



การตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอจากวัตถุพยานทางชีวภาพที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้น
(Presumptive test) โดยวิธีไคเร็คพีซีอาร์ (Direct PCR)
STR Typing Using Direct PCR from Presumptively Tested
Biological Evidence

กฤติกา ระเหม
Krittika Raham

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 การตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอจากวัตถุพยานทางชีวภาพที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้น (Presumptive test) โดยวิธีไคเร็คพีซีอาร์ (Direct PCR)

ผู้เขียน นางสาวกฤติกา ระเหม

สาขาวิชา นิติวิทยาศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	คณะกรรมการสอบ
.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จูติกา กิจพิพิธ)	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐฉิณี พันธุ์วิเศษ)
.....กรรมการ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จูติกา กิจพิพิธ)
.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภูวดล ธนะเกียรติไกร)	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภูวดล ธนะเกียรติไกร)
.....กรรมการ
	(ดร. วงศ์กัญ ภูภูมิรัตน์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. ชีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณ
บุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จุติกา กิจพิพิธ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภาวดี ณะเกียรติไกร)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลงชื่อ

(นางสาวกฤติกา ระเหม)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน
และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ

(นางสาวกฤติกา ระเหม)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอจากวัตถุพยานทางชีวภาพที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้น (Presumptive test) โดยวิธีไคเร็คพีซีอาร์ (Direct PCR)
ผู้เขียน	นางสาวกฤติกา ระเหม
สาขาวิชา	นิติวิทยาศาสตร์
ปีการศึกษา	2559

บทคัดย่อ

วัตถุพยานทางชีวภาพเป็นหลักฐานที่มีความสำคัญในการสืบสวนสอบสวนทางนิติวิทยาศาสตร์ ซึ่งมักพบในปริมาณน้อย และเสียหายจากสภาวะแวดล้อมบริเวณสถานที่เกิดเหตุ ทำให้ดีเอ็นเอที่ไคกลับคืนมาในขั้นตอนการสกัดนั้นมีปริมาณน้อย อีกทั้งส่วนหนึ่งต้องนำไปทดสอบเบื้องต้นก่อน ทำให้บางครั้งตัวอย่างไม่เพียงพอสำหรับการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประยุกต์ใช้เทคนิคไคเร็คพีซีอาร์หรือการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยไม่ผ่านการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างชีวภาพทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการทดสอบเบื้องต้น รวมถึงศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกี่ยวข้อง ผลการศึกษาพบว่าสามารถพัฒนากระบวนการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอจากวัตถุพยานทางชีวภาพเป้าหมายโดยวิธีไคเร็คพีซีอาร์ได้สำเร็จ โดยอัตราความสำเร็จในการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์จากตัวอย่างที่ไม่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นสูงถึง 95.6% ($N = 90$) นอกจากนี้ยังพบว่าชนิดของชุดน้ำยาทดสอบเบื้องต้นมีผลต่อความสำเร็จในการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยชุดน้ำยาลูมิโนลมีผลกระทบต่อปริมาณดีเอ็นเอน้อยที่สุด ซึ่งมีอัตราความสำเร็จอยู่ที่ 88% รองลงมาคือ ชุดทดสอบ Hemastix® (78%) ชุดน้ำยาลิวโคมาลาไคท์กรีน (50%) และชุดน้ำยาแคสเทิลเมเยอร์ (50%) ส่วนชุดน้ำยาทดสอบอสุจิ (Acid phosphatase) และน้ำลาย (Phadebas paper) มีอัตราความสำเร็จเท่ากับ 85% และ 73% ตามลำดับ นอกจากนี้ผลการศึกษายังชี้ให้เห็นว่าวัสดุหลักฐานที่แตกต่างกันมีผลกระทบต่อการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยวัสดุเสื้อผ้าชนิดผ้าฝ้ายมีอัตราความสำเร็จในการได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ดีที่สุดในขณะนี้เทคนิคที่พัฒนาขึ้นสามารถประยุกต์ใช้กับตัวอย่างชีวภาพที่มีอายุมากถึง 6 เดือนได้ งานวิจัยชิ้นนี้สามารถช่วยเพิ่มโอกาสในการได้รับดีเอ็นเอจากหลักฐาน ลดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของดีเอ็นเอจากขั้นตอนการสกัดที่ซับซ้อน ยุ่งยาก และที่สำคัญใช้ตัวอย่างปริมาณน้อยในการตรวจวิเคราะห์

Thesis Title	STR typing using direct PCR from presumptively tested biological evidence
Author	Miss Krittika Raham
Major Program	Forensic Science
Academic Year	2016

ABSTRACT

Biological evidence is important for forensic investigation. In some cases, only small amounts can be found and they can be heavily degraded due to the environmental factors at the crime scene. As such, the DNA purified from the extraction process may not be enough for STR typing. The problem is worsened when part of a sample has to be spared for presumptive testing. Therefore, the aims of this research are to apply direct STR typing to both presumptive tested and non-presumptive tested biological samples on filter papers and also to study associated factors that influence the process. The results showed that the developed direct PCR technique was able to achieved a high rate of successful DNA amplification (full DNA profiles). Non-presumptive tested samples gave 95.6% first pass success rates ($N = 90$). Furthermore, the kind of presumptive test kit had an effect on the success rates of STR typing as follows, Luminol (88% of samples gave full DNA profiles), Hemastix (78%), Leucomalachite green, and Kastle-Meyer (50%). Semen presumptive test (acid phosphatase) and saliva (Phadebas paper) had success rates of 85% and 73.33%, respectively. Moreover, the substrate type also had an effect, with the highest success rate seen with cotton. The developed direct PCR protocol can be used to generate STR profiles from even with 6 months-old biological samples. The benefits of this research include increasing amount of DNA obtainable from evidence, as the protocol can be performed directly from filter paper that had been used for presumptive testing; reducing the risk of DNA contamination from extraction procedures; and most importantly, using minimal samples for analysis.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ฐิติกา กิจพิพิธ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่คอยให้คำแนะนำแนวทางในการศึกษาหาความรู้และช่วยปรับปรุงแก้ไขเล่มวิทยานิพนธ์เพื่อให้ออกมาสมบูรณ์ ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภูวดล ธนะเกียรติไกร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่คอยให้คำแนะนำเรื่องการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ การวิเคราะห์ทางสถิติที่เกี่ยวข้อง ตลอดจนแนะนำแนวทางการเขียนเพื่อให้วิทยานิพนธ์มีความสมบูรณ์

ผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐินี พันธุ์วิवास และ ดร. วงศ์กัญญุมิรัตน์ ที่สละเวลามาเป็นประธานและกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ รวมถึงแนะนำชี้แนะเนื้อหาเพิ่มเติมเพื่อให้วิทยานิพนธ์มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนทุนอุดหนุนการศึกษาเป็นผู้ช่วยวิจัย (Research Assistant) (สัญญาเลขที่ 1-2557-02-009) และขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาวิจัย รวมถึงสนับสนุนทุนการศึกษาเป็นผู้ช่วยสอน (Teaching Assistantship) เพื่อให้ผู้วิจัยได้ใช้ความรู้ความสามารถที่เป็นประโยชน์ต่อการเรียนการสอน

ผู้วิจัยขอขอบคุณพันตำรวจเอกสุเจตนา โสทธิพันธ์ กลุ่มงานตรวจชีววิทยาและดีเอ็นเอ ศูนย์พิสูจน์หลักฐานกลาง ที่ให้การสนับสนุนเครื่องมือสำหรับการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ขอขอบคุณร้อยตำรวจเอกหญิงสุกัญญา เพชรเพ็ง นักวิทยาศาสตร์ สบ. 1 กลุ่มงานตรวจชีววิทยาและดีเอ็นเอ ศูนย์พิสูจน์หลักฐาน 10 ตลอดจนผู้ช่วยนักวิทยาศาสตร์ในหน่วยงานทุกท่าน ที่คอยให้คำแนะนำ และอำนวยความสะดวกเรื่องสถานที่ วัน และเวลา ในการใช้เครื่องมือสำหรับการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณจินตนา ประดุงกาญจนา นักเทคนิคการแพทย์ชำนาญการพิเศษ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้คำปรึกษา เรื่องการยื่นขอจริยธรรมการวิจัยในคนสำหรับงานวิจัยในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณครอบครัว ญาติ พี่ น้อง ที่คอยเป็นกำลังใจ และสนับสนุนการศึกษาตลอดมา ขอขอบคุณนักศึกษาปริญญาโท สาขานิติวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ แนะนำ ชี้แนะ รวมถึงเป็นกำลังใจตลอดระยะเวลาในการวิจัยในครั้งนี้

กฤติกา ระเหม

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	(5)
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	(6)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(9)
รายการตาราง	(11)
รายการภาพประกอบ	(12)
รายการผลงานตีพิมพ์	(16)
List of permission	(17)
บทที่ 1 บทนำ	1
1. บทนำตั้งเรื่อง	1
2. การตรวจเอกสาร	4
3. วัตถุประสงค์	16
บทที่ 2 วิธีการวิจัย	17
1. การเก็บและเตรียมตัวอย่างวัตถุพยานทางชีวภาพ	17
2. การเตรียมสารเคมีที่ใช้สำหรับการทดสอบเบื้องต้น (Presumptive test)	18
3. วิธีการทดสอบคราบต้องสงสัยเบื้องต้น (Presumptive test)	19
4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีไคเร็คพีซีอาร์ (Direct PCR)	22
5. การแยกและตรวจสอบดีเอ็นเอ (DNA separation and detescion)	25
6. การศึกษาปัจจัยด้านวัสดุหลักฐานที่มีผลกระทบต่อ การตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอโดยวิธีไคเร็คพีซีอาร์	26

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
7. การศึกษาปัจจัยด้านอายุของวัตถุพยานทางชีวภาพที่มีผลกระทบต่อการศึกษาตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอโดยวิธีไมโครเฟลลิกซ์ไคเร็คพีซีอาร์	27
8. การวิเคราะห์ทางสถิติ	27
บทที่ 3 ผลและวิเคราะห์ผล	29
1. การเพิ่มปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากวัตถุพยานทางชีวภาพที่ไม่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไมโครเฟลลิกซ์ไคเร็คพีซีอาร์ (Multiplex-Direct PCR)	29
2. การเพิ่มปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากวัตถุพยานทางชีวภาพที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไมโครเฟลลิกซ์ไคเร็คพีซีอาร์ (Multiplex-Direct PCR)	45
บทที่ 4 บทสรุป	76
บรรณานุกรม	77
ภาคผนวก	83
ต้นฉบับสำหรับตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ	85
ประวัติผู้เขียน	94

รายการตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 น้ำยาและสารเคมีที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ Polymerase chain reaction (PCR)	23
ตารางที่ 2 ขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในการทำพีซีอาร์ Polymerase chain reaction (PCR)	23
ตารางที่ 3 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และขนาด (Product size) ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาการคัดกรองตัวอย่างด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel electrophoresis) ก่อนนำตัวอย่างชีวภาพไปจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ	24
ตารางที่ 4 น้ำยาและสารเคมีที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ Polymerase chain reaction (PCR)	24
ตารางที่ 5 ขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในการทำพีซีอาร์ Polymerase chain reaction (PCR)	25
ตารางที่ 6 น้ำยาและสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการวิเคราะห์โดยวิธีแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Capillary electrophoresis)	26
ตารางที่ 7 สรุปผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากวัตถุดิบทางชีวภาพทั้ง 3 ประเภท ได้แก่ เลือด อสุจิ และน้ำลายที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยเทคนิค มัลติเพล็กซ์ไดเรคทีฟพีซีอาร์ และเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส	61

รายการภาพประกอบ

		หน้า
ภาพที่ 1	แสดงปฏิกิริยาการทดสอบเลือดด้วยชุดน้ำยาลูมิโนล	5
ภาพที่ 2	แสดงปฏิกิริยาการทดสอบเลือดด้วยชุดน้ำยาแคสเทิลเมเยอร์	6
ภาพที่ 3	แสดงปฏิกิริยาการทดสอบเลือดด้วยชุดน้ำยาลิวโคมาลาไคท์กรีน	7
ภาพที่ 4	แสดงชุดทดสอบแบบแถบ Hemastix®	7
ภาพที่ 5	แสดงปฏิกิริยาการทดสอบอสุจิด้วยชุดน้ำยาแอซิดฟอสฟาเตส	8
ภาพที่ 6	แสดงปฏิกิริยาการทดสอบน้ำลายด้วยชุดทดสอบ Phadebas paper	9
ภาพที่ 7	แสดงโครงสร้างของดีเอ็นเอ	10
ภาพที่ 8	แสดงจีโนมมนุษย์ (Human genome)	11
ภาพที่ 9	เทคนิคแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส	13
ภาพที่ 10	แสดงตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ	13
ภาพที่ 11	ผลบวกของปฏิกิริยาการทดสอบคราบเลือดเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาลูมิโนล	19
ภาพที่ 12	ผลบวกของปฏิกิริยาการทดสอบคราบเลือดเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาแคสเทิลเมเยอร์	20
ภาพที่ 13	ผลบวกของปฏิกิริยาการทดสอบคราบเลือดเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาลิวโคมาลาไคท์กรีน	20
ภาพที่ 14	ผลบวกของปฏิกิริยาการทดสอบคราบเลือดเบื้องต้นด้วยชุดทดสอบแบบแถบ Hemastix®	20
ภาพที่ 15	ผลบวกของปฏิกิริยาการทดสอบคราบอสุจิเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาแอซิดฟอสฟาเตส	21
ภาพที่ 16	ผลบวกของปฏิกิริยาการทดสอบคราบน้ำลายเบื้องต้นด้วยชุดทดสอบ Phadebas paper	21
ภาพที่ 17	แสดงวัตถุพยานทางชีวภาพ วัสดุหลักฐาน และชุดน้ำยาทดสอบเบื้องต้น	27

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

		หน้า
ภาพที่ 18	2% เจลอะกาโรส แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากตัวอย่างเลือดที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคซิงเกิลเพล็กซ์และเกรเดียนพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ D3	30
ภาพที่ 19	2% เจลอะกาโรส แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากตัวอย่างเลือดที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคซิงเกิลเพล็กซ์และเกรเดียนพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ FGA	31
ภาพที่ 20	2% เจลอะกาโรส แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากตัวอย่างเลือดที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไคเร็กซ์พีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ D3 และ FGA	32
ภาพที่ 21	2% เจลอะกาโรส แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากตัวอย่างเลือดที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไคเร็กซ์พีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ D3 และ FGA	33
ภาพที่ 22	2% เจลอะกาโรส แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากตัวอย่างอสุจิที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ D3 และ FGA	34
ภาพที่ 23	2% เจลอะกาโรส แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากตัวอย่างน้ำลายที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไคเร็กซ์พีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ D3 และ FGA	35
ภาพที่ 24	แสดงตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากวัตถุพยานชีวภาพที่เกิด Over-amplification peak	38
ภาพที่ 25	แสดงผลการศึกษาช่วงความเข้มข้นสารละลายดีเอ็นเอ (Pre-PCR solution) ที่เหมาะสมสำหรับเพิ่มปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากคราบเลือดด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไคเร็กซ์พีซีอาร์	39
ภาพที่ 26	แสดงผลการศึกษาช่วงความเข้มข้นสารละลายดีเอ็นเอ (Pre-PCR solution) ที่เหมาะสมสำหรับเพิ่มปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากคราบอสุจิด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไคเร็กซ์พีซีอาร์	41
ภาพที่ 27	แสดงตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากวัตถุพยานชีวภาพประเภทอสุจิแบบ Low partial profile	42

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

		หน้า
ภาพที่ 28	แสดงผลการศึกษาช่วงความเข้มข้นสารละลายดีเอ็นเอ (Pre-PCR solution) ที่เหมาะสมสำหรับเพิ่มปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากคราบน้ำลายด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ดีเร็คพีซีอาร์	44
ภาพที่ 29	ผลบวกของปฏิกิริยาการทดสอบคราบเลือดเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาลูมินอล	46
ภาพที่ 30	ผลบวกของปฏิกิริยาการทดสอบคราบเลือดเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาแคสเทิลเมเยอร์	46
ภาพที่ 31	ผลบวกของปฏิกิริยาการทดสอบคราบเลือดเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาลิวโคมาลาไคท์กรีน	47
ภาพที่ 32	ผลบวกของปฏิกิริยาการทดสอบคราบเลือดเบื้องต้นด้วยชุดทดสอบแบบแถบ Hemastix®	47
ภาพที่ 33	ผลบวกของปฏิกิริยาการทดสอบคราบอสุจิเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาแอซิดฟอสฟาเตส	48
ภาพที่ 34	ผลบวกของปฏิกิริยาการทดสอบคราบน้ำลายเบื้องต้นด้วยชุดทดสอบ Phadebas paper	49
ภาพที่ 35	2% เจลอะกาโรส แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากตัวอย่างเลือดที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาลูมินอล	53
ภาพที่ 36	2% เจลอะกาโรส แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากตัวอย่างเลือดที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาแคสเทิลเมเยอร์	54
ภาพที่ 37	2% เจลอะกาโรส แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากตัวอย่างเลือดที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาลิวโคมาลาไคท์กรีน	55
ภาพที่ 38	2% เจลอะกาโรส แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากตัวอย่างเลือดที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยชุดทดสอบแบบแถบ Hemastix®	56
ภาพที่ 39	2% เจลอะกาโรส แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากตัวอย่างอสุจิที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาแอซิดฟอสฟาเตส	57
ภาพที่ 40	2% เจลอะกาโรส แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากตัวอย่างน้ำลายที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยชุดทดสอบ Phadebas paper	59

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

	หน้า
<p>ภาพที่ 41 แสดงผลการศึกษาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากวัตถุพยานทางชีวภาพ ที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไดเรคพีซีอาร์ และแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยแสดงจำนวนอัลลีล (ก) และค่าความสูงพีค (ข) ที่ได้รับจากการเพิ่มปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของคราบเลือด</p>	64
<p>ภาพที่ 42 แสดงผลการศึกษาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากวัตถุพยานทางชีวภาพ ที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไดเรคพีซีอาร์ และแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยแสดงจำนวนอัลลีล (ก) และค่าความสูงพีค (ข) ที่ได้รับจากการเพิ่มปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของคราบอสุจิ</p>	66
<p>ภาพที่ 43 แสดงผลการศึกษาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากวัตถุพยานทางชีวภาพ ที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไดเรคพีซีอาร์ และแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยแสดงจำนวนอัลลีล (ก) และค่าความสูงพีค (ข) ที่ได้รับจากการเพิ่มปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของคราบน้ำลาย</p>	68
<p>ภาพที่ 44 แสดงผลการศึกษาเปรียบเทียบผลคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากวัตถุพยานทางชีวภาพที่ผ่านและไม่ผ่านการทดสอบเบื้องต้น ซึ่งใช้ค่าสถิติความเชื่อมั่น 95% ของ Bayesian (เทียบเท่ากับ $p < 0.01$ ในทางสถิติแบบ Frequentist))</p>	70
<p>ภาพที่ 45 แสดงผลการศึกษาปัจจัยด้านอายุของวัตถุพยานทางชีวภาพ โดยแสดงจำนวนอัลลีล (ก) และค่าความสูงพีค (ข) จากการเพิ่มปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างวัตถุพยานชีวภาพที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาทางเคมีต่างๆ</p>	72
<p>ภาพที่ 46 แสดงตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดผลบวกปลอม Split peak</p>	74
<p>ภาพที่ 47 แสดงตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดผลบวกปลอม Pull-ups</p>	75
<p>ภาพที่ 48 แสดงตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดผลบวกปลอม Stutter</p>	75

รายการผลงานตีพิมพ์

Thanakiatkrai, P., Raham, K., Pradutkanchana, J., Sotthibandhu, S., and Kitpipit, T.
2017. Direct-STR typing from presumptively-tested and untreated body fluids.
Forensic Science International: Genetics, 30, 1–9.

List of permission**ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Jul 17, 2017

This Agreement between Ms. krittika Raham ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4151140749165
License date	Jul 17, 2017
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Forensic Science International: Genetics
Licensed Content Title	Direct-STR typing from presumptively-tested and untreated body fluids
Licensed Content Author	Phuvadol Thanakiatkrai, Krittika Raham, Jintana Pradutkanchana, Sujettana Sotthibandhu, Thitika Kitpipit
Licensed Content Date	Sep 1, 2017
Licensed Content Volume	30
Licensed Content Issue	n/a
Licensed Content Pages	9
Start Page	1
End Page	9
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
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	STR typing using direct PCR from presumptively tested biological evidence
Expected completion date	Jul 2017
Estimated size (number of pages)	110

Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Requestor Location	Ms. krittika Raham 39 Moo 4 Phetkasem Road Ao-luk, Krabi 81110 Thailand Attn: Ms. krittika Raham
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 author incorporated 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? customer care@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

บทที่ 1

บทนำ

1. บทนำต้นเรื่อง

วัตถุพยานทางชีวภาพมีความสำคัญมากในการสืบสวนหาข้อเท็จจริงทางนิติวิทยาศาสตร์ เพราะเป็นพยานหลักฐานที่มีความน่าเชื่อถือเมื่อเปรียบเทียบกับพยานบุคคล (Tobe *et al.*, 2007) วัตถุพยานทางชีวภาพที่พบบ่อยในสถานที่เกิดเหตุ ได้แก่ คราบเลือด อสุจิ และน้ำลาย โดยคราบเลือดมักพบในคดีความรุนแรงที่เกี่ยวข้องกับชีวิต ส่วนอสุจิและน้ำลายเป็นวัตถุพยานที่พบบ่อยในคดีข่มขืนกระทำชำเรา (Virkler and Lednev, 2009) การตรวจดีเอ็นเอเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลโดยการวิเคราะห์แปลผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากวัตถุพยานเหล่านี้สามารถเชื่อมโยงหลักฐานสู่ตัวผู้กระทำผิดเพื่อเข้าสู่กระบวนการยุติธรรมต่อไปได้ ซึ่งกระบวนการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลนั้นประกอบด้วย 6 ขั้นตอนหลักดังนี้ คือ 1) การตรวจหาวัตถุพยานทางชีวภาพจากหลักฐาน 2) การทดสอบคราบต้องสงสัยเบื้องต้นด้วยน้ำยาเคมี (Presumptive test) 3) การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่าง 4) การวัดปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดออกมาจากตัวอย่างโดยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ (Real-time PCR) 5) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) และ 6) การตรวจสอบและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (STR profile) ด้วยแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Capillary electrophoresis) (Butler *et al.*, 2004)

การทดสอบคราบต้องสงสัยเบื้องต้นนั้นเป็นหนึ่งในขั้นตอนสำคัญที่ทดสอบว่าคราบเหล่านั้นมีแหล่งที่มาจากตัวอย่างทางชีวภาพหรือไม่ เพื่อประกอบการตัดสินใจวิเคราะห์ดีเอ็นเอเชิงลึกต่อไป โดยขั้นตอนนี้สามารถแบ่งออกได้ 2 ประเภท คือ วิธีทางกายภาพ โดยใช้แหล่งกำเนิดแสงทางเลือก (Alternate light source) ซึ่งอาศัยหลักการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแตกต่างกัน และวิธีทางเคมี ซึ่งใช้กันอย่างแพร่หลายทั่วโลกทั้งในสถานที่เกิดเหตุการณ์และห้องปฏิบัติการ (Vandenberg and Oorschot, 2006) โดยชุดน้ำยาทางเคมีที่นิยมใช้สำหรับทดสอบคราบเลือดเบื้องต้นมีทั้งแบบอาศัยหลักการเปลี่ยนแปลงสี (Color test) และสารเรืองแสง (Luminescence) ได้แก่ น้ำยาลูมินอล (Luminol) น้ำยาลิวโคมาลาโคทกรีน (Leucomalachite green) น้ำยาแคสเทิลเมเยอร์ (Kastle-Meyer) ชุดทดสอบแบบแถบ Hemastix® น้ำยา Hemident™ และน้ำยา Bluestar© (Tobe *et al.*, 2007) การทดสอบคราบอสุจิเบื้องต้นนิยมใช้น้ำยาแอซิดฟอสฟาเตส (Acid phosphatase) ซึ่งอาศัยหลักการเปลี่ยนแปลงสีภายใน 1 นาที เมื่อมีการปรากฏของเอนไซม์เซมินอลแอซิดฟอสฟาเตส (Seminal Acid Phosphatase) (Lewis *et al.*, 2013) และการทดสอบน้ำลายเบื้องต้นนิยมใช้ชุดทดสอบ Phadebas paper ซึ่งเป็นการ

ดัดแปลงโมเลกุลแบ็งให้ติดฉลากสีด้วยวิธีทางเคมี เมื่อมีการปรากฏตัวของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส โมเลกุลของแบ็งจะถูกย่อยและทำให้ฉลากสีหลุดออกมา โดยฉลากสีดังกล่าวมีคุณสมบัติในการละลายน้ำจึงเกิดการแพร่ของเม็ดสีและกลุ่มของสีขึ้น (Hedman *et al.*, 2008) อย่างไรก็ตามวัตถุพยานทางชีวภาพที่พบในสถานที่เกิดเหตุส่วนมากจะพบในปริมาณน้อย (Trace evidence) และมักเสียสภาพจากสภาวะแวดล้อมภายนอก ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น สารเคมี และจุลินทรีย์ (Butler, 2012b; Swaran and Welch, 2012) ทำให้ในบางครั้งวัตถุพยานเหล่านี้จึงไม่เพียงพอในการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอหรือเกิดการสูญเสียดีเอ็นเอจากขั้นตอนการสกัด ทำให้ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้กลับคืนมาจากวัตถุพยานทางชีวภาพนั้นมีปริมาณน้อยมาก ส่งผลให้ยากต่อการได้รับผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ อีกทั้งเมื่อพบร่องรอยวัตถุพยานทางชีวภาพดังกล่าวส่วนหนึ่งจะต้องนำมาทดสอบตัวอย่างทางชีวภาพเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาทางเคมี ก่อน ทำให้หลงเหลือคราบวัตถุพยานทางชีวภาพน้อยเกินกว่าจะนำมาใช้ตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอในขั้นตอนถัดไปได้

เทคนิคไดเรคทีพีซีอาร์ (Direct PCR) เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากวัตถุพยานทางชีวภาพโดยไม่ผ่านกระบวนการสกัดดีเอ็นเอ และใช้ปริมาณตัวอย่างน้อยมากในการตรวจวิเคราะห์ เทคนิคดังกล่าวนี้มีการนำมาใช้เพิ่มมากขึ้นในการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอเนื่องจากลดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนดีเอ็นเอที่ไม่เกี่ยวข้องจากขั้นตอนการสกัดที่มีความซับซ้อนและยุ่งยาก อีกทั้งสะดวก ประหยัดค่าใช้จ่าย มีความรวดเร็วในการตรวจพิสูจน์ และที่สำคัญคือมีโอกาสได้ปริมาณดีเอ็นเอที่มากขึ้น เพราะกระบวนการสกัดดีเอ็นเอที่ไม่มีประสิทธิภาพจะมีการสูญเสียดีเอ็นเอมากถึง 30–70% (Colussi *et al.*, 2009; Kishore *et al.*, 2006) โดยงานวิจัยที่ผ่านมามีการนำเทคนิคไดเรคทีพีซีอาร์มาประยุกต์ใช้ในการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอมนุษย์ และที่ไม่ใช่มนุษย์ได้สำเร็จ เช่น การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากคราบเลือดบนวัสดุหลักฐานประเภทต่างๆ เช่น กระสุนปืน หนังสือ ผ้ายีน ผ้าขนแกะ หิน พื้นถนน ไม้อัด และใบไม้ เป็นต้น (Gray *et al.*, 2014) การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากรากผม (Ottens *et al.*, 2013) การระบุชนิดพันธุ์ของสัตว์ป่าคุ้มครองจากวัตถุพยานทางชีวภาพ 8 ประเภท เช่น เลือด เนื้อเยื่อ ผิวหนัง และกระดูก เป็นต้น (Kitpipit *et al.*, 2013) การระบุชนิดของเนื้อสัตว์ในอาหาร (Kitpipit *et al.*, 2014) และการระบุชนิดของเชื้อก่อโรคที่พบในอาหาร (Hasap *et al.*, 2013) นอกจากนี้ยังพบว่ามีรายงานการใช้เทคนิคไดเรคทีพีซีอาร์ในการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือด อสุจิ และน้ำลายที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นได้สำเร็จ โดยสามารถได้รับอัลลีลสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ แต่ทั้งนี้งานวิจัยดังกล่าวใช้ร่วมกับเครื่อง ParaDNA และทดลองเฉพาะในวัสดุเส้นผ้าเท่านั้น (Donachie *et al.*, 2015)

อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าจะมีการนำเทคนิคไดเรคทีวีซีอาร์มาประยุกต์ใช้กับ ตัวอย่างชีวภาพทั้งสามประเภทที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นแล้ว แต่ก็ยังไม่มีการศึกษาบนวัสดุ หลักฐานหลากหลายประเภท รวมถึงศึกษาปัจจัยทางด้านอายุของวัตถุพยานทางชีวภาพ ดังกล่าวร่วมด้วย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนากระบวนการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ จากวัตถุพยานทางชีวภาพทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นโดยใช้เทคนิคไดเรคทีวีซีอาร์ เพื่อเพิ่มโอกาสในการได้รับผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากวัตถุพยานปริมาณน้อย และเพิ่ม ประสิทธิภาพการตรวจพิสูจน์ ผลจากงานวิจัยชิ้นนี้จะเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมความมั่นคง ที่เกี่ยวข้องในแง่ของความน่าเชื่อถือในกระบวนการยุติธรรม การลดระยะเวลาในการตรวจพิสูจน์ และการลดค่าใช้จ่ายในการตรวจพิสูจน์อันเนื่องมาจากกระบวนการที่จะพัฒนาขึ้นไม่ต้องอาศัย การสกัดดีเอ็นเอ

2. การตรวจเอกสาร

2.1 วัตถุประสงค์ทางชีวภาพ

เลือด (Blood) เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดหนึ่งของร่างกายมนุษย์ ซึ่งมีอยู่ประมาณ 7–8 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักตัว โดยเลือดมีหน้าที่หลักในการลำเลียงออกซิเจนและอาหารไปยังอวัยวะต่างๆ ทั่วร่างกาย พร้อมทั้งนำของเสียที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ไปกำจัดออกนอกร่างกาย อีกทั้งช่วยในการทำลายเชื้อโรคและป้องกันการเสียเลือดเมื่อเกิดบาดแผลเล็กน้อย โดยการแข็งตัวปิดบาดแผล ซึ่งลักษณะของเลือดนั้นจะมีความแตกต่างกันออกไปตามอายุ เพศ สุขภาพร่างกาย และการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของบุคคลนั้นๆ โดยเลือดมีองค์ประกอบที่สำคัญ 4 ประเภท ได้แก่ พลาสมาหรือของเหลวในเซลล์ (Plasma) กเกล็ดเลือด (Thrombocytes) เซลล์เม็ดเลือดขาว (Leucocyte) ซึ่งบรรจุสารพันธุกรรม และเซลล์เม็ดเลือดแดง (Erythrocyte) (Burnouf *et al.*, 2015)

อสุจิ (Semen) ของมนุษย์มีองค์ประกอบที่สำคัญ คือ ตัวอสุจิ (Sperm) และของเหลวอื่นๆ ที่หลั่งออกมาจากระบบสืบพันธุ์ของเพศชาย ซึ่งตัวอสุจินั้นประกอบด้วย 3 ส่วนหลัก ได้แก่ ส่วนหัว (Head) ส่วนคอและลำตัว (Middle part) และส่วนหาง (Tail) (Ghasemian *et al.*, 2015) ส่วนหัวจะมีโครงสร้างที่เรียกว่าอะโครโซม (Acrosome) มีหน้าที่ในการย่อยผนังเซลล์ไข่ของเพศเมีย โดยภายในส่วนหัวของอสุจิมีนิวเคลียสที่ประกอบด้วยสารพันธุกรรมเพื่อใช้ในการปฏิสนธิ ส่วนคอและลำตัวของอสุจิประกอบด้วยโครงสร้างของเส้นใยฟิลาเมนต์ โดยมีไมโทคอนเดรียพันอยู่ทำหน้าที่ในการสร้างพลังงาน จึงทำให้ตัวอสุจิสามารถเคลื่อนที่ได้ และส่วนหางของอสุจิประกอบด้วยเส้นใยไมโครทิวบูลเรียงตัวกัน ทำให้เกิดโครงสร้างที่เรียกว่าแฟลกเจลลา (Flagella) ซึ่งเป็นส่วนที่สามารถทำให้อสุจิเคลื่อนที่ได้เช่นกัน สำหรับของเหลวในอสุจิที่หลั่งออกมาจากระบบอวัยวะสืบพันธุ์ต่างๆ ของเพศชาย อาทิเช่น สารจำพวกน้ำตาลฟรุกโตส (Fructose) โพรสตาแกลนดิน (Prostaglandin) โพลีฟอสฟอริลโคลีน (Phosphorylcholine) ที่หลั่งมาจากถุงน้ำอสุจิ ธาตุสังกะสี แมกนีเซียม แคลเซียม โพรตีน PSA (Prostatic specific antigen) (Sato *et al.*, 2002) และแอซิดฟอสฟาเตส (Acid phosphatase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ผลิตมาจากต่อมลูกหมาก (Prostate gland) มีปริมาณสูงในน้ำอสุจิ ทำให้ปัจจุบันมีการใช้เอนไซม์ดังกล่าวนี้ในการตรวจหาคราบอสุจิโดยการทดสอบเบื้องต้นทางเคมี

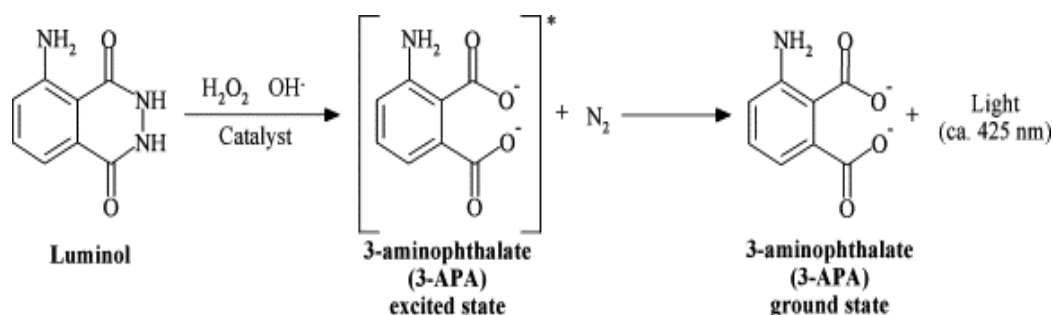
น้ำลาย (Saliva) ผลิตมาจากต่อมน้ำลาย 3 คู่ ได้แก่ ต่อมน้ำลายบริเวณกกหู (Parotid gland) ต่อมน้ำลายบริเวณขากรรไกรล่าง (Submandibular gland) และต่อมน้ำลายบริเวณใต้ลิ้น (Sublingual gland) ซึ่งในน้ำลายของมนุษย์มีส่วนประกอบของน้ำถึง 98 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลือจะประกอบด้วยโปรตีน อิเล็กโทรไลต์ เมือก สารยับยั้งแบคทีเรีย เซลล์

สารอินทรีย์ขนาดเล็ก และเอนไซม์ต่างๆ (Brandão *et al.*, 2014) โดยเอนไซม์หลักที่มีอยู่ในน้ำลาย ได้แก่ แอลฟา-อะไมเลส (α -Amylase) ไลโซไซม์ (Lysozyme) และลิเพส (Lipase) มีหน้าที่ในการย่อยอาหารจำพวกแป้ง ปรับสมดุล pH และทำลายเชื้อโรคไม่ให้เข้าสู่ร่างกาย อีกทั้งในน้ำลายมีเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มที่มีนิวเคลียสซึ่งบรรจุสารพันธุกรรมไว้ จึงทำให้มีความสำคัญในงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ในการระบุเอกลักษณ์บุคคลได้ (Hedman *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2010)

2.2 สารเคมีที่ใช้ทดสอบคราบต้องสงสัยเบื้องต้นและหลักการของปฏิกิริยา

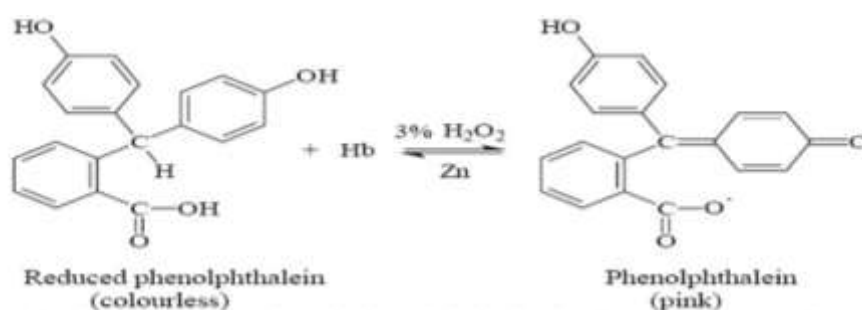
2.2.1 สารเคมีที่ใช้ทดสอบเลือด

ชุดน้ำยาลูมิโนล เป็นชุดทดสอบเลือดเบื้องต้นที่นิยมใช้ในทางนิติวิทยาศาสตร์สำหรับกรณีที่คราบเลือดถูกชะล้างหรือไม่สามารถมองเห็นได้ในสถานที่เกิดเหตุที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงหรือชีวิต ซึ่งชุดทดสอบประกอบด้วยสารลูมิโนลที่มีคุณสมบัติเรืองแสง คือ เมื่ออะตอมหรือโมเลกุลของสารถูกกระตุ้นโดยปฏิกิริยาทางเคมีแล้วกลับสู่สภาวะพื้นจะเกิดการปล่อยพลังงานออกมาในรูปของโฟตอน (Photon) หรือการเปล่งแสงขึ้น ทำการเตรียมโดยละลายสารลูมิโนลกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ให้อยู่ในรูปไดแอนไอออน (Dianion) แล้วนำไปทดสอบกับคราบเลือด เหล็กในเลือดจะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวทำให้สารลูมิโนลเกิดการสูญเสียอิเล็กตรอน และอยู่ในสภาวะไม่เสถียร ทำให้เกิดการคายพลังงานออกมาในรูปของการเปล่งแสงสีฟ้าเพื่อกลับสู่สภาวะเสถียรอีกครั้ง (Barni *et al.*, 2007) โดยในการทดสอบจะต้องทำในที่มืดสนิท เพราะจะสามารถมองเห็นการเปล่งแสงบริเวณที่มีคราบเลือดได้ชัดเจนยิ่งขึ้น ซึ่งปฏิกิริยาการทดสอบเลือดเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาลูมิโนล ดังแสดงในภาพที่ 1



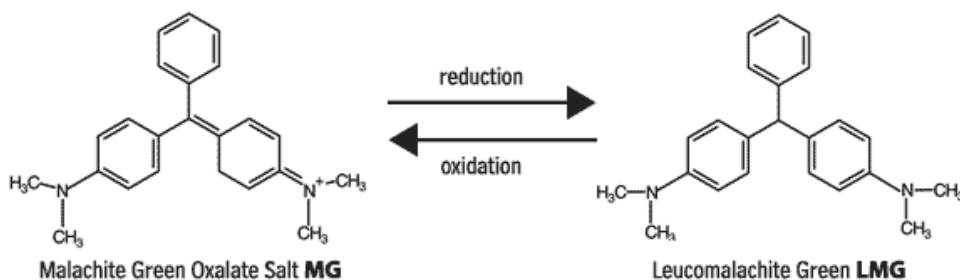
ภาพที่ 1 แสดงปฏิกิริยาการทดสอบเลือดด้วยชุดน้ำยาลูมิโนล (Barni *et al.*, 2007)

ชุดน้ำยาแคสเทิลเมเยอร์ เป็นชุดทดสอบเลือดเบื้องต้นที่นิยมใช้มากที่สุดในงานทางนิติวิทยาศาสตร์ เพราะเป็นชุดทดสอบที่เตรียมง่าย สะดวก และเก็บได้นาน โดยชุดน้ำยาแคสเทิลเมเยอร์ประกอบด้วยสารเคมีที่มีคุณสมบัติในการเปลี่ยนแปลงสี (Chromogen) คือ ฟีนอล์ฟทาลีน (Phenolphthalein) กับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งจะเตรียมไว้ในสารละลายต่าง และสังกะสี (Zinc) ให้อยู่ในรูปของรีดิวซ์ฟอร์มที่ไม่มีสี เมื่อนำไปทดสอบกับคราบเลือด เหล็กในเลือดจะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทำให้เกิดโมเลกุลของน้ำ สารฟีนอล์ฟทาลีนจึงเกิดการออกซิเดชันหรือสูญเสียอิเล็กตรอน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีเป็นสีชมพูขึ้น (Miller, 2014) ซึ่งปฏิกิริยาการทดสอบเลือดเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาแคสเทิลเมเยอร์ ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 แสดงปฏิกิริยาการทดสอบเลือดด้วยชุดน้ำยาแคสเทิลเมเยอร์ (Legg, 2014)

ชุดน้ำยาลิวโคมาลาโคท์กรีน เป็นชุดทดสอบเลือดที่มีความนิยมเช่นเดียวกันในงานทางนิติวิทยาศาสตร์ ซึ่งอาศัยหลักการเดียวกับชุดน้ำยาแคสเทิลเมเยอร์ คือ มีสารตั้งต้นที่มีคุณสมบัติในการเปลี่ยนแปลงสี เมื่อเตรียมสารลิวโคมาลาโคท์กรีนกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ให้อยู่ในรูปของรีดิวซ์ฟอร์มที่ไม่มีสี แล้วนำไปทดสอบกับคราบเลือด เหล็กในเลือดจะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทำให้เกิดโมเลกุลของน้ำ สารลิวโคมาลาโคท์กรีนจึงเกิดการออกซิเดชันหรือสูญเสียอิเล็กตรอน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีเป็นสีฟ้าเขียว (Mitrowska *et al.*, 2005) ซึ่งปฏิกิริยาการทดสอบเลือดเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาลิวโคมาลาโคท์กรีน ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 แสดงปฏิกิริยาการทดสอบเลือดด้วยชุดน้ำยาไลวโคมาลาไคท์กรีน (Mitrowska *et al.*, 2005)

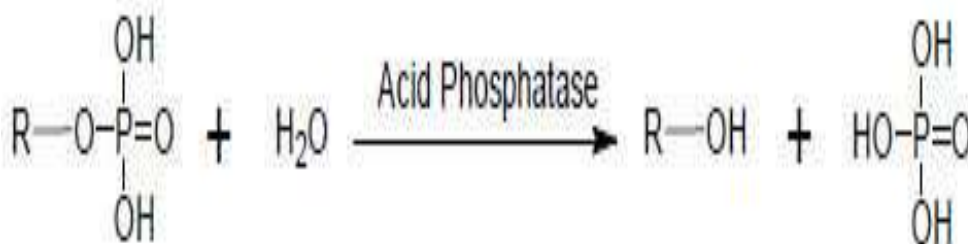
ชุดทดสอบแบบแถบ Hemastix® ปกติเป็นชุดทดสอบที่ใช้สำหรับทดสอบเลือดในปัสสาวะ แต่ในปัจจุบันได้มีการนำมาประยุกต์ใช้ในทางนิติวิทยาศาสตร์สำหรับการตรวจเลือดเบื้องต้นในสถานที่เกิดเหตุ เนื่องจากเป็นชุดทดสอบที่สามารถพกพาได้สะดวก มีความรวดเร็ว และน่าเชื่อถือ โดยชุดทดสอบมีลักษณะเป็นแผ่นพลาสติกที่มีสารพิเศษเคลือบไว้ ซึ่งประกอบด้วย Diisopropylbenzenedihydroperoxide และ 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine การทดสอบจะอาศัยหลักการเหมือนชุดทดสอบอื่นๆ ข้างต้น คือ เมื่อนำไปทดสอบกับคราบเลือด เหล็กในเลือดจะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทำให้เกิดโมเลกุลของน้ำ โดยสาร 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine เกิดการออกซิเดชันหรือสูญเสียอิเล็กตรอนจึงเกิดการเปลี่ยนแปลงสีเป็นสีเขียว อีกทั้งสามารถนำไปเปรียบเทียบกับบริเวณข้างขวดบรรจุภัณฑ์เพื่อดูระดับของฮีโมโกลบินในตัวอย่างคราบเลือดที่ตรวจได้ (National Forensic Science Technology Center) ดังแสดงในภาพที่ 4 แต่มีข้อจำกัดสำหรับชุดทดสอบนี้ คือ ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเลือดมนุษย์กับเลือดสัตว์ได้



ภาพที่ 4 แสดงชุดทดสอบแบบแถบ Hemastix®

2.2.2 สารเคมีที่ใช้ทดสอบอสุจิ

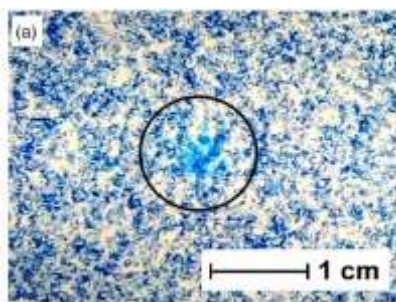
ชุดน้ำยาแอซิดฟอสฟาเตส เป็นชุดทดสอบคราบอสุจิเบื้องต้นที่ใช้กันทั่วไปในงานทางนิติวิทยาศาสตร์ในการตรวจหาเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเตส โดยเป็นเอนไซม์ที่มีปริมาณสูงในน้ำอสุจิ ซึ่งผลิตมาจากต่อมลูกหมากของอวัยวะสืบพันธุ์เพศชาย โดยชุดทดสอบอาศัยหลักการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาเคมีภายในชุดน้ำยา คือ เมื่อนำไปทดสอบกับคราบอสุจิ เอนไซม์แอซิดฟอสฟาเตสดังกล่าวจะเป็นตัวเร่งการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของสารฟอสเฟต-อินทรีย์ที่อยู่ในชุดน้ำยา เช่น ฟอสเฟตอัลฟาแนปทิล (Alpha-naphthyl phosphate) ทำให้เกิดสารพวกฟีนอล (Naphthol) ซึ่งสารพวกฟีนอลจะทำปฏิกิริยาต่อกับสารที่ทำให้เกิดสีพวก Diazonium salt chromogen เช่น เบนทามีนฟาสบลู (Brentamine Fast Blue) ภายในชุดน้ำยา จึงเกิดการเปลี่ยนแปลงสีเป็นสีม่วงภายใน 1 นาที (Lewis *et al.*, 2013) ซึ่งปฏิกิริยาการทดสอบอสุจิเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาแอซิดฟอสฟาเตส ดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 แสดงปฏิกิริยาการทดสอบอสุจิด้วยชุดน้ำยาแอซิดฟอสฟาเตส (Yang *et al.*, 2008)

2.2.3 สารเคมีที่ใช้ทดสอบน้ำลาย

ชุดทดสอบ Phadebas paper เป็นชุดทดสอบน้ำลายเบื้องต้นที่นิยมใช้กันทั่วไป โดยอาศัยหลักการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีปริมาณมากที่สุดในน้ำลาย เพื่อใช้ในการระบุตำแหน่งของคราบน้ำลายบนหลักฐานต่างๆ โดย Phadebas® ประกอบด้วยแป้งที่ถูกดัดแปลงโมเลกุลให้ติดฉลากสีฟ้า ปัจจุบันมักอยู่ในรูปเม็ด (Tablet) จึงจำเป็นต้องเตรียมให้อยู่ในรูปของสารละลายก่อน แล้วทำการฉีดพ่นลงบนกระดาษกรองที่มีคุณสมบัติให้น้ำซึมผ่านได้ จากนั้นรอให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเพื่อสะดวกต่อการนำไปใช้ ซึ่งเมื่อนำแผ่น Phadebas paper วางลงบนคราบน้ำลาย แล้วทำให้เปียกชุ่มด้วยน้ำที่สะอาดและปราศจากเชื้อเอนไซม์อะไมเลสที่อยู่ในน้ำลายจะทำการย่อยโมเลกุลของแป้งที่ติดฉลากสีไว้ จึงทำให้เกิดกลุ่มสีฟ้าขึ้นบริเวณที่มีคราบน้ำลาย (Hedman *et al.*, 2008) ดังแสดงในภาพที่ 6



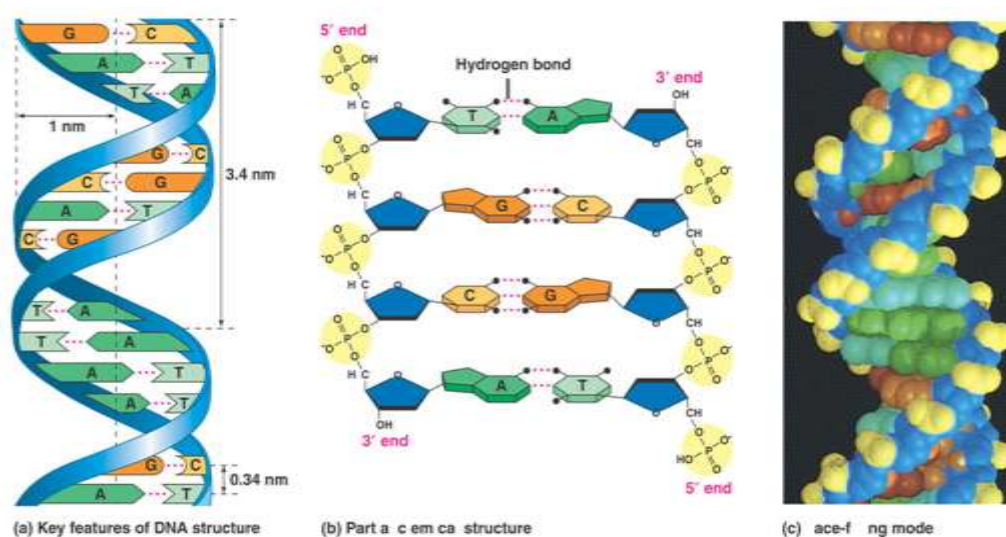
ภาพที่ 6 แสดงปฏิกิริยาการทดสอบน้ำลายด้วยชุดทดสอบ Phadebas paper (Hedman *et al.*, 2011)

2.3 การตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล

2.3.1 ดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอ (Deoxyribonucleic acid, DNA) คือ สารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกและถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เรียกว่า นิวคลีโอไทด์ (Nucleotide) โดยแต่ละนิวคลีโอไทด์ประกอบด้วยน้ำตาลเพนโทสที่มีคาร์บอน 5 อะตอม ชนิดดีออกซีไรโบส (Deoxyribose) หมู่ฟอสเฟส (Phosphate group) และไนโตรจีนัสเบส (Nitrogenous base) โดยไนโตรจีนัสเบสแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ พิวรีน (Purine) และไพริมิดีน (Pyrimidine) สำหรับไนโตรจีนัสเบสกลุ่มพิวรีนมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยวงแหวนที่มีอะตอมของคาร์บอนและไนโตรเจน 2 วง ได้แก่ อะดีนีน (Adenine) และกัวนีน (Guanine) ส่วนไนโตรจีนัสเบสกลุ่มไพริมิดีนมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยวงแหวนที่มีอะตอมของคาร์บอนและไนโตรเจน 1 วง ได้แก่ ไซโทซีน (Cytosine) และไทมีน (Thymine) ซึ่งนิวคลีโอไทด์หลายๆ โมเลกุลประกอบเป็นดีเอ็นเอได้โดยนิวคลีโอไทด์หนึ่งต่อกับนิวคลีโอไทด์หนึ่งด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ (Phosphodiester bond) ซึ่งเกิดขึ้นระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของน้ำตาลดีออกซีไรโบสของนิวคลีโอไทด์โมเลกุลหนึ่งกับหมู่ฟอสเฟส ซึ่งอยู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของนิวคลีโอไทด์โมเลกุลหนึ่ง และเชื่อมต่อกับโมเลกุลนิวคลีโอไทด์ต่อไปด้วยพันธะแบบเดียวกัน เกิดเป็นโพลีนิวคลีโอไทด์หรือดีเอ็นเอ 1 สาย โดยนิวคลีโอไทด์ที่ปลายด้านหนึ่งของดีเอ็นเอมีคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของน้ำตาลดีออกซีไรโบสต่อกับหมู่ฟอสเฟสเรียกว่าปลาย 5' ส่วนนิวคลีโอไทด์ที่ปลายอีกด้านหนึ่งของสายดีเอ็นเอมีคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของน้ำตาลดีออกซีไรโบสต่อกับหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) เรียกว่าปลาย 3' อย่างไรก็ตามดีเอ็นเอที่ทำหน้าที่เป็นสารพันธุกรรมประกอบด้วยดีเอ็นเอ 2 สายเข้าคู่กันในทิศทางตรงกันข้าม (Antiparallel) (Butler, 2010b) โดยดีเอ็นเอ 2 สายเชื่อมกันด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างไนโตรจีนัสเบสกลุ่มพิวรีนและไพริมิดีนเข้าคู่กัน เรียกว่า เบสคู่สม (Complementary base pair)

คือ A เข้าคู่กับ T ด้วยพันธะไฮโดรเจน 2 พันธะ และ C คู่กับ G ด้วยพันธะไฮโดรเจน 3 พันธะ ซึ่งการเข้าคู่กันของดีเอ็นเอ 2 สาย ก่อให้เกิดโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นเกลียวคู่ (Double helix) ทำให้เกิดร่อง 2 ลักษณะ คือ ร่องขนาดใหญ่ (Major groove) และร่องขนาดเล็ก (Minor groove) ระหว่างเกลียวคู่ดังกล่าว ซึ่งโครงสร้างของดีเอ็นเอดังแสดงในภาพที่ 7

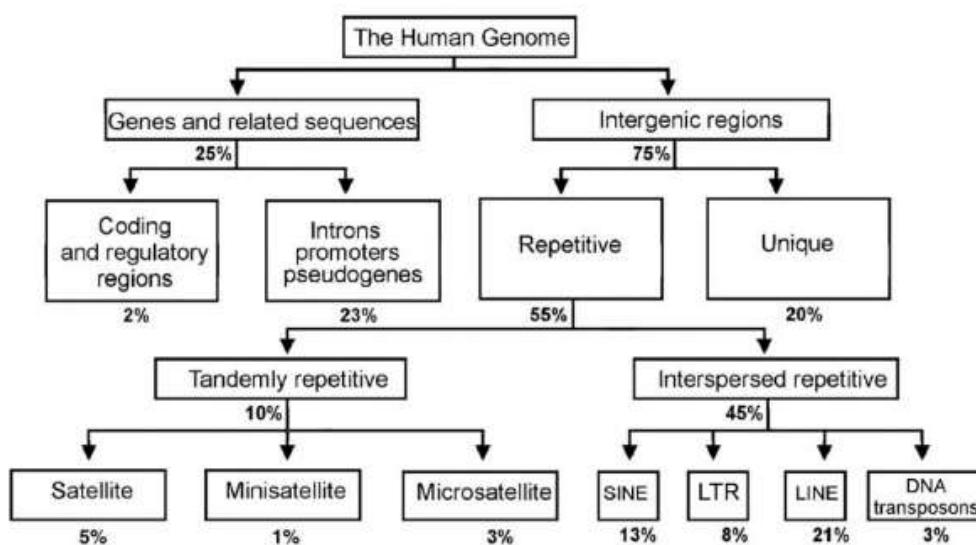


ภาพที่ 7 แสดงโครงสร้างของดีเอ็นเอ (เทคโนโลยีชีวภาพ. (ม.ป.ป.). โครงสร้างของดีเอ็นเอ. สืบค้นเมื่อ 2 ธันวาคม 2559, สืบค้นจาก <http://www.thaibiotech.info/structure-of-dna.php>)

2.3.2 จีโนม (Genome)

จีโนม คือ สารพันธุกรรมทั้งหมดที่บรรจุอยู่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ซึ่งมีความแตกต่างกันและจำเพาะกับสิ่งมีชีวิตนั้นๆ สำหรับในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง ได้แก่ มนุษย์ พืช และสัตว์ จะอยู่ในรูปของโครโมโซม (Chromosome) ที่ประกอบด้วยดีเอ็นเอและโปรตีนประเภทฮิสโตน (Histone) เข้าเกาะกันและขดกันเป็นเกลียวบรรจุอยู่ในนิวเคลียสของเซลล์ โดยจีโนมหรือสารพันธุกรรมของมนุษย์สามารถพบได้ทั้งในนิวเคลียส (Nuclear genome) และในออร์แกเนลล์ไมโทคอนเดรีย (Mitochondrial genome) ซึ่งในนิวเคลียสนั้นมีจีโนมหรือสารพันธุกรรมของมนุษย์อยู่ประมาณ 3.2 พันล้านเบส ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นยีน (Gene and related sequences) 25 เปอร์เซ็นต์ มีหน้าที่กำหนดลักษณะพันธุกรรมต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต และส่วนที่ไม่ใช่ยีน (Intergenic regions) มีอยู่ 75 เปอร์เซ็นต์ โดยส่วนที่ไม่ใช่ยีนประกอบด้วยส่วนที่มีการเรียงตัวของเบสที่จำเพาะ (Unique) 20 เปอร์เซ็นต์ และส่วนที่มีการเรียงตัวของเบสซ้ำกัน (Repetitive) 55 เปอร์เซ็นต์ สำหรับส่วนที่มีเบสซ้ำกันประกอบด้วยส่วนที่ซ้ำกันแบบต่อเนื่อง 10 เปอร์เซ็นต์ และส่วนที่มีเบสซ้ำกันแบบกระจัดกระจาย 45 เปอร์เซ็นต์ (Jasinska and

Krzyzosiak, 2004) ดังแสดงในภาพที่ 8 อีกทั้งในส่วนที่มีการซ้ำกันของเบสแบบต่อเนื่อง สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภทตามจำนวนของเบสแกนกลาง ได้แก่ ดีเอ็นเอแซทเทิลไลท์ (Satellite DNA) มีขนาดเบสแกนกลางยาวมากที่สุดซึ่งอาจถึง 1000 เบส ดีเอ็นเอมินิแซทเทิลไลท์ (Minisatellite DNA) มีขนาดเบสแกนกลางประมาณ 10–100 เบส และดีเอ็นเอไมโครแซทเทิลไลท์ (Microsatellite DNA) มีเบสแกนกลางยาวประมาณ 1–6 เบส ซึ่งมีความสำคัญและสามารถนำไปใช้ในงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ในการระบุเอกลักษณ์บุคคลได้ (Schlötterer, 2000)



ภาพที่ 8 แสดงจีโนมมนุษย์ (Human genome) (Jasinska and Krzyzosiak, 2004)

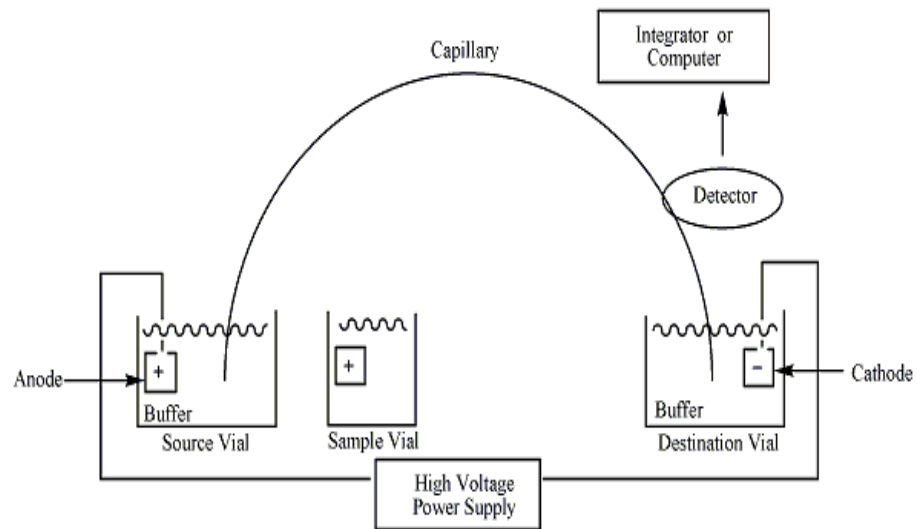
2.3.3 ดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทิลไลท์

ดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทิลไลท์ หรือ STR (Short tandem repeat) เป็นสารพันธุกรรมที่ประกอบด้วยเบสซ้ำๆ กันต่อเนื่องดังที่กล่าวมาข้างต้น ซึ่งประกอบด้วยเบสแกนกลางจำนวน 1–6 คู่เบส และมีขนาดความยาวน้อยกว่า 350 คู่เบส ทำให้เอื้อต่อการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอในงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ในปัจจุบัน เพราะเนื่องจากวัตถุประสงค์ทางชีวภาพที่พบในสถานที่เกิดเหตุมักพบในปริมาณน้อย เสื่อมสภาพ และถูกทำลายจากสภาวะแวดล้อม จึงทำให้ดีเอ็นเอที่ตรวจเก็บได้มีขนาดสายเบสสั้นๆ ซึ่งในปัจจุบันตำแหน่ง STR มาตรฐานมีอยู่ประมาณ 20 ตำแหน่งที่นำมาใช้ในงานทางด้านนิติพันธุศาสตร์ เช่น ตำแหน่ง STR มาตรฐานที่ใช้ในการระบุเอกลักษณ์บุคคลของระบบ Combined DNA Index System (CODIS) ของหน่วยสืบสวนสหรัฐอเมริกาที่มีทั้งหมด 20 ตำแหน่ง ได้แก่ CSF1PO, FGA, THO1, TPOX, VWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, D1S1656, D2S441, D2S1338, D10S1248, D12S391, D19S433 และ

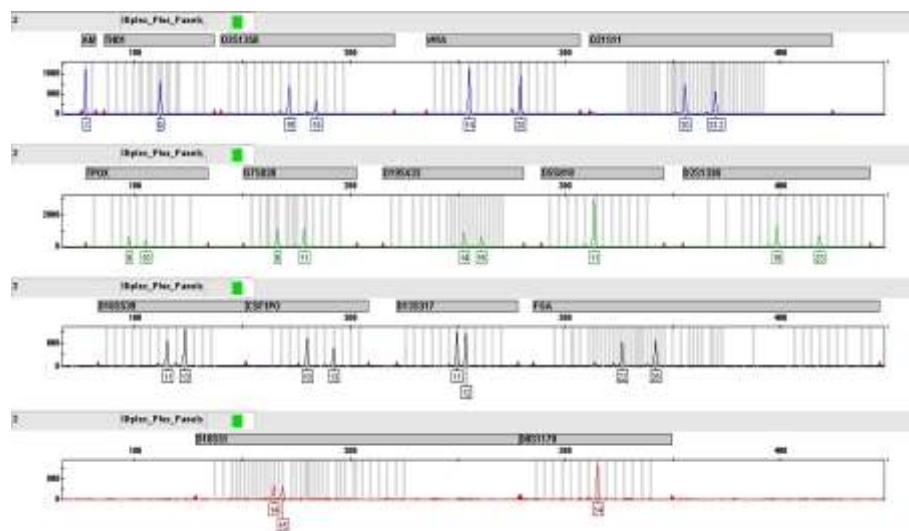
D22S1045 แต่ทั้งนี้การเลือกตำแหน่ง STR ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในงานทางด้านนิติ-วิทยาศาสตร์นั้นประกอบด้วยเหตุผลอีกหลายประการดังนี้ คือ ต้องมีอัตราการกลายพันธุ์ต่ำ (Mutation rate) ทนทานต่อตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ มีความแม่นยำในการทำซ้ำสูง (Reproducibility) สามารถนำมาใช้ในชุดทดสอบหลายตำแหน่ง (Multiplex) ได้ ขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ที่ได้ไม่ควรเกิน 500 คู่เบส และขนาดของอัลลีลมีขนาดที่ต่างกันในแต่ละตำแหน่ง โดยสามารถแยกออกจากกันได้ชัดเจน รวมทั้งสามารถจำแนกกระหว่างบุคคลได้สูง คือ มีอัลลีลในคู่โครโมโซมต่างกันมากกว่าร้อยละ 70 ในประชากร และไม่มีความเชื่อมโยงกับตำแหน่ง STR อื่นๆ (Butler, 2010)

2.3.4 กระบวนการตรวจพิสูจน์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ขั้นตอนในการระบุเอกลักษณ์บุคคลด้วยการตรวจพิสูจน์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ประกอบด้วยขั้นตอนหลักคือ 1) การตรวจหาวัตถุพยานทางชีวภาพจากหลักฐาน 2) การทดสอบคราบต้องสงสัยเบื้องต้นด้วยน้ำยาเคมี 3) การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่าง 4) การวัดปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดออกมาจากตัวอย่างโดยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ 5) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และ 6) การตรวจสอบและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Butler, 2010a) ซึ่งชุดน้ำยานิยมใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์เพื่อการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอในปัจจุบันนั้นมีอยู่มากมาย และมีจำนวนของตำแหน่ง STR ที่ได้ในการวิเคราะห์แตกต่างกัน อาทิเช่น ชุดน้ำยา AmpFISTR® Profiler™, AmpFISTR® Profiler Plus™, AmpFISTR® SGM Plus™, AmpFISTR® Identifier™, AmpFISTR NGM, PowerPlex® 16, PowerPlex® ES, PowerPlex® 18D System, PowerPlex® 21 System, QIAGEN® Investigator IDplex® Plus Kit และ Investigator IDplex GO! Kit เป็นต้น สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแต่ละชุดน้ำยานั้นอาศัยหลักการติดฉลากเรืองแสงที่ไพรเมอร์ตรงปลาย 5' (Butler, 2012a) ซึ่งฉลากเรืองแสงจะใช้สีที่แตกต่างกันเพื่อแยกขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีขนาดใกล้เคียงกันออกจากกันได้ด้วยเทคนิคแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส ดังแสดงในภาพที่ 9 โดยอาศัยหลักการแยกขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์กับหลอดรูเล็กที่บรรจุพอลิเมอร์ไว้ด้วยกระแสไฟฟ้า และทำการตรวจวัดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescent dye) ด้วยการยิงเลเซอร์ จากนั้นทำการวิเคราะห์แปลผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม GeneMapper® ออกมาในรูปแบบของอิเล็กโทรฟีโรแกรม (Electropherogram) ดังแสดงในภาพที่ 10



ภาพที่ 9 เทคนิคแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (รูปนี้เป็นสมบัติสาธารณะ)



ภาพที่ 10 แสดงตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันมีการนำเทคนิคไดเรคพีซีอาร์มาใช้มากขึ้นในงานนิติพันธุศาสตร์สำหรับวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากตัวอย่างทั้งที่เป็นมนุษย์และไม่ใช่มนุษย์ เนื่องจากสะดวก รวดเร็ว สามารถลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ ลดการปนเปื้อนของตัวอย่างดีเอ็นเอที่ไม่เกี่ยวข้องจากขั้นตอนการสกัดที่มีความซับซ้อน ยุ่งยาก และที่สำคัญสามารถเพิ่มโอกาสในการได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอปริมาณน้อยได้มากขึ้น ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการนำเทคนิคไดเรคพีซีอาร์มาประยุกต์ใช้ในการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดบนวัสดุหลักฐานหลากหลายประเภทด้วยชุดน้ำยา Promega PowerPlex® 21 ซึ่งวัสดุหลักฐานที่ทดลอง ได้แก่ บนพื้นถนน คอนกรีต หินอ่อน หินไม้ ไม้อัด หญ้า ใบไม้ ขนแกะ ผ้ายีน พรม กระสุนปืน และฝาปิดท่อ ผลการทดลองพบว่ามีอัตราความสำเร็จในการจัดทาลายพิมพ์ดีเอ็นเอสูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์ (Gray *et al.*, 2014) และมีการศึกษาในการเพิ่มปริมาณและจัดทาลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากตัวอย่างรากผมมนุษย์ด้วยชุดน้ำยา AmpFISTR® NGM® kit (Applied Biosystems, USA) ผลการทดลองพบว่ามีอัตราความสำเร็จในการจัดทาลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ 100 เปอร์เซ็นต์ (Ottens *et al.*, 2013) อีกทั้งได้มีการเปรียบเทียบการเตรียมตัวอย่างแบบวิธีการสกัดดีเอ็นเอกับวิธีไดเรคพีซีอาร์จากตัวอย่างดีเอ็นเอบนวัสดุทดลอง 4 ประเภท ได้แก่ แก้ว พลาสติก เซรามิกส์ และสแตนเลส ด้วยชุดน้ำยา PowerPlex® 16 HS ผลการทดลองพบว่าวิธีไดเรคพีซีอาร์สามารถใช้เพิ่มปริมาณและจัดทาลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ดีกว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่าง ทั้งนี้เนื่องจากการสกัดดีเอ็นเอนั้นมีการสูญเสียดีเอ็นเอไปในระหว่างขั้นตอนการสกัด ทำให้ส่งผลกระทบต่อคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับ และพบว่าวัสดุทดลองที่แตกต่างกันสามารถได้รับปริมาณดีเอ็นเอที่แตกต่างกันด้วย จึงทำให้วัสดุทดลองมีผลกระทบต่อการจัดทาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (Swaran and Welch, 2012) นอกจากนี้ยังมีการนำเทคนิคไดเรคพีซีอาร์มาใช้กับตัวอย่างดีเอ็นเอที่เกิดจากการสัมผัส (Touch DNA) ได้สำเร็จ โดยใช้ก้านสำลี (Swab) 3 ชนิด ได้แก่ ไนลอน (Nylon) โฟม (Foam) และผ้าฝ้าย (Cotton) ในการเก็บดีเอ็นเอ แล้วนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยา Profiler Plus® STR kit (ABI) ผลการทดลองพบว่าก้านสำลีชนิดไนลอนมีประสิทธิภาพในการเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่เกิดจากการสัมผัสได้ดีที่สุด (Templeton *et al.*, 2013)

สำหรับการนำเทคนิคไดเรคพีซีอาร์มาประยุกต์ใช้กับตัวอย่างที่ไม่ใช่มนุษย์นั้น ได้มีการพัฒนาชุดทดสอบมัลติเพล็กซ์ไดเรคพีซีอาร์สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างสัตว์ 6 ชนิดพร้อมกันได้สำเร็จ ซึ่งได้แก่ หมู แกะ ไก่ นกกระจอกเทศ ม้า และวัว ทำให้ประหยัดเวลาในการวิเคราะห์ตัวอย่างได้มากยิ่งขึ้น และจากผลการทดลองสามารถนำชุดทดสอบมัลติเพล็กซ์ไดเรคพีซีอาร์ไปใช้ได้จริงกับตัวอย่างอาหารตามท้องตลาด เพราะมีความไววิเคราะห์ สะดวก และรวดเร็ว (Kitpipit *et al.*, 2014) อีกทั้งมีการนำเทคนิคไดเรคพีซีอาร์ไปใช้

ในการระบุชนิดพันธุ์ของสัตว์ป่าคุ้มครองจากตัวอย่างเส้นขน กล้ามเนื้อ ทรายเลือด กระดูก หนุ่ ผัวหนึ่ง ปัสสาวะ และอุจจาระ ผลการทดลองพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างทั้งหมดได้สำเร็จ (Kitpipit *et al.*, 2013) นอกจากนี้ยังมีการนำเทคนิคไดเรคพีซีอาร์ไปประยุกต์ใช้ในการระบุชนิดของเชื้อก่อโรคที่พบในอาหาร โดยผลการทดลองพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไดเรคพีซีอาร์ของเชื้อก่อโรคทั้งหมด 3 ชนิดได้พร้อมกันได้แก่ เชื้อ *E.coli* O157:H7, *C.jejuni* and *L.monocytogenes* (Hasap *et al.*, 2013)

ชุดน้ำยาทดสอบคราบต้องสงสัยเบื้องต้นมีความสำคัญมากเช่นกันในงานทางด้านนิติพันธุศาสตร์ เนื่องจากสามารถใช้คัดกรองตัวอย่างวัตถุพยานทางชีวภาพก่อนนำไปเพิ่มปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอในขั้นตอนถัดไป ซึ่งสามารถช่วยประหยัดงบประมาณในการวิเคราะห์ตัวอย่างได้ โดยชุดน้ำยาทดสอบเบื้องต้นที่นิยมใช้กันทั่วไปในปัจจุบันมีหลายชนิด ได้แก่ ชุดน้ำยาทางเคมีที่ใช้ทดสอบเลือดเบื้องต้น เช่น ชุดน้ำยาลูมิโนล (Luminol, Luminol 16®) Bluestar® Ferensic และเบนซิดีน (Benzidine) ชุดน้ำยาที่ใช้ทดสอบอสุจิเบื้องต้น คือ ชุดน้ำยาแอซิดฟอสฟาเตส (Acid phosphatase) และชุดทดสอบน้ำลายเบื้องต้น คือ ชุดทดสอบ Phadebas paper โดยจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าชุดน้ำยาลูมิโนลไม่ส่งผลกระทบต่อการเพิ่มปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ รองลงมา คือ Bluestar® Ferensic และ Luminol 16® ส่วนชุดน้ำยาเบนซิดีนส่งผลกระทบต่อการเพิ่มปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอมากที่สุด สำหรับชุดน้ำยา Acid phosphatase และชุดทดสอบ Phadebas paper จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าไม่ส่งผลกระทบต่อการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (Lewis *et al.*, 2013) และ (Hedman *et al.*, 2011) ตามลำดับ

3. วัตถุประสงค์

3.1 เพื่อพัฒนากระบวนการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอจากวัตถุพยานทางชีวภาพ 3 ประเภท ได้แก่ คราบเลือด อสุจิ และน้ำลาย โดยวิธีไคเรคพีซีอาร์

3.2 เพื่อพัฒนากระบวนการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอจากวัตถุพยานทางชีวภาพ 3 ประเภท ได้แก่ คราบเลือด อสุจิ และน้ำลายที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้น (Presumptive test) โดยวิธีไคเรคพีซีอาร์

3.3 เพื่อศึกษาการใช้เทคนิค Gel electrophoresis เป็น screening method ก่อนการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิธีไคเรคพีซีอาร์

3.4 เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอจากวัตถุพยานทางชีวภาพ โดยวิธีไคเรคพีซีอาร์ ซึ่งได้แก่ ปัจจัยในเรื่องชนิดของชุดน้ำยาทดสอบเบื้องต้น อายุของวัตถุพยานทางชีวภาพ และประเภทวัสดุหลักฐานต่างๆ

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

1. การเก็บและเตรียมตัวอย่างวัตถุพยานทางชีวภาพ

วัตถุพยานทางชีวภาพที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ เลือด อสุจิ และน้ำลาย ซึ่งได้มาจากผู้บริจาคทั้งเพศหญิงและเพศชายอายุประมาณ 22–24 ปี จำนวน 10 คน เก็บตัวอย่างวัตถุพยานเลือด โดยเก็บจากหลอดเลือดดำโดยพยาบาลวิชาชีพปริมาณ 10 ซีซี ใส่ในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA สำหรับอสุจิเก็บจากผู้บริจาคเพศชายที่สมบุรณ์แข็งแรง โดยเก็บใส่หลอดขนาด 10 มิลลิลิตรที่สะอาด และปราศจากเชื้อ ส่วนน้ำลายเก็บโดยให้อาสาสมัครบ้วนใส่หลอดขนาด 10 มิลลิลิตรที่สะอาด และปราศจากเชื้อ จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างดังกล่าวไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

การศึกษาและทำงานวิจัยในครั้งนี้ได้ศึกษาวิจัยในคน และรวมถึงสารคัดหลั่งที่มาจากคน ซึ่งได้แก่ เลือด อสุจิ และน้ำลาย ดังนั้นจึงได้ดำเนินการขอจริยธรรมการทำวิจัยในคนโดยยึดหลัก “แนวทางจริยธรรมการทำวิจัยในคนในประเทศไทย พ.ศ. 2550” ของชมรมจริยธรรมการทำวิจัยในคนในประเทศไทย (Forum for Ethical Review Committee in Thailand หรือ FERGIT) โดยมีเอกสารอนุมัติเลขที่ 59-297-19-9

ทำการเตรียมวัตถุพยานทางชีวภาพเพื่อการทดลอง โดยปิเปตตัวอย่างคราบเลือด อสุจิ และน้ำลาย ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ลงบนวัสดุหลักฐานแต่ละประเภท (ตัวอย่างเลือด ทำการศึกษาในวัสดุเส้นผ่าชนิดผ้าฝ้าย กระดาษทิชชู ไม้ และมิด ตัวอย่างอสุจิทำการศึกษาในวัสดุเส้นผ่าชนิดผ้าฝ้าย และกระดาษทิชชู และตัวอย่างน้ำลายทำการศึกษาในวัสดุเส้นผ่าชนิดผ้าฝ้าย กระดาษทิชชู และกระป๋องอะลูมิเนียม) จำนวน 10 หยด เพื่อใช้ทำการทดลองจำนวน 10 ซ้ำ โดยกำหนดให้ความสูงของปิเปตห่างจากวัสดุประมาณ 1 เซนติเมตร จากนั้นวางทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนใช้กระดาษกรองเก็บตัวอย่างวัตถุพยานทางชีวภาพดังกล่าวออกมาจากวัสดุก่อนนำไปศึกษาในขั้นตอนถัดไป

2. การเตรียมสารเคมีที่ใช้สำหรับการทดสอบเบื้องต้น (Presumptive test)

2.1 สารเคมีที่ใช้ทดสอบเลือด

2.1.1 ชุดน้ำยาลูมินอล (Luminol)

ชั่งสารลูมินอล 0.19 กรัม และโซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate) 0.1 กรัม ละลายในไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (3% Hydrogen peroxide) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

2.1.2 ชุดน้ำยาแคสเทิลเมเยอร์ (Kastle-Meyer)

ชั่งสารฟีนอร์ฟทาลีน (Phenolphthalein) 2 กรัม โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (Potassium hydroxide) 20 กรัม และซิงค์ (Zinc dust) 30 กรัม ละลายในน้ำปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วให้ความร้อนโดยการต้มจนสารละลายไม่มีสี จากนั้นรอให้สารละลายเย็น แล้วเติมเอทานอล (Ethanol) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.1.3 ชุดน้ำยาลิวโคมาลาไคท์กรีน (Leuchomalachite green)

ชั่งสารลิวโคมาลาไคท์กรีน (Leuchomalachitegreen) 0.25 กรัม ละลายในน้ำปริมาตร 150 มิลลิลิตร เติมกรดอะซิติกเข้มข้น (Glacial acetic acid) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และเติมซิงค์ (Zinc dust) 30 กรัม จากนั้นผสมให้เข้ากันพร้อมให้ความร้อนโดยการต้มจนสารละลายไม่มีสี แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด

2.1.4 ชุดทดสอบแบบแถบ Hemastix®

ชุดทดสอบแบบแถบ Hemastix® เป็นของบริษัท Siemens Healthcare Diagnostics Inc. (USA)

2.2 สารเคมีที่ใช้ทดสอบอสุจิ

การศึกษานี้ใช้ชุดน้ำยาแอซิดฟอสฟาเตส (Acid phosphatase test) สำหรับทดสอบคราบอสุจิเบื้องต้น โดยประกอบด้วยสารละลาย 2 ชนิด คือ สารละลาย A (Stock Solution A) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และสารละลาย B (Stock Solution B) 1 มิลลิลิตร นำมาผสมให้เข้ากันด้วยน้ำปริมาตร 89 มิลลิลิตร โดยมีการเตรียมสารละลายทั้ง 2 ชนิด ดังนี้ สารละลาย

A (Stock Solution A) เตรียมโดยชั่ง O-dianisidinetetrazotised (Fast Blue B) 1 กรัม และ โซเดียมอะซิเตท (Sodium acetate) 20 กรัม ละลายในน้ำปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมกรดอะซิติก (Acetic acid) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นผสมจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ส่วนสารละลาย B (Stock Solution B) เตรียมโดยชั่ง Sodium alpha-naphthyl phosphate 0.8 กรัม ละลายในน้ำปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมจนเป็นสารละลายเนื้อเดียวกัน

2.3 สารเคมีที่ใช้ทดสอบน้ำลาย

การศึกษานี้ใช้ชุดทดสอบ Phadebas paper สำหรับทดสอบคราบน้ำลายเบื้องต้น โดยบดเม็ด Phadebas® (เป็นของบริษัท Magle AB, Lund, Sweden) ให้ละเอียด ชั่งปริมาณ 0.9 กรัม ละลายในน้ำปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายที่ได้ฉีดพ่นลงบนกระดาษกรอง รอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เก็บไว้ในถุงซิปล็อคที่สะอาดและปราศจากเชื้อ

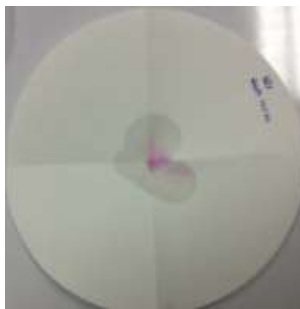
3. วิธีการทดสอบคราบต้องสงสัยเบื้องต้น (Presumptive test)

3.1 การทดสอบคราบเลือดเบื้องต้น (Blood presumptive test)

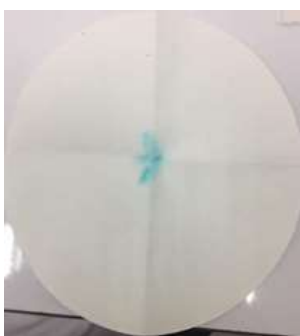
การทดสอบด้วยชุดน้ำยาลูมินอล (Luminol) ทำโดยฉีดพ่นชุดน้ำยาทดสอบลงบนคราบเลือดบริเวณตรงกลางของกระดาษกรอง ผลบวกของปฏิกิริยาจะเปล่งแสงสีฟ้า ดังแสดงในภาพที่ 11 โดยต้องทำการสังเกตการเรืองแสงในที่มืดสนิท สำหรับการทดสอบด้วยชุดน้ำยาแคสเทลเมเยอร์ (Kastle-Meyer) และการทดสอบด้วยชุดน้ำยาลิวโคมาลาไคท์กรีน (Leuchomalachite green) ทำโดยหยดชุดน้ำยาทดสอบจำนวน 2 หยด ลงบนคราบเลือดตรงกลางของกระดาษกรอง ตามด้วย 3% Hydrogen peroxide จำนวน 2 หยด ผลบวกของปฏิกิริยาการทดสอบด้วยชุดน้ำยาแคสเทลเมเยอร์จะให้สีชมพูดังแสดงในภาพที่ 12 ส่วนผลบวกของปฏิกิริยาการทดสอบด้วยชุดน้ำยาลิวโคมาลาไคท์กรีนจะให้สีฟ้าเขียว ดังแสดงในภาพที่ 13



ภาพที่ 11 ผลบวกของปฏิกิริยาการทดสอบคราบเลือดเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาลูมินอล



ภาพที่ 12 ผลบวกของปฏิกิริยาการทดสอบคราบเลือดเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาแคสเทิลเมเยอร์



ภาพที่ 13 ผลบวกของปฏิกิริยาการทดสอบคราบเลือดเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาลิวโคมาลาไคท์กรีน

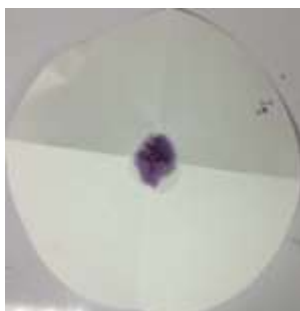
การทดสอบด้วยชุดทดสอบแบบแถบ Hemastix® ทำโดยหยดน้ำกลั่น (Distilled water) ลงบนชุดทดสอบ จากนั้นนำไปสัมผัสกับคราบเลือดบนพื้นผิววัสดุ ผลบวกของปฏิกิริยาจะเปลี่ยนกระดาษลิสมัทจากสีเหลืองเป็นสีเขียว ดังแสดงในภาพที่ 14



ภาพที่ 14 ผลบวกของปฏิกิริยาการทดสอบคราบเลือดเบื้องต้นด้วยชุดทดสอบ Hemastix®

3.2 การทดสอบคราบอสุจิเบื้องต้น (Semen presumptive test)

การทดสอบด้วยชุดน้ำยาแอซิดฟอสฟาเตส (Acid phosphatase) ทำโดยหยดชุดน้ำยาทดสอบจำนวน 2 หยด ลงบนคราบอสุจิตรงกลางของกระดาษกรอง จะให้ผลบวกของปฏิกิริยาเกิดเป็นสีม่วงภายใน 1 นาที ดังแสดงในภาพที่ 15



ภาพที่ 15 ผลบวกของปฏิกิริยาการทดสอบคราบอสุจิเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาแอซิดฟอสฟาเตส

3.3 การทดสอบคราบน้ำลายเบื้องต้น (Saliva presumptive test)

การทดสอบด้วย Phadebas paper ทำได้โดยนำแผ่น Phadebas paper วางบนคราบน้ำลายตรงกลางของกระดาษกรอง จากนั้นทำให้เปียกชุ่มด้วยน้ำกลั่น (Distilled water) จะเกิดการแพร่ของเม็ดสีและเกิดกลุ่มสีฟ้าขึ้นบริเวณที่มีคราบน้ำลายดังแสดงในภาพที่ 16



ภาพที่ 16 ผลบวกของปฏิกิริยาการทดสอบคราบน้ำลายเบื้องต้นด้วยชุดทดสอบ Phadebas paper

4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีไดเรกต์พีซีอาร์ (Direct amplification)

ทำการเตรียมตัวอย่างก่อนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไดเรกต์พีซีอาร์ ตามวิธีการของ Kitpipit และคณะ (Kitpipit *et al.*, 2014) โดยตัดกระดาษกรองที่มีคราบ วัตถุพยานทางชีวภาพทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นขนาดประมาณ 1×1 มิลลิเมตร ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่สะอาด และปราศจากเชื้อ จากนั้นเติม PBS (Phosphate Buffer Saline) ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex แล้วนำไป บ่มที่อุณหภูมิ 98°C เป็นเวลา 2 นาที สารละลายในที่นี่จะเรียกว่าสารละลาย Pre-PCR ซึ่งจะนำไปใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์แทนการใส่สารสกัดดีเอ็นเอ

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากวัตถุพยานทางชีวภาพโดยวิธีไดเรกต์พีซีอาร์ (Direct PCR) เพื่อคัดกรองตัวอย่างด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel electrophoresis) นำ สารละลาย Pre-PCR ที่ศึกษามาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยา Phire® Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Scientific, Thailand) โดยใส่น้ำยาและสารเคมีที่เกี่ยวข้องตามคู่มือ ปฏิบัติการ (ตารางที่ 1) แล้วนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง T100™ Bio-Rad thermal cycler จำนวน 35 รอบ ภายใต้สภาวะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (ตารางที่ 2) โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณตำแหน่ง STR (Short tandem repeat) จำนวน 2 ตำแหน่ง ซึ่งเป็นตำแหน่ง STR มาตรฐานในการระบุเอกลักษณ์บุคคลในปัจจุบัน โดยเลือกขนาดความ ยาวของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ที่ใหญ่สุดและขนาดความยาวของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ที่เล็กสุด ซึ่งได้แก่ FGA และ D3 (ตารางที่ 3) เพื่อใช้ศึกษาการคัดกรองตัวอย่างด้วยเทคนิค เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ก่อนนำตัวอย่างทางชีวภาพไปจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอต่อไป

ตารางที่ 1 น้ำยาและสารเคมีที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ Polymerase chain reaction (PCR)

สารเคมี	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้น สุดท้าย
5x Phire Reaction Buffer (contains 7.5 mM MgCl ₂)	2.0	7.5 mM
10 mM dNTP	0.2	10 mM
Phire® Hot Start II DNA Polymerase	0.2	-
10 μM Primer FGA-F	0.5	10 μM
10 μM Primer FGA-R	0.5	10 μM
10 μM Primer D3-F	0.5	10 μM
10 μM Primer D3-R	0.5	10 μM
DNA sample	1	-
Sterile water	4.6	-
ปริมาตรรวม	10	-

ตารางที่ 2 ขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในการทำพีซีอาร์ Polymerase chain reaction (PCR)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (วินาที)	จำนวนรอบ
Initial denaturation	98	300	1
Denaturation	98	0.05	} 35
Annealing	62	0.25	
Extension	72	60	
Final Extension	4	∞	1

ตารางที่ 3 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และขนาด (Product size) ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา การคัดกรองตัวอย่างด้วยเทคนิค Gel electrophoresis ก่อนนำตัวอย่างทางชีวภาพไปจัดทำ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอต่อไป

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส 5'→3'	ขนาดความยาว	อ้างอิง
FGA-F	GGCTGCAGGGCATAACATTA	322–444 คู่เบส	(Elkins, 2012)
FGA-R	ATTCTATGACTTTGCGCTTCAGGA		
D3-F	ACTGCAGTCCAATCTGGGT	115–147 คู่เบส	
D3-R	ATGAAATCAACAGAGGCTTGC		

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากวัตถุพยานทางชีวภาพโดยวิธีไดเรกต์พีซีอาร์ (Direct PCR) เพื่อการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Capillary electrophoresis) นำสารละลาย Pre-PCR ที่ศึกษามาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex® Plus Kit (Qiagen, UK) โดยใส่น้ำยาและสารเคมีที่เกี่ยวข้อง ตามคู่มือปฏิบัติการ (ตารางที่ 4) แล้วนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง T100™ Bio-Rad thermal cycler ตามสภาวะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่แนะนำในคู่มือปฏิบัติการ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 4 น้ำยาและสารเคมีที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ Polymerase chain reaction (PCR)

สารเคมี	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
Fast Reaction Mix	3.75
Primer Mix	1.25
Nuclease-free Water	2.5
DNA sample	5
ปริมาตรรวม	12.5

ตารางที่ 5 ขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในการทำพีซีอาร์ Polymerase chain reaction (PCR)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (วินาที)	จำนวนรอบ
Initial denaturation	95	300	1
Denaturation	96	10	} 30
Annealing/Extension	61	120	
Final Extension	10	∞	1

5. การแยกและตรวจสอบดีเอ็นเอ (DNA separation and detection)

5.1 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel electrophoresis)

เตรียมแผ่นเจลอะกาโรสสำหรับตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ โดยชั่งผงอะกาโรส (Agarose) ปริมาณ 2 กรัม ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ 1X TBE (Tris-Borate-EDTA) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนสารละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกัน วางให้สารละลายเย็น จากนั้นเติม Ethidium bromide ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำสารละลายที่ได้เทลงใน ถาดเจลให้มีความหนาประมาณ 1 เซนติเมตร วางหวี (Comb) สำหรับเป็นช่องหยอด ดีเอ็นเอ จากนั้นรอจนเจลอะกาโรสแข็งตัวประมาณ 30 นาที ถอดหวีออก นำถาดเจลอะกาโรส ไปวางในอ่างอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis tank) ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ 1X TBE ทั้งนี้ให้ สารละลายบัฟเฟอร์ท่วมถาดเจล จากนั้นผสมผลิตภัณฑ์พีซีอาร์กับ Loading dye ในอัตราส่วน 5:1 ผสมให้เข้ากันก่อนนำไปหยอดในช่องหยอดดีเอ็นเอที่เตรียมไว้ แล้วให้กระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลานำไปส่องดูภายใต้แสงยูวี (Ultraviolet-UV) และทำการถ่ายภาพด้วยเครื่อง Gel Doc™ (Biorad, USA)

5.2 การตรวจสอบ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (STR product) ด้วยเทคนิคแคปิลลารี-อิเล็กโทรโฟรีซิส (Capillary electrophoresis)

ผสมผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ปริมาตร 1 ไมโครลิตรกับส่วนผสมของ Hi-Di formamide และ DNA Size Standard 550 (BTO) ในสัดส่วนปริมาตร 12 ต่อ 0.5 ไมโครลิตร (ตารางที่ 6) จากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ (Centrifuge) ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ปมที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที และแช่แข็งเป็นเวลา 3 นาที จากนั้น

นำเข้าเครื่อง 3130x/ Genetic analyzer (Applied Biosystems) ซึ่งภายในหลอดแคปิลลารีจะบรรจุพอลิเมอซัน POP-4® และมีความยาวของหลอด 36 เซนติเมตร เวลาในการฉีดตัวอย่าง 3 กิโลโวลต์ (kV) นาน 10 วินาที ส่วนข้อมูลดิบที่ได้จะนำไปวิเคราะห์ด้วยซอฟต์แวร์ GeneMapper® เวอร์ชัน 3.2 ต่อไป

ตารางที่ 6 น้ำยาและสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการวิเคราะห์โดยวิธีแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Capillary electrophoresis)

สารเคมี	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
Hi-Di formamide	12
DNA Size Standard 550 (BTO)	0.5

6. การศึกษาปัจจัยด้านวัสดุหลักฐานที่มีผลกระทบต่อการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอโดยวิธีไดเรคทีชีอาร์

การทดลองส่วนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลกระทบของวัสดุหลักฐานประเภทต่างๆ ต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากวัตถุพยานทางชีวภาพทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นโดยวิธีไดเรคทีชีอาร์ในวัสดุหลักฐานหลากหลายประเภท โดยวัสดุหลักฐานที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เลือกมาจากหลักฐานที่มักพบคราบวัตถุพยานชีวภาพเป้าหมาย สำหรับตัวอย่างคราบเลือดได้ทำการศึกษาในวัสดุเสื่อผ้าชนิดผ้าฝ้าย กระดาษทิชชู ไม้ และมัต สำหรับตัวอย่างคราบอสุจิได้ทำการศึกษาในวัสดุเสื่อผ้าชนิดผ้าฝ้าย และกระดาษทิชชู สำหรับคราบตัวอย่างน้ำลายได้ทำการศึกษาในวัสดุเสื่อผ้าชนิดผ้าฝ้าย กระดาษทิชชู และกระป๋องอะลูมิเนียม ดังแสดงในภาพที่ 17 โดยในแต่ละชุดการทดลองจะทำซ้ำจำนวน 10 ซ้ำ

วัตถุพยานทางชีวภาพ	วัสดุหลักฐาน	ชุดน้ำยาทดสอบเบื้องต้น
เลือด	เสื้อผ้า	Luminol reagent
	กระดาษทิชชู	Kastle-Meyer reagent
	ไม้	Leucomalachite reagent
	มีด	Hemastix®
อสุจิ	เสื้อผ้า	Acid Phosphatase
	กระดาษทิชชู	
น้ำลาย	เสื้อผ้า	Phadebas paper
	กระดาษทิชชู	
	กระป๋องอะลูมิเนียม	

ภาพที่ 17 แสดงวัตถุพยานทางชีวภาพ วัสดุหลักฐาน และชุดน้ำยาทดสอบเบื้องต้น

7. การศึกษาปัจจัยด้านอายุของวัตถุพยานทางชีวภาพที่มีผลกระทบต่อ การตรวจพิสูจน์ ดีเอ็นเอโดยวิธีไดเรคทีฟซีอาร์

การทดลองส่วนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของอายุวัตถุพยานชีวภาพต่อคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับจากการเพิ่มปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคที่พัฒนาขึ้น ทำการทดลองโดยหยดตัวอย่างวัตถุพยานชีวภาพทั้ง 3 ประเภทบนวัสดุเสื้อผ้าชนิดผ้าฝ้าย จากนั้นวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน, 14 วัน, 1 เดือน, 3 เดือน และ 6 เดือน ก่อนใช้กระดาษกรองเก็บตัวอย่างออกจากวัสดุ แล้วทำการศึกษาตามกระบวนการที่กล่าวมาข้างต้น โดยในแต่ละชุดการทดลองจะซ้ำจำนวน 5 ซ้ำ

8. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการเปรียบเทียบชุดข้อมูลทั้งหมดระหว่างความแตกต่างของการเจือจาง สัดส่วนดีเอ็นเอ การทดสอบเบื้องต้น วัสดุหลักฐาน และอายุของวัตถุพยานทางชีวภาพ โดยใช้ช่วงความน่าเชื่อถือ 95 เปอร์เซนต์ของ Bayesian ในทางสถิติ ซึ่งช่วงความน่าเชื่อถือ 95 เปอร์เซนต์ คือ โอกาสที่ค่ากลางหรือค่าเฉลี่ยที่ได้ตกอยู่ในช่วงนี้จริง ๆ ซึ่งหากช่วงความน่าเชื่อถือ 95 เปอร์เซนต์ของสองชุดข้อมูลไม่มีการซ้อนทับกัน แสดงให้เห็นว่าทั้งสองชุดข้อมูลมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การคำนวณช่วงความน่าเชื่อถือ 95 เปอร์เซ็นต์ของ Bayesian ทำได้โดยนำชุดข้อมูลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์กับ yarr ในโปรแกรม R ซึ่งโปรแกรมดังกล่าวจะทำการสุ่มข้อมูลจำนวน 2000 ซ้ำเพื่อนำมาวิเคราะห์หาช่วงความน่าเชื่อถือ 95 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ได้ทำการเปรียบเทียบผลคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับจากตัวอย่างที่ผ่านและไม่ผ่านการทดสอบเบื้องต้น ซึ่งทำการคำนวณโดยนำค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลีลและค่าเฉลี่ยความสูงพีคในแต่ละชุดการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์กับ BEST ในโปรแกรม R ซึ่งโปรแกรมดังกล่าวจะทำการสุ่มข้อมูลจำนวน 2000 ซ้ำ เพื่อนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างในแต่ละชุดการทดลองเช่นกัน โดยหากค่าที่ได้เท่ากับศูนย์แสดงให้เห็นว่าชุดข้อมูลทั้งสองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 3

ผลและวิเคราะห์ผล

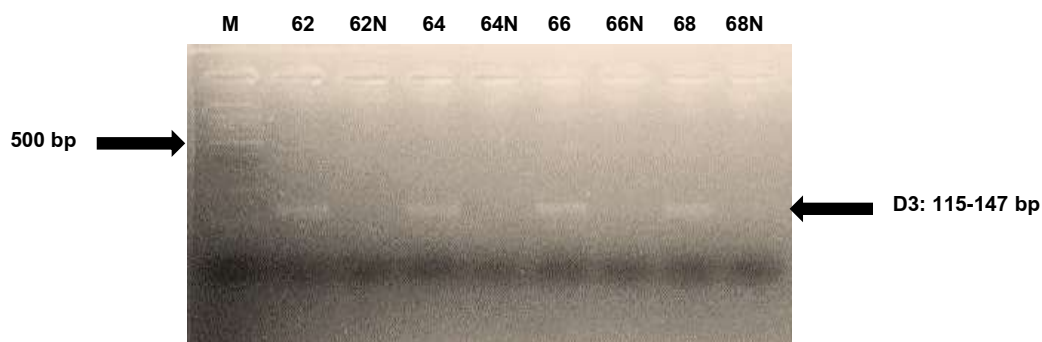
1. การเพิ่มปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากวัตถุพยานทางชีวภาพที่ไม่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไดเรคทีฟพีซีอาร์ (Multiplex-Direct PCR)

1.1 การศึกษาความเป็นไปได้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากวัตถุพยานทางชีวภาพด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไดเรคทีฟพีซีอาร์โดยใช้เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

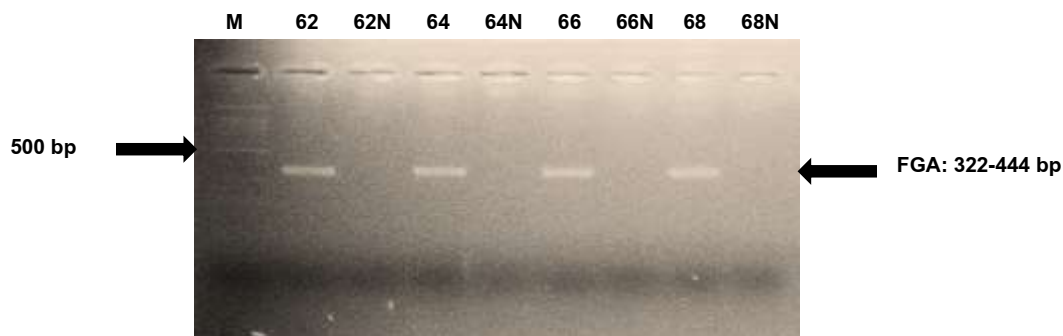
การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างชีวภาพโดยไม่ผ่านการสกัดดีเอ็นเอ และใช้เทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสในการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์เป้าหมายที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่ง STR จำนวน 2 ตำแหน่ง คือ ไพรเมอร์ D3 และ FGA รวมทั้งหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตำแหน่งเป้าหมายนี้พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียว ทำการทดลองโดยหยดเลือดปริมาณ 10 ไมโครลิตรลงบนวัสดุเสื่อผ้าชนิดผ้าฝ้าย จากนั้นวางทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนใช้กระดาษกรองเก็บตัวอย่างเลือดออกมาจากวัสดุ เพื่อเตรียมสารละลาย Pre-PCR ดังที่อธิบายในบทที่ 2 ข้อ 4 ซึ่งนำไปใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์แทนการใส่สารสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากสารละลายดังกล่าวด้วยชุดน้ำยา Phire® Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Scientific, Thailand) โดยใช้ไพรเมอร์ D3 และ FGA รวมถึงสารเคมีที่เกี่ยวข้องตามคู่มือปฏิบัติการ ดังแสดงในบทที่ 2 ตารางที่ 1 ทั้งนี้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคซิงเกิลเพล็กซ์และเกรเดียนต์พีซีอาร์ (Singleplex-Gradient PCR) โดยใช้อุณหภูมิ annealing จำนวน 4 อุณหภูมิ คือ อุณหภูมิ 62, 64, 66 และ 68 องศาเซลเซียส เพื่อทดสอบไพรเมอร์เป้าหมายทั้ง 2 คู่ และหาอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปตรวจวัดด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ผลการศึกษาพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่ง D3 และ FGA จากตัวอย่างเลือดด้วยเทคนิคไดเรคทีฟพีซีอาร์ได้สำเร็จ โดยใช้ไพรเมอร์ D3 ให้แถบดีเอ็นเอที่คาดหวังซึ่งมีขนาดประมาณ 115–147 คู่เบส จากทั้ง 4 อุณหภูมิ คือ อุณหภูมิ 62, 64, 66 และ 68 องศาเซลเซียส ดังแสดงในภาพที่ 18 สำหรับไพรเมอร์ FGA ให้แถบดีเอ็นเอที่คาดหวังซึ่งมีขนาดประมาณ 322–444 คู่เบส จากทั้ง 4 อุณหภูมิเช่นกัน ดังแสดงในภาพที่ 19 โดยแถบดีเอ็นเอที่มีความเข้มมากที่สุด คือ แถบดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิ

annealing 62 และ 64 องศาเซลเซียส ทั้งนี้เนื่องจากการใช้อุณหภูมิ annealing ต่ำจะทำให้ไพรเมอร์สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอแม่แบบได้ดี จึงทำให้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จำนวนมาก และปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีความเข้มมาก (Welsh and McClelland, 1990) แต่อย่างไรก็ตามหากอุณหภูมิ annealing ต่ำเกินไปจะทำให้ไพรเมอร์สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอแม่แบบอย่างไม่จำเพาะเจาะจง ทำให้ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ไม่ใช่ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เป้าหมายได้ (Rychlik *et al.*, 1990) ในขณะที่หากอุณหภูมิ annealing สูงเกินไปจะเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบได้ยาก ทำให้ปรากฏแถบดีเอ็นเอปริมาณน้อยหรือมีความเข้มต่ำ (National Forensic Science Technology Center 2007) ส่วนชุดควบคุมลบ (Negative control, N) ที่ไม่มีการเติมดีเอ็นเอลงไป ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในทุกอุณหภูมิที่ทำการทดลอง แสดงให้เห็นว่าไม่มีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอที่ไม่เกี่ยวข้องในชุดน้ำยาที่ใช้ทดสอบ และระหว่างดำเนินการทดลอง

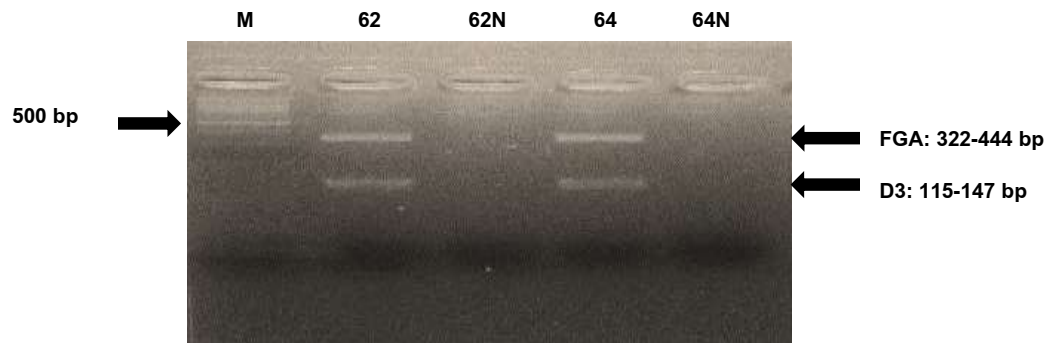


ภาพที่ 18 2% เจลอะกาโรส แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากตัวอย่างเลือดที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคซิงเกิลเพล็กซ์และเกรเดียนพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ D3 ซึ่งช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Marker), ช่อง 62, 64, 66 และ 68 คือ ค่าอุณหภูมิ annealing ที่ทดลอง (องศาเซลเซียส), ช่อง 62N, 64N, 66N และ 68N คือ ชุดควบคุมลบของแต่ละอุณหภูมิ annealing



ภาพที่ 19 2% เจลอะกาโรส แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากตัวอย่างเลือดที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคซิงเกิลเพล็กซ์และเกรเดียนพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ FGA ซึ่งช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Marker), ช่อง 62, 64, 66 และ 68 คือ ค่าอุณหภูมิ annealing ที่ทดลอง (องศาเซลเซียส), ช่อง 62N, 64N, 66N และ 68N คือ ชุดควบคุมลบของแต่ละอุณหภูมิ annealing

การศึกษาถัดไปจึงทดสอบภาวะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไดเรกต์พีซีอาร์ (Multiplex-direct PCR) ด้วยไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ (ไพรเมอร์ D3 และ FGA) เพื่อลดระยะเวลาการวิเคราะห์ และสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทั้งสองตำแหน่งได้พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียว ทั้งนี้ได้ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใส่ไพรเมอร์ D3 และ FGA ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ลงในหลอดทดลองหลอดเดียว ใช้ภาวะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเช่นเดียวกับการทดลองก่อนหน้า และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิ annealing 62 และ 64 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ให้แถบดีเอ็นเอเข้มที่สุดของไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ ผลการทดลองพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง D3 และ FGA ในปฏิกิริยาเดียวได้สำเร็จทั้งสองอุณหภูมิ โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังซึ่งมีขนาดประมาณ 115–147 คู่เบส สำหรับไพรเมอร์ D3 และแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังซึ่งมีขนาดขนาดประมาณ 322–444 คู่เบส สำหรับไพรเมอร์ FGA ดังแสดงในภาพที่ 20 อย่างไรก็ตามพบว่าที่อุณหภูมิ annealing ที่ 62 องศาเซลเซียส ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีความเข้มมากที่สุด และความเข้มของแถบดีเอ็นเอทั้งสองมีความใกล้เคียงกัน จึงเลือกอุณหภูมิ annealing ที่ 62 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และใช้ในการศึกษาถัดไป นอกจากนี้ชุดควบคุมลบ (ภาพที่ 20 ช่อง 62N และ 64N) ที่ไม่มีการเติมดีเอ็นเอลงไป ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในทุกอุณหภูมิที่ทำการทดลอง แสดงให้เห็นว่าไม่มีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอที่ไม่เกี่ยวข้องในชุดน้ำยาที่ใช้ทดสอบ และระหว่างดำเนินการทดลอง



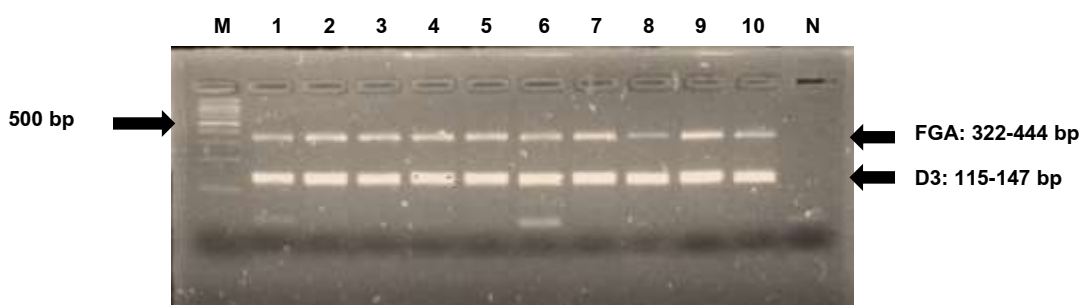
ภาพที่ 20 2% เจลอะกาโรส แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากตัวอย่างเลือดที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไคเรคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ D3 และ FGA ซึ่งช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Marker), ช่อง 62 และ 64 คือ ค่าอุณหภูมิ annealing ที่ทดลอง (องศาเซลเซียส), ช่อง 62N และ 64N คือ ชุดควบคุมลบของแต่ละอุณหภูมิ annealing

1.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากวัตถุพยานทางชีวภาพด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไดเรคทีฟพีซีอาร์ และเจลอิลีกโทรโฟรีซิส

การทดลองนี้ได้ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากวัตถุพยานทางชีวภาพ 3 ประเภท ได้แก่ เลือด อสุจิ และน้ำลายด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไดเรคทีฟพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นจากการทดลองก่อนหน้า ซึ่งทำการทดลองโดยหยดวัตถุพยานชีวภาพเป้าหมายปริมาณ 10 ไมโครลิตร ลงบนวัสดุเสื่อผ้าชนิดผ้าฝ้าย จากนั้นวางทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนใช้กระดาษกรองเก็บตัวอย่างวัตถุพยานชีวภาพออกมาจากวัสดุ แล้วนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไดเรคทีฟพีซีอาร์ โดยใช้อุณหภูมิ annealing 62 องศาเซลเซียส ดังที่อธิบายในหัวข้อที่ 1.1 ทั้งนี้จะทำการทดลองจำนวน 10 ซ้ำ สำหรับวัตถุพยานทางชีวภาพแต่ละประเภท เพื่อทดสอบความแม่นยำของวิธีที่พัฒนาขึ้น

1.2.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากคราบเลือด

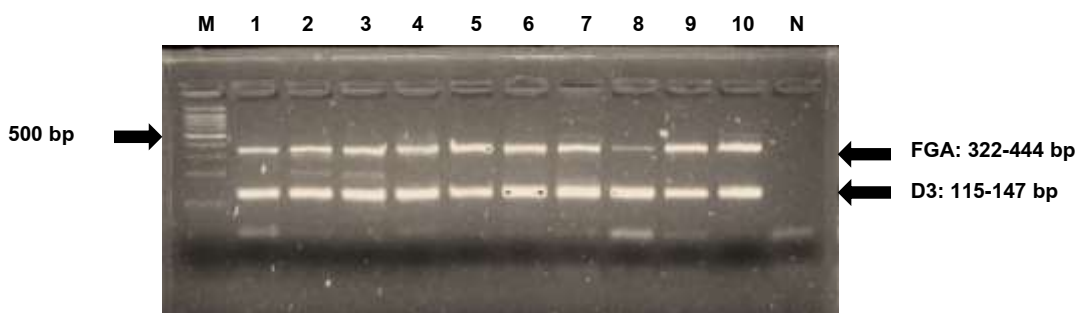
ผลการศึกษาพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไดเรคทีฟพีซีอาร์ได้สำเร็จ โดยใช้อุณหภูมิ annealing ที่ 62 องศาเซลเซียส และสามารถให้แถบดีเอ็นเอที่คาดหวังซึ่งมีขนาดประมาณ 115–147 และ 322–444 คู่เบส ครบทั้ง 10 ตัวอย่าง ดังแสดงในภาพที่ 21 คิดเป็นความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนชุดควบคุมลบที่ไม่มีการเติมดีเอ็นเอลงไป ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ แสดงให้เห็นว่าไม่มีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอที่ไม่เกี่ยวข้องในชุดน้ำยาที่ใช้ทดสอบ และระหว่างดำเนินการทดลอง ดังนั้นผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ากระบวนการที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ได้กับตัวอย่างชีวภาพประเภทเลือดได้จริง



ภาพที่ 21 2% เจลอะกาโรส แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากตัวอย่างเลือดที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไดเรคทีฟพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ D3 และ FGA ซึ่งช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Marker), ช่อง 1–10 คือ ตัวอย่างเลือดมนุษย์ และช่อง N คือ ชุดควบคุมลบ

1.2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากคราบอสุจิ

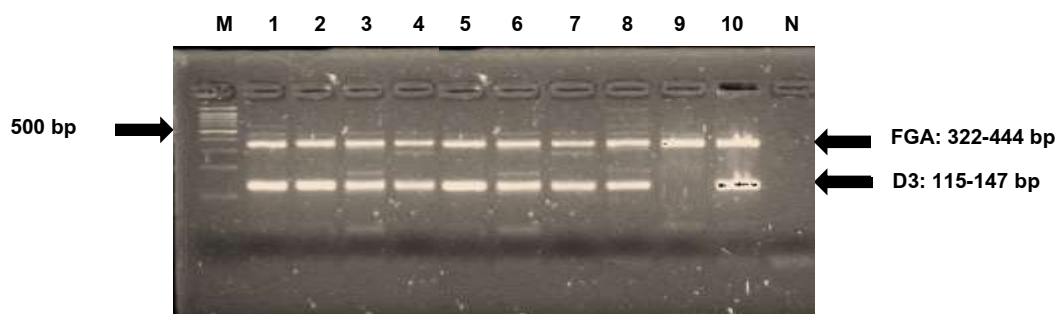
ผลการศึกษาพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างอสุจิด้วยเทคนิค มัลติเพล็กซ์ไจเร็กซ์พีซีอาร์ได้สำเร็จ โดยใช้อุณหภูมิ annealing ที่ 62 องศาเซลเซียส และสามารถให้แถบดีเอ็นเอที่คาดหวังซึ่งมีขนาดประมาณ 115–147 และ 322–444 คู่เบส ครบทั้ง 10 ตัวอย่าง ดังแสดงในภาพที่ 22 คิดเป็นความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างอสุจิ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมดีเอ็นเอลงไป ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ แสดงให้เห็นว่าไม่มีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอที่ไม่เกี่ยวข้องในชุดน้ำยาที่ใช้ทดสอบ และระหว่างดำเนินการทดลอง ดังนั้นผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ากระบวนการที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ได้กับตัวอย่างชีวภาพประเภทอสุจิได้จริง



ภาพที่ 22 2% เจลอะกาโรส แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากตัวอย่างอสุจิที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไจเร็กซ์พีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ D3 และ FGA ซึ่งช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Marker), ช่อง 1–10 คือ ตัวอย่างอสุจิมนุษย์ และช่อง N คือ ชุดควบคุม

1.2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากคราบน้ำลาย

ผลการศึกษาพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างน้ำลายด้วยเทคนิค มัลติเพล็กซ์ไจเร็กซ์พีซีอาร์ได้สำเร็จ โดยใช้อุณหภูมิ annealing ที่ 62 องศาเซลเซียส และสามารถให้แถบดีเอ็นเอที่คาดหวังซึ่งมีขนาดประมาณ 115–147 และ 322–444 คู่เบส ทั้งหมด 9 ตัวอย่าง ดังแสดงในภาพที่ 23 คิดเป็นความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างน้ำลาย 90 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ตัวอย่างน้ำลายอีก 1 ตัวอย่างนั้นให้แถบที่เอ็นเอที่คาดหวังซึ่งมีขนาดประมาณ 322–444 คู่เบส เท่านั้น (ภาพที่ 23 ช่องที่ 9) ส่วนชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมดีเอ็นเอลงไป ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ แสดงให้เห็นว่าไม่มีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอที่ไม่เกี่ยวข้องในชุดน้ำยาที่ใช้ทดสอบ และระหว่างดำเนินการทดลอง ดังนั้นผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ากระบวนการที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ได้กับตัวอย่างชีวภาพประเภทน้ำลายได้จริง



ภาพที่ 23 2% เจลอะกาโรส แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากตัวอย่างน้ำลายที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไคเรคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ D3 และ FGA ซึ่งช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Marker), ช่อง 1-10 คือ ตัวอย่างน้ำลายมนุษย์ และช่อง N คือ ชุดควบคุมลบ

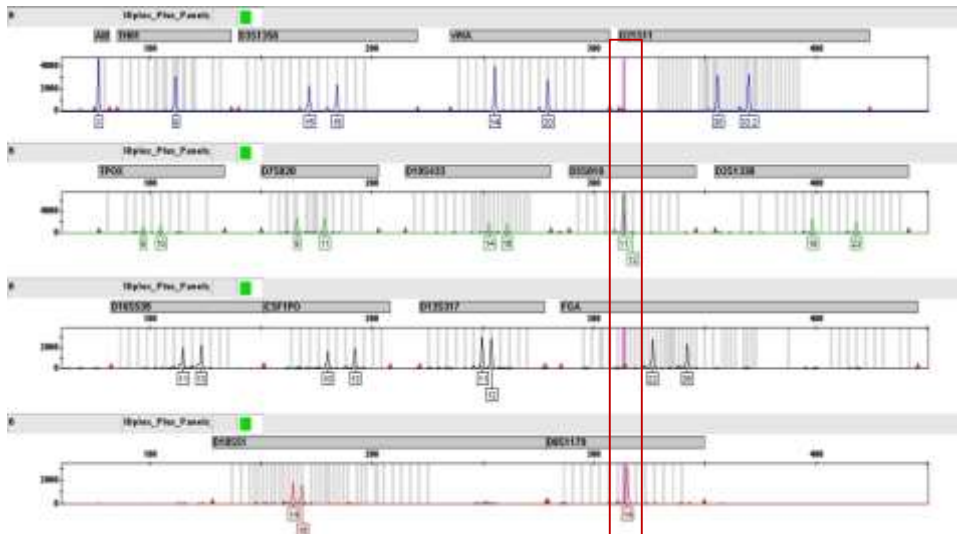
โดยสรุปพบว่างานวิจัยชิ้นนี้สามารถพัฒนากระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากวัตถุดิบทางชีวภาพทั้ง 3 ประเภท (เลือด อสุจิ และน้ำลาย) ได้สำเร็จด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไคเรคพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้น โดยมีหลายปัจจัยที่ส่งเสริมความสำเร็จในครั้งนี้ ได้แก่ การเจือจางตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR inhibitor) ด้วย PBS (Phosphate buffer saline) ก่อนนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไคเรคพีซีอาร์ ซึ่ง PBS สามารถช่วยเจือจางตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์จากตัวอย่างชีวภาพทั้งสามประเภทได้ เช่น เจือจางฮีโมโกลบินในเลือด ยูเรียในอสุจิและน้ำลาย (De Almeida *et al.*, 2012) เป็นต้น และรักษาสมดุลของสารละลายในระหว่างการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Kitpipit *et al.*, 2014) นอกจากนี้ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างโดยวิธีไคเรคพีซีอาร์ที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ นั้นสามารถทำให้เซลล์แตกและปลดปล่อยดีเอ็นเอออกมาได้ ในขณะที่เดียวกันยังสามารถทำลายเซลล์โปรตีน และเอนไซม์ DNase ที่ทำหน้าที่ย่อยดีเอ็นเอได้อีกด้วย (Kitpipit *et al.*, 2014) อีกทั้งงานวิจัยนี้ใช้ชุดน้ำยา Phire® Hot Start II DNA Polymerase ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไคเรคพีซีอาร์ ซึ่ง Phire® Hot Start II DNA Polymerase ในชุดน้ำยานี้มีองค์ประกอบของ SSo-binding domain ที่สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณร่องขนาดเล็ก (Minor groove) ของสายดีเอ็นเอ ทำให้พอลิเมอเรสสามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอแม่แบบในตำแหน่งเป้าหมายได้อย่างมีประสิทธิภาพขึ้น (Wang *et al.*, 2004) และพอลิเมอเรสดังกล่าวมีการพัฒนาให้ทนทานต่อตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ ทำให้ปฏิกิริยาพีซีอาร์สามารถดำเนินต่อไปได้ โดยจากผลการศึกษาตัวอย่างเลือดและอสุจิมีอัตราความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนตัวอย่างน้ำลายมีอัตราความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอคิดเป็น 90 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ตัวอย่างน้ำลาย 1 ตัวอย่างที่ล้มเหลวในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ นั้นอาจมีปริมาณเซลล์เยื่อ

กระพุงแก้มน้อยกว่าตัวอย่างอื่น จึงไม่เพียงพอต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่ง STR เป้าหมายข้างต้นได้

1.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากวัตถุพยานทางชีวภาพด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไคเร็กซ์พีซีอาร์ และแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส

จากผลการทดลองในข้อ 1.2 แสดงให้เห็นว่ากระบวนการมัลติเพล็กซ์ไคเร็กซ์พีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่ง D3 และ FGA จากวัตถุพยานทางชีวภาพทั้ง 3 ประเภทได้จริง ดังนั้นในการทดลองนี้จึงต้องการศึกษาผลคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคดังกล่าวจากวัตถุพยานทางชีวภาพเป้าหมายทั้ง 3 ประเภท ทั้งนี้ได้ทำการศึกษาปัจจัยในเรื่องประเภทของวัสดุหลักฐานที่อาจส่งผลกระทบต่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไคเร็กซ์พีซีอาร์ประกอบร่วมในการทดลองด้วยโดยวัสดุหลักฐานที่ใช้ในการศึกษารั้งนี้เลือกมาจากหลักฐานที่มักพบคราบวัตถุพยานชีวภาพเป้าหมายข้างต้น สำหรับตัวอย่างคราบเลือดได้ทำการศึกษาในวัสดุเส้นผ้าชนิดผ้าฝ้าย กระดาษทิชชู ไม้ และมีด สำหรับตัวอย่างคราบอสุจิได้ทำการศึกษาในวัสดุเส้นผ้าชนิดผ้าฝ้าย และกระดาษทิชชู และสำหรับตัวอย่างคราบน้ำลายได้ทำการศึกษาในวัสดุเส้นผ้าชนิดผ้าฝ้าย กระดาษทิชชู และกระป๋องอะลูมิเนียม การศึกษานี้ทำการทดลองโดยหยดวัตถุพยานทางชีวภาพเป้าหมายปริมาณ 10 ไมโครลิตร ลงบนวัสดุหลักฐานแต่ละประเภท จากนั้นวางทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนใช้กระดาษกรองเก็บตัวอย่างวัตถุพยานชีวภาพออกมาจากวัสดุ เพื่อเตรียมสารละลาย Pre-PCR ดังที่อธิบายในบทที่ 2 ข้อ 4 ซึ่งนำไปใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์แทนการใส่สารสกัดดีเอ็นเอจากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากสารละลายดังกล่าวด้วยชุดน้ำยา QIAGEN® Investigator IDplex® Plus Kit (Qiagen, UK) รวมถึงสารเคมีที่เกี่ยวข้องตามคู่มือปฏิบัติการ ดังแสดงในบทที่ 2 ตารางที่ 4 ทั้งนี้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไคเร็กซ์พีซีอาร์ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปตรวจวัดด้วยเทคนิคแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส

ผลการศึกษาพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากวัตถุพยานทางชีวภาพทั้ง 3 ประเภทด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไคเร็กซ์พีซีอาร์ได้สำเร็จ และทั้งหมดให้ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ ซึ่งปรากฏจำนวนอัลลีลทั้งสิ้น 32 อัลลีล สำหรับตำแหน่ง STR ทั้ง 16 ตำแหน่ง อย่างไรก็ตามลักษณะของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับทั้งหมดปรากฏแถบสีชมพูเรียกว่า Over-amplification peak ขึ้นในบางตำแหน่งดังแสดงในภาพที่ 24 ทั้งนี้เนื่องจากมีปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยาพีซีอาร์มากเกินไป (Butler, 2005) การศึกษาถัดไปจึงทดลองเจือจางสารละลาย Pre-PCR ที่สัดส่วนความเข้มข้นต่าง ๆ ก่อนนำไปเพิ่มปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ



ภาพที่ 24 แสดงตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากวัตถุพยานชีวภาพที่เกิด Over-amplification peak

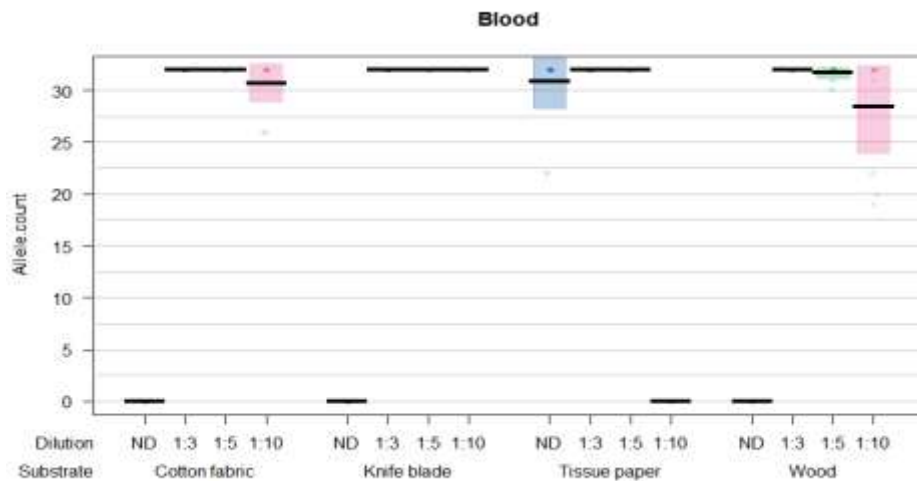
1.3.1 การศึกษาช่วงความเข้มข้นสารละลายดีเอ็นเอ (Pre-PCR solution) ที่เหมาะสมสำหรับเพิ่มปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากคราบเลือดด้วยเทคนิค มัลติเพล็กซ์ไดเรคทีชีอาร์

การทดลองนี้ทำการเจือจางสารละลาย Pre-PCR ของคราบเลือดที่สัดส่วนต่างๆ เพื่อหาสัดส่วนการเจือจางที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค มัลติเพล็กซ์ ไดเรคทีชีอาร์ และได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดี ทั้งนี้วัสดุทดลองแต่ละประเภทมีสัดส่วนการเจือจางที่ต่างกันขึ้นอยู่กับผลการทดลองเบื้องต้น โดยสารละลาย Pre-PCR ของคราบเลือดที่เก็บจากวัสดุเสื้อผ้าชนิดผ้าฝ้าย ไม้ และมีด จะทำการเจือจางที่สัดส่วน 1:3 (สารละลาย Pre-PCR 1 ส่วน ในน้ำ 2 ส่วน), 1:5 (สารละลาย Pre-PCR 1 ส่วน ในน้ำ 4 ส่วน) และ 1:10 (สารละลาย Pre-PCR 1 ส่วน ในน้ำ 9 ส่วน) ส่วนสารละลาย Pre-PCR ของคราบเลือดที่เก็บจากวัสดุกระดาษทิชชู จะทำการเจือจางที่สัดส่วน 1:3, 1:5 และไม่เจือจางสารละลาย Pre-PCR ซึ่งในแต่ละชุดการทดลองจะทำซ้ำจำนวน 10 ซ้ำ เพื่อทดสอบความแม่นยำของวิธีที่พัฒนาขึ้น

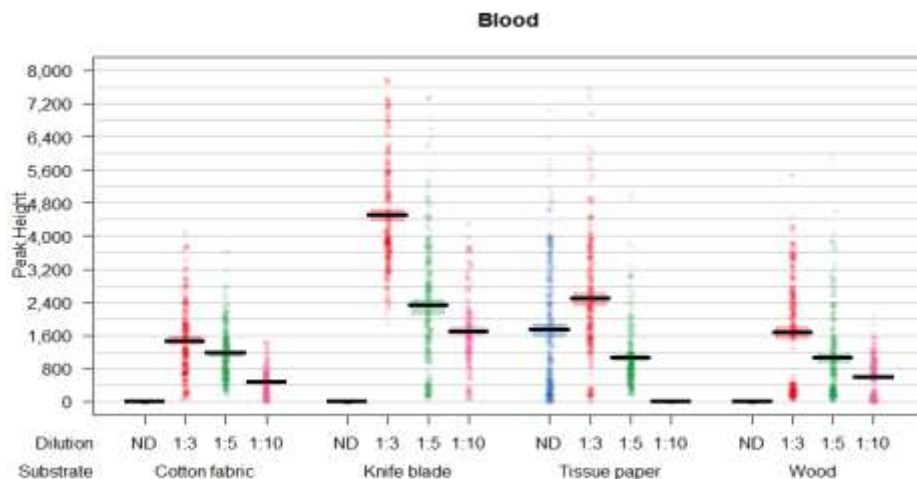
ผลการศึกษาพบว่า การเจือจางสารละลาย Pre-PCR ของคราบเลือดที่สัดส่วน 1:3 ในทุกวัสดุทดลอง สามารถใช้เพิ่มปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ครบทั้ง 32 อัลลีลในทุกตัวอย่าง ดังแสดงในภาพที่ 25 ซึ่งคิดเป็นอัตราความสำเร็จในการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ (Full profile) 100 เปอร์เซ็นต์ รวมถึงการเจือจางสารละลาย Pre-PCR ของคราบเลือดที่สัดส่วนดังกล่าวยังให้ค่าความสูงพีคสูงที่สุดในทุกวัสดุทดลอง ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2527 ± 1744 RFU (Relative fluorescent unit) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากที่สัดส่วนการ

เจือจางดังกล่าวมีปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไดเรคทีวี่อาร์ทีพีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้น จึงทำให้สามารถได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ในทุกวัสดุการทดลอง

(ก)



(ข)



ภาพที่ 25 แสดงผลการศึกษาช่วงความเข้มข้นสารละลายดีเอ็นเอ (Pre-PCR solution) ที่เหมาะสมสำหรับเพิ่มปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากคราบเลือดด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไดเรคทีวี่อาร์ทีเอ็นเอ โดยแสดงจำนวนอัลลีล (ก) และค่าความสูงพีค (ข) ที่ได้รับจากการเจือจางสารละลาย Pre-PCR จากคราบเลือดที่เก็บจากวัสดุเส้นผ้าชนิดผ้าฝ้าย, กระดาษทิชชู, ไม้ และ มีด ซึ่งในแต่ละชุดการทดลองจะทำซ้ำจำนวน 10 ซ้ำ

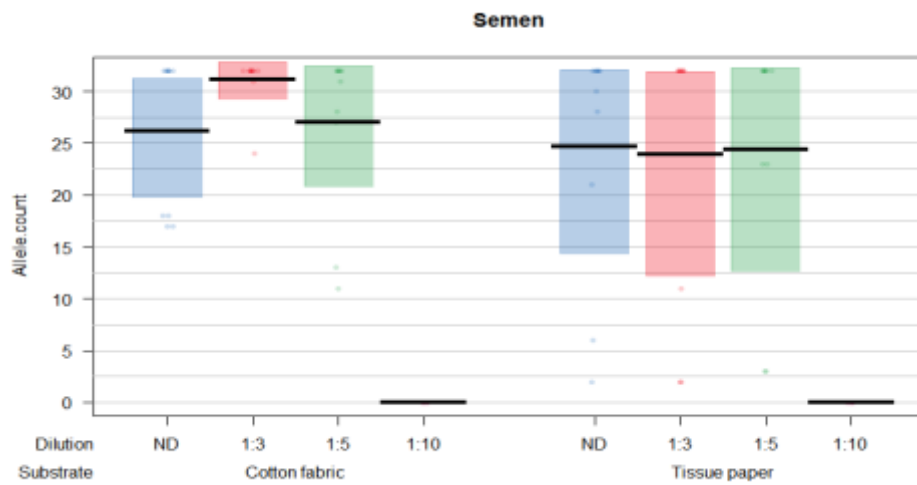
1.3.2 การศึกษาช่วงความเข้มข้นสารละลายดีเอ็นเอ (Pre-PCR solution) ที่เหมาะสมสำหรับเพิ่มปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากคราบอสุจิด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไดเรคทีชีอาร์

การทดลองนี้ทำการเจือจางสารละลาย Pre-PCR ของคราบอสุจิที่สัดส่วนต่างๆ เพื่อหาสัดส่วนการเจือจางที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไดเรคทีชีอาร์ และได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดี โดยสารละลาย Pre-PCR ของคราบอสุจิที่เก็บจากวัสดุเสื้อผ้าชนิดผ้าฝ้าย และกระดาษทิชชู จะทำการเจือจางที่สัดส่วน 1:3, 1:5 และ 1:10 ซึ่งในแต่ละชุดการทดลองจะทำซ้ำจำนวน 10 ซ้ำ เพื่อทดสอบความแม่นยำของวิธีที่พัฒนาขึ้น

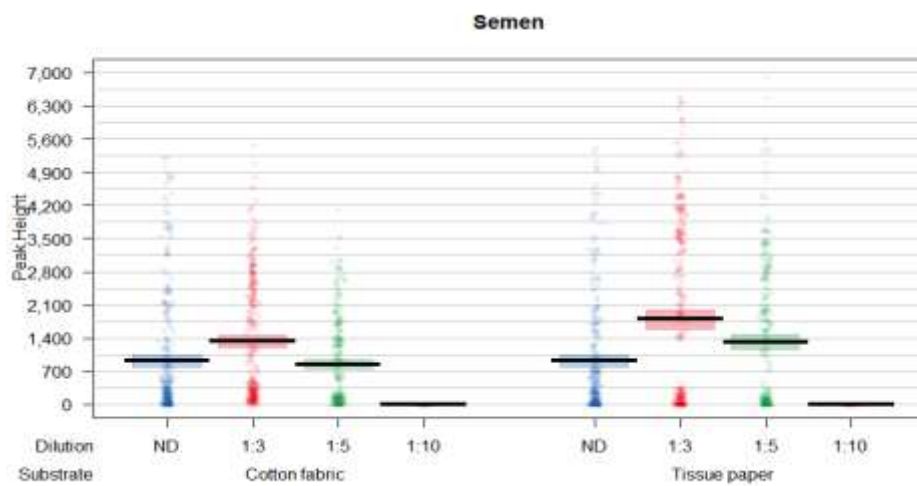
ผลการศึกษาในวัสดุเสื้อผ้าชนิดผ้าฝ้ายพบว่า การเจือจางสารละลาย Pre-PCR ของคราบอสุจิที่สัดส่วน 1:3 สามารถใช้เพิ่มปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ได้ทั้งหมด 9 ตัวอย่าง คิดเป็นอัตราความสำเร็จในการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ 90 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอีก 1 ตัวอย่างที่เหลือนั้นให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีจำนวนอัลลีลเฉลี่ยเท่ากับ 24 อัลลีล ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม High partial profile และการเจือจางสารละลาย Pre-PCR ของคราบอสุจิที่สัดส่วนดังกล่าวยังให้ค่าความสูงพีคสูงที่สุด ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1334 ± 383 RFU ดังแสดงในภาพที่ 26 ทั้งนี้ตัวอย่างอสุจิ 1 ตัวอย่างที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ได้นั้น อาจเนื่องจากส่วนหัวของอสุจิซึ่งมีผนังห่อหุ้มเซลล์ที่มีความแข็งแรง (Tobe *et al.*, 2017) และมีองค์ประกอบของพันธะไดซัลไฟด์ (Disulfide bond) (Saowaros and Panyim, 1979) อาจทำให้ดีเอ็นเอถูกปลดปล่อยออกมาได้ไม่ดีเท่าที่ควร จึงส่งผลต่อคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้รับ

สำหรับในวัสดุกระดาษทิชชูพบว่า การเจือจางสารละลาย Pre-PCR ของคราบอสุจิในทุกสัดส่วนให้คุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ใกล้เคียงกัน ดังแสดงในภาพที่ 26 ซึ่งมีจำนวนอัลลีลเฉลี่ยรวมเท่ากับ 24 อัลลีล และมีค่าความสูงพีคเฉลี่ยเท่ากับ 1796 ± 1925 RFU แต่ทั้งนี้พบว่าค่าความสูงพีคจากการเจือจางสารละลาย Pre-PCR ของคราบอสุจิที่สัดส่วน 1:3 มีค่าสูงสุด ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1808 ± 638 RFU จึงเลือกสัดส่วนการเจือจางสารละลาย Pre-PCR ของคราบอสุจิที่สัดส่วน 1:3 สำหรับวัสดุกระดาษทิชชู และพบว่าที่สัดส่วนดังกล่าวสามารถเพิ่มปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ได้ทั้งหมด 7 ตัวอย่าง คิดเป็นอัตราความสำเร็จในการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ 70 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอีก 3 ตัวอย่างที่เหลือนั้นให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีจำนวนอัลลีลเฉลี่ยรวมเท่ากับ 5 อัลลีล ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม Low partial profile (ดังแสดงในภาพที่ 27) ทั้งนี้อาจเนื่องจากกระดาษทิชชูเป็นพื้นผิวที่มีคุณสมบัติในการดูดซับสูง ทำให้ไม่สามารถเก็บตัวอย่างออกจากวัสดุได้ดีเท่าที่ควร จึงส่งผลต่อคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

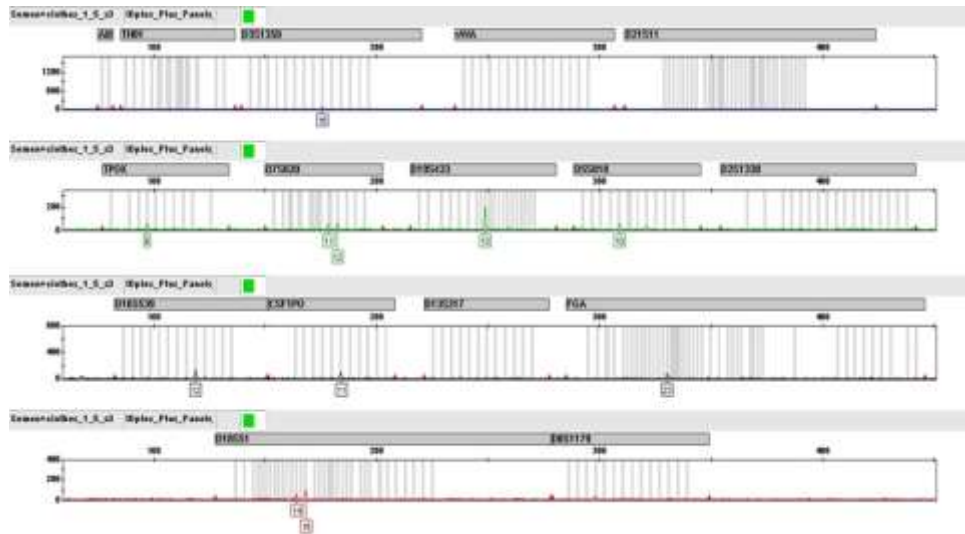
(ก)



(ข)



ภาพที่ 26 แสดงผลการศึกษาช่วงความเข้มข้นสารละลายดีเอ็นเอ (Pre-PCR solution) ที่เหมาะสมสำหรับเพิ่มปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากคราบอสุจิด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ ไตเร็กซ์พีซีอาร์ โดยแสดงจำนวนอัลลีล (ก) และค่าความสูงพีค (ข) ที่ได้รับจากการเจือจางสารละลาย Pre-PCR จากคราบอสุจิที่เก็บจากวัสดุเสื่อผ้าชนิดผ้าฝ้าย และกระดาษทิชชู ซึ่งในแต่ละชุดการทดลองจะทำซ้ำจำนวน 10 ซ้ำ



ภาพที่ 27 แสดงตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากวัตถุพยานชีวภาพประเภทอสุจิแบบ Low partial profile

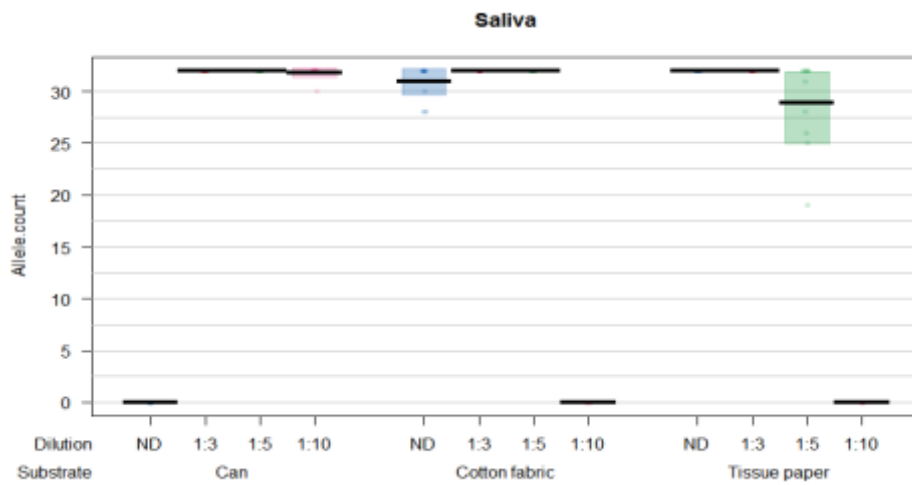
1.3.3 การศึกษาช่วงความเข้มข้นสารละลายดีเอ็นเอ (Pre-PCR solution) ที่เหมาะสมสำหรับเพิ่มปริมาณและจัดทาลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากคราบน้ำลายด้วยเทคนิค มัลติเพล็กซ์ไดเรคทีชีอาร์

การทดลองนี้ทำการเจือจางสารละลาย Pre-PCR ของคราบน้ำลายที่สัดส่วนต่างๆ เพื่อหาสัดส่วนการเจือจางที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค มัลติเพล็กซ์ ไดเรคทีชีอาร์ และได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดี โดยสารละลาย Pre-PCR ของคราบน้ำลายที่เก็บจากวัสดุเสื่อผ้าชนิดผ้าฝ้าย กระดาษทิชชู และกระป๋องอะลูมิเนียม จะทำการเจือจางที่สัดส่วน 1:3, 1:5 และ 1:10 ซึ่งในแต่ละชุดการทดลองจะทำซ้ำจำนวน 10 ซ้ำ เพื่อทดสอบความแม่นยำของวิธีที่พัฒนาขึ้น

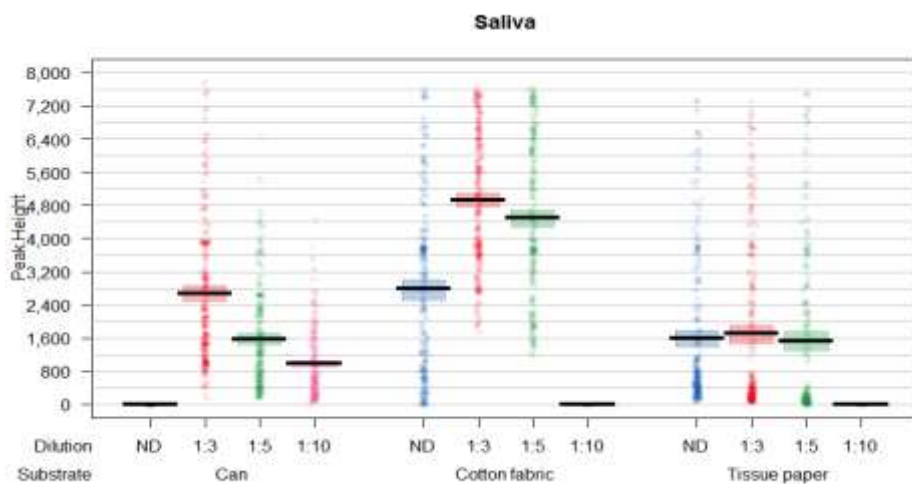
ผลการศึกษาในวัสดุกระป๋องอะลูมิเนียม และเสื่อผ้าชนิดผ้าฝ้ายพบว่า การเจือจางสารละลาย Pre-PCR ของคราบน้ำลายที่สัดส่วน 1:3 และ 1:5 สามารถใช้เพิ่มปริมาณ และจัดทาลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ครบทั้ง 32 อัลลีลในทุกตัวอย่าง ดังแสดงในภาพที่ 28 คิดเป็นอัตราความสำเร็จในการจัดทาลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ทั้งนี้พบว่าค่าความสูงพีคจากการเจือจางสารละลาย Pre-PCR ของคราบน้ำลายที่สัดส่วน 1:3 มีค่าความสูงพีคสูงที่สุด ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2679 ± 1516 RFU สำหรับวัสดุกระป๋องอะลูมิเนียม และ 4921 ± 1286 RFU สำหรับเสื่อผ้าชนิดผ้าฝ้าย ดังนั้นจึงเลือกสัดส่วนดังกล่าวเป็นสัดส่วนการเจือจางสารละลาย Pre-PCR ของคราบน้ำลายที่ดีที่สุดสำหรับทั้ง 2 วัสดุทดลอง

สำหรับวัสดุกระดาษทิชชูพบว่าการเจือจางสารละลาย Pre-PCR ของคราบ น้ำลายที่สัดส่วน 1:3 และไม่เจือจางสารละลาย Pre-PCR สามารถใช้เพิ่มปริมาณและจัดทำลาย พิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ครบทั้ง 32 อัลลิลในทุกตัวอย่างเช่นกัน ดังแสดงในภาพที่ 28 คิดเป็น อัตราความสำเร็จในการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ทั้งนี้พบว่าค่า ความสูงพีคจากการเจือจางสารละลาย Pre-PCR ของคราบน้ำลายที่สัดส่วน 1:3 มีค่าความสูง พีคสูงที่สุด ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1702 ± 608 RFU จึงเลือกสัดส่วนดังกล่าวเป็นสัดส่วนการเจือจาง สารละลาย Pre-PCR ของคราบน้ำลายที่ดีที่สุดสำหรับวัสดุกระดาษทิชชู

(ก)



(ข)



ภาพที่ 28 แสดงผลการศึกษาช่วงความเข้มข้นสารละลายดีเอ็นเอ (Pre-PCR solution) ที่เหมาะสมสำหรับเพิ่มปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากคราบ น้ำลายด้วยเทคนิค มัลติเพล็กซ์ไคเร็กซ์พีซีอาร์ โดยแสดงจำนวนอัลลีล (ก) และค่าความสูงพีค (ข) ที่ได้รับจากการ เจือจางสารละลาย Pre-PCR จากคราบ น้ำลายที่เก็บจากวัสดุกระป๋องอะลูมิเนียม, เสื้อผ้าชนิดผ้า ฝ้าย และกระดาษทิชชู ซึ่งในแต่ละชุดการทดลองจะทำซ้ำจำนวน 10 ซ้ำ

โดยสรุปพบว่างานวิจัยชิ้นนี้สามารถพัฒนากระบวนการเพิ่มปริมาณและจัด ทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากวัตถุพยานชีวภาพประเภทเลือด อสุจิ และน้ำลายได้สำเร็จด้วยเทคนิค มัลติเพล็กซ์ไคเร็กซ์พีซีอาร์ โดยการเจือจางสารละลาย Pre-PCR ของคราบวัตถุพยานชีวภาพ ดังกล่าวที่สัดส่วน 1:3 สามารถใช้เพิ่มปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีในทุก วัสดุทดลอง ซึ่งให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์มากถึง 95.6 เปอร์เซ็นต์

2. การเพิ่มปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากวัตถุพยานทางชีวภาพที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไดเรคทีฟซีอาร์

2.1 การทดสอบวัตถุพยานทางชีวภาพเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาทางเคมี

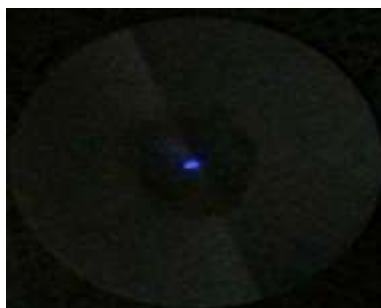
การทดลองนี้ได้ศึกษาผลการทดสอบคราบวัตถุพยานชีวภาพเบื้องต้นเป้าหมายด้วยชุดน้ำยาทางเคมีที่จะใช้ในการศึกษาครั้งนี้ โดยหยดวัตถุพยานทางชีวภาพ 3 ประเภท ซึ่งได้แก่ เลือด อสุจิ และน้ำลายปริมาณ 10 ไมโครลิตร ลงบนวัสดุหลักฐานแต่ละประเภท เช่นเดียวกับการทดลองก่อนหน้า (ตัวอย่างเลือดทดลองในวัสดุเสื้อผ้าชนิดผ้าฝ้าย กระดาษทิชชูไม้ และมีด ตัวอย่างอสุจิตดลองในวัสดุเสื้อผ้าชนิดผ้าฝ้าย และกระดาษทิชชู และตัวอย่างน้ำลายทดลองในวัสดุเสื้อผ้าชนิดผ้าฝ้าย กระดาษทิชชู และกระป๋องอะลูมิเนียม) ทั้งนี้จะทำการทดลองจำนวน 10 ซ้ำ สำหรับวัตถุพยานชีวภาพแต่ละประเภท เพื่อทดสอบความแม่นยำของวิธีที่พัฒนาขึ้น จากนั้นใช้กระดาษกรองเก็บตัวอย่างชีวภาพดังกล่าวออกมาจากวัสดุ แล้วคลี่กระดาษกรองออกจะพบคราบบริเวณตรงกลางของกระดาษกรอง ซึ่งจะถูกนำไปทดสอบเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาทางเคมีที่เกี่ยวข้อง

2.1.1 การทดสอบคราบเลือดเบื้องต้น

ในการทดลองนี้ได้ศึกษาผลการทดสอบคราบเลือดเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาทางเคมีทั้งหมด 4 ชนิด คือ ชุดน้ำยาลูมินอล (Luminol) แคสเทิลเมเยอร์ (Kastle-Meyer) ลิวโคมาลาไคท์กรีน (Leuchomalachite green) และชุดทดสอบแบบแถบ Hemastix® โดยทำการศึกษจำนวน 10 ซ้ำ ในแต่ละชุดน้ำยาทางเคมี ($N = 40$) ผลการทดลองดังแสดง

2.1.1.1 ชุดน้ำยาลูมินอล

จากผลการทดสอบคราบเลือดเบื้องต้นจำนวน 40 ตัวอย่างด้วยชุดน้ำยาลูมินอลพบว่าเมื่อทำการฉีดพ่นชุดน้ำยาลูมินอลลงบนคราบเลือดตรงกลางของกระดาษกรองจะเกิดการเปล่งแสงสีฟ้าอ่อนขึ้นในทุกตัวอย่าง แต่จะค่อยๆ จางหายไปภายหลังการทดสอบ ดังแสดงในภาพที่ 29 ซึ่งการปรากฏแสงสีฟ้าอ่อนนั้นเกิดจากเหล็กในเลือดไปเร่งการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวทำให้สารลูมินอลเกิดการสูญเสียอิเล็กตรอน และอยู่ในสภาวะไม่เสถียร จึงเกิดการคายพลังงานออกมาในรูปของการเปล่งแสงสีฟ้าขึ้นเพื่อกลับสู่สภาวะเสถียรอีกครั้ง (Barni *et al.*, 2007)



ภาพที่ 29 ผลบวกของปฏิกิริยาการทดสอบคราบเลือดเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาลูมินอล (Luminol)

2.1.1.2 ชุดน้ำยาแคสเทิลเมเยอร์

จากผลการทดสอบคราบเลือดเบื้องต้นจำนวน 40 ตัวอย่างด้วยชุดน้ำยาแคสเทิลเมเยอร์ พบว่าเมื่อทำการหยดชุดน้ำยาแคสเทิลเมเยอร์กับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงบนคราบเลือดตรงกลางของกระดาษกรองจะเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นสีชมพูขึ้นในทุกตัวอย่าง ดังแสดงในภาพที่ 30 ซึ่งการปรากฏสีชมพูนั้นเกิดจากเหล็กในเลือดไปเร่งการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวทำให้สารฟีนอล์ฟทาไลน์ ซึ่งอยู่ในรูปของรีดิวซ์ฟอร์มที่ไม่มีสีเกิดการออกซิเดชันหรือสูญเสียอิเล็กตรอน จึงเกิดการเปลี่ยนแปลงสีเป็นสีชมพูขึ้น (Miller, 2014)



ภาพที่ 30 ผลบวกของปฏิกิริยาการทดสอบคราบเลือดเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาแคสเทิลเมเยอร์ (Kastle-Meyer)

2.1.1.3 ชุดน้ำยาลิวโคมาลาโคท์กรีน

จากผลการทดสอบคราบเลือดเบื้องต้นจำนวน 40 ตัวอย่างด้วยชุดน้ำยาลิวโคมาลาโคท์กรีน พบว่าเมื่อทำการหยดน้ำยาลิวโคมาลาโคท์กรีนกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงบนคราบเลือดตรงกลางของกระดาษกรองจะเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นสีฟ้าเขียวขึ้นในทุกตัวอย่าง ดังแสดงในภาพที่ 31 ซึ่งการปรากฏสีฟ้าเขียวนั้นเกิดจากเหล็กในเลือดไปเร่งการเกิด

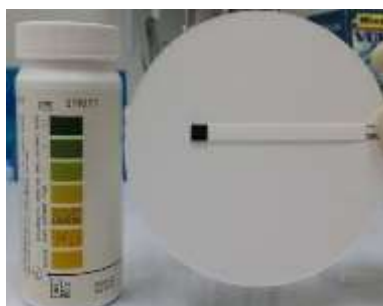
ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวทำให้สารลิวโคมาลาโคท์กรีน ซึ่งอยู่ในรูปของรีดิคัลฟอร์มที่ไม่มีสีเกิดการออกซิเดชันหรือสูญเสียอิเล็กตรอน จึงเกิดการเปลี่ยนแปลงสีเป็นสีฟ้าเขียวขึ้น (National Forensic Science Technology Center)



ภาพที่ 31 ผลบวกของปฏิกิริยาการทดสอบคราบเลือดเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาลิวโคมาลาโคท์กรีน (Leuchomalachite green)

2.1.1.4 ชุดทดสอบแบบแถบ Hemastix®

จากผลการทดสอบคราบเลือดเบื้องต้นจำนวน 40 ตัวอย่างด้วยชุดทดสอบแบบแถบ Hemastix® พบว่าเมื่อนำแถบทดสอบที่เปียกชุ่มด้วยน้ำกลั่นที่สะอาด และปราศจากเชื้อไปสัมผัสคราบเลือดบนพื้นผิวแต่ละวัสดุจะเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นสีเขียวขึ้นในทุกตัวอย่าง ดังแสดงในภาพที่ 32 ซึ่งการปรากฏสีเขียวขึ้นเกิดจากเหล็กในเลือดไปเร่งการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวทำให้สาร 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine ในชุดทดสอบเกิดการออกซิเดชันหรือสูญเสียอิเล็กตรอน จึงเกิดการเปลี่ยนแปลงสีเป็นสีเขียวขึ้น (National Forensic Science technology Center)



ภาพที่ 32 ผลบวกของปฏิกิริยาการทดสอบคราบเลือดเบื้องต้นด้วยชุดทดสอบแบบแถบ Hemastix®

2.1.2 การทดสอบคราบอสุจิเบื้องต้น

ในการทดลองนี้ได้ศึกษาผลการทดสอบคราบอสุจิเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาทางเคมี คือ ชุดน้ำยาแอซิดฟอสฟาเตส (Acid phosphatase) โดยทำการศึกษาจำนวน 10 ซ้ำ ในวัสดุเส้นผ่าชนิตผ่าฝ้าย และกระดาษทิชชู ($N = 20$) จากผลการทดสอบคราบอสุจิเบื้องต้นจำนวน 20 ตัวอย่างด้วยชุดน้ำยาแอซิดฟอสฟาเตส พบว่าเมื่อทำการหยดชุดน้ำยาทดสอบลงบนคราบอสุจิตรงกลางของกระดาษกรอง จะเกิดการเปลี่ยนแปลงสีเป็นสีม่วงขึ้นภายใน 1 นาทีในทุกตัวอย่าง ดังแสดงในภาพที่ 33 ซึ่งการปรากฏสีม่วงนั้นเกิดจากเอนไซม์เซมิโนลแอซิดฟอสฟาเตสในน้ำอสุจิไปเร่งการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์กับสารฟอสเฟตอินทรีย์ (ฟอสเฟตอัลฟาแนปทิล) ทำให้เกิดสารพวคีนอล ซึ่งสารพวคีนอลจะทำปฏิกิริยาต่อกับสารที่ทำให้เกิดสีพวค Diazonium salt chromogen (เบนทามีนฟาสบลู) ภายในชุดน้ำยา จึงเกิดการเปลี่ยนแปลงสีเป็นสีม่วงขึ้น (Lewis *et al.*, 2013)



ภาพที่ 33 ผลบวกของปฏิกิริยาการทดสอบคราบอสุจิเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาแอซิดฟอสฟาเตส (Acid phosphatase)

2.1.3 การทดสอบคราบน้ำลายเบื้องต้น

ในการทดลองนี้ได้ศึกษาผลการทดสอบคราบน้ำลายเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาทางเคมี คือ ชุดทดสอบ Phadebas paper โดยทำการศึกษาจำนวน 10 ซ้ำ ในวัสดุเส้นผ่าชนิตผ่าฝ้าย กระดาษทิชชู และกระป๋องอะลูมิเนียม ($N = 30$) จากผลการทดสอบคราบน้ำลายเบื้องต้นจำนวน 30 ตัวอย่างด้วยชุดทดสอบ Phadebas paper พบว่าเมื่อนำชุดทดสอบ Phadebas paper วางลงบนคราบน้ำลายตรงกลางของกระดาษกรองแล้วทำให้เปียกชุ่มด้วยน้ำกลั่นที่สะอาด และปราศจากเชื้อ จะเกิดการแพร่ของเม็ดสีและเกิดกลุ่มสีฟ้าขึ้นบริเวณที่มีคราบน้ำลาย ในทุกตัวอย่าง ดังแสดงในภาพที่ 34 ซึ่งการปรากฏกลุ่มสีฟ้านั้นเกิดจากเอนไซม์อะไมเลสในน้ำลายไปย่อยโมเลกุลของแป้งที่ถูกตัดแปลงโมเลกุลให้ติดฉลากสีฟ้าไว้ในชุดทดสอบ เมื่อปรากฏน้ำลายจึงเกิดการย่อยแป้งและทำให้เกิดกลุ่มสีฟ้าขึ้น (Hedman *et al.*, 2008)



ภาพที่ 34 ผลบวกของปฏิกิริยาการทดสอบคราบน้ำตาลเบื้องต้นด้วยชุดทดสอบ Phadebas paper

2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากวัตถุพยานทางชีวภาพที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไคเรคพีซีอาร์ และเจลอิเล็กโทรโฟริซิส

การทดลองนี้ได้ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากวัตถุพยานชีวภาพ 3 ประเภท ได้แก่ เลือด อสุจิ และน้ำลายที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาทางเคมี โดยใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์ไคเรคพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้น ซึ่งทำการทดลองโดยหยดวัตถุพยานชีวภาพเป้าหมาย ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ลงบนวัสดุทดลองแต่ละประเภท จากนั้นวางทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนใช้กระดาษกรองเก็บตัวอย่างวัตถุพยานชีวภาพออกมาจากวัสดุ แล้วคลี่กระดาษกรองออก จะพบคราบบริเวณตรงกลางของกระดาษกรอง ซึ่งจะนำไปทดสอบคราบวัตถุพยานชีวภาพเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาทางเคมีที่เกี่ยวข้อง ทั้งนี้ตัวอย่างเลือดทำการทดสอบเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาลูมินอล ชุดน้ำยาแคสเทิลเมเยอร์ ชุดน้ำยาลิวโคมาลาโคไนกรีน และชุดทดสอบแบบแถบ Hemastix® ตัวอย่างอสุจิทดสอบเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาแอซิดฟอสฟาเตส และตัวอย่างน้ำลายทดสอบเบื้องต้นด้วยชุดทดสอบ Phadebas paper จากนั้นนำคราบวัตถุพยานชีวภาพที่มีการเปลี่ยนแปลงสีไปเตรียมสารละลาย Pre-PCR และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไคเรคพีซีอาร์ที่อุณหภูมิ annealing 62 องศาเซลเซียส ดังที่อธิบายในหัวข้อที่ 1.1 ทั้งนี้จะทำการทดลองจำนวน 10 ซ้ำ ในแต่ละชุดการทดลอง เพื่อทดสอบความแม่นยำของวิธีที่พัฒนาขึ้น

2.2.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากคราบเลือดที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้น

2.2.1.1 ชุดน้ำยาลูมินอล

ผลการศึกษาพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดที่เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นสีฟ้าอ่อนเมื่อทดสอบเบื้องต้นกับชุดน้ำยาลูมินอลด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไคเรคพีซีอาร์ได้สำเร็จในทุกวัสดุทดลอง และสามารถให้แถบดีเอ็นเอที่คาดหวังซึ่งมีขนาดประมาณ 115–147 และ 322–444 คู่เบส ครบทั้ง 10 ตัวอย่าง ดังแสดงในภาพที่ 35 คิดเป็นความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดที่ผ่านการทดสอบด้วยชุดน้ำยาลูมินอล 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนชุดควบคุมลบที่ไม่มีการเติมดีเอ็นเอลงไป ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ แสดงให้เห็นว่าไม่มีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอที่ไม่เกี่ยวข้องในชุดน้ำยาที่ใช้ทดสอบ และระหว่างดำเนินการทดลอง ดังนั้นผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ากระบวนการที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ได้กับตัวอย่างชีวภาพประเภทเลือดที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาลูมินอลได้จริง

2.2.1.2 ชุดน้ำยาแคสเทิลเมเยอร์

ผลการศึกษาพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีเป็นสีชมพูเมื่อทดสอบเบื้องต้นกับชุดน้ำยาแคสเทิลเมเยอร์ด้วยเทคนิค มัลติเพล็กซ์โตเร็กซ์ไออาร์ได้สำเร็จในบางตัวอย่าง และบางวัสดุทดลอง ดังแสดงในภาพที่ 35 ทั้งนี้พบว่าในวัสดุเสื้อผ้าชนิดผ้าฝ้าย (ภาพที่ 36 ก ช่องที่ 2-5, 7, 9 และ 11) สามารถให้แถบ ดีเอ็นเอที่คาดหวังซึ่งมีขนาดประมาณ 115-147 และ 322-444 คู่เบส ได้ทั้งหมด 7 ตัวอย่าง คิด เป็นความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยชุด น้ำยาแคสเทิลเมเยอร์ 70 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่วัสดุกระดาษทิชชู (ภาพที่ 36 ข ช่อง 2-4, 8, 9 และ 11) และมีด (ภาพที่ 36 ง ช่องที่ 2-6 และ 9) สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่คาดหวังซึ่งมีขนาด ประมาณ 115-147 และ 322-444 คู่เบส ได้ทั้งหมด 6 ตัวอย่าง คิดเป็นความสำเร็จในการเพิ่ม ปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาแคสเทิลเมเยอร์ 60 เปอร์เซ็นต์ และพบแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังขนาดเล็กซึ่งมีขนาดประมาณ 115-147 คู่เบส ในวัสดุ เสื้อผ้าชนิดผ้าฝ้าย (ภาพที่ 36 ก ช่องที่ 6, 8 และ 10) วัสดุกระดาษทิชชู (ภาพที่ 36 ข ช่องที่ 10) วัสดุไม้ (ภาพที่ 36 ค ช่องที่ 3-5, 7-9 และ 11) และวัสดุมีด (ภาพที่ 36 ง ช่องที่ 7-8 และ 11) รวมถึงพบแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังขนาดใหญ่ซึ่งมีขนาดประมาณ 322-444 คู่เบส (ภาพที่ 36 ข ช่องที่ 7) ส่วนชุดควบคุมลบที่ไม่มีการเติมดีเอ็นเอลงไป ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ แสดงให้เห็น ว่าไม่มีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอที่ไม่เกี่ยวข้องในชุดน้ำยาที่ใช้ทดสอบ และระหว่างดำเนินการ ทดลอง ดังนั้นผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ากระบวนการที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ได้กับตัวอย่าง ชีวภาพประเภทเลือดที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาแคสเทิลเมเยอร์ได้จริง

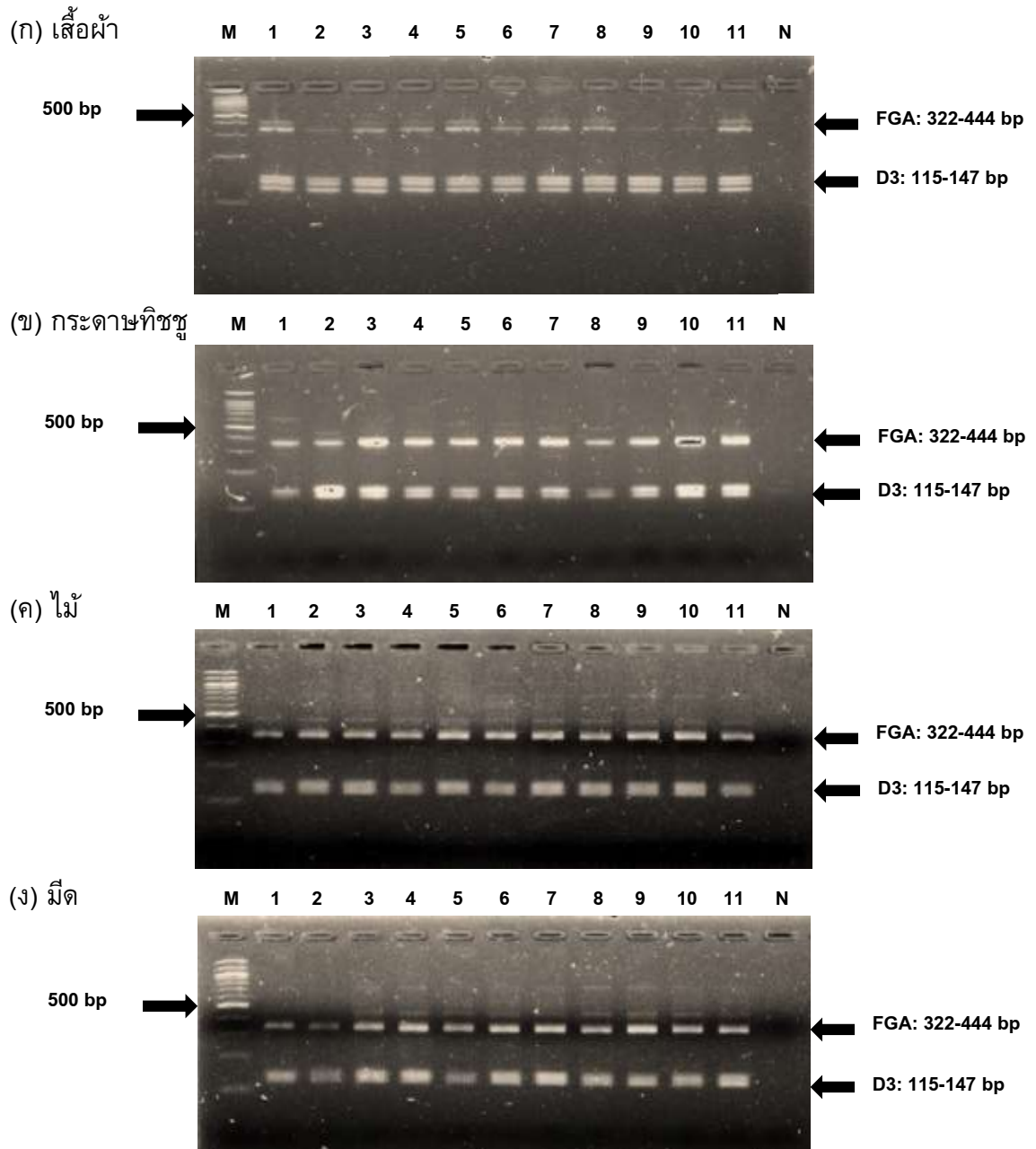
2.2.1.3 ชุดน้ำยาลิวโคมาลาไคท์กรีน

ผลการศึกษาพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดที่เกิดการ เปลี่ยนแปลงสีเป็นสีฟ้าเขียวเมื่อทดสอบเบื้องต้นกับชุดน้ำยาลิวโคมาลาไคท์กรีนด้วยเทคนิค มัลติเพล็กซ์โตเร็กซ์ไออาร์ได้สำเร็จในบางตัวอย่าง และบางวัสดุทดลอง ดังแสดงในภาพที่ 37 ทั้งนี้พบว่าในวัสดุเสื้อผ้าชนิดผ้าฝ้าย (ภาพที่ 37 ก) กระดาษทิชชู (ภาพที่ 37 ข) และมีด (ภาพที่ 37 ง) สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่คาดหวังซึ่งมีขนาดประมาณ 115-147 และ 322-444 คู่เบส ครบทั้ง 10 ตัวอย่าง คิดเป็นความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดที่ผ่านการ ทดสอบเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาลิวโคมาลาไคท์กรีน 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่วัสดุไม้สามารถให้ แถบดีเอ็นเอที่คาดหวังซึ่งมีขนาดประมาณ 115-147 และ 322-444 คู่เบส ได้ทั้งหมด 9 ตัวอย่าง คิดเป็นความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดที่ผ่านการทดสอบ เบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาลิวโคมาลาไคท์กรีน 90 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอีก 1 ตัวอย่างที่เหลือ (ภาพที่ 37

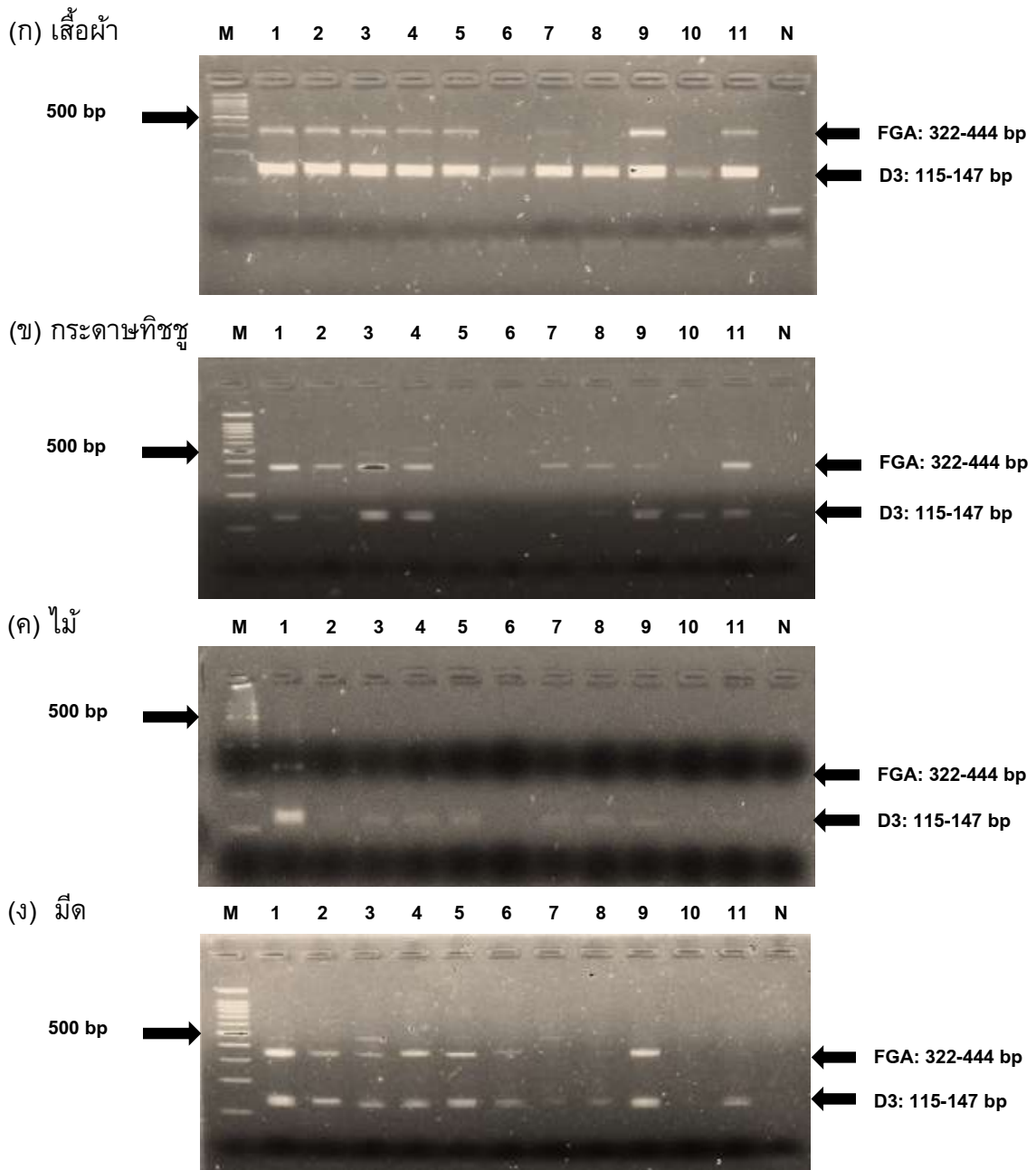
ค ช่องที่ 5) พบแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังขนาดเล็กซึ่งมีขนาดประมาณ 115–147 คู่เบสเท่านั้น ส่วนชุดควบคุมลบที่ไม่มีการเติมดีเอ็นเอลงไป ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ แสดงให้เห็นว่าไม่มีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอที่ไม่เกี่ยวข้องในชุดน้ำยาที่ใช้ทดสอบ และระหว่างดำเนินการทดลอง ดังนั้นผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ากระบวนการที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ได้กับตัวอย่างชีวภาพประเภทเลือดที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาลิวโคมาลาไคท์กรีนได้จริง

2.2.1.4 ชุดทดสอบแบบแถบ Hemastix®

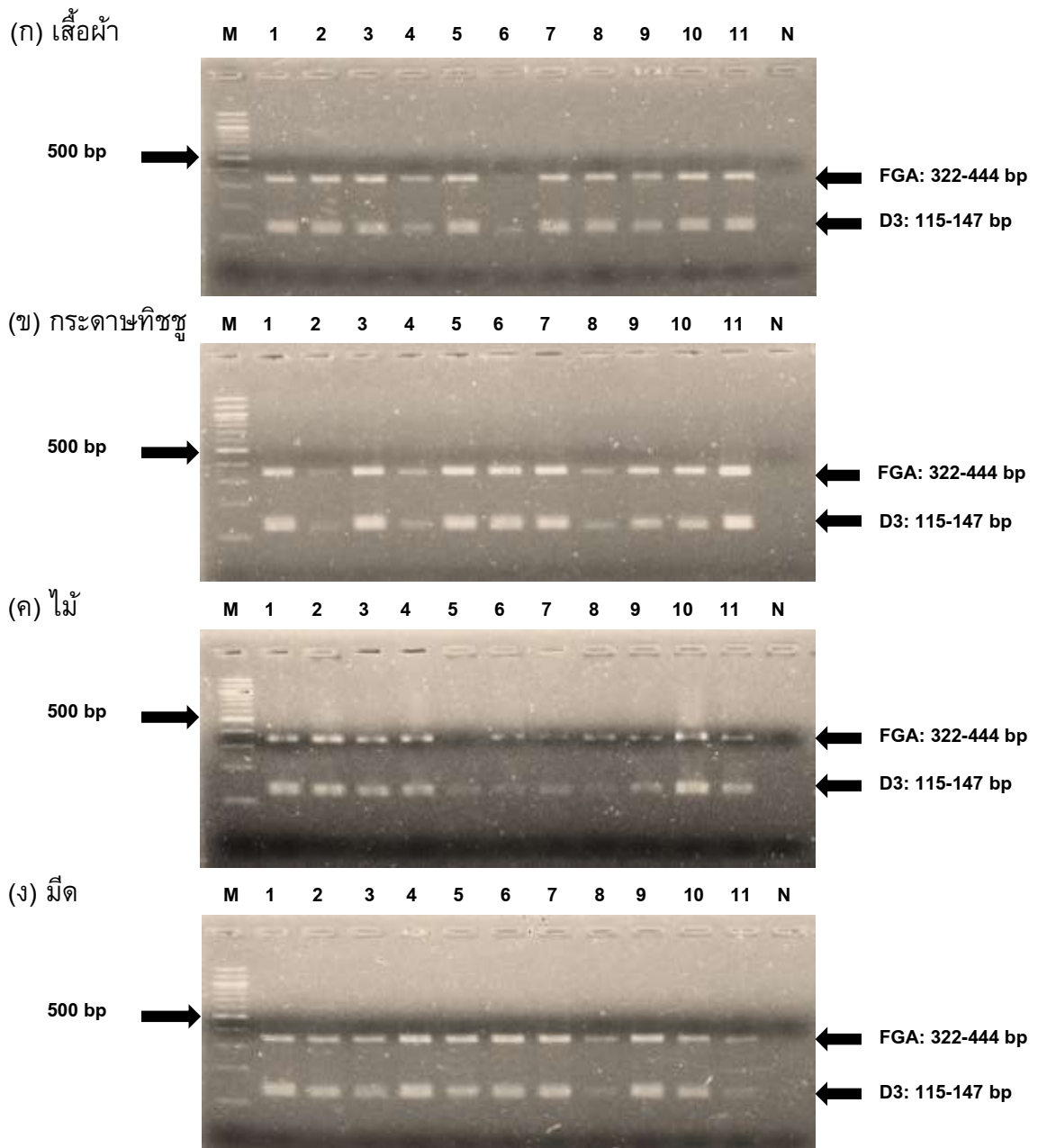
ผลการศึกษาพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีเป็นสีเขียวเมื่อทดสอบเบื้องต้นกับชุดทดสอบแบบแถบ Hemastix® ด้วยเทคนิค มัลติเพล็กซ์โตเร็กซ์อาร์ได้สำเร็จในบางตัวอย่าง และบางวัสดุทดลอง ดังแสดงในภาพที่ 38 ทั้งนี้พบว่าในวัสดุเสื้อผ้าชนิดผ้าฝ้าย (ภาพที่ 38 ก) กระดาษทิชชู (ภาพที่ 38 ข) และไม้ (ภาพที่ 38 ค) สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่คาดหวังซึ่งมีขนาดประมาณ 115–147 และ 322–444 คู่เบสครบทั้ง 10 ตัวอย่าง คิดเป็นความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยชุดทดสอบแบบแถบ Hemastix® 100 เปอร์เซนต์ ในขณะที่วัสดุไม้สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่คาดหวังซึ่งมีขนาดประมาณ 115–147 และ 322–444 คู่เบสได้ทั้งหมด 8 ตัวอย่าง คิดเป็นความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยชุดทดสอบแบบแถบ Hemastix® 80 เปอร์เซนต์ ส่วนอีก 2 ตัวอย่างที่เหลือ (ภาพที่ 38 ง ช่องที่ 3 และ 9) พบแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังขนาดเล็กซึ่งมีขนาดประมาณ 115–147 คู่เบสเท่านั้น ส่วนชุดควบคุมลบที่ไม่มีการเติมดีเอ็นเอลงไป ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ แสดงให้เห็นว่าไม่มีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอที่ไม่เกี่ยวข้องในชุดน้ำยาที่ใช้ทดสอบ และระหว่างดำเนินการทดลอง ดังนั้นผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ากระบวนการที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ได้กับตัวอย่างชีวภาพประเภทเลือดที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยชุดทดสอบแบบแถบ Hemastix® ได้จริง



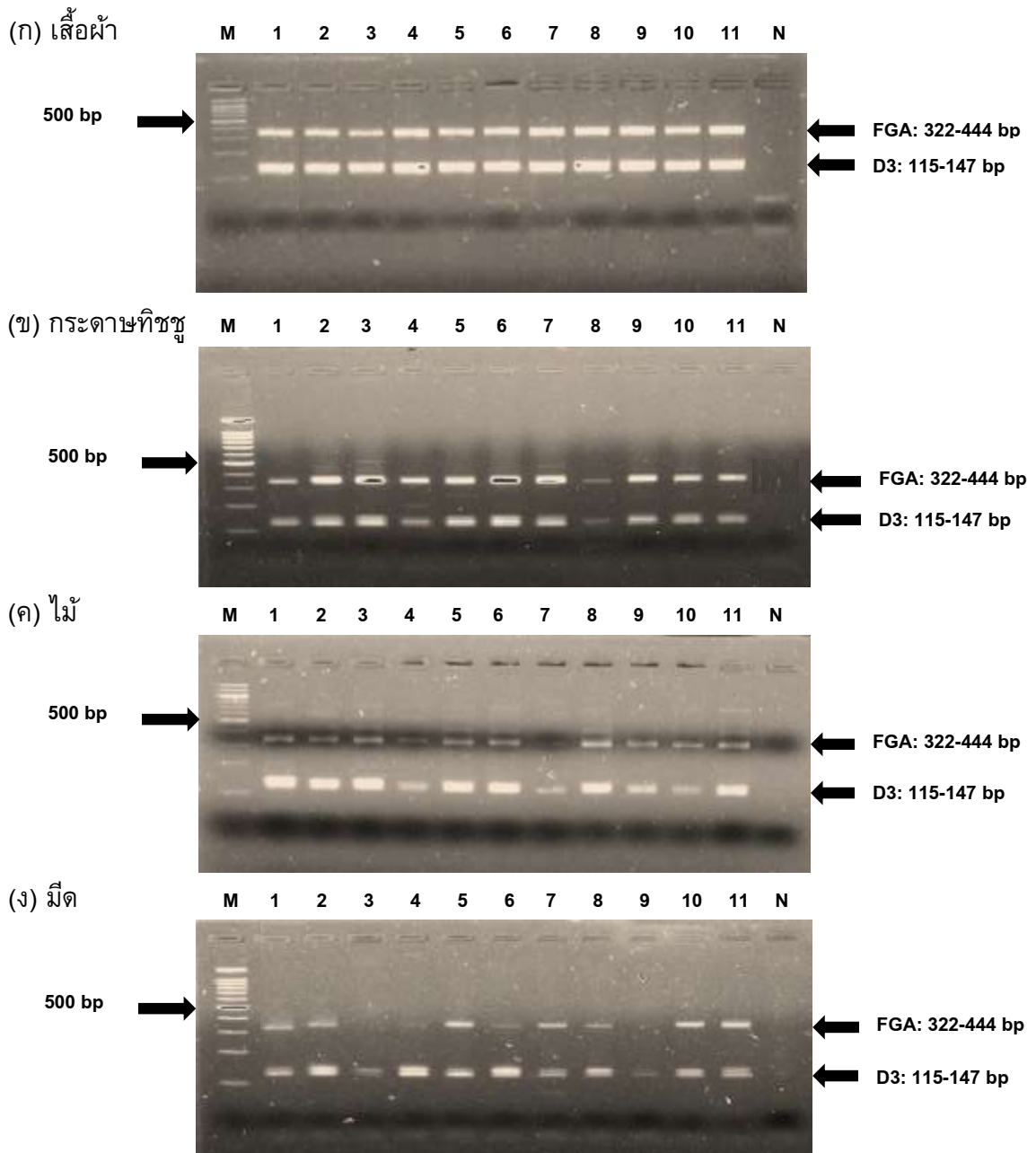
ภาพที่ 35 2% เจลอะกาโรส แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากตัวอย่างเลือดที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาลูมินอล (Luminol) และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไตเร็กซ์พีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้น ซึ่งภาพ ก คือ วัสดุเสื้อผ้าชนิดผ้าฝ้าย, ข คือ วัสดุกระดาษทิชชู, ค คือ วัสดุไม้ และ ง คือ วัสดุมีด ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Marker), ช่อง 1 คือ ชุดควบคุมผลบวก (ดีเอ็นเอจากเลือดมนุษย์), ช่อง 2-11 คือ ตัวอย่างเลือดมนุษย์ และช่อง N คือ ชุดควบคุมผลลบ



ภาพที่ 36 2% เจลอะกาโรส แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากตัวอย่างเลือดที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาแคสเทิลเมเยอร์ (Kastle-Meyer) และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไดเรคทีฟพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้น ซึ่งภาพ ก คือ วัสดุเสื้อผ้าชนิดผ้าฝ้าย, ข คือ วัสดุกระดาษทิชชู, ค คือ วัสดุไม้ และ ง คือ วัสดุมีด ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Marker), ช่อง 1 คือ ชุดควบคุมผลบวก (ดีเอ็นเอจากเลือดมนุษย์), ช่อง 2-11 คือ ตัวอย่างเลือดมนุษย์ และช่อง N คือ ชุดควบคุมผลลบ



ภาพที่ 37 2% เจลอะกาโรส แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากตัวอย่างเลือดที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาลิวโคมาลาโคทกรีน (Leuchomalachite green) และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไคเรคพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้น ซึ่งภาพ ก คือ วัสดุเสื้อผ้าชนิดผ้าฝ้าย, ข คือ วัสดุกระดาษทิชชู, ค คือ วัสดุไม้ และ ง คือ วัสดุมีด ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Marker), ช่อง 1 คือ ชุดควบคุมผลบวก (ดีเอ็นเอจากเลือดมนุษย์), ช่อง 2-11 คือ ตัวอย่างเลือดมนุษย์ และช่อง N คือ ชุดควบคุมผลลบ



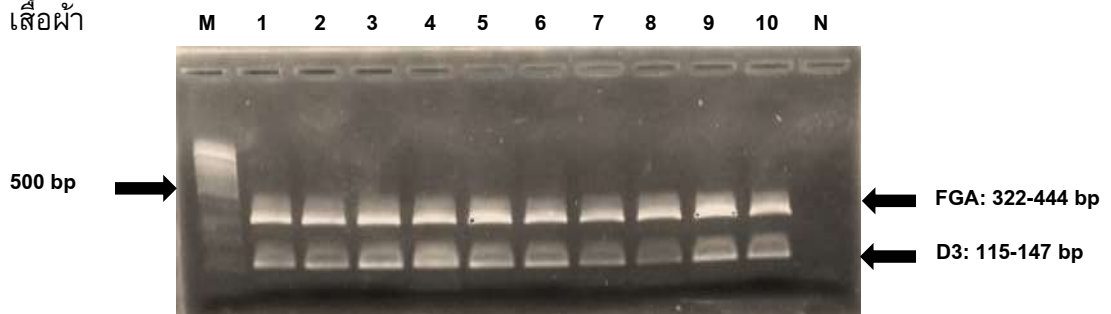
ภาพที่ 38 2% เจลอะกาโรส แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากตัวอย่างเลือดที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยชุดทดสอบแบบแถบ Hemastix® และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไโตเร็กซ์พีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้น ซึ่งภาพ ก คือ วัสดุเสื้อผ้าชนิดผ้าฝ้าย, ข คือ วัสดุกระดาษทิชชู, ค คือ วัสดุไม้ และ ง คือ วัสดุมีด ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Marker), ช่อง 1 คือ ชุดควบคุมผลบวก (ดีเอ็นเอจากเลือดมนุษย์), ช่อง 2-11 คือ ตัวอย่างเลือดมนุษย์ และช่อง N คือ ชุดควบคุมผลลบ

2.2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากคราบอสุจิที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้น

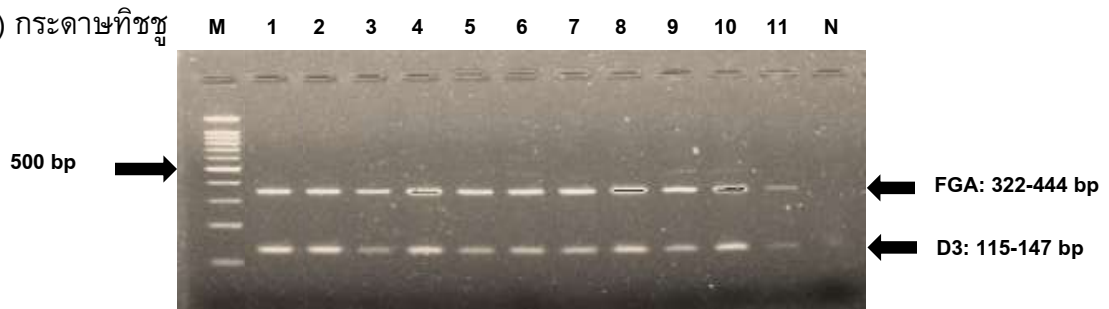
2.2.2.1 ชุดน้ำยาแอซิดฟอสฟาเตส

ผลการศึกษาพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างอสุจิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีเป็นสีม่วงเมื่อทดสอบเบื้องต้นกับชุดน้ำยาแอซิดฟอสฟาเตสด้วยเทคนิค มัลติเพล็กซ์ดีเรคพีซีอาร์ได้สำเร็จในทุกวัสดุทดลอง และสามารถให้แถบดีเอ็นเอที่คาดหวังซึ่งมีขนาดประมาณ 115–147 และ 322–444 คู่เบส ครบทั้ง 10 ตัวอย่าง ดังแสดงในภาพที่ 39 คิดเป็นความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างอสุจิที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาแอซิดฟอสฟาเตส 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนชุดควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอเองไป ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ แสดงให้เห็นว่าไม่มีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอที่ไม่เกี่ยวข้องในชุดน้ำยาที่ใช้ทดสอบ และระหว่างดำเนินการทดลอง ดังนั้นผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ากระบวนการที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ได้กับตัวอย่างชีวภาพประเภทอสุจิที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาแอซิดฟอสฟาเตสได้จริง

(ก) เสื้อผ้า



(ข) กระดาษทิชชู

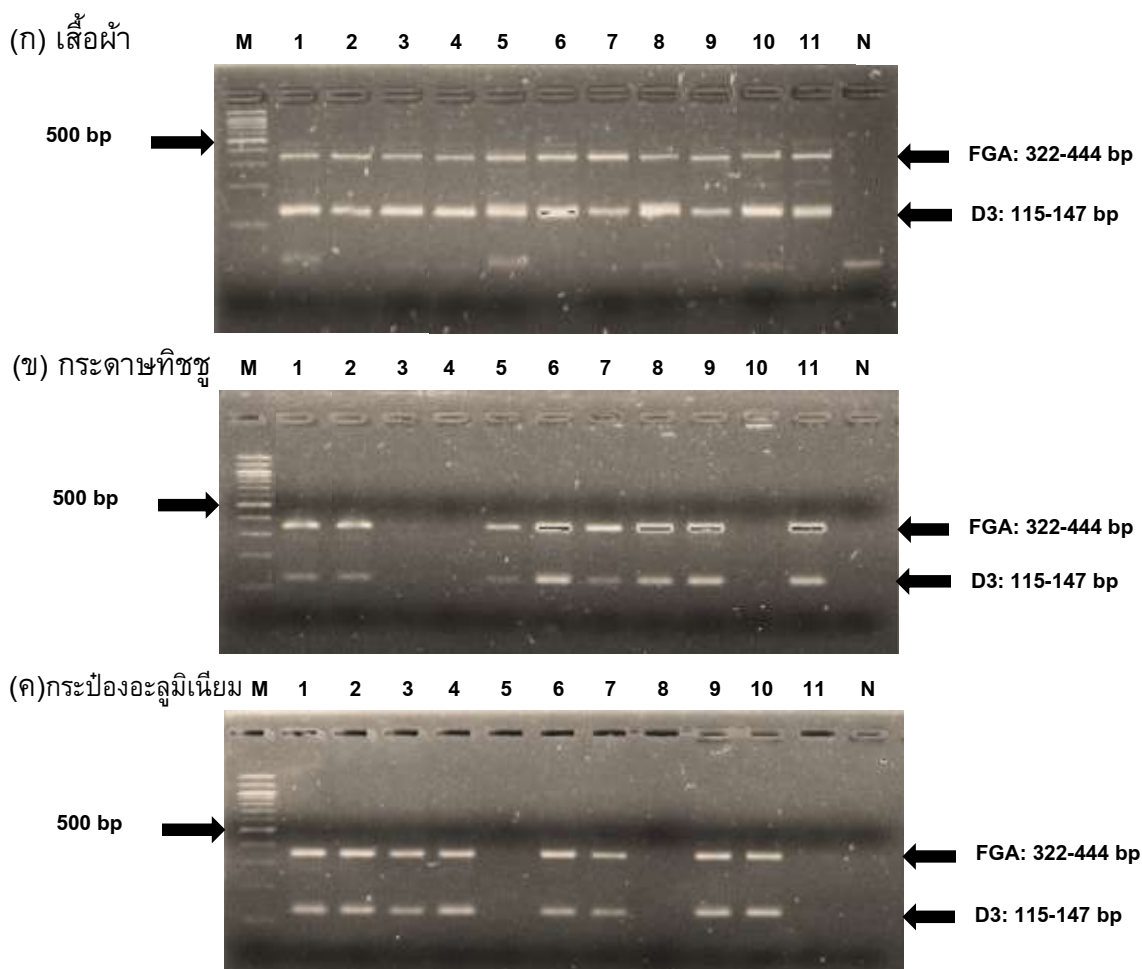


ภาพที่ 39 2% เจลอะกาโรส แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากตัวอย่างอสุจิที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาแอซิดฟอสฟาเตส (Acid phosphatase) และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค มัลติเพล็กซ์ดีเรคพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้น ซึ่งภาพ ก คือ วัสดุเสื้อผ้าชนิดผ้าฝ้าย และ ข คือ วัสดุกระดาษทิชชู ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Marker), ช่อง 1 คือ ชุดควบคุมผลบวก (ดีเอ็นเอจากเลือดมนุษย์), ช่อง 2–11 คือ ตัวอย่างอสุจิมนุษย์ และช่อง N คือ ชุดควบคุมผลลบ

2.2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากคราบน้ำลายที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้น

2.2.3.1 ชุดทดสอบ Phadebas paper

ผลการศึกษาพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างน้ำลายที่เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นกลุ่มสีฟ้าเมื่อทดสอบเบื้องต้นกับชุดทดสอบ Phadebas paper ด้วยเทคนิค มัลติเพล็กซ์ไคเรคพีซีอาร์ได้สำเร็จในบางตัวอย่าง และบางวัสดุทดลอง ดังแสดงในภาพที่ 40 ทั้งนี้พบว่าในวัสดุเสื้อผ้าชนิดผ้าฝ้าย (ภาพที่ 40 ก) สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่คาดหวังซึ่งมีขนาดประมาณ 115–147 และ 322–444 คู่เบส ครบทั้ง 10 ตัวอย่าง คิดเป็นความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างน้ำลายที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยชุดทดสอบ Phadebas paper 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่วัสดุกระดาษทิชชู และกระป๋องอะลูมิเนียม สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่คาดหวังซึ่งมีขนาดประมาณ 115–147 และ 322–444 คู่เบส ได้ทั้งหมด 7 ตัวอย่าง คิดเป็นความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างน้ำลายที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยชุดทดสอบ Phadebas paper 70 เปอร์เซ็นต์ ส่วนชุดควบคุมที่ไม่มี การเติมดีเอ็นเอลงไป ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ แสดงให้เห็นว่าไม่มีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอที่ไม่เกี่ยวข้องในชุดน้ำยาที่ใช้ทดสอบ และระหว่างดำเนินการทดลอง ดังนั้นผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ากระบวนการที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ได้กับตัวอย่างชีวภาพประเภทน้ำลายที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยชุดทดสอบ Phadebas paper ได้จริง



ภาพที่ 40 2% เจลอะกาโรส แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากตัวอย่างน้ำลายที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยชุดทดสอบ Phadebas paper และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไคเร็กซ์พีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้น ซึ่งภาพ ก คือ วัสดุเสื้อผ้าชนิดผ้าฝ้าย, ข คือ วัสดุกระดาษทิชชู และ ค คือ วัสดุครอบอะลูมิเนียม ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Marker), ช่อง 1 คือ ชุดควบคุมผลบวก (ดีเอ็นเอจากเลือดมนุษย์), ช่อง 2-11 คือ ตัวอย่างน้ำลายมนุษย์ และช่อง N คือ ชุดควบคุมผลลบ

โดยสรุปพบว่างานวิจัยชิ้นนี้สามารถพัฒนากระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากวัตถุพยานทางชีวภาพทั้ง 3 ประเภท (เลือด อสุจิ และน้ำลาย) ที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาทางเคมีต่างๆ ได้สำเร็จด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไคเร็กซ์พีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้น ซึ่งจะเห็นได้ว่าชุดน้ำยาทดสอบเบื้องต้นและวัสดุหลักฐานส่งผลกระทบต่อการใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างชีวภาพทั้ง 3 ประเภทแตกต่างกัน โดยชุดน้ำยาลูมิโนลและชุดน้ำยาแอซิดฟอสฟาเตสพบว่าไม่ส่งผลกระทบต่อการใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างวัตถุพยานชีวภาพที่เกี่ยวข้องด้วยเทคนิคที่พัฒนาขึ้นในทุกวัสดุทดลอง ซึ่งมีอัตราความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 100

เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้อาจเนื่องจากชุดน้ำยาลูมินอลมีการเตรียมสารเคมีในชุดน้ำยาและวิธีการทดสอบเบื้องต้นที่แตกต่างจากชุดน้ำยาอื่น โดยจะผสมสารลูมินอลกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ก่อนนำไปทดสอบเบื้องต้นโดยการสเปรย์ลงบนคราบตัวอย่างชีวภาพบริเวณตรงกลางของกระดาษกรอง ซึ่งจากรายงานก่อนหน้าพบว่าสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถทำให้ดีเอ็นเอเสียหายได้ (Driessens *et al.*, 2009) แต่ทั้งนี้การทดสอบเบื้องต้นของชุดน้ำยาลูมินอลด้วยการสเปรย์นั้นปริมาณสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่สัมผัสกับตัวอย่างอาจมีปริมาณน้อยกว่าชุดน้ำยาอื่นที่มีการหยดสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงบนตัวอย่างโดยตรง จึงทำให้ชุดน้ำยาลูมินอลไม่ส่งผลกระทบต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด และสำหรับชุดน้ำยาแอสซิฟอสฟาเตสไม่มีองค์ประกอบของสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในชุดน้ำยา ทำให้ไม่ส่งผลกระทบต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างอสุจิ ส่วนชุดน้ำยาลิวโคมาลาไคท์กรีน และชุดทดสอบแบบแถบ Hemastix® พบว่าส่งผลกระทบต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดบ้างเล็กน้อย โดยมีอัตราความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 98 เปอร์เซ็นต์ และ 95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ชุดน้ำยาแคสเทิลเมเยอร์ส่งผลกระทบต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดมากที่สุด โดยมีอัตราความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 48 เปอร์เซ็นต์ อาจเนื่องจากชุดน้ำยาแคสเทิลเมเยอร์มีค่า pH เท่ากับ 9 ซึ่งเป็นค่า pH ที่ทำให้ดีเอ็นเอเสียหายได้เช่นกัน โดยเกิดการไฮโดรไลซิสของพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ (Phosphodiester bond) ในโครงสร้างดีเอ็นเอ (Ageno *et al.*, 1969) ทำให้ส่งผลกระทบต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างมากที่สุด และสำหรับชุดทดสอบ Phadebas paper พบว่าส่งผลกระทบต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างน้ำลายบ้างเล็กน้อย โดยมีอัตราความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 80 เปอร์เซ็นต์ ผลการศึกษาโดยสรุปดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 สรุปผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากวัตถุพยานชีวภาพทั้ง 3 ประเภท ได้แก่ เลือด อสุจิ และน้ำลาย ที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไดเรคพีซีอาร์ และเทคนิค เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ซึ่งในแต่ละชุดการทดลองจะทำซ้ำจำนวน 10 ซ้ำ

ตัวอย่าง	การทดสอบเบื้องต้น	วัสดุ	ผลผลิตพีซีอาร์ (Gel electrophoresis) (N = 10)			
			ตำแหน่ง D3&FGA	ตำแหน่ง D3	ตำแหน่ง FGA	ไม่ปรากฏ
เลือด	Luminol	เส้นผ่าชนิดผ้าฝ้าย	10	-	-	-
		กระดาษทิชชู	10	-	-	-
		ไม้	10	-	-	-
		มีด	10	-	-	-
	Kastle-Meyer	เส้นผ่าชนิดผ้าฝ้าย	7	3	-	-
		กระดาษทิชชู	6	1	1	2
		ไม้	-	7	-	3
		มีด	6	3	-	1
	Leucomalachite Green	เส้นผ่าชนิดผ้าฝ้าย	10	-	-	-
		กระดาษทิชชู	10	-	-	-
		ไม้	9	1	-	-
		มีด	10	-	-	-
	Hemastix®	เส้นผ่าชนิดผ้าฝ้าย	10	-	-	-
		กระดาษทิชชู	10	-	-	-
		ไม้	10	-	-	-
		มีด	8	2	-	-
อสุจิ	Acid phosphatase	เส้นผ่าชนิดผ้าฝ้าย	10	-	-	-
		กระดาษทิชชู	10	-	-	-
น้ำลาย	Phadebas paper	เส้นผ่าชนิดผ้าฝ้าย	10	-	-	-
		กระดาษทิชชู	7	-	-	3
		กระป๋องอะลูมิเนียม	7	-	-	3

2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากวัตถุดิบทางชีวภาพที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไดเรคทีซีอาร์ และแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส

จากผลการทดลองในข้อ 2.2 แสดงให้เห็นว่ากระบวนการมัลติเพล็กซ์ไดเรคทีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่ง D3 และ FGA จากวัตถุดิบทางชีวภาพทั้ง 3 ประเภทได้จริง ดังนั้นในการทดลองนี้จึงต้องการศึกษาผลคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคดังกล่าวจากวัตถุดิบชีวภาพเป้าหมายทั้ง 3 ประเภทที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาทางเคมีต่าง ๆ ทั้งนี้ชุดน้ำยาทางเคมีที่ใช้ทดสอบคราบวัตถุดิบชีวภาพเบื้องต้น และประเภทของวัสดุทดลองเช่นเดียวกันกับการทดลองก่อนหน้า ในหัวข้อที่ 2.2 ทำการทดลองโดยหยดวัตถุทางชีวภาพเป้าหมายปริมาณ 10 ไมโครลิตร ลงบนวัสดุทดลองแต่ละประเภท แล้ววางทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนใช้กระดาษกรองเก็บตัวอย่างวัตถุดิบชีวภาพออกมาจากวัสดุ ซึ่งจะนำไปทดสอบด้วยชุดน้ำยาทางเคมีที่เกี่ยวข้อง จากนั้นนำคราบวัตถุดิบที่มีการเปลี่ยนแปลงสีไปเตรียมสารละลาย Pre-PCR และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไดเรคทีซีอาร์ ดังแสดงในหัวข้อที่ 1.3 ทั้งนี้จะทำการทดลองจำนวน 10 ซ้ำ ในแต่ละชุดการทดลอง เพื่อทดสอบความแม่นยำของวิธีที่พัฒนาขึ้น

2.3.1 การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากคราบเลือดที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้น

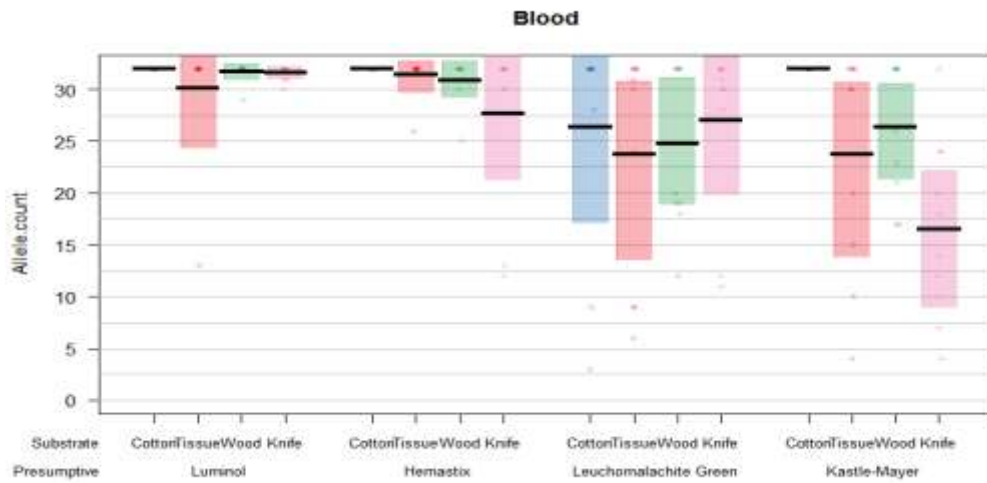
การทดลองนี้ได้ศึกษาการเพิ่มปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากวัตถุดิบชีวภาพประเภทเลือดที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาทางเคมี 4 ชนิด ได้แก่ ชุดน้ำยาลูมินอล ชุดน้ำยาแคสเทิลเมเยอร์ ชุดน้ำยาลิวโคมาลาโคทกรีน และชุดทดสอบแบบแถบ Hemastix® เพื่อศึกษาปัจจัยของชุดน้ำยาทางเคมีดังกล่าวที่อาจส่งผลกระทบต่อปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไดเรคทีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้น ทั้งนี้ได้ทำการเจือจางสัดส่วนสารละลาย Pre-PCR ของคราบเลือดก่อนนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สัดส่วน 1:3 (สารละลาย Pre-PCR 1 ส่วน ในน้ำ 2 ส่วน) ซึ่งเป็นผลการศึกษาในหัวข้อที่ 1.3

ผลการศึกษาพบว่าชุดน้ำยาทดสอบคราบเลือดเบื้องต้นทั้ง 4 ชุด ส่งผลกระทบต่อปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไดเรคทีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นแตกต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 41 เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีของชุดน้ำยาแต่ละชนิดแตกต่างกัน ทั้งนี้พบว่าชุดน้ำยาลูมินอลส่งผลกระทบต่อคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับจากตัวอย่างเลือดน้อยที่สุด โดยมีจำนวนอัลลีลเฉลี่ยเท่ากับ 31 ± 2 อัลลีล และความสูงพีคเฉลี่ยเท่ากับ 1992 ± 561 RFU ผลการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Tobe และคณะ (Tobe *et al.*, 2007) ที่พบว่าชุดน้ำยาลูมินอลส่งผลกระทบต่อปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอน้อยที่สุด รองลงมาคือ ชุดทดสอบแบบแถบ Hemastix® ซึ่งได้จำนวนอัลลีลเฉลี่ยเท่ากับ 31 ± 3 อัลลีล และความสูง

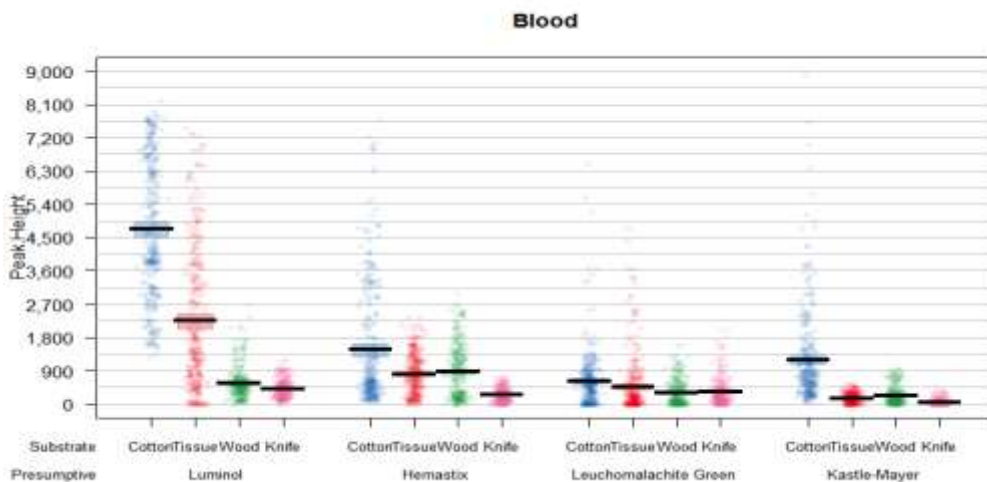
พีคเฉลี่ยเท่ากับ 854 ± 242 RFU สำหรับชุดน้ำยาลิวโคมาลาโคทกรีนได้จำนวนอัลลีลเฉลี่ยเท่ากับ 25 ± 10 อัลลีล และความสูงพีคเฉลี่ยเท่ากับ 443 ± 218 RFU ในขณะที่ชุดน้ำยาแคสเทิล-เมเยอร์ส่งผลกระทบต่อคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอมากที่สุด โดยมีจำนวนอัลลีลเฉลี่ยเท่ากับ 25 ± 6 อัลลีล และความสูงพีคเฉลี่ยเท่ากับ 427 ± 174 RFU ทั้งนี้อาจเนื่องจากชุดน้ำยาแคสเทิล-เมเยอร์ มีค่า pH เท่ากับ 9 ซึ่งเป็นค่า pH ที่สามารถทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ โดยเกิดการไฮโดรไลซิสของพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ (Phosphodiester bonds) ในโครงสร้างดีเอ็นเอ (Ageno *et al.*, 1969) ทำให้ส่งผลกระทบต่อคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับ

ผลการศึกษาข้างต้น (ภาพที่ 41) ยังพบว่าประเภทของวัสดุหลักฐานส่งผลกระทบต่อการเพิ่มปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไดเรคทีซีอาร์เช่นกัน โดยภาพรวมพบว่าวัสดุเสื่อผ้าชนิดผ้าฝ้ายส่งผลกระทบต่อคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับน้อยที่สุด ซึ่งมีจำนวนอัลลีลเฉลี่ยเท่ากับ 31 ± 3 อัลลีล และความสูงพีคเฉลี่ยเท่ากับ 2004 ± 627 RFU ทั้งนี้เนื่องจากวัสดุเสื่อผ้าชนิดผ้าฝ้ายมีคุณสมบัติเนื้อนุ่ม โปร่งสบาย ระบายความร้อนได้ดี รวมถึงมีช่องระหว่างเส้นใย เมื่อใช้กระดาษกรองเก็บตัวอย่างออกมาจากวัสดุจึงทำให้เก็บตัวอย่างออกมาได้ง่าย และได้รับปริมาณดีเอ็นเอจำนวนมาก ทำให้ส่งผลกระทบต่อคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอน้อยที่สุด ในขณะที่วัสดุเม็ดส่งผลกระทบต่อคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอมากที่สุด โดยมีจำนวนอัลลีลเฉลี่ยเท่ากับ 26 ± 6 อัลลีล และความสูงพีคเฉลี่ยเท่ากับ 279 ± 115 RFU ทั้งนี้เนื่องจากวัสดุเม็ดมีพื้นผิวที่ไม่ดูดซับ การเก็บตัวอย่างเลือดออกมาจากวัสดุจึงทำให้ได้ตัวอย่างเลือดในปริมาณมาก ส่งผลให้ปริมาณฮีมซึ่งเป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์มีปริมาณมากเช่นกัน ดังนั้นจึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ผลการทดลองนี้มีคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอต่ำ

(ก)



(ข)



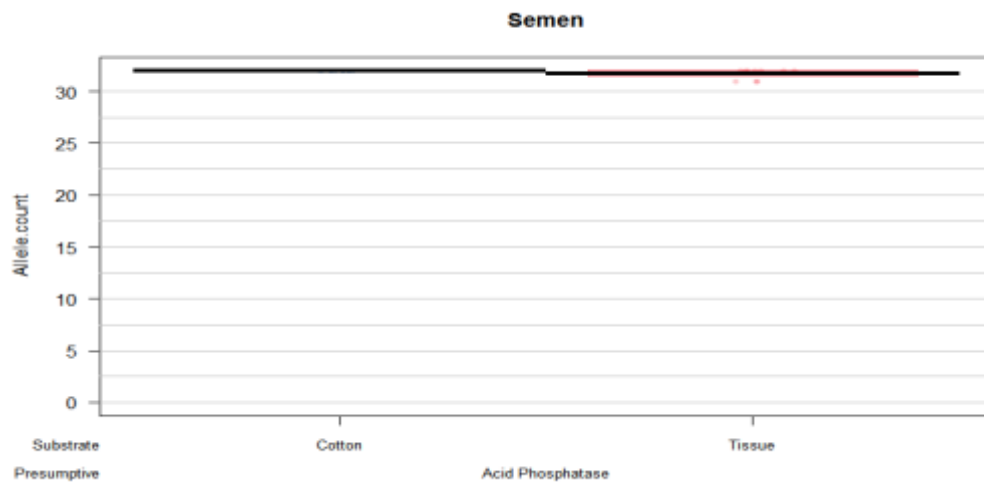
ภาพที่ 41 แสดงผลการศึกษาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากวัตถุพยานทางชีวภาพที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไดเรคทีอีอาร์ และแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยแสดงจำนวนอัลลีล (ก) และค่าความสูงพีค (ข) ที่ได้รับการเพิ่มปริมาณและจัดทาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของคราบเลือดที่เก็บจากวัสดุเสื้อผ้าชนิดผ้าฝ้าย, กระดาษทิชชู, ไม้ และมิด ที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาเคมีต่างๆ ซึ่งในแต่ละชุดการทดลองจะทำซ้ำจำนวน 10 ซ้ำ

2.3.2 ผลการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากคราบอสุจิที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้น

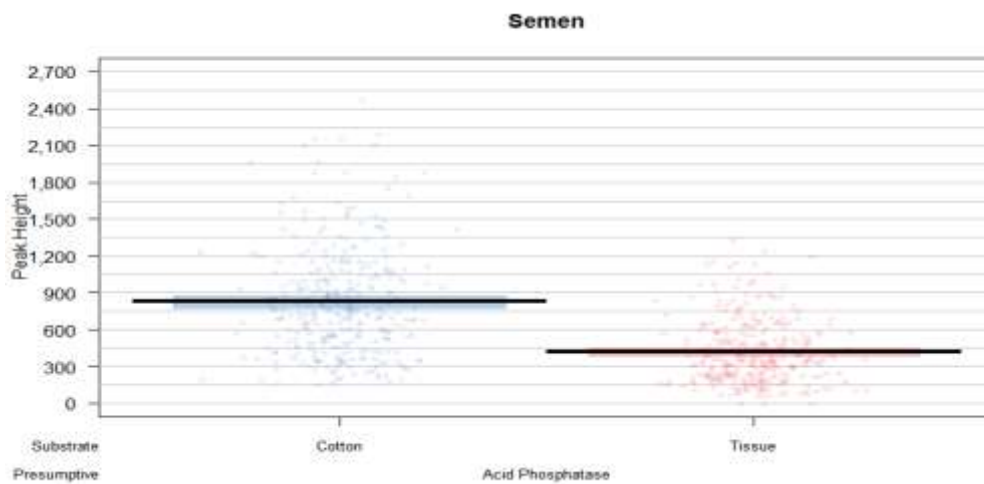
การทดลองนี้ได้ศึกษาการเพิ่มปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากวัตถุพยานชีวภาพประเภทอสุจิที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาแอสซิดฟอสฟาเตส เพื่อศึกษาปัจจัยของชุดน้ำยาทางเคมีดังกล่าวที่อาจส่งผลกระทบต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไคเรคพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้น ทั้งนี้ได้ทำการเจือจางสัดส่วนสารละลาย Pre-PCR ของคราบอสุจีก่อนนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สัดส่วน 1:3 (สารละลาย Pre-PCR 1 ส่วน ในน้ำ 2 ส่วน) ซึ่งเป็นผลการศึกษาในหัวข้อที่ 1.3

ผลการศึกษาพบว่าชุดน้ำยาแอสซิดฟอสฟาเตสส่งผลกระทบต่อการเพิ่มปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไคเรคพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นในบางวัสดุทดลอง ดังแสดงในภาพที่ 42 ทั้งนี้พบว่าวัสดุเส้นผ่าศูนย์กลางไม่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับจากตัวอย่างอสุจิ ซึ่งมีจำนวนอัลลีลเฉลี่ยเท่ากับ 32 ± 0 อัลลีล และความสูงพีคเฉลี่ยเท่ากับ 829 ± 334 RFU ในขณะที่วัสดุกระดาษทิชชูส่งผลกระทบต่อคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยมีจำนวนอัลลีลเฉลี่ยเท่ากับ 32 ± 0 อัลลีล และความสูงพีคเฉลี่ยเท่ากับ 418 ± 189 RFU ผลการศึกษาสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lewis และคณะ (Lewis *et al.*, 2013) ที่พบว่าวัสดุทดลองต่างกันส่งผลกระทบต่อคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับจากตัวอย่างอสุจิแตกต่างกันด้วย อีกทั้ง Phillips และคณะ ยังพบว่าชุดน้ำยาแอสซิดฟอสฟาเตสทำให้ปริมาณดีเอ็นเอลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (Phillips *et al.*, 2011) จึงทำให้ชุดน้ำยาดังกล่าวส่งผลกระทบต่อคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอในบางวัสดุทดลอง

(ก)



(ข)



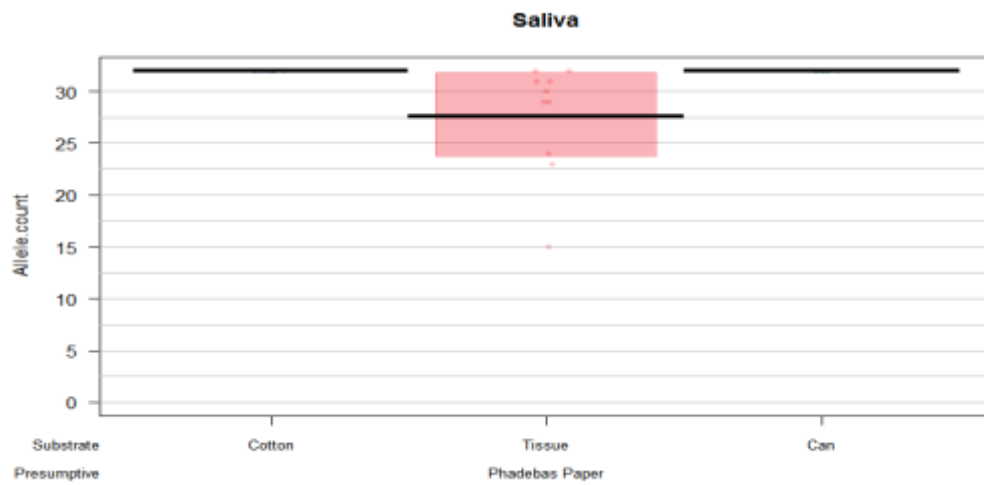
ภาพที่ 42 แสดงผลการศึกษาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากวัตถุพยานทางชีวภาพที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไดเรคทีอีอาร์ และแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยแสดงจำนวนอัลลีล (ก) และค่าความสูงพีค (ข) ที่ได้รับการเพิ่มปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของคราบอสุจิที่เก็บจากวัสดุเสื้อผ้าชนิดผ้าฝ้าย และกระดาษทิชชู ที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาแอซิดฟอสฟาเตส ซึ่งในแต่ละชุดการทดลองจะทำซ้ำจำนวน 10 ซ้ำ

2.3.3 การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากคราบน้ำลายที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้น

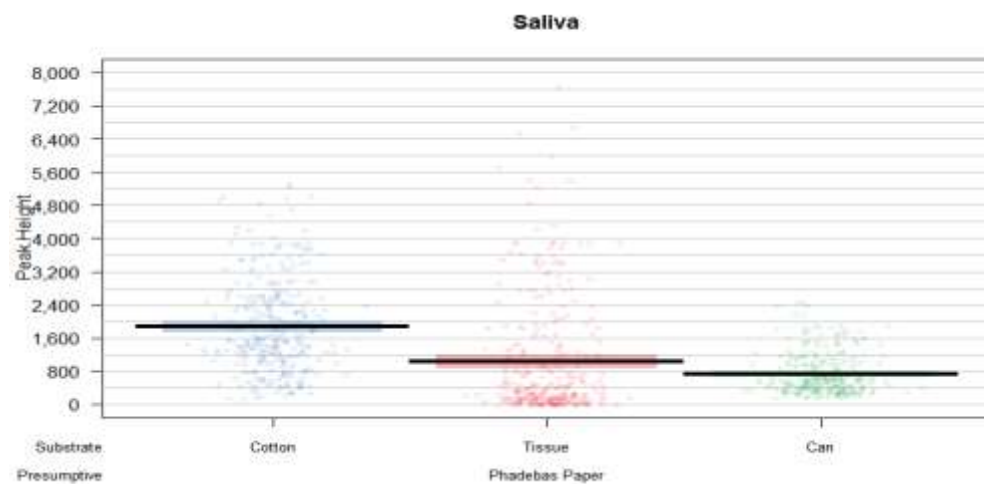
การทดลองนี้ได้ศึกษาการเพิ่มปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากวัตถุพยานชีวภาพประเภทน้ำลายที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยชุดทดสอบ Phadebas paper เพื่อศึกษาปัจจัยของชุดน้ำยาทางเคมีดังกล่าวที่อาจส่งผลกระทบต่อการศึกษาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไคเร็กซ์ที่พัฒนาขึ้น ทั้งนี้ได้ทำการเจือจางสัดส่วนสารละลาย Pre-PCR ของคราบน้ำลายก่อนนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สัดส่วน 1:3 (สารละลาย Pre-PCR 1 ส่วน ในน้ำ 2 ส่วน) ซึ่งเป็นผลการศึกษาในหัวข้อที่ 1.3

ผลการศึกษาพบว่าชุดทดสอบ Phadebas paper ส่งผลกระทบต่อการศึกษาเพิ่มปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไคเร็กซ์ที่พัฒนาขึ้นในบางวัสดุทดลอง ดังแสดงในภาพที่ 43 ทั้งนี้พบว่าวัสดุเสื้อผ้าชนิดผ้าฝ้าย และกระป๋องอะลูมิเนียมไม่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ซึ่งมีจำนวนอัลลีลเฉลี่ยเท่ากับ 32 ± 0 อัลลีล และความสูงพีคเฉลี่ยเท่ากับ 1869 ± 570 RFU สำหรับวัสดุเสื้อผ้าชนิดผ้าฝ้าย และความสูงพีคเฉลี่ยเท่ากับ 736 ± 312 RFU สำหรับวัสดุกระป๋องอะลูมิเนียม ในขณะที่วัสดุกระดาษทิชชูส่งผลกระทบต่อคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยมีจำนวนอัลลีลเฉลี่ยเท่ากับ 28 อัลลีล และความสูงพีคเฉลี่ยเท่ากับ 1114 ± 1145 RFU ทั้งนี้อาจเนื่องจากวัสดุกระดาษทิชชูเป็นพื้นผิวที่มีคุณสมบัติในการดูดซับสูง ทำให้เก็บตัวอย่างออกมาจากวัสดุได้ไม่ดีเท่าที่ควร จึงส่งผลกระทบต่อคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

(ก)



(ข)

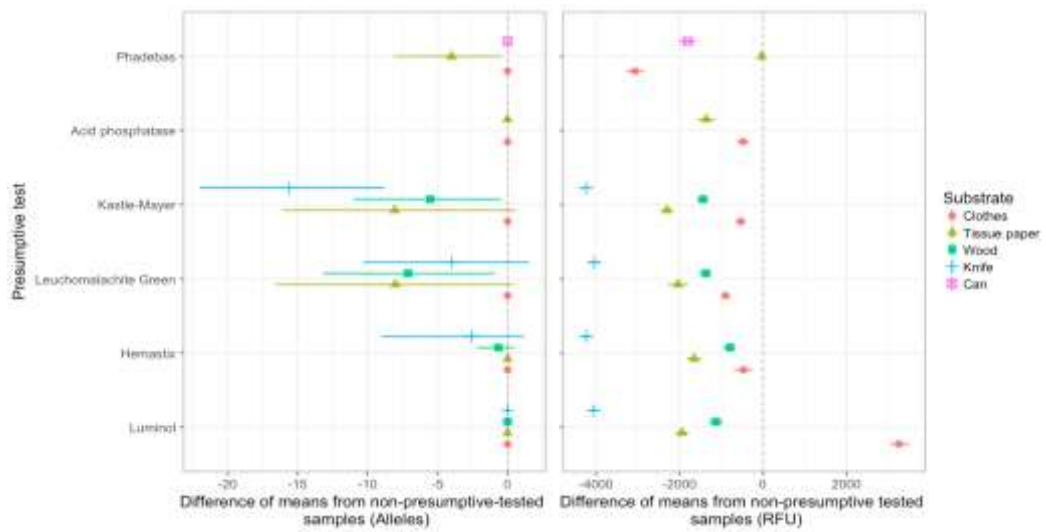


ภาพที่ 43 แสดงผลการศึกษาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากวัตถุพยานทางชีวภาพที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไคเร็กซ์พีซีอาร์ และแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยแสดงจำนวนอัลลีล (ก) และค่าความสูงพีค (ข) ที่ได้รับการเพิ่มปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของคราบน้ำลายที่เก็บจากวัสดุเสื้อผ้าชนิดผ้าฝ้าย กระดาษทิชชู และกระป๋องอะลูมิเนียมที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยชุดทดสอบ Phadebas paper ซึ่งในแต่ละชุดการทดลองจะทำซ้ำจำนวน 10 ซ้ำ

2.4 การเปรียบเทียบผลคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากวัตถุพยานทางชีวภาพที่ผ่านและไม่ผ่านการทดสอบเบื้องต้น

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อการศึกษาเปรียบเทียบผลคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากตัวอย่างวัตถุพยานชีวภาพทั้ง 3 ประเภท (เลือด อสุจิ และน้ำลาย) ที่ผ่านและไม่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาทางเคมีต่างๆ ทำการศึกษาโดยนำค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลีลและค่าเฉลี่ยความสูงพีคในแต่ละชุดการทดลองมาคำนวณค่าทางสถิติของ Bayesian ร่วมกับโปรแกรม R โดยหากค่าที่ได้เท่ากับศูนย์แสดงให้เห็นว่าชุดข้อมูลทั้งสองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการศึกษาพบว่าค่าทางสถิติที่ได้รับจากการทดลองของชุดน้ำยาลูมินอล ชุดน้ำยาแอซิดฟอสฟาเตส และชุดทดสอบ Phadebas paper (ยกเว้นวัสดุทดลองประเภทกระดาษทิชชู) มีค่าเท่ากับศูนย์ ดังแสดงในภาพที่ 44 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างวัตถุพยานชีวภาพที่ผ่านและไม่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาทางเคมีดังกล่าวมีคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกัน กล่าวคือชุดน้ำยาทางเคมีดังกล่าวไม่มีผลต่อคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับ ในขณะที่ค่าทางสถิติที่ได้รับจากชุดการทดลองของชุดน้ำยาแคสเทิลเมเยอร์ และชุดน้ำยาลิวโคมาลาไลท์กรีน มีค่าติดลบในทุกวัสดุทดลอง แสดงให้เห็นว่าชุดน้ำยาทางเคมีดังกล่าวมีผลต่อคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ทั้งนี้อาจเนื่องจากชุดน้ำยาแคสเทิลเมเยอร์ และชุดน้ำยาลิวโคมาลาไลท์กรีน มีองค์ประกอบของสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในชุดน้ำยา และมีค่า pH ที่สูง คือ pH เท่ากับ 9 และ 13 ตามลำดับ ซึ่งทั้งสองปัจจัยดังกล่าวส่งผลกระทบต่อคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (Ageno *et al.*, 1969; Driessens *et al.*, 2009) และเมื่อพิจารณาค่าความสูงพีคพบว่าชุดน้ำยาทดสอบเบื้องต้นทางเคมีทุกชนิดมีค่าติดลบ แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างวัตถุพยานชีวภาพที่ผ่านและไม่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาทางเคมีทุกชนิดส่งผลกระทบต่อความสูงพีคที่ได้รับ ยกเว้นในวัสดุทดลองประเภทกระดาษทิชชูสำหรับชุดทดสอบ Phadebas paper และวัสดุทดลองประเภทเสื้อผ้าชนิดผ้าฝ้ายสำหรับชุดน้ำยาลูมินอล



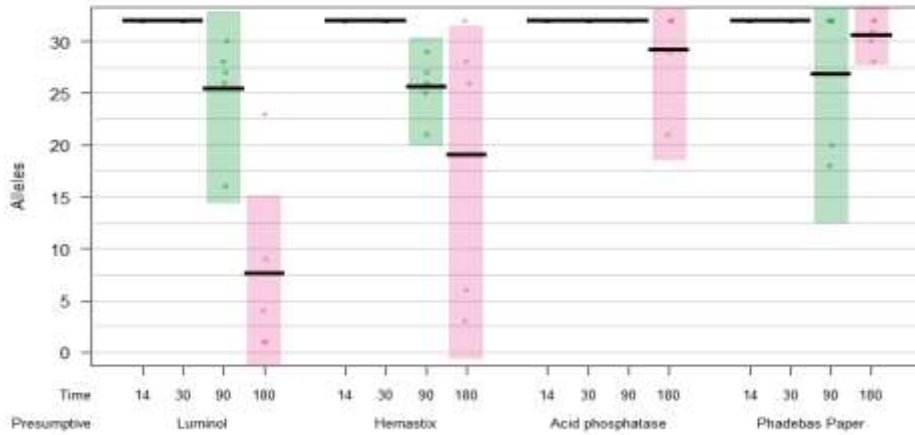
ภาพที่ 44 แสดงผลการศึกษาเปรียบเทียบผลคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากวัตถุพยานทางชีวภาพที่ผ่านและไม่ผ่านการทดสอบเบื้องต้น ซึ่งใช้ค่าสถิติความเชื่อมั่น 95% ของ Bayesian (เทียบเท่ากับ $p < 0.01$ ในทางสถิติแบบ Frequentist) โดยภาพด้านขวาแสดงค่าความสูงพีคและภาพด้านซ้ายแสดงจำนวนอัลลีล ในแต่ละชุดการทดลอง

2.5 การศึกษาปัจจัยด้านอายุของวัตถุพยานทางชีวภาพ

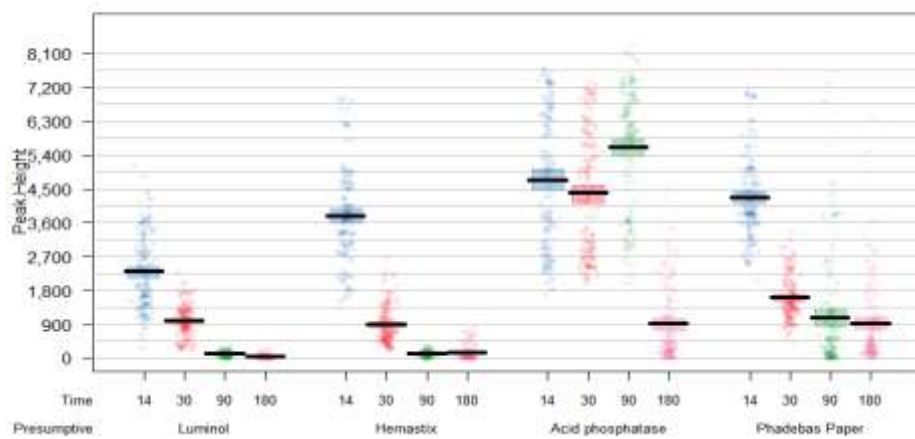
การทดลองส่วนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของอายุวัตถุพยานทางชีวภาพทั้ง 3 ประเภท (เลือด อสุจิ และน้ำลาย) ต่อคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับจากการเพิ่มปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคที่พัฒนาขึ้นในการศึกษารั้งนี้ ทำการทดลองโดยหยดวัตถุพยานทางชีวภาพเป้าหมายปริมาณ 10 ไมโครลิตร ลงบนวัสดุเสื่อผ้าชนิดผ้าฝ้าย จากนั้นวางทิ้งไว้เป็นเวลา 14, 30, 90 และ 180 วัน ก่อนใช้กระดาษกรองเก็บตัวอย่างออกมาจากวัสดุ แล้วคลี่กระดาษกรองออก จะพบคราบบริเวณตรงกลางของกระดาษกรอง ซึ่งจะนำไปทดสอบเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาทางเคมีตามโปรโตคอลของแต่ละชุดน้ำยา โดยชุดน้ำยาทางเคมีที่เลือกมาใช้ทดสอบคราบวัตถุพยานชีวภาพเบื้องต้นเช่นเดียวกับการทดลองก่อนหน้านี้ จากนั้นนำคราบวัตถุพยานชีวภาพที่มีการเปลี่ยนแปลงสีไปเตรียมสารละลาย Pre-PCR และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไคเร็กซ์ซีอาร์ ดังที่แสดงในหัวข้อที่ 1.3 ทั้งนี้จะทำการทดลองจำนวน 5 ซ้ำ ในแต่ละชุดการทดลอง เพื่อทดสอบความแม่นยำของวิธีที่พัฒนาขึ้น

ผลการศึกษาพบว่าวัตถุพยานทางชีวภาพที่มีอายุมากส่งผลกระทบต่อคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับจากกระบวนการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้น ทั้งนี้พบว่าวัตถุพยานทางชีวภาพ (เลือด อสุจิ และน้ำลาย) ที่มีอายุ 30 วัน ไม่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอในทุกตัวอย่าง คิดเป็นความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ 100 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพที่ 45 นอกจากนี้ยังพบว่าตัวอย่างอสุจิที่มีอายุ 90 วัน ยังสามารถเพิ่มปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ได้ในทุกตัวอย่าง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นคราบอสุจิมีลักษณะแห้ง ทำให้ลดการเสียหายของอะโครโซมซึ่งเป็นองค์ประกอบของส่วนหัวอสุจิที่บรรจุสารพันธุกรรมไว้ (Cross and Meizel, 1989) ส่งผลให้มียึดความสำเร็จในการได้รับลายพิมพ์ดีเอ็นเอสูง และผลการศึกษาพบว่าวัตถุพยานทางชีวภาพที่มีอายุมากขึ้นส่งผลกระทบต่อคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยมีจำนวนอัลลีลและค่าความสูงพีคเฉลี่ยที่ลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามตัวอย่างน้ำลายที่มีอายุ 180 วัน พบว่ามีจำนวนอัลลีลเฉลี่ยสูงกว่าตัวอย่างน้ำลายที่มีอายุ 90 วัน ทั้งนี้อาจเนื่องจากการเก็บตัวอย่างวัตถุพยานชีวภาพด้วยเทคนิคไคเร็กซ์ซีอาร์นั้นยากต่อการควบคุมปริมาณตัวอย่างที่ใส่ในหลอดทดลอง ทำให้เกิดความผันแปรของปริมาณตัวอย่างสูงในแต่ละครั้งของการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ จึงอาจส่งผลทำให้ตัวอย่างน้ำลายที่มีอายุ 180 วัน มีจำนวนอัลลีลมากกว่าตัวอย่างน้ำลายที่มีอายุ 90 วัน

(ก)



(ข)



ภาพที่ 45 แสดงผลการศึกษาปัจจัยด้านอายุของวัตถุพยานทางชีวภาพ โดยแสดงจำนวนอัลลีล (ก) และค่าความสูงพีค (ข) จากการเพิ่มปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างวัตถุพยานชีวภาพที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาทางเคมีต่างๆ ซึ่งในแต่ละชุดการทดลองจะทำซ้ำจำนวน 5 ซ้ำ

2.6 การศึกษาผลบวกปลอม (Artifact) และชุดควบคุม (Control)

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลบวกปลอมประเภทต่างๆ ที่อาจปรากฏจากการประยุกต์ใช้กระบวนการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอจากวัตถุพยานทางชีวภาพทั้ง 3 ประเภท (เลือด อสุจิ และน้ำลาย) ด้วยเทคนิคไดเรคท์พีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้น ทั้งนี้จากการศึกษามีจำนวนลายพิมพ์ดีเอ็นเอทั้งหมด 620 ตัวอย่าง ประกอบด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากตัวอย่างวัตถุพยานชีวภาพเป้าหมาย 560 ตัวอย่าง ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากชุดควบคุมลบในแต่ละวัสดุทดลอง 12 ตัวอย่าง และลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากชุดควบคุมลบและชุดควบคุมบวกในปฏิกิริยาพีซีอาร์อย่างละ 24 ตัวอย่าง

ผลการศึกษาพบว่าพบผลบวกปลอมทั้งหมด 5 แบบ ได้แก่ Drop-ins, Split peak, Pull-ups, Stutter และ Dye blobs ซึ่งเกิดได้จากตัวอย่างหรือเกิดจากเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ โดยผลบวกปลอม Drop-ins หรืออัลลีลที่ไม่ใช่อัลลีลที่แท้จริงของตัวอย่าง แต่เป็นอัลลีลที่ถูกเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอปริมาณที่น้อยมาก มาจากการปนเปื้อนของสารเคมี วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองหรืออากาศ พบทั้งหมด 24 ตัวอย่าง คิดเป็น 4 เปอร์เซ็นต์

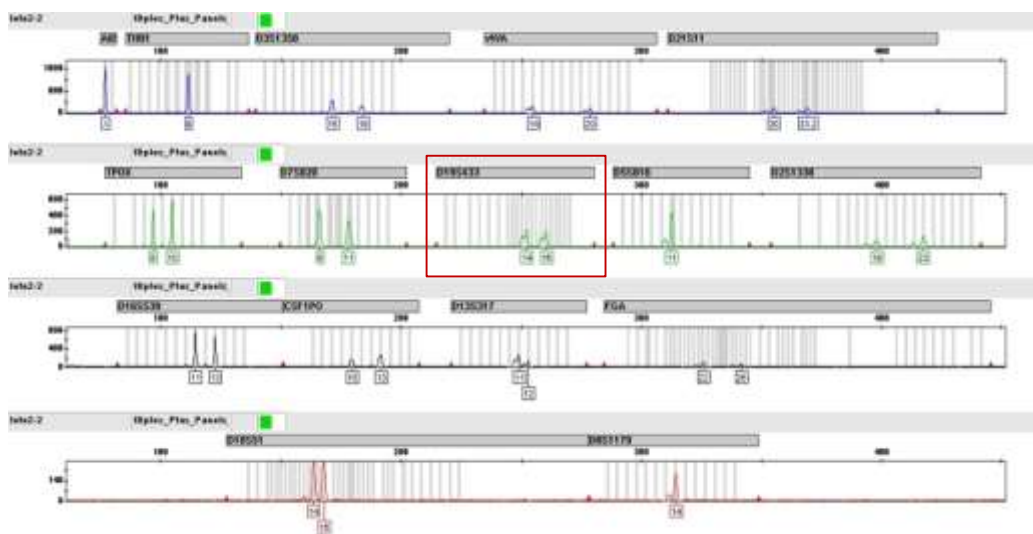
ผลบวกปลอม Split peak หรืออัลลีลที่มีลักษณะพีกหัวแตก เกิดจากการทำงานของเอนไซม์พอลิเมอเรสไม่เต็มประสิทธิภาพ โดยมีการเติมเบสอะดีนีนที่ปลายสายดีเอ็นเอด้านที่ถูกสร้างขึ้นด้าน 3' เป็นบางครั้งเท่านั้น (Brownstein *et al.*, 1996) ทำให้เกิดความแตกต่างของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ในส่วนปลายเบสอะดีนีนนี้ (แสดงในภาพที่ 46) พบทั้งหมด 30 ตัวอย่าง คิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์

ผลบวกปลอม Pull-ups หรือการเกิดแถบสีชมพูขึ้นในลายพิมพ์ดีเอ็นเอในบางตำแหน่ง เนื่องจากมีปริมาณดีเอ็นเอที่มากเกินไปในกระบวนการเพิ่มปริมาณและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไดเรคท์พีซีอาร์ จึงทำให้เครื่องแคปิลลารีอิเล็กโตรโฟรีซิสไม่สามารถตรวจแยกแถบสีที่ซ้อนทับกันได้ในช่วงขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม GeneMapper™ (Butler, 2005) (แสดงในภาพที่ 47) พบทั้งหมด 156 ตัวอย่าง คิดเป็น 28 เปอร์เซ็นต์

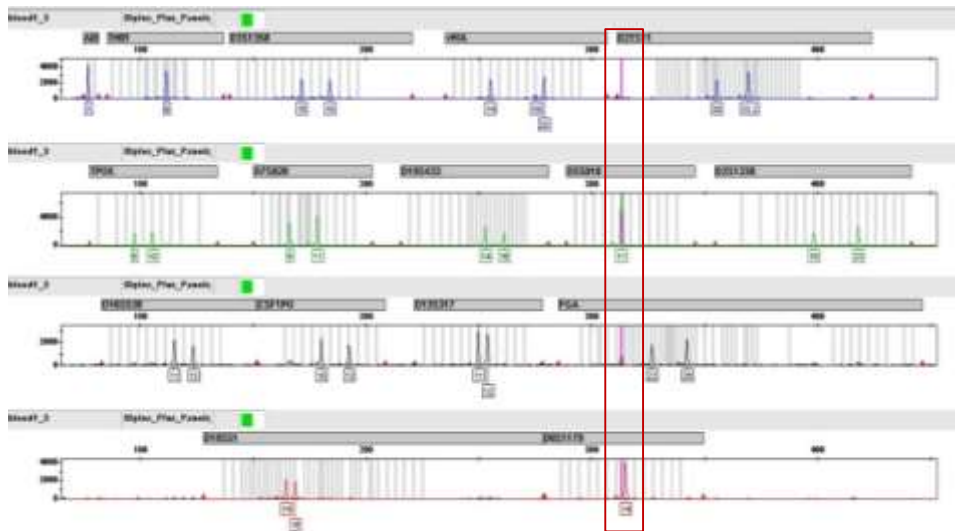
ผลบวกปลอม Stutter หรืออัลลีลที่มีหน่วยซ้ำน้อยกว่าดีเอ็นเอเป้าหมาย 1 หน่วยซ้ำหรือน้อยกว่าจำนวน 4 เบส เนื่องมาจากการเลื่อนหลุดของสายดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์พอลิเมอเรสในปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดย Stutter มีความสูงพีกต่ำกว่าพีกจริงประมาณ 15–20 เปอร์เซ็นต์ และสามารถตัดออกได้โดยใช้โปรแกรม GeneMapper™ (Brookes *et al.*, 2012; Taylor *et al.*, 2013) (แสดงในภาพที่ 48) พบทั้งหมด 33 ตัวอย่าง คิดเป็น 6 เปอร์เซ็นต์

ผลบวกปลอม Dry blobs เกิดจากการหลุดของสีที่ติดอยู่กับไพรเมอร์หรือเกิดจากการเคลื่อนย้ายของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ โดยพีคจะมีฐานที่กว้าง และสามารถเกิดซ้ำได้ถ้าใช้ชุดน้ำยาเดิมในการทดลอง เพราะสีของไพรเมอร์เดิมก็จะหลุดในระหว่างกระบวนการพีซีอาร์ได้อีก ซึ่งพบบ้างเพียงเล็กน้อยจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอทั้งหมด

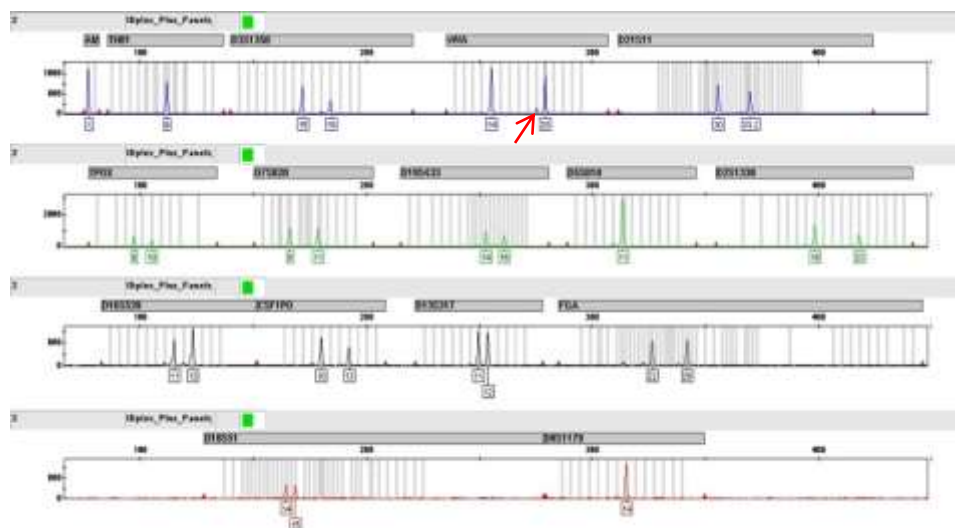
เมื่อศึกษาเปรียบเทียบผลคุณภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากตัวอย่างที่ผ่านและไม่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นพบว่าอัตราการเกิดผลบวกปลอมที่ได้ของทั้งสองชุดการทดลอง (ตัวอย่างที่ผ่านและไม่ผ่านการทดสอบเบื้องต้น) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยตัวอย่างที่ไม่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นเกิดผลบวกปลอม 38 เปอร์เซ็นต์ (213 ตัวอย่าง ใน 560 ตัวอย่าง) ในขณะที่ในตัวอย่างที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นเกิดผลบวกปลอม 32 เปอร์เซ็นต์ (179 ตัวอย่าง ใน 560 ตัวอย่าง) และหากไม่นับรวมการเกิด Pull-ups ในการทดลองทั้งหมด ผลบวกปลอมจากตัวอย่างวัตถุพยานทางชีวภาพที่ไม่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นจะมีค่าลดลง 12 เปอร์เซ็นต์ และจากตัวอย่างวัตถุพยานทางชีวภาพที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นจะมีค่าลดลง 6 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 46 แสดงตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดผลบวกปลอม Split peak



ภาพที่ 47 แสดงตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดผลบวกปลอม Pull-ups



ภาพที่ 48 แสดงตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดผลบวกปลอม Stutter

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

กระบวนการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอโดยวิธีไดเรคพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้กับ วัตถุประสงค์ทางชีวภาพทั้ง 3 ประเภททั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการทดสอบเบื้องต้น และศึกษาปัจจัย ทางด้านอายุของวัตถุประสงค์สำเร็จ โดยใช้โปรโตรคอลเดียวในทุกวัสดุทดลองเพื่อสามารถ นำไปใช้ได้อย่างง่ายขึ้น ส่วนชุดน้ำยาทดสอบเบื้องต้น และวัสดุทดลองประเภทต่างๆ เป็น ข้อจำกัดที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้เช่นกัน ผู้วิจัยจึงแนะนำให้การศึกษาเพิ่มเติมในวัสดุหลักฐาน หลากหลายประเภทยิ่งขึ้นที่พบในสถานที่เกิดเหตุ เช่น ศึกษาในผ้าชนิดต่างๆ รวมถึงในชุด น้ำยาทดสอบเบื้องต้นหลากหลายชนิด เช่น Hemident™ และ Bluestar© ชุดน้ำยา ลูมินอลชนิดต่างๆ ที่ใช้ทดสอบเลือดเบื้องต้น หรือ ชุดทดสอบ SERATEC PSA สำหรับทดสอบ อสุจิ เพื่อสามารถใช้ในการเปรียบเทียบและเป็นทางเลือกให้กับนักนิติวิทยาศาสตร์ในการ ตัดสินใจเลือกใช้ชุดทดสอบเบื้องต้นที่ดีที่สุดในห้องปฏิบัