีตัวยับยั้งกระบวนการพีซีอาร์ปะปนอยู่ ทั้งหมดนี้เพื่อนำไปสู่การแปลผลที่ถูกต้องแม่นยำที่สุดให้สามารถนำไปใช้ระบุบุคคลและเชื่อมโยงบุคคลกับคดีความได้ ซึ่งลายพิมพ์ STR ที่ดีนั้นจะต้องพิจารณาจากหลายองค์ประกอบทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ การเลือกใช้ชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ STR มีผลโดยตรงกับคุณภาพของลายพิมพ์ STR และสำคัญต่อการนำไปใช้ในฐานข้อมูลระหว่างห้องปฏิบัติการ เนื่องจากในปัจจุบันนั้นมีชุดน้ำยาสำเร็จรูปสำหรับการทำลายพิมพ์ STR มากมายหลายชุดจากหลายบริษัทผู้ผลิต ซึ่งแต่ละชุดน้ำยาก็จะมีประสิทธิภาพและมีคุณสมบัติที่แตกต่างกันไป อีกทั้งตำแหน่ง STR ที่วิเคราะห์ได้ก็แตกต่างกันไป การเลือกใช้ชุดน้ำยาในหน่วยงานหนึ่งๆนั้นจะต้องพิจารณาจากวัตถุประสงค์ของการตรวจพิสูจน์ ความพร้อมและความเหมาะสมของห้องปฏิบัติการและเครื่องมือ รวมทั้งประสิทธิภาพในการตรวจนั้นก็มีความสำคัญอย่างยิ่ง ผู้ใช้สามารถพิจารณาเลือกใช้ชุดน้ำยาได้จากรายงานผลการทดสอบชุดน้ำยานั้นๆที่เผยแพร่โดยบริษัทผู้ผลิตรวมทั้งจะต้องทำการทวนสอบชุดน้ำยาดังกล่าวภายในห้องปฏิบัติการนั้นๆ ก่อนที่จะนำไปใช้ทำลายพิมพ์ STR จากวัตถุพยานทางชีวภาพจากคดีจริงตามข้อกำหนดของหน่วยงานนิติวิทยาศาสตร์ (Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDAM), July 2004) ทั้งนี้ในปัจจุบันหน่วยงานหลักภาครัฐของประเทศไทยที่รับผิดชอบการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอจากวัตถุพยานทางชีวภาพคือ สำนักงานพิสูจน์หลักฐานตำรวจ สำนักงานตำรวจแห่งชาติและสถาบันนิติวิทยาศาสตร์ กระทรวงยุติธรรมเลือกใช้ชุดน้ำยาหลักในการจัดทำลายพิมพ์ STR คือชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus ต่อมาเมื่อเดือนพฤษภาคม พ.ศ.2555 ชุดน้ำยา IDplex Plus ได้ผลิตออกจำหน่ายซึ่งมีราคาถูกกว่า สามารถประหยัดงบประมาณได้มากกว่า 12.6 ล้านบาทต่อปี ใช้เวลาในการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอน้อยกว่า และยังสามารถตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอตำแหน่งเดียวกันกับชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus อีกทั้งบริษัทผู้ผลิตอ้างว่าชุดน้ำยาดังกล่าวมีประสิทธิภาพและความคงทนสูงต่อตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ รวมถึงมีความไวในการวิเคราะห์สูง (Builes *et al*., 2011; QIAGEN, 2012) จึงมีความจำเป็นต้องศึกษาเปรียบเทียบคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับจากชุดน้ำยาทั้งสอง

โดยค่าความสมบูรณ์ของลายพิมพ์ STR (Percent profile), พีคแปลกปลอมต่างๆที่รบกวนต่อการแปลผล (Artifact), ค่าความสมดุลความสูงของสองอัลลีลใน STR ตำแหน่งเดียวกัน (Intra-locus balance), ค่าความสมดุลความสูงของอัลลีลระหว่างตำแหน่ง STR ในแต่ละโพรไฟล์ (Inter-locus balance) และค่าความสอดคล้องของอัลลีลที่ตรวจวัดด้วยชุดน้ำยาที่แตกต่างกัน (Concordance) เป็นต้น (Tvedebrink *et al*., 2012)

จากการทดสอบประสิทธิภาพชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus และชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus ในด้านความไววิเคราะห์มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ทราบถึงปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นที่น้อยที่สุดที่ยังสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ลายพิมพ์ STR ที่สมบูรณ์หรือปรากฏอัลลีลครบทุกตำแหน่ง STR รวมถึงมีความสูงของพีคอยู่ในช่วงที่เหมาะสมซึ่งก็คือ 500-6,000 RFUs (Butler, 2005) และไม่มีพีคแปลกปลอมซึ่งรบกวนต่อการแปลผล (Artefact) การทดลองนี้ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอควบคุมในการศึกษาเปรียบเทียบเพื่อให้ได้มาซึ่งลายพิมพ์ STR ที่ทราบอัลลีลแน่ชัดในทุกตำแหน่ง STR เป้าหมาย เพื่อให้ง่ายต่อการสังเกตและวิเคราะห์ว่าลายพิมพ์ STR ที่ได้ ปรากฏอัลลีลครบทุกตำแหน่งหรือไม่ และสามารถสังเกตุถึงการขาดหายหรือการเกินของอัลลีล (Allelic drop-in/Allelic drop-out) ที่อาจเกิดขึ้นในตัวอย่างที่มีปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นน้อยได้ จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus มีประสิทธิภาพด้านความไววิเคราะห์ที่ดีกว่า ชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus โดยพิจารณาจากค่าเฉลี่ยความสูงของอัลลีลที่มากกว่าซึ่งตรวจวัดได้ในตัวอย่างที่มีปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นน้อยๆ ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus มีการปรับปรุงพัฒนาเคมีหรือองค์ประกอบต่างๆภายในชุดน้ำยาให้มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น ตัวอย่างเช่น มีการปรับปรุงเอ็นไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสให้มีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณยิ่งขึ้น หรือปรับปรุงให้สารละลายพีซีอาร์มีความคงทนต่อตัวยับยั้งกระบวนการพีซีอาร์มากขึ้น เป็นต้น (Myers *et al*., 2012; Vallone *et al*., 2011) รวมทั้งมีสภาวะในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่แตกต่างกันจะเห็นได้ว่าชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus มีอุณหภูมิที่ต่างกันและใช้จำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณที่มากกว่า คือ 30 รอบ ในขณะที่ชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 28 รอบ (Biosystems, 2012; QIAGEN, 2012) ซึ่งอาจส่งผลให้ลายพิมพ์ STR จากชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus ให้ความสูงของอัลลีลที่มากกว่า ทั้งนี้ ผลการทดสอบความไววิเคราะห์ชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus ในงานวิจัยนี้สอดคล้องกับผลการทวนสอบชุดน้ำยาโดยผู้ผลิตและผลงานวิจัยทดสอบประสิทธิภาพของชุดน้ำยาซึ่งทดสอบโดย Wang Chang และคณะ เมื่อปี 2012 (Biosystems, 2012; Wang *et al.,* 2012) ซึ่งรายงานไว้ว่าที่ปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้น 62.5 - 1,000 พิโคกรัม สามารถตรวจวิเคราะห์

ได้ลายพิมพ์ STR ที่สมบูรณ์ในขณะที่ปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้น 31 พิโคกรัม ได้ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ไม่สมบูรณ์ ส่วนผลการทวนสอบชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus จากผู้ผลิตได้รายงานผลด้านความไววิเคราะห์ที่สอดคล้องกับผลการศึกษาในงานวิจัยนี้เช่นกัน คือจากตัวอย่างดีเอ็นเอควบคุมปริมาณ 31.25 พิโคกรัม เริ่มมีอัลลีลหายไปจากลายพิมพ์จำนวน 1 - 2 อัลลีล (QIAGEN, 2012)

การพิจารณาถึงความสมดุลของอัลลีลในลายพิมพ์ STR ก็มีความสำคัญ โดยหนึ่งในพารามิเตอร์ที่ศึกษาในงานวิจัยนี้คือ ค่า Intra-locus balance ที่บ่งบอกถึงความสมดุลของความสูงของอัลลีลระหว่างสองอัลลีลใน STR ตำแหน่งหนึ่งๆ ในกรณีที่ STR ตำแหน่งนั้นมีอัลลีลสองอัลลีลที่ต่างกัน (Heterozygous alleles) โดยค่า Intra-locus balance นั้นมีค่าสูงสุดเท่ากับ 1 ซึ่งหมายถึงอัลลีลทั้งสองใน STR ตำแหน่งเดียวกันมีความสูงเท่ากัน ทั้งนี้เนื่องจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มาจากคนๆเดียวควรจะมีสัดส่วนค่า Intra-locus balance ประมาณ 0.6 ขึ้นไป (Debernardi *et al*., 2011; Tvedebrink *et al*., 2012) ซึ่งจากผลการศึกษาในงานวิจัยนี้พบว่าชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus และชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus นั้น มีค่าอยู่ในช่วง 0.6 - 0.11 และ 0.7 - 0.9 ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสมและแสดงให้เห็นว่าชุดน้ำยาทั้งสองให้ผลความความสูงของอัลลีลระหว่างสองอัลลีลที่มีความสมดุลดี ซึ่งหากว่าอัลลีลทั้งสองนั้นมีความสูงแตกต่างกันมากอาจส่งผลให้การแปลผลผิดพลาดหรือเป็นไปได้ว่าจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอนั้นเป็นดีเอ็นเอจากบุคคลมากกว่าหนึ่งคนหรือที่เรียกว่า Mixed DNA profile หรือเกิดจากความผิดปกติของโครโมโซม เช่น ดาวน์ซินโดรม เป็นต้น

จากการศึกษาค่าความสมดุลของความสูงของอัลลีลระหว่างตำแหน่ง STR ในลายพิมพ์เดียวกันหรือที่เรียกว่า Inter-locus balance พบความแตกต่างกันระหว่างสองชุดน้ำยา โดยชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus มีความสมดุลของค่าความสูงของอัลลีลในลายพิมพ์ STR ที่เข้าใกล้ศูนย์ แสดงให้เห็นว่าชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus มีสมดุลความสูงของอัลลีลระหว่างตำแหน่ง STR ที่ดีกว่าน้ำชุดยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus ซึ่งค่า Inter-locus balance ที่ดีนั้นจะต้องมีค่าเข้าใกล้ศูนย์หรือเท่ากับศูนย์นั่นหมายถึง ค่าความสูงของอัลลีลในตำแหน่ง STR นั้นๆ มีค่าเท่ากับค่าเฉลี่ยของความสูงของพีคในลายพิมพ์เดียวกัน ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพที่ดีของชุดน้ำยาในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยกระบวนการพีซีอาร์ ส่วนค่า Inter-locus balance ที่มีค่าไปทางบวกแสดงถึงความสูงของอัลลีลในตำแหน่ง STR นั้นมีค่าสูงกว่าค่าเฉลี่ยความสูงของอัลลีลในลายพิมพ์ STR เดียวกันและหากค่า Inter-locus balance มีค่าไปทางลบหมายถึง ค่าความสูงของอัลลีลในตำแหน่ง STR นั้นมีค่าน้อยกว่าค่าเฉลี่ยของความสูงของอัลลีลในลายพิมพ์ STR เดียวกัน นอกจากนี้หากค่า Inter-locus

balance ห่างจากศูนย์มาก ณ ตำแหน่ง STR ใดๆ ในลายพิมพ์ STR ของบุคคลคนเดียวก็บ่งบอกถึง STR ตำแหน่งนั้นมีความสูงของอัลลีลแตกต่างจากตำแหน่งอื่นๆมากในลายพิมพ์เดียวกัน ทั้งนี้เนื่องจากว่ากระบวนการพีซีอาร์เป็นปฏิกิริยาแบบสุ่ม หรือที่เรียกว่า Stochastic reaction ทำให้มีโอกาสเกิดเป็นอัลลีลที่ไม่สมดุลได้ (Imbalance) (Balding and Buckleton, 2009; Tvedebrink *et al*., 2012) การเกิด Imbalance ในลายพิมพ์ STR จะส่งผลให้การแปลผลมีความยุ่งยากมากขึ้น เช่น ไม่สามารถยืนยันได้ว่าลายพิมพ์ STR นั้นๆ เป็นดีเอ็นเอที่ได้มาจากบุคคลคนเดียวหรือเป็นดีเอ็นเอผสมของบุคคลมากกว่า 1 คน เป็นต้น (Balding and Buckleton, 2009; Buckleton *et al*., 2016; Debernardi *et al*., 2011) และการเกิด Imbalance ในแต่ละตำแหน่ง STR มีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้น เมื่อปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นจากตัวอย่างดีเอ็นเอลดลงจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นในช่วง 1000 - 62.5 พิโคกรัม (Wang *et al*., 2012) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในงานวิจัยนี้

จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างชุดน้ำยา AmpFISTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus ในด้านความคงทนต่อตัวยับยั้งการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทั้งสามชนิด ซึ่งได้แก่ แคลเซียม ฮิวมิคแอซิด และเฮมาติน ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus สามารถทนทานต่อตัวยับยั้งการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทั้งสามชนิดได้ดีกว่าชุดน้ำยา AmpFISTR® Identifiler® Plus ผลการศึกษาดังกล่าวมีความสอดคล้องกันกับผลการทวนสอบชุดน้ำยา STR จากบริษัทผู้ผลิตและผลการศึกษาวิจัยก่อน หน้านี้ (Akane *et al*.,1994; Biosystems, 2012; Opel *et al*., 2010; QIAGEN, 2012) โดยตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ทั้งสามชนิดมีผลทำให้ความสูงของอัลลีลและจำนวนของอัลลีลที่ตรวจวัดได้ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมบวกซึ่งไม่มีการเติมตัวยับยั้งใดๆลงไปในสารละลายพีซีอาร์ ทั้งนี้แคลเซียมไอออนที่พบมากในกระดูกมีผลรบกวนการทำงานของแมกนีเซียมไอออนและเอ็นไซม์ *Taq* polymerase ในกระบวนการพีซีอาร์ (Opel *et al*., 2010) ในส่วนของฮิวมิคแอซิดซึ่งพบมากในดิน ส่งผลกระทบต่อกระบวนการพีซีอาร์ทำให้ลดประสิทธิภาพการจับกันระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบ และเฮมาตินซึ่งพบได้ในเม็ดเลือดแดงเป็นตัวยับยั้งที่เชื่อว่ามีผลลดความสามารถการทำงานของ *Taq* polymerase ในกระบวนการพีซีอาร์ (Akane *et al*., 1994; Faber et al, 2013; Mulero et al., 2008; Opel et al., 2010; Wang et al., 2012)

ผลการศึกษาจากการนำวัตถุพยานทางชีวภาพในคดีจริงจำนวน 64 มาเพิ่มปริมาณด้วยชุดน้ำยา AmpFISTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus และเปรียบเทียบความสมบูรณ์ของลายพิมพ์ STR ผลปรากฏว่าชุดน้ำยาทั้งสองสามารถให้ผลลาย

พิมพ์ STR ที่สอดคล้องกันเกือบทั้งหมด อย่างไรก็ตามพบอัลลีลที่ไม่สอดคล้องกัน (Non-concordance) จำนวน 2 อัลลีล จากตัวอย่างเลือด 1 ตัวอย่างคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความสอดคล้องเท่ากับ 99.7 เปอร์เซ็นต์โดยพบอัลลีลดังกล่าวบริเวณ STR ตำแหน่ง TPOX ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากการใช้ชุดน้ำยาต่างกันจะมีไพรเมอร์ที่ต่างกันในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกระบวนการพีซีอาร์ทำให้อาจเกิดความแปรผันตรงตำแหน่งที่เป็น Primer binding site เกิดเป็นผลจีโนไทป์ที่ไม่สอดคล้องกันได้ (Ensenberger *et al*., 2010) ทั้งนี้ไม่พบ Allelic-drop in จากลายพิมพ์ STR ของชุดน้ำยาทั้งสอง

ลายพิมพ์ STR มักปรากฏพีคสตัตเตอร์ซึ่งสามารถพบได้ทุกตำแหน่ง STR โดยพีคสตัตเตอร์เหล่านี้มีผลทำให้การวิเคราะห์และแปลผลมีความยุ่งยากขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งในลายพิมพ์ STR ที่มีความสูงของอัลลีลต่ำ ดังนั้นในการทวนสอบชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณ STR จากบริษัทผู้ผลิตจะต้องมีการศึกษาอัตราส่วนความสูงของพีคสตัตเตอร์ที่เกิดขึ้นใน STR ตำแหน่งต่าง ๆและรายงานอัตราส่วนความสูงของพีคสตัตเตอร์ด้วยเพื่อเป็นเกณฑ์ที่ใช้กำหนดในการวิเคราะห์ลายพิมพ์ STR ในงานทางนิติวิทยาศาสตร์ (Levinson and Gutman, 1987; Walsh *et al*., 1996) จากผลการศึกษาลักษณะการเกิดพีคสตัตเตอร์ พบแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของอัตราส่วนความสูงของพีคสตัตเตอร์เมื่อหน่วยซ้ำของ STR หรือขนาดของ STR เพิ่มขึ้น (Brookes *et al*., 2012) รวมทั้งพบพีคปลอมดังกล่าวมาในตำแหน่งที่มีลักษณะการซ้ำของชุดเบสเป็นแบบ Simple repeat ได้แก่ ตำแหน่ง D16S539, CSF1PO, D5S818, D18S51, D13S317, TPOX, D7S820 และ TH01 กับ STR ตำแหน่งที่เป็น Compound repeat ได้แก่ D2S1338, D3S1358, D8S1179, D19S433, D21S11 และ vWA (Butler, 2012) นอกจากนี้ ในบางอัลลีลที่มีเบสแกนกลางมากกว่า 1 แบบ โดยมีความต่างกันที่จำนวนของเบสแกนกลางหรือที่เรียกว่า Complex repeat นั้น อัตราส่วนการเกิดสตัตเตอร์จะขึ้นอยู่กับความยาวของหน่วยซ้ำที่ยาวที่สุดในอัลลีลนั้นๆ ซึ่งเป็นไปตามการทดลองศึกษาการเกิดพีคสตัตเตอร์โดย Clare Brookes และคณะ (Biosystems, 2012; Brookes *et al*., 2012; Mulero *et al*., 2006) อย่างไรก็ตามเปอร์เซ็นต์ความสูงสตัตเตอร์ที่เกิดขึ้นจากผลการทดลองนี้อยู่ในช่วงที่ไม่เกิน 15 เปอร์เซ็นต์ของความสูงของอัลลีลจริง ซึ่งเป็นช่วงที่ยอมรับได้ในงานทางนิติวิทยาศาสตร์ (Butler, 2005, 2007, 2012)

1.5 สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและจัดทำลายพิมพ์ STR ระหว่างชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus ซึ่งเป็นชุดน้ำยาที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่ง STR เป้าหมาย 16 ตำแหน่งที่เหมือนกัน โดยที่ ชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus ใช้เวลาในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอน้อยกว่า และมีราคาถูกกว่า ซึ่งอาจทำให้ประหยัดงบประมาณได้มากกว่า 18 ล้านบาทต่อปี จากการศึกษาพบว่าชุดน้ำยาทั้งสองนั้นมีประสิทธิภาพที่ใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus มีความไววิเคราะห์และคงทนต่อตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ดีกว่าชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดีของชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและจัดทำลายพิมพ์ STR เนื่องจากวัตถุพยานทางนิติวิทยาศาสตร์ส่วนมากประกอบด้วยดีเอ็นเอปริมาณน้อยและเสื่อมสภาพอันเนื่องจากสภาพแวดล้อมต่างๆในสถานที่เกิดเหตุ ส่วนชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus นั้นพบว่ามีประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์วัตถุพยานจริงให้ผลอัลลีลเฉลี่ยที่ดีกว่า มีค่าอัตราส่วนความสูงของอัลลีลที่สมดุลดีกว่าชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus ผู้ตรวจพิสูจน์สามารถใช้ชุดน้ำยาชุดใหม่ได้โดยไม่ต้องเปลี่ยนแปลงเครื่องมือและขั้นตอนการทำงานมาตรฐานเดิมและสามารถนำผลลายพิมพ์ STR ไปใช้ร่วมกับฐานข้อมูลเดิมได้

เอกสารอ้างอิง

Akane, A., Matsubara, K., Nakamura, H., Takahashi, S., and Kimura, K. (1994). Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. J Forensic Sci, 39(2), 362-372.

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

Barbaro, A, Cormaci, P, and Agostino, A. (2011). Validation of AmpFLSTR NGM SElect™ PCR amplification kit on forensic samples. Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 3(1), e67-e68.

Biosystems, Applied. (2012). AmpFlSTR® Identifiler® Plus PCR Amplification Kit User Guide.

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

Buckleton, John S, Bright, Jo-Anne, and Taylor, Duncan. (2016). Forensic DNA evidence interpretation: CRC press.

Builes, J. J., Trejos, D., Suárez, D., Moreno, S., Siza, L., Acevedo, M., and Zuluaga, L. (2011). New alternative for human identification. Investigator IDplex Kit – QIAGEN® reproducibility: Latin American interlaboratory study. Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 3(1), e83-e84.

Butler, J. M. (2006). Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. J Forensic Sci, 51(2), 253-265.

Butler, John. (2005). Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers (2nd ed.). Burlington, Massachusetts: Elsevier.

Butler, John M. (2011). Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology: Methodology: Academic Press.

Butler, John M. (2014). Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Interpretation: Academic Press.

Butler, John M. (2012). Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodologies. Massachusetts: Academic Press.

Debernardi, A., Suzanne, E., Formant, A., Pene, L., Dufour, A. B., and Lobry, J. R. (2011). One year variability of peak heights, heterozygous balance and inter-locus balance for the DNA positive control of AmpFlSTR(c) Identifiler(c) STR kit. Forensic Sci Int Genet, 5(1), 43-49.

Ensenberger, Martin G, Thompson, Jonelle, Hill, Becky, Homick, Kristen, Kearney, Veronica, Mayntz-Press, Kathleen A, and Raley, Kelli. (2010). Developmental validation of the PowerPlex® 16 HS System: An improved 16-locus fluorescent STR multiplex. Forensic Science International: Genetics, 4(4), 257-264.

Faber, Korie L, Person, Eric C, and Hudlow, William R. (2013). PCR inhibitor removal using the NucleoSpin DNA Clean-Up XS kit. Forensic Science International: Genetics, 7(1), 209-213.

Flores, S., Sun, J., King, J., and Budowle, B. (2014). Internal validation of the GlobalFiler Express PCR Amplification Kit for the direct amplification of reference DNA samples on a high-throughput automated workflow. Forensic Sci Int Genet, 10, 33-39.

Hares, D. R. (2012a). Addendum to expanding the CODIS core loci in the United States. Forensic Science International-Genetics, 6(5), E135-E135.

Hares, D. R. (2012b). Expanding the CODIS core loci in the United States. Forensic Sci Int Genet, 6(1), e52-54.

Hill, C. R., Duewer, D. L., Kline, M. C., Sprecher, C. J., McLaren, R. S., Rabbach, D. R., and Butler, J. M. (2011). Concordance and population studies along with stutter and peak height ratio analysis for the PowerPlex (R) ESX 17 and ESI 17 Systems. Forensic Sci Int Genet, 5(4), 269-275.

Levinson, G., and Gutman, G. A. (1987). Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. Mol Biol Evol, 4(3), 203-221.

McLaren, Robert S., Bourdeau-Heller, Jeanne, Patel, Jaynish, Thompson, Jonelle M., Pagram, Jenny, Loake, Thomas, and Storts, Douglas R. (2014). Developmental validation of the PowerPlex® ESI 16/17 Fast and PowerPlex® ESX 16/17 Fast Systems. Forensic Science International: Genetics, 13(0), 195-205.

Melo, Filipa, Amorim, António, and Alves, Cíntia. (2014). Comparative performance between “next generation” multiplex systems and the new European Standard Set of STR markers in the Portuguese Population. Forensic Science International: Genetics, 8(1), 137-142.

Mulero, J. J., Chang, C. W., & Hennessy, L. K. (2006). Characterization of the N+3 stutter product in the trinucleotide repeat locus DYS392. J Forensic Sci, 51(5), 1069-1073.

Mulero, J. J., Chang, C. W., Lagace, R. E., Wang, D. Y., Bas, J. L., McMahon, T. P., and Hennessy, L. K. (2008). Development and validation of the AmpFlSTR MiniFiler PCR Amplification Kit: a MiniSTR multiplex for the analysis of degraded and/or PCR inhibited DNA. J Forensic Sci, 53(4), 838-852.

Myers, Blake A, King, Jonathan L, and Budowle, Bruce. (2012). Evaluation and comparative analysis of direct amplification of STRs using PowerPlex® 18D and Identifiler® Direct systems. Forensic Science International: Genetics, 6(5), 640-645.

Odriozola, A., Riancho, J. A., Colorado, M., & Zarrabeitia, M. T. (2013). Evaluation of the sensitivity of two recently developed STR multiplexes for the analysis of chimerism after haematopoietic stem cell transplantation. Int J Immunogenet, 40(2), 88-92. doi: 10.1111/j.1744-313X.2012.01123.x

Opel, K. L., Chung, D., and McCord, B. R. (2010). A Study of PCR Inhibition Mechanisms Using Real Time PCR. Journal of Forensic Sciences, 55(1), 25-33.

Buckleton, J. S., Bright, J. A., and Taylor, D. (Eds.). (2016). Forensic DNA evidence interpretation. CRC press.

QIAGEN. (2012). Developmental validation report of the Investigator® IDplex Plus Kit.

Thanakiatkrai, P., and Kitpipit, T. (2013). Current STR-based techniques in forensic science. Maejo International Journal of Science and Technology, 7(1), 1-15.

Tucker, Valerie C, Hopwood, Andrew J, Sprecher, Cynthia J, McLaren, Robert S, Rabbach, Dawn R, Ensenberger, Martin G, and Storts, Douglas R. (2011). Developmental validation of the PowerPlex® ESI 16 and PowerPlex® ESI 17 Systems: STR multiplexes for the new European standard. Forensic Sci Int Genet, 5(5), 436-448.

Tvedebrink, T., Eriksen, P. S., Mogensen, H. S., and Morling, N. (2012). Statistical model for degraded DNA samples and adjusted probabilities for allelic drop-out. Forensic Sci Int Genet, 6(1), 97-101.

Tvedebrink, T., Mogensen, H. S., Stene, M. C., and Morling, N. (2012). Performance of two 17 locus forensic identification STR kits-Applied Biosystems's AmpFlSTR$^{(R)}$ NGMSElect and Promega's PowerPlex$^{(R)}$ ESI17 kits. Forensic Sci Int Genet, 6(5), 523-531.

Vallone, Peter M, Hill, Carolyn R, and Butts, Erica LR. (2011). Concordance study of direct PCR kits: PowerPlex 18D and Identifiler Direct. Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 3(1), e353-e354.

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

Wang, D. Y., Chang, C. W., Lagace, R. E., Calandro, L. M., and Hennessy, L. K. (2012). Developmental validation of the AmpFlSTR(R) Identifiler(R) Plus PCR Amplification Kit: an established multiplex assay with improved performance. J Forensic Sci, 57(2), 453-465.

Whitaker, JP, Cotton, EA, and Gill, P. (2001). A comparison of the characteristics of profiles produced with the AMPFISTR SGM Plus™ multiplex system for both standard and low copy number (LCN) STR DNA analysis. Forensic Science International, 123(2), 215-223.

ภาคผนวก

ก ต้นฉบับสำหรับตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

Science and Justice 56 (2016) 468–474

Contents lists available at ScienceDirect

Science and Justice

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

Comparative performance of AmpFLSTR® Identifiler® Plus PCR amplification kit and QIAGEN® Investigator® IDplex Plus kit☆

Dalad Mattayat [a], Thitika Kitpipit [a], Sukanya Phetpeng [b], Watee Asawutmangkul [c], Phuvadol Thanakiatkrai [a,*]

[a] Forensic Science Program, Department of Applied Science, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90110, Thailand
[b] DNA Analysis Center, Scientific Crime Detection Division 10, Royal Thai Police, Hat Yai, Songkhla 90110, Thailand
[c] Institute of Forensic Medicine, Royal Thai Police, Bangkok 10330, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:
Received 2 February 2016
Received in revised form 15 June 2016
Accepted 20 June 2016

Keywords:
AmpFLSTR® Identifiler® Plus
IDplex Plus
STR typing kit
Short tandem repeat
Comparative performance

ABSTRACT

Many forensic STR kits are currently available in the market. The AmpFLSTR® Identifiler® Plus kit, which targets 15 STRs, is commonly used worldwide. The Thai forensic DNA community is built around it in terms of instrument, databases, and interpretation. QIAGEN's IDplex Plus kit targets the same loci, but the PCR cycling time is shorter by about 90 min. A direct comparison that assesses forensic parameters and applicability to casework between the two kits has never been carried out. In this study, we performed a direct comparison between the two kits using serial dilutions of two control DNA samples and 60 randomly selected casework samples, including samples taken from improvised explosive devices and terrorist raids. We statistically compared the performance of the two kits in terms of peak height, number of allele detected (allelic drop-out), intra-locus balance, inter-locus balance, inhibitor tolerance, stutter ratio, concordance, and allelic drop-in. The results demonstrate that both kits are statistically similar in performance. IDplex Plus gave higher peak heights in sensitivity test and tolerated inhibitors better, but had slightly worse inter-locus balances and stutter ratios. However, these differences were not practically significant, as seen by the resulting profiles of the casework samples ($p = 0.601$). The performance on low-template samples also was not different. In conclusion, laboratories looking to replace the aging Identifiler® Plus might consider the IDplex Plus as a faster, more robust alternative that fits right into their existing structure without further investment in instrument and DNA database. Having more kits available worldwide by different companies could help bring the technology to different forensic laboratories and the justice system as a whole.

© 2016 The Chartered Society of Forensic Sciences. Published by Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

DNA analysis is crucial to criminal investigations and is considered the gold standard in forensic science. Initially, the Federal Bureau of Investigation selected 13 STR loci plus the amelogenin locus as the US Combined DNA Index System (CODIS) Core loci [1]. Over 50 countries worldwide have adopted the 13 CODIS loci as their standard set [2]. In 2012, the core loci was expanded to 20 loci: amelogenin, D18S51, FGA, D21S11, D8S1179, vWA, D13S317, D16S539, D7S820, TH01, D3S1358, D5S818, CSF1PO, D2S1338, D19S433, D1S1656, D12S391, D2S441, D10S1248, and DYS391 [3].

Various manufacturers sell commercial kits that target the core 13 loci and other additional targets. Relevant forensic agencies (e.g. SWGDAM, DAB, and ENFSI) have issued rigorous procedures to standardize the development and implementation of STR typing kits. Manufacturers must perform developmental validation studies [4,5], which are sometimes followed by comparative analysis by a third party (e.g. [6–8]). Finally, an internal validation is necessary prior to implementation in a working laboratory (e.g. [9,10]). Together these studies are used to evaluate various forensic parameters, such as sensitivity, robustness, effects of increased cycle numbers, and inhibitor tolerance.

The AmpFLSTR® Identifiler® Plus kit, which types 15 STR loci (CODIS 13 plus D2S1338 and D19S433) and amelogenin, is widely used. The forensic DNA workflow in Thailand is built around this kit (i.e. qPCR machines, genetic analyzers, and databases are some examples) — an experience echoed by many developing countries. A few years after the introduction of the Identifiler® Plus kit, QIAGEN® commercialized the QIAGEN® Investigator® IDplex Plus kit, which types the same 16 loci. In developmental validation, QIAGEN® claims that IDplex Plus performs well in established methodologies for forensic DNA analysis, offers high resistance to PCR inhibitors, and has high sensitivity [11,12]. Additionally, this kit takes 90 min less than Identifiler® Plus. Deciding which STR kit to use is very important; however, no study

☆ Additional note: This manuscript has been seen and approved by all authors and by any person whose aid has been acknowledged.

* Corresponding author.
E-mail addresses: pthanakiatkrai@gmail.com, phuvadol.t@psu.ac.th (P. Thanakiatkrai).

http://dx.doi.org/10.1016/j.scijus.2016.06.008
1355-0306/© 2016 The Chartered Society of Forensic Sciences. Published by Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

has directly compared the performance of these two competing kits for forensic use, especially on real casework samples. If the performances are on par, adopting the IDplex Plus kit could save both time and money for a forensic laboratory. Switching kits could improve turn-around time, especially for high profile cases, without further investment in associated platforms, such as a new genetic analyzer or a database upgrade.

Here, we compared the performance of both kits using both control DNA, typical casework samples, and atypical casework samples (improvise explosive device evidence). The following forensic parameters were investigated: peak height, number of alleles detected (allelic drop-out), intra-locus balance, inter-locus balance, inhibitor tolerance, stutter ratio, concordance, and allelic drop-in.

2. Materials and method

2.1. Samples

The samples used in this study consisted of control DNA 9947A and 9948, as well as 60 casework samples. The control DNAs were diluted to five input amounts: 500 pg, 250 pg, 125 pg, 62.5 pg and 31.25 pg. They were used to assess sensitivity, intra- and inter-locus balance, stutter ratio, allelic drop-in, and inhibitor tolerance. Casework samples that were submitted to our laboratory from January 2014 to December 2014 were randomly selected for this study using a random number generator. The type of case were as follows: 28 terrorist-related cases, 11 drug-related cases, 10 database samples, 7 homicide case, and 1

Table 1
Number of alleles detected from casework samples using Identifiler® Plus and IDplex Plus (n = 45). The DNA concentrations and the input amounts are also shown. Rows in which Identifiler® Plus detected more alleles are shown in blue. Similarly, red is used for rows that IDplex Plus detected more alleles.

Sample	Case type	[DNA] (ng/uL)	Input (ng)	Identifiler Plus (alleles)	IDplex Plus (alleles)
Bloodstain 1	Homicide / blood on gun	1.070	0.50	32	32
Bloodstain 2	Homicide / blood on weapon	61.100	0.50	32	32
Bloodstain 3	Homicide / blood on cloth	0.025	0.13	16	20
Bloodstain 4	Drug -related / blood on wall	0.024	0.12	24	18
Bloodstain 5	Terrorism / blood in suspect's car	0.028	0.14	4	10
Bloodstain 6	Terrorism / blood in suspect's car	0.105	0.50	16	32
Bloodstain 7	Terrorism / blood at scene	12.600	0.50	32	32
Bloodstain 8	Terrorism / blood at scene	15.800	0.50	32	32
Bloodstain 9	Terrorism / blood at scene	19.700	0.50	32	32
Bloodstain 10	Terrorism / blood at scene	8.010	0.50	32	32
Bloodstain 11	Terrorism / blood in scene	0.023	0.12	32	15
Bloodstain 12	Drug -related / blood in scene	0.026	0.13	32	14
Buccal swab 1	Terrorism / suspect reference	1.240	0.50	32	32
Buccal swab 2	Terrorism / raid, suspect on scene	60.200	0.50	32	32
Buccal swab 3	Terrorism / suspect reference	45.100	0.50	32	32
Buccal swab 4	Terrorism / suspect reference	43.000	0.50	32	32
Buccal swab 5	Database / current convict	96.300	0.50	32	32
Buccal swab 6	Database / current convict	31.100	0.50	32	32
Buccal swab 7	Database / current convict	93.600	0.50	32	32
Buccal swab 8	Database / current convict	2.750	0.50	32	32
Buccal swab 9	Terrorism / suspect reference	17.200	0.50	32	32
Buccal swab 10	Terrorism / suspect reference	16.700	0.50	32	32
Buccal swab 11	Database / current convict	9.570	0.50	32	32
Buccal swab 12	Database / current convict	9.570	0.50	32	32
Buccal swab 13	Database / current convict	11.000	0.50	32	32
Cigarette butt 1	Homicide / cigarette at scene	1.760	0.50	32	30
Cigarette butt 2	Terrorism / cigarette at scene	0.011	0.06	2	12
Cigarette butt 3	Terrorism / cigarette at scene	0.025	0.13	16	16
Cigarette butt 4	Drug -related / cigarette at scene	0.024	0.12	32	32
Cigarette butt 5	Drug -related / cigarette at scene	0.109	0.50	32	30
Cigarette butt 6	Terrorism / cigarette at scene	10.500	0.50	32	32
Cigarette butt 7	Terrorism / cigarette at scene	0.667	0.50	32	32
Electrical tape 1	Terrorism / tape in IED	0.015	0.08	8	10
Electrical tape 2	Terrorism / tape in IED	0.262	0.50	32	32
Electrical tape 3	Terrorism / tape in IED	0.162	0.50	13	8
Electrical tape 4	Terrorism / tape in IED	0.022	0.11	13	5
Nail	Drug -related / nail clippings at scene	0.005	0.03	17	26
Hair	Homicide / hair on victim	5.630	0.50	32	32
Unknown-cloth	Homicide / cloth at scene	10.100	0.50	31	32
Unknown-swab 1	Terrorism / backpack at scene	5.520	0.50	32	32
Unknown-swab 2	Terrorism / hammock at scene	0.011	0.05	12	23
Unknown-swab 3	Homicide / knife handle	0.011	0.05	28	8
Unknown-swab 4	Terrorism / PVC in IED	0.057	0.29	22	18
Unknown-swab 5	Drug-related / drug wrapper	0.121	0.50	32	29
Unknown-tape-lift	Terrorism / circuit board in IED	0.050	0.25	21	28
Average (SD)		**13.14 (23.6)**	**0.37 (0.19)**	**27.07 (8.73)**	**26.44 (8.76)**

rape case. The samples included 13 bloodstains, 13 buccal swabs, 8 trace DNA swabs, 7 cigarettes, 6 trace DNA tape-lifts, 5 pieces of clothing, 4 electrical tapes, 2 hair samples, 1 nail clippings, and 1 toothbrush (Table 1; only 45 single-source samples are shown). Casework samples were used to assess the kits' performances with typical samples and challenging samples (i.e. improvise explosives) that are encountered in forensic investigations. Casework STR profiles were also used for stutter ratio analysis and concordance.

2.2. PCR inhibitors

$CaCl_2$, hematin, and humic acid were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Final concentrations of the three inhibitors were as follows: 1 mM, 2 mM and 3 mM $CaCl_2$ in sterile water; 300 μM, 600 μM and 900 μM hematin in 0.1 N sodium hydroxide; and 75 ng/μL, 150 ng/μL and 225 ng/μL humic acid in sterile water. Each inhibitor was spiked into a PCR reaction containing 500 pg of control DNA 9947A or 9948 to test for inhibitor tolerance.

2.3. DNA extraction

All casework samples were extracted using the DNA IQ™ System (Promega Corporation, WI, USA) following the manufacturer's protocol. All samples were stored at −20 °C until amplification. DNA was eluted in 20–100 μL elution buffer, depending on the sample type. Negative controls were DNA-free swabs and positive controls were buccal swabs.

2.4. DNA quantification

DNA extracts from casework samples were quantified in duplicate using the Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems, CA, USA). One microliter extracted DNA was added to 6.25 μL Quantifiler Human Primer Mix and 5.25 μL Quantifiler PCR Reaction Mix. DNA standards and no-template controls were included with each plate. Quantification data were analyzed with the SDS Software v1.0.

2.5. STR amplification

Two replicates were performed for all samples. Positive and negative PCR controls were included with every set of reaction. For the Identifiler® Plus kit, a half-reaction volume of 12.5 μL, containing 5.0 μL PCR Master Mix, 2.5 μL Primer Mix, and 5.0 μL DNA, was used. PCRs were performed using the ABI 9700 with the following conditions: 95 °C for 11 min followed by 28 cycles of 94 °C for 1 min, 59 °C for 1 min, then 72 °C for 1 min, and a final extension at 60 °C for 60 min. PCR products were kept at 4 °C.

For the QIAGEN® Investigator® IDplex Plus kit, a half-reaction volume of 12.5 μL, containing 3.75 μL Fast Reaction Mix, 1.25 μL Primer Mix, 2.5 μL nuclease-free water and 5.0 μL DNA, was used. PCRs were performed using the ABI 9700 with the following conditions: 95 °C for 5 min followed by 30 cycles of 96 °C for 10 s and 61 °C for 2 min. PCR products were kept at 4 °C.

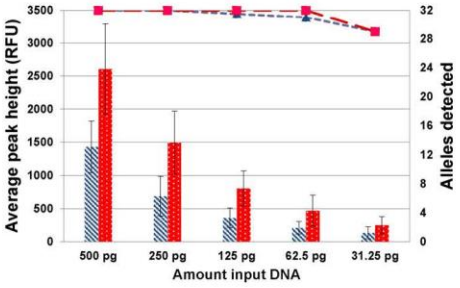


Fig. 1. Sensitivity of Identifiler® Plus kit (blue triangle and striped bars) and IDplex Plus kit (red squares and dotted bars). Average peak height per allele (in RFU) and the average number of alleles detected are shown (n = 4 per input DNA amount). Error bars denote one standard deviation.

2.6. DNA separation and detection

PCR products were analyzed on an ABI 3130xl Genetic Analyzer using POP-4 polymer and 36 cm capillary. One microliter of amplified PCR products were added to 10.7 μL formamide and 0.3 μL GeneScan LIZ-500 for the Identifiler® Plus kit and 12 μL formamide and 0.5 μL DNA Size Standard 550 (BTO) for the IDplex Plus kit. The mixed solution was then denatured at 95 °C for 2 min. The injection condition was 15 kV/5 s and 3 kV/10 s for Identifiler® Plus kit and IDplex Plus kit, respectively. Alleles were called using GeneMapper® ID v3.2.1. Except for stutter analysis, an analytical threshold of 50 RFU and a stochastic threshold of 200 RFU, which has an allelic drop-out probability of 0.01 [13], were used for all samples.

For casework samples, consensus profiling was used to obtain a single profile and to account for allelic drop-ins. Alleles that were not repeatable were discarded. Mixtures were assessed using Caragine's et al. criteria [14] and removed from further analysis.

2.7. Statistical analysis

Using R and Microsoft Excel, the following parameters were investigated:

- Alleles detected: the number of alleles detected in a profile.
- Intra-locus balance: This was calculated by dividing the peak height with lower RFU by the one with higher RFU in a heterozygous locus. A value close to one means that the two alleles are balanced. A ratio of <0.6 is rare for single-source sample [15].
- Inter-locus balance: This was calculated by comparing the deviation of the peak height for each locus from the sample average [7]. Normalization of signal was carried out by dividing the difference by the square root of the average peak height per locus [7].

$$\text{Inter-locus balance} = \frac{\text{locus height} - \text{average peak heak height from 16 loci}}{\sqrt{\text{average peak heak height from 16 loci.}}}$$

Negative values indicate that the locus has peak heights below the average, and vice versa. A value close to zero indicates a well-balance profile.

- Stutter ratio: Peak heights of peaks in position n-4 bp relative to the true allele in position n bp were divided by the true allele peak height. Genemapper's stutter filter was not applied so that all signals in each STR profile are detected.
- Allelic drop-in: A peak that did not belong to the reference profile, was not a stutter, and was not a pull-up peak was counted as an allelic drop-in.

Wilcoxon signed-rank test was used to compare the peak heights obtained in the sensitivity study and inhibitor tolerance study, as well as the number of alleles detected for the real casework study. For multiple comparisons due to different concentrations of DNA and inhibitors, Holm-Bonferroni correction was employed. Repeated measures ANOVA was used to compare the heterozygous balance and stutter ratios of the two kits with the following stratifications: kit within concentration and kit within locus, respectively. ANOVA assumptions were checked with normal quantile-quantile plots (sample quantiles against theoretical

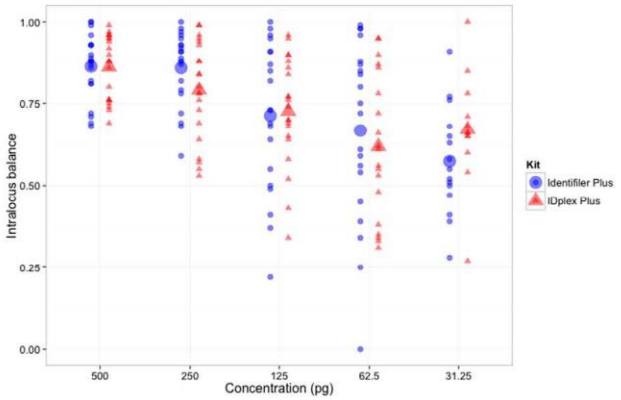


Fig. 2. Intra-locus balance of the Identifiler® Plus kit (blue circle) and the IDplex Plus kit (red triangle). The means are shown as larger symbols (n = 4 for each amount; no homozygous loci used).

quantiles) and homoscedasticity plots. A p-value of <0.05 was considered statistically significant.

3. Result

3.1. Alleles detected and peak height

The number of alleles observed and the average peak heights decreased as the amount of starting DNA template decreased (Fig. 1). We observed allelic drop-outs at 125 pg, 62.5 pg, and 31.25 pg for Identifiler® Plus, while IDplex Plus showed drop-outs only at 31.25 pg. The differences between the two kits were less than two alleles at 125 pg and 62.5 pg of DNA, and no difference was observed at 31.25 pg. Average peak heights of Identifiler® Plus were about half of IDplex Plus at all amounts of starting template ($p < 0.001$).

3.2. Intra-locus balance

Fig. 2 shows intra-locus balance of two STR kits with varying amounts of initial DNA template. The mean intra-locus balance of both kits decreased with decreasing template amount. The intra-locus balances were highly similar for the two kits ($p = 0.752$).

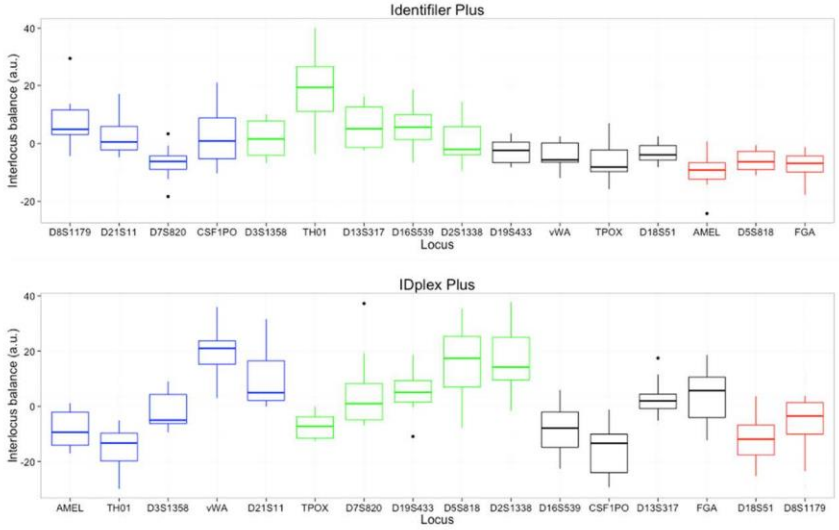


Fig. 3. Boxplots of inter-locus balance (arbitrary unit) by locus and color of the Identifiler® Plus and IDplex Plus kits. Values close to zero indicate that the locus' peak height is close to the average locus height of the profile [7]. The loci are arranged by color then by PCR product size (n = 20 per kit from 4 replicates of each input amount from 500 pg to 31.25 pg).

3.3. Inter-locus balance

Fig. 3 shows inter-locus balances of the two kits by dye color and locus. Identifiler® Plus showed better inter-locus balance than IDplex Plus, as seen by the smaller shifts from zero both within and between different dyes. For Identifiler® Plus, the blue and green channels (6-FAM™ and VIC® dyes) had higher locus peak heights than yellow and red channels (NED™ and PET® dyes). For IDplex Plus, this pattern was not evident, but loci with larger PCR product sizes showed higher peak heights than those of the smaller loci (e.g. D2S1338 vs TPOX in the green channel).

3.4. Inhibitor study

IDplex Plus had higher tolerance to calcium and hematin than Identifiler® Plus, but were on par for humic acid (Fig. 4A–C). At 1 mM of $CaCl_2$, full profiles were obtained for both kits. At higher concentrations, the numbers of alleles detected and average peak heights decreased. More alleles dropped out for Identifiler Plus compared with IDplex Plus (11 and 5.5 alleles detected versus 21.5 and 15.5 alleles detected for 2 mM and 3 mM of $CaCl_2$, respectively). For hematin, complete inhibition was seen at all concentrations for Identifiler® Plus while partial profiles were obtained for IDplex Plus (31, 25, and 1 alleles). The loss of alleles were accompanied by a marked decrease in peak heights when going from 600 μM to 900 μM of hematin. Lastly, for humic acid, full profiles were obtained for all concentrations with Identifiler® Plus and at 75 and 150 ng/μL for IDplex Plus. At 225 ng/μL, 30.5 alleles were obtained for IDPlex Plus. Average peak heights of the two kits were very similar except at 150 ng/μL humic acid.

Lastly, no allelic drop-in was observed in any amplification using control DNAs.

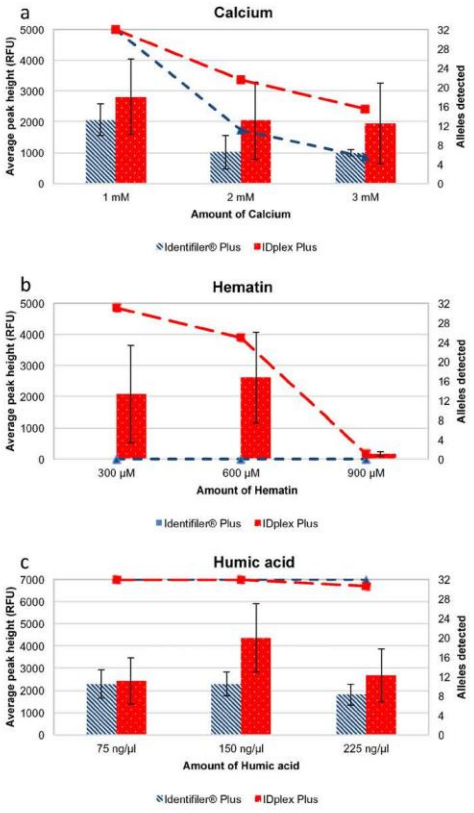


Fig. 4. Average peak height per allele (RFU) and the number of alleles detected for the Identifiler® Plus kit (striped blue bars and triangles) and IDplex Plus kit (dotted red bars and squares) with different concentrations of PCR inhibitor: (A) calcium, (B) hematin, and (C) humic acid (n = 4 per concentration). Error bars denote one standard deviation.

3.5. Real casework performance

Real casework samples were used to compare the two kits in terms of real world performances (Table 1). Of the 60 samples randomly selected from casework between January 2014 to December 2014, 15 were mixtures (1 bloodstain, 1 hair sample, 1 toothbrush, 4 pieces of cloth, 3 trace DNA swabs, and 5 trace DNA tapelifts) and thus they were eliminated from further statistical analyses. For the single-source samples, DNA concentrations ranged from 0.011 ng/μL to 96.3 ng/μL (yielding minimal DNA input at 0.053 ng and maximal DNA input at 0.50 ng). IDplex Plus detected more alleles in 9 samples and Identifiler® Plus detected more alleles in 10 samples (Table 1). No difference was seen in 26 samples. Both the averages (27.1 vs 26.4 for Identifiler Plus and IDplex Plus) and the standard deviations (8.7 vs 8.8) of the two kits were very close to each other ($p = 0.601$).

Considering only the 13 samples with DNA concentration in the low template range (<0.15 ng added). Both kits still performed similarly, with Identifiler® Plus yielding more alleles in five samples and IDplex Plus yielding more alleles in six samples. The number of alleles recovered from the other two samples did not differ between the two kits. Overall, Identifiler® Plus detected an average of 18.3 ± 11.1 alleles while IDplex Plus detected 15.3 ± 7.36 alleles.

Full concordance was observed for all alleles compared (n = 736 alleles).

3.6. Stutter analysis

Fig. 5 shows that the stutter ratios were very similar for the two kits, with almost all ratios falling under 0.15. The two loci with the lowest stutter ratios were TH01 and TPOX. Slightly higher ratios were seen for the IDplex Plus kit ($p = 0.04$), with overall means and standard deviations of 0.070 ± 0.042 and 0.074 ± 0.040 for Identifiler® Plus and IDplex Plus, respectively. Within a locus, smaller alleles gave lower stutter ratio than large alleles at the same marker (data not shown) [16,17].

4. Discussion

This study is the first to directly compare the Identifiler® Plus kit, a well-established commercial kit by Life Technologies, with the IDplex Plus kit by Qiagen. Using both control DNA samples, typical casework samples, and our unique touch DNA and low copy number samples from terrorism-related cases, the performances of the Identifiler® Plus kit and IDplex Plus kit were highly similar in most aspects. IDplex Plus better tolerated inhibitors, but had slightly worse inter-locus balances and stutter ratios. However, these differences were not practically significant. In other words, IDplex Plus could be used in place of Identifiler® Plus.

This sensitivity result of both kits agrees with the developmental validation reports [12,18], and is not different from multiplex STR kits of the same generation, such as the PowerPlex® 16 HS System [8]. The difference in peak height, although statistically significant, is not practically significant as only a difference of one to two alleles was seen.

Other relevant parameters — intra-locus balance, inter-locus balance, and stutter ratio — affect the interpretation of complex profiles resulting from mixtures and low-template DNA samples [19]. The performances of both kits conform to existing standards and other kits (e.g. [6,8,20,21]). The intra-locus balances of non-low template DNA samples for both kits were above 60% [15]. As for inter-locus balance, most values obtained were within ± 20 arbitrary units, a figure that is highly similar to the newer AmpFLSTR® NGMSElect kit and the PowerPlex® ESI17 kit [7]. Most stutters did not exceed the general guideline of 0.15 [15]. As expected, low-template samples had higher stutter ratios than samples with higher amount of DNA (data not shown) [22,23]. Similar to Brookes et al. [17], stutter ratios depend on the longest uninterrupted sequence (LUS).

Concordance between the two kits was 100%, which is slightly higher than other studies that compared different kits [8,16]. The difference could be due to the higher number of alleles compared in the previously published studies.

We tested inhibitor tolerance with three common inhibitors: calcium (*Taq* inhibitor), hematin (*Taq* inhibitor), and humic acid (sequence-specific inhibitor) [24]. These inhibitors are usually found in bones, blood, and soil, respectively, and they could be co-extracted with DNA. The inhibitor concentrations used range from possibly found in casework to highly unlikely [12,25]. The difference in inhibitor tolerance was again not practically significant. The results of the inhibitor tolerance test agree with the literature on these two kits [12,18,25].

The differences between the two kits — the higher peak heights observed in the sensitivity test, the slightly more deviations in the interlocus balance, the slightly higher stutter ratios, and the better inhibitor tolerance of the IDplex Plus kit — could possibly be explained by the newer chemistry and increased cycle number (30 cycles in the IDplex Plus compared to 28 cycles in the Identifiler® Plus). We did not use the same cycle number because we wanted to compare the optimized conditions suggested by the manufacturers, and not modified conditions.

However, these differences did not result in better casework performances. The results demonstrate successful STR typing of casework sample using both the recommended input amount and low template level of DNA. Both kits performed equally well, especially with optimal DNA input. For lower input levels, some samples were better amplified with one kit and vice versa. Using 1036 U.S. population samples [26], the combined probabilities of identity (PID) for the smaller loci (<200 bp) are similar between the two kits (Table 2), even though only two loci overlap (i.e. TH01 and D3S1358). If D21S11, which have alleles ranging from 180 bp to 250 bp, is included for Identifiler® Plus, its PID is better than IDplex Plus by one order of magnitude. If not, the PID becomes worse by one order of magnitude. Since both kits type the same 15 STR loci, the overall combined PID is the same for the samples that yielded full profiles or very high partial profiles.

Table 2
Combined probability of identity (PID) calculated from 1036 U.S. population samples [26] for the two multiplex STR kits for small STR loci. Loci are arranged by dye color of each kit.

Kit	Identifiler Plus	IDplex Plus
Small loci (<200 bp)	D8S1179, D21S11[a] D3S1358, TH01 D19S433, vWA D5S818	TH01, D3S1358 TPOX, D7S820 D16S539, CSF1PO D18S51
Combined PID[b]	1.47×10^{-7} to 5.94×10^{-9}	1.41×10^{-8}

[a] D21S11 spans approximately 180 bp to 250 bp.
[b] PID for Identifiler® Plus calculated without D21S11 and with D21S11.

When we considered only the nine samples that showed some degree of inhibition (difference in IPC Ct of at least 0.5 when compared to standards), both kits also did not differ in amplifying these samples (data not shown). One limitation of using real casework samples is that one does not know whether the alleles detected are true alleles. We minimized the effect of allelic drop-ins by (1) using consensus profiling from duplicate amplifications and (2) only using single source profiles.

Our results suggest that IDplex Plus can replace Identifiler® Plus. As the two kits target the same 16 loci and require the same instruments, forensic laboratories can easily transition to the IDplex Plus kit. Doing so would improve turnaround time, as the PCR cycling step of IDplex Plus is shorter by about 90 min. An alternative kit might have the additional economic advantage as competition can help drive the prices down. Also, availability of the STR kits by local distributors may vary by country. As with any change in STR typing kit, one must keep discordant alleles in mind and make appropriate safeguards in the transition process, especially with database searching [16,27].

Although newer and more powerful kits, e.g. the AmpFlSTR® GlobalFiler™ kit and QIAGEN® Investigator 24plex kits, are currently available in the market, transitioning to these new kits necessitates purchasing of new genetic analyzers, rewriting of standard operating

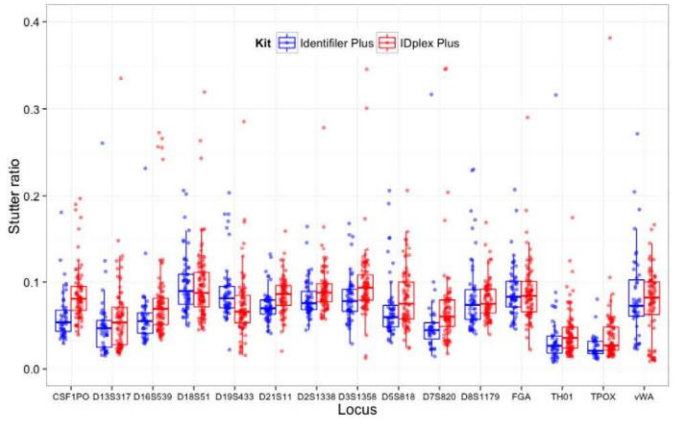


Fig. 5. Shutter ratios of Identifiler® Plus kit (blue) and IDplex Plus kit (red) was determined from casework samples and serial dilutions of control DNA. Each dot represents one datum of stutter ratio.

protocols, and upgrading of DNA databases. The newer kits also cost much more than the two kits being compared in this study. All these require additional investments of time, money, and labor, which might not be available to a routine laboratory in a developing country.

5. Conclusion

This study focused on comparative performance of Identifiler® Plus and IDplex Plus. As both kits target the same loci, we investigated whether IDplex Plus could be a substitute to Identifiler® Plus due to its lower cost per sample and faster PCR cycling time. The results showed that although some differences were observed in some parameters, both kits performed equally well in most areas and did not differ in casework performance. Thus, laboratories looking to replace the aging Identifiler® Plus might consider the IDplex Plus as a viable alternative that fits right into their existing structure, including standard operating protocols and current DNA database.

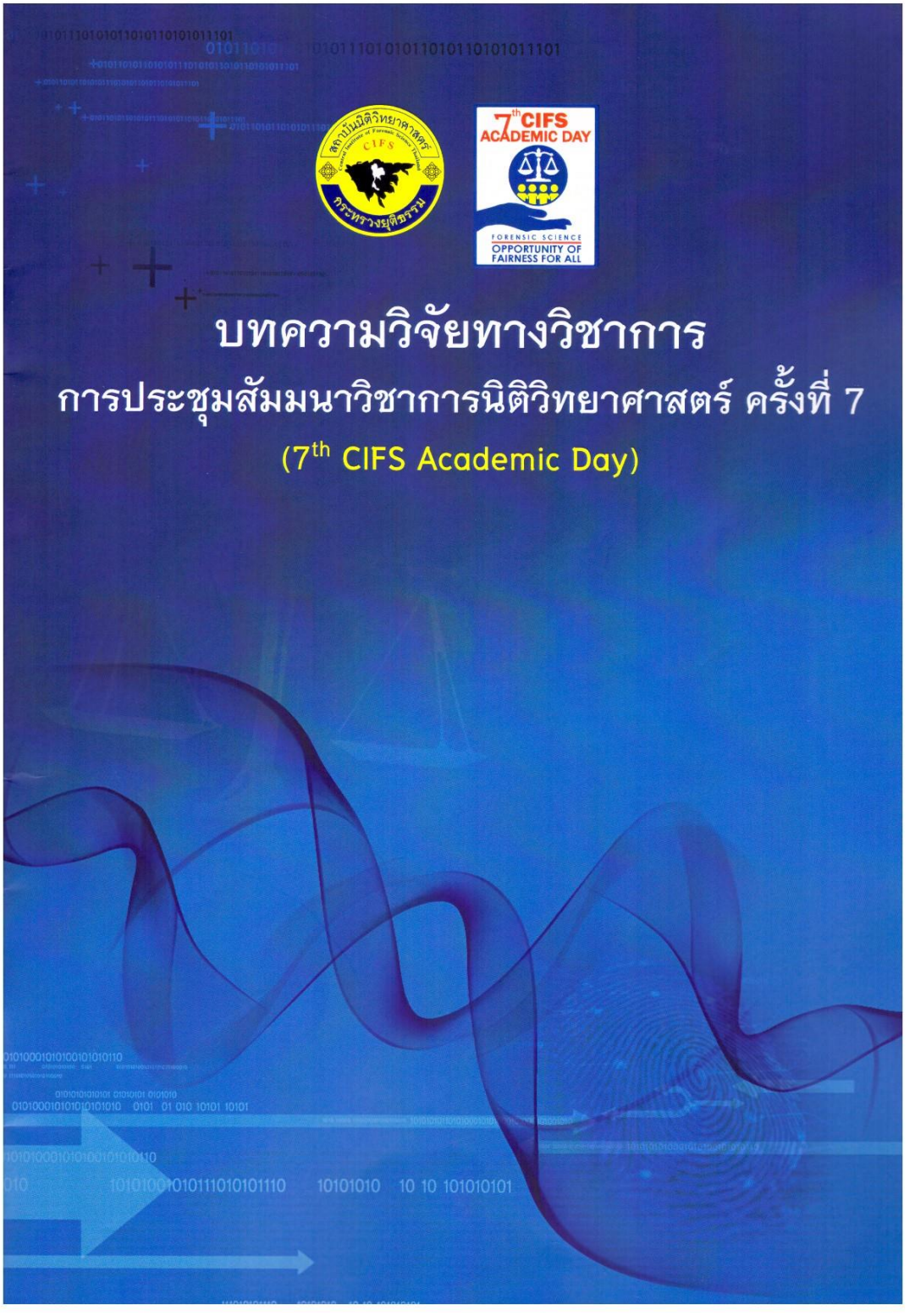
Acknowledgement

This work was funded by the Thailand Research Fund (TRF) Grant no. RDG5750118. We also acknowledge the help of Ms. Rapeeporn Khienthong at the DNA Analysis Center.

References

[1] J.M. Butler, Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing, J. Forensic Sci. 51 (2006) 253–265.
[2] Federal Bureau of Investigation, CODIS Brochure, in, FBI, Department of Justice, US Government, 2015.
[3] D.R. Hares, Selection and implementation of expanded CODIS core loci in the United States, Forensic Sci. Int. Genet. 17 (2015) 33–34.
[4] J. Butler, Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers, second ed. Elsevier, Burlington, Massachusetts, 2005.
[5] Scientific Working Group on DNA Analysis Methods, Validation Guidelines for DNA Analysis Methods, in, SWGDAM, 2012, pp. 1–13.
[6] F. Melo, A. Amorim, C. Alves, Comparative performance between "next generation" multiplex systems and the new European standard set of STR markers in the Portuguese population, Forensic Sci. Int. Genet. 8 (2014) 137–142.
[7] T. Tvedebrink, H.S. Mogensen, M.C. Stene, N. Morling, Performance of two 17 locus forensic identification STR kits—applied Biosystems's AmpFlSTR® NGMSElect and Promega's PowerPlex® ESI17 kits, Forensic Sci. Int. Genet. 6 (2012) 523–531.
[8] N. Laurin, A. DeMoors, C. Fregeau, Performance of identifiler direct and PowerPlex 16 HS on the applied biosystems 3730 DNA analyzer for processing biological samples archived on FTA cards, Forensic Sci. Int. Genet. 6 (2012) 621–629.
[9] S. Flores, J. Sun, J. King, B. Budowle, Internal validation of the GlobalFiler express PCR amplification kit for the direct amplification of reference DNA samples on a high-throughput automated workflow, Forensic Sci. Int. Genet. 10 (2014) 33–39.
[10] C. Gehrig, A. Teyssier, Internal validation of the AmpFlSTR MiniFiler kit, Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Series 1 (2008) 115–117.
[11] J.J. Builes, D. Trejos, D. Suárez, S. Moreno, L. Siza, M. Acevedo, A. Castillo, L. Beltrán, A. Ibarra, R.M.B. Cicarelli, A. Gaviria, L. Zuluaga, New alternative for human identification. Investigator IDplex kit—QIAGEN® reproducibility: Latin American interlaboratory study, Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Series 3 (2011) e83–e84.
[12] QIAGEN, Developmental Validation of the Investigator® IDplex Plus Kit, in, QIAGEN, 2012.
[13] T. Tvedebrink, P.S. Eriksen, H.S. Mogensen, N. Morling, Estimating the probability of allelic drop-out of STR alleles in forensic genetics, Forensic Sci. Int. Genet. 3 (2009) 222–226.
[14] T. Caragine, R. Mikulasovich, J. Tamariz, E. Bajda, J. Sebestyen, H. Baum, M. Prinz, Validation of testing and interpretation protocols for low template DNA samples using AmpFlSTR® Identifiler®, Croat. Med. J. 50 (2009) 250–267.
[15] J. Butler, Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodologies, Academic Press, Massachusetts, 2012.
[16] C.R. Hill, D.L. Duewer, M.C. Kline, C.J. Sprecher, R.S. McLaren, D.R. Rabbach, B.E. Krenke, M.G. Ensenberger, P.M. Fulmer, D.R. Storts, J.M. Butler, Concordance and population studies along with stutter and peak height ratio analysis for the PowerPlex® ESX 17 and ESI 17 systems, Forensic Sci. Int. Genet. 5 (2011) 269–275.
[17] C. Brookes, J.A. Bright, S. Harbison, J. Buckleton, Characterising stutter in forensic STR multiplexes, Forensic Sci. Int. Genet. 6 (2012) 58–63.
[18] D.Y. Wang, C.W. Chang, R.E. Lagace, L.M. Calandro, L.K. Hennessy, Developmental validation of the AmpFlSTR® Identifiler® Plus PCR amplification kit: an established multiplex assay with improved performance, J. Forensic Sci. 57 (2012) 453–465.
[19] J.M. Butler, Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Interpretation, Elsevier Science, Oxford, UK, 2014.
[20] V.C. Tucker, A.J. Hopwood, C.J. Sprecher, R.S. McLaren, D.R. Rabbach, M.G. Ensenberger, J.M. Thompson, D.R. Storts, Developmental validation of the PowerPlex® ESI 16 and PowerPlex® ESI 17 systems: STR multiplexes for the new European standard, Forensic Sci. Int. Genet. 5 (2011) 436–448.
[21] A. Barbaro, P. Cormaci, A. Agostino, Validation of AmpFLSTR NGM SElect™ PCR amplification kit on forensic samples, Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Series 3 (2011) e67–e68.
[22] J.J. Mulero, C.W. Chang, L.M. Calandro, R.L. Green, Y. Li, C.L. Johnson, L.K. Hennessy, Development and validation of the AmpFlSTR Yfiler PCR amplification kit: a male specific, single amplification 17 Y-STR multiplex system, J. Forensic Sci. 51 (2006) 64–75.
[23] J.P. Whitaker, E.A. Cotton, P. Gill, A comparison of the characteristics of profiles produced with the AMPFlSTR® SGM plus™ multiplex system for both standard and low copy number (LCN) STR DNA analysis, Forensic Sci. Int. 123 (2001) 215–223.
[24] K.L. Opel, D. Chung, B.R. McCord, A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR, J. Forensic Sci. 55 (2010) 25–33.
[25] A. Biosystems, AmpFlSTR® Identifiler® Plus PCR Amplification Kit User Guide, in, Applied Biosystems, Foster City, CA, 2012.
[26] C.R. Hill, D.L. Duewer, M.C. Kline, M.D. Coble, J.M. Butler, U.S. population data for 29 autosomal STR loci, Forensic Sci. Int. Genet., 7 (2013) e82–83.
[27] C.R. Hill, M.C. Kline, D.L. Duewer, J.M. Butler, Concordance testing comparing STR multiplex kits with a standard data set, Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser. 3 (2011) e188–e189.

ข ผลงานวิจัยที่นำเสนอแบบบรรยายในการประชุมวิชาการระดับชาติ


7th CIFS ACADEMIC DAY
FORENSIC SCIENCE
OPPORTUNITY OF FAIRNESS FOR ALL
บทความวิจัยทางวิชาการ
การประชุมสัมมนาวิชาการนิติวิทยาศาสตร์ ครั้งที่ 7
(7th CIFS Academic Day)

การเปรียบเทียบชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus PCR Amplification Kit กับ QIAGEN® Investigator IDplex Plus Kit

Comparison of AmpFlSTR® Identifiler® Plus PCR Amplification Kit and QIAGEN® Investigator IDplex Plus Kit

ผู้วิจัย ดาลัด มัธยัสถ์[1] ฐิติกา กิจพิพิธ[2] สุกัญญา เพชรเพ็ง[3] วาที อัศวุตมางกุร[4] และภูวดล ธนะเกียรติไกร[1]

Dalad Mattayat, Thitika Kitpipit, Sukanya Phetpeng, Vatee Asavutmangkul, and Phuvadol Thanakiatkrai

บทคัดย่อ

ชุดน้ำยาสำเร็จรูปสำหรับการทำ STR typing ได้นำมาใช้ห้องปฏิบัติการทางนิติวิทยาศาสตร์ทั่วโลก และในประเทศไทย สำนักงานพิสูจน์หลักฐานตำรวจได้ใช้ชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus เป็นชุดน้ำยาหลักในการตรวจพิสูจน์ ต่อมาชุดน้ำยาชุดใหม่ได้ผลิตออกมา คือ ชุด Qiagen® Investigator IDplex® Plus ซึ่งตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ 16 ตำแหน่ง เป้าหมายที่เหมือนกัน แต่มีราคาถูกกว่าและใช้เวลาในการตรวจพิสูจน์น้อยกว่า การเปลี่ยนมาใช้ชุดน้ำยา Qiagen® Investigator IDplex® Plus นั้นจะทำให้หน่วยงานประหยัดงบประมาณได้หลายล้านบาทและลดเวลาในการตรวจพิสูจน์ได้มาก อย่างไรก็ตาม การศึกษาพัฒนาและทวนสอบนั้น ไม่ได้มีรายงานถึงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดน้ำยาโดยตรง ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในด้านความไววิเคราะห์ระหว่างชุดน้ำยาทั้งสอง ผลการศึกษาพบว่า ชุดน้ำยา Qiagen® Investigator IDplex® Plus ให้ค่าความสูงของพีคที่มากกว่าในปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นที่เท่ากัน และยังตรวจวัดได้จำนวนอัลลีลที่มากกว่า ทั้งนี้จะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในเชิงลึกต่อไป

คำสำคัญ: AmpFlSTR® Identifiler® Plus, Investigator IDplex Plus, ความไววิเคราะห์, ความสูงของพีค, เปอร์เซนต์โพรไฟล์

Abstract

Commercial STR typing kits are used by forensic laboratories worldwide. The AmpFlSTR® Identifiler® Plus kit is the main kit used by the Office of Police Forensic Science, Royal Thai Police. The newer Qiagen® Investigator IDplex® Plus kit targets the same 16 loci, but is cheaper and take less time to run. Switching to the IDplex® Plus kit could potentially save millions of baht and many hours of forensic analysts' time. However, besides developmental validations, no one has directly compared the performances of the kits.. Therefore, we aimed to compare the two STR kits in terms of sensitivity. The IDplex Plus kit showed higher peak heights at all amounts of DNA input tested as well as more alleles detected. The results suggest that further studies should be performed for a more in-depth comparison between the kits.

[1] นักศึกษา สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (*Corresponding author; e-mail: fiwer2705@gmail.com)

[2] ผศ.ดร.สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 90112

[3] ร้อยตำรวจโทหญิง กลุ่มงานตรวจชีววิทยาและดีเอ็นเอ ศูนย์พิสูจน์หลักฐาน 10 สำนักงานตำรวจแห่งชาติ สงขลา 90112

[4] พ.ต.อ. กลุ่มงานตรวจเลือดชีวเคมีและเขม่าดินปืน สถาบันนิติเวชวิทยา โรงพยาบาลตำรวจ สำนักงานตำรวจแห่งชาติ กทม. 10330

Keywords: AmpFlSTR® Identifiler® Plus, Investigator IDplex® Plus, sensitivity, peak height, percent profile

บทนำ

การตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลเป็นส่วนสำคัญของกระบวนการสืบสวน โดยวิธีที่เป็นที่นิยม คือ การตรวจดีเอ็นเอส่วน Short Tandem Repeat (STR) ซึ่งเป็นส่วนของสารพันธุกรรมที่ประกอบไปด้วยลำดับเบส 2-10 คู่เบส ซ้ำแบบต่อเนื่อง และในแต่ละบุคคลจะมีจำนวนซ้ำของชุดเบสแตกต่างกัน ทำให้เกิดเป็นลักษณะที่จำเพาะในแต่ละบุคคลที่สามารถนำมาใช้ระบุบุคคลได้ [1] ซึ่งตำแหน่ง STR มาตรฐานที่ประเทศไทยใช้อิงมาจากระบบ Combined DNA Index System (CODIS) ของ FBI ซึ่งประกอบด้วยตำแหน่ง STR ทั้งสิ้น 20 ตำแหน่ง [2, 3] โดยกระบวนการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอนั้นประกอบไปด้วย การเก็บวัตถุพยานชีวภาพจากสถานที่เกิดเหตุ การสกัดดีเอ็นเอ การหาปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีการเรียลไทม์ (Real-time PCR) การเพิ่มปริมาณตำแหน่ง STR เป้าหมาย และการตรวจสอบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณขึ้นด้วยเทคนิคแคพิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Capillary electrophoresis) ในแต่ละขั้นตอนนั้นจะมีการใช้เครื่องมือและชุดน้ำยาต่างๆ ที่ได้มาตรฐาน และผ่านการทวนสอบประสิทธิภาพก่อนจะนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการทางนิติวิทยาศาสตร์ [4]

ชุดน้ำยาทางการค้า AmpFlSTR® Identifiler® Plus เป็นชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอหลักที่สำนักงานพิสูจน์หลักฐานตำรวจ สำนักงานตำรวจแห่งชาติ เลือกใช้ในการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ โดยใช้เพิ่มปริมาณ STR เป้าหมายจำนวน 15 ตำแหน่ง ได้แก่ D8S1179 D21S11 D7S820 CSF1PO D3S1358 TH01 D13S317 D16S539 D2S1338 D19S433 vWA TPOX D18S51 D5S818 FGA และตำแหน่งระบุเพศบนยีน Amelogenin [5, 6] ชุดน้ำยาดังกล่าวได้ถูกนำมาตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอจากวัตถุพยานทางชีวภาพมากกว่า 40,000 รายการต่อปี คิดเป็นจำนวนเงินกว่า 54 ล้านบาทต่อปีงบประมาณ ต่อมาบริษัท Qiagen ได้ผลิตชุดน้ำยาสำเร็จรูปชื่อว่า Qiagen® Investigator IDplex Plus ซึ่งใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเหมือนกับชุดน้ำยา Identifiler® Plus ทุกตำแหน่ง ผู้ผลิตได้รายงานผลการทดสอบชุดน้ำยาดังกล่าวว่าสามารถตรวจพิสูจน์วัตถุพยานทางนิติวิทยาศาสตร์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมทั้งใช้เวลาในการตรวจพิสูจน์น้อยกว่าชุดน้ำยา Identifiler® Plus [7] นอกจากนี้ค่าใช้จ่ายในการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยาดังกล่าว ยังน้อยกว่าชุดน้ำยา Identifiler® Plus ถึง 350 บาท ต่อหนึ่งตัวอย่าง ซึ่งอาจทำให้ประหยัดงบประมาณได้มากกว่า 10 ล้านบาทต่อปี และลดเวลาในการตรวจวิเคราะห์ได้มาก แต่ปัจจุบันไม่มีรายงานการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างชุดน้ำยา Identifiler® Plus และ IDplex Plus อย่างไรก็ตามการตัดสินใจเปลี่ยนชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นเรื่องที่ต้องศึกษาให้ถี่ถ้วน ทั้งนี้เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจส่งผลกระทบต่อขั้นตอนการปฏิบัติงานมาตรฐาน (Standard operating protocols) ภายในองค์กร และมีผลกระทบต่อรูปคดี และการพิจารณาคดีความในกระบวนการยุติธรรมได้

ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดน้ำยาทั้งสอง โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 31-500 pg เพื่อศึกษาความไววิเคราะห์ในการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ โดยพิจารณาเปรียบเทียบข้อมูลจากความสูงของพีค และจำนวนอัลลีลที่ตรวจวัดได้ของทั้งสองชุดน้ำยา

วิธีการวิจัย

1. ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย

การศึกษานี้ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอมาตรฐาน 9947A และ 9948 โดยทำการเตรียมดีเอ็นเอดังกล่าวที่ความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5 และ 6.25 พิโคกรัมต่อไมโครลิตรด้วย TA buffer และเก็บรักษาไว้ที่ -20°C เพื่อนำไปเพิ่มปริมาณในขั้นตอนต่อไป

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป AmpFlSTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex® Plus ตามที่ระบุไว้ในคู่มือจากผู้ผลิต สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus ในแต่ละตัวอย่างนั้น ผสมน้ำยาในปริมาตรรวม 12.5 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบไปด้วย สารละลาย PCR Master Mix ปริมาตร 5.0 ไมโครลิตร สารละลาย Primer Mix ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอที่สกัดได้ปริมาตร 5.0 ไมโครลิตร จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องพีซีอาร์ รุ่น ABI 9700 โดยใช้สภาวะอุณหภูมิสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้ อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 11 นาที ตามด้วยอุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 20 วินาทีและ 59°C นาน 3 นาที เป็นจำนวน 28 รอบ จากนั้นตั้งค่าอุณหภูมิที่ 60°C เป็นเวลา 10 นาที สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus ในแต่ละตัวอย่างนั้น ผสมน้ำยาในปริมาตรรวม 12.5 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบไปด้วย สารละลาย Fast Reaction Mix ปริมาตร 3.75 ไมโครลิตร สารละลาย Primer Mix ปริมาตร 1.25 ไมโครลิตร น้ำสะอาดปราศจากเชื้อและดีเอ็นเอปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอที่สกัดได้ปริมาตร 5.0 ไมโครลิตร จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องพีซีอาร์ รุ่น ABI 9700 โดยใช้สภาวะอุณหภูมิสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้ อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยอุณหภูมิ 96°C เป็นเวลา 10 วินาทีและ 61°C นาน 2 นาที เป็นจำนวน 30 รอบ เก็บรักษาผลผลิตพีซีอาร์ไว้ที่ -20°C เพื่อนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนถัดไป

3. การวัดและตรวจสอบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณ

ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณขึ้นถูกนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิคแคพิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส ด้วยเครื่อง ABI 3130xl Genetic Analyzer พอลิเมอร์ที่ใช้ คือ POP-4® และแคพิลลารีความยาว 36 ซม. ทำการเตรียมสารละลายก่อนการวิเคราะห์โดยสำหรับชุดน้ำยา Identifiler® Plus ผสมผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ปริมาตร 1 ไมโครลิตร กับฟอร์มาไมด์ปริมาตร 10.7 ไมโครลิตร และ Genescan LIZ-500 ปริมาตร 0.3 ไมโครลิตร สำหรับชุดน้ำยา IDplex Plus จะผสมผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ปริมาตร 1 ไมโครลิตรกับฟอร์มาไมด์ปริมาตร 12 ไมโครลิตร และ DNA Size Standard 550 (BTO) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร

นำสารละลายทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 2 นาที และแช่แข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำสารละลายผสมเข้าวิเคราะห์ในเครื่อง ABI 3130xl Genetic Analyzer โดยใช้สภาวะการฉีดสาร 15 kV/5 วินาที และ 3 kV/10 วินาทีสำหรับชุดน้ำยา Identifiler® Plus และ IDplex Plus ตามลำดับ ข้อมูลที่ได้นำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม GeneMapper® ID v. 3.2 ในกรณีที่พบว่าตำแหน่งใด ๆ มีอัลลีลทั้งสองเหมือนกัน (homozygous) จะพิจารณาจากความสูงของอัลลีลหรือพีค

ซึ่งหากมากกว่า 200 RFU ขึ้นไปจะนับเป็น 2 อัลลีล หากน้อยกว่านั้นจะนับเป็นอัลลีลเดียว ส่วนอัลลีลที่หายไปจะจัดเป็น allelic drop-out

4. การวิเคราะห์ทางสถิติ

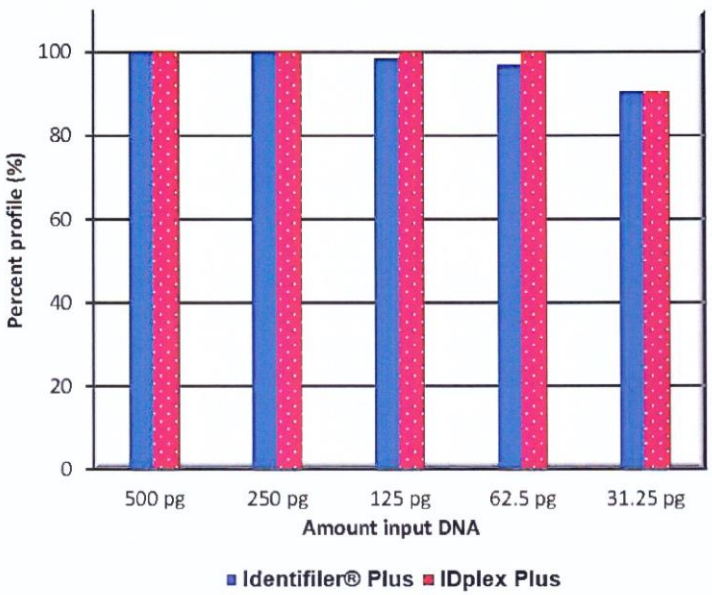
ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากขั้นตอนที่แล้วถูกนำวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Microsoft Excel โดยวิเคราะห์พารามิเตอร์ที่สำคัญ ดังนี้

- Percent profile คือ สัดส่วนของจำนวนอัลลีลที่ตรวจพบในลายพิมพ์ดีเอ็นเอต่อจำนวนอัลลีลทั้งหมดที่สามารถตรวจพบได้ในลายพิมพ์ดีเอ็นเอลายหนึ่ง ในที่นี้จำนวนอัลลีลสูงสุดที่สามารถตรวจวัดได้เท่ากับ 32 เนื่องจากชุดน้ำยาที่ใช้ทั้งสองชุดเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 16 ตำแหน่ง จากการศึกษาวิจัยนี้ จะอธิบายโดยใช้เปอร์เซ็นต์โพรไฟล์ซึ่งแสดงถึงจำนวนอัลลีลที่ตรวจวัดได้ ซึ่ง 100 เปอร์เซ็นต์ หมายถึง ตรวจวัดอัลลีลได้ครบทั้ง 32 อัลลีล (Full profile) และ เปอร์เซ็นต์โพรไฟล์ต่ำกว่า 100 เปอร์เซ็นต์ คือ ตรวจวัด STR ได้ไม่ครบทุกตำแหน่ง หรือ มีอัลลีลในบางตำแหน่ง หายไป (Partial profile)

- Peak height คือ ความสูงของพีคหรืออัลลีลหนึ่งๆ สำหรับตำแหน่งที่มีอัลลีลทั้งสองเหมือนกัน (homozygous) ความสูงของพีคของอัลลีลในตำแหน่งนั้นจะถูกหารสอง

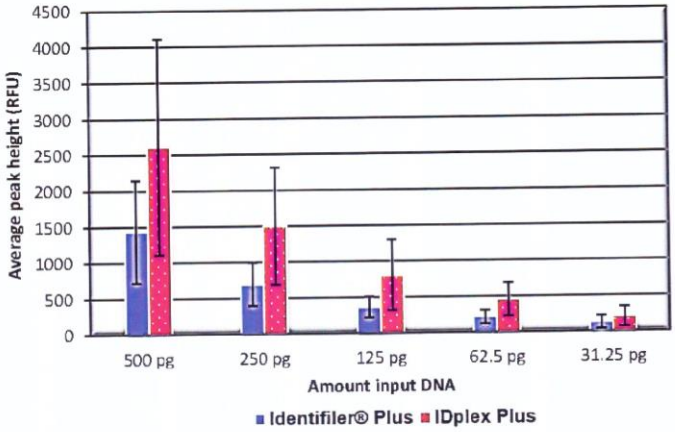
ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

จากผลการทดลองเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์โพรไฟล์ในแต่ละปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นที่เท่ากัน ระหว่างชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus พบว่า ที่ปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้น 500 และ 250 พิโคกรัม ชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus สามารถตรวจวัดอัลลีลได้ครบทุกตำแหน่ง (Full profile) แต่ที่ปริมาณดีเอ็นเอต่ำกว่านั้น (125 – 31.25 พิโคกรัม) ชุดน้ำยานี้ไม่สามารถได้ Full profile ในขณะที่ชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus ตรวจวัดอัลลีลได้ครบทุกตำแหน่งที่ปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้น 500-62.5 พิโคกรัม และให้ผลเป็น partial profile ที่ปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้น 31.25 พิโคกรัมปริมาณเดียว ดังแสดงในแผนภูมิที่ 1 ผลการทดสอบความไววิเคราะห์ชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus ในงานวิจัยนี้ให้ผลที่สอดคล้องกับการทวนสอบชุดน้ำยาโดยผู้ผลิตและผลการทดสอบประสิทธิภาพของชุดน้ำยาซึ่งทดสอบโดย Chang และคณะ [8] คือ ที่ปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้น 1000 -125 พิโคกรัม ชุดน้ำยานี้สามารถตรวจวัด STR ได้ครบทุกตำแหน่ง ในขณะที่ปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้น 31 พิโคกรัม ได้ผลเป็น partial STR profile ส่วนผลการทวนสอบชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus จากผู้ผลิตได้รายงานผลด้านความไววิเคราะห์ที่สอดคล้องกับผลการศึกษาในงานวิจัยนี้เช่นกัน คือให้ผล STR เป็น partial profile จาก ดีเอ็นเอตั้งต้นที่ 32.5 พิโคกรัมเช่นกัน [9]



แผนภูมิที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นโพรไฟล์ระหว่างชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus ในแต่ละความเข้มข้น (n=20)

นอกจากการศึกษาคุณภาพของโพรไฟล์ STR แล้วค่าความสูงของอัลลีล ก็มีความสำคัญเช่นกัน จากผลการทดลองศึกษาเปรียบเทียบความไวในการวิเคราะห์ระหว่างชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus ให้ผลดังแสดงในแผนภูมิที่ 2 ค่าเฉลี่ยความสูงของอัลลีลในแต่ละปริมาณของดีเอ็นเอตั้งต้นระหว่างชุดน้ำยาทั้งสองมีความแตกต่างกัน โดย ค่าเฉลี่ยความสูงของอัลลีลจากการใช้ชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus มีค่าสูงกว่าเป็นเท่าตัวเมื่อเปรียบเทียบกับ ค่าเฉลี่ยความสูงของอัลลีลจากชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus ในทุก ๆ ความเข้มข้น



แผนภูมิที่ 2 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความสูงของอัลลีล ระหว่างชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus ในแต่ละความเข้มข้น (n=20)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus มีความไววิเคราะห์ที่ดีกว่า AmpFlSTR® Identifiler® Plus ซึ่งน่าจะมีสาเหตุมาจากจำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus ที่มากกว่า ทำให้ความสูงของอัล-ลีลมีค่ามากกว่า รวมทั้งอาจเป็นสาเหตุมาจากชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus ซึ่งผลิตและจาหน่ายเดือนตุลาคม พ.ศ.2555 ตามหลังชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus ที่ผลิตและจาหน่ายเมื่อเดือนมกราคม พ.ศ.2553 [10] ซึ่งเคมีต่างๆในชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus อาจมีการพัฒนามาให้มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น ผลการทดสอบเบื้องต้นนี้แสดงให้เห็นว่าควรมีการทำการทดสอบเปรียบเทียบพารามิเตอร์อื่นๆที่สำคัญทางนิติพันธุศาสตร์ เช่น ความทนทานต่อตัวยับยั้งกระบวนการพีซีอาร์ ประสิทธิภาพการนำไปใช้กับวัตถุพยานทางจริง เป็นต้น เพื่อเป็นข้อมูลให้หน่วยงานทางนิติวิทยาศาสตร์ของไทยสามารถนำไปประกอบการตัดสินใจเลือกใช้ชุดน้ำยาในการปฏิบัติงานจริง

สรุปผลการวิจัย

ชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus และ QIAGEN® Investigator IDplex Plus นั้นเป็นชุดน้ำยาที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่งเป้าหมาย 16 ตำแหน่งที่เหมือนกัน จากผลการศึกษาในงานวิจัยนี้ ชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus นั้นแสดงผลความไวไวิเคราะห์ที่ดีกว่า ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดีกับวัตถุพยานทางนิติวิทยาศาสตร์ซึ่งอาจเป็นตัวอย่างที่มีดีเอ็นเอปริมาณน้อย จึงกล่าวได้ว่าชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex Plus อาจจะนำมาใช้แทน ชุดน้ำยา AmpFlSTR® Identifiler® Plus ในห้องปฏิบัติการได้ โดยเฉพาะหน่วยงานทางนิติวิทยาศาสตร์อย่างสำนักงานพิสูจน์หลักฐานตำรวจ สำนักงานตำรวจแห่งชาติ ซึ่งมีจำนวนตัวอย่างกว่า 40,000 ตัวอย่างในแต่ละปี จะทำให้หน่วยงานประหยัดงบประมาณได้มาก อีกทั้งลดเวลาในการตรวจพิสูจน์

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย ทุนวิจัยจากภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ กลุ่มงานตรวจชีววิทยาและดีเอ็นเอ ศูนย์พิสูจน์หลักฐาน 10 สำนักงานตำรวจแห่งชาติ รวมทั้งทุนวิจัย สกว. อุตสาหกรรมเพื่อความมั่นคงของประเทศ สัญญาเลขที่ RDG5750118

เอกสารอ้างอิง

1. Butler, J.M., Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. Journal of forensic sciences, 2006. 51(2): p. 253-65.
2. Butler, J.M., Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodologies. 2012, Massachusetts: Academic Press.
3. Hares, D.R., Expanding the CODIS core loci in the United States. Forensic Sci Int Genet, 2012. 6(1): p. e52-4.
4. Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDAM). Revised validation guidelines. July 2004 2 february 2015 [cited 2015; Volumn 6:[Available from: http://www.fbi.gov/about-us/lab/forensic-science-communications/fsc/july2004/standards/2004_03_standards02.htm/.
5. Biosystems, A., AmpFlSTR® Identifiler® Plus PCR Amplification Kit User Guide. 2012.
6. Thanakiatkrai, P. and T. Kitpipit, Current STR-based techniques in forensic science. Maejo International Journal of Science and Technology, 2013. 7(1): p. 1-15.
7. Builes, J.J., et al., New alternative for human identification. Investigator IDplex Kit – QIAGEN® reproducibility: Latin American interlaboratory study. Forensic Sci Int Genet, 2011. 3(1): p. e83-e84.
8. Wang, D.Y., et al., Developmental validation of the AmpFlSTR(R) Identifiler(R) Plus PCR Amplification Kit: an established multiplex assay with improved performance. J Forensic Sci, 2012. 57(2): p. 453-65.
9. QIAGEN, Developmental validation report of the Investigator® IDplex Plus Kit. 2012.
10. Butler, J.M., Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology: Methodology. 2011: Academic Press.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวดาลัด มัธยัสถ์

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5610220029

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมี-ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2555

ทุนการศึกษา

1. ทุนอุดหนุนการศึกษาเป็นผู้ช่วยวิจัย (Research Assistant) ปีการศึกษา 2556 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
2. ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ประจำปีงบประมาณ 2557 มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
3. ทุนสนับสนุนการนำเสนอผลงานวิชาการ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Mattayat D, Kitpipit T, Phetpeng S, Asawutmangkul W, Thanakiatkrai P. Comparative performance of AmpFLSTR® Identifiler® Plus PCR amplification kit and QIAGEN® Investigator® IDplex Plus kit. Science & Justice. 2016;56(6):468-74.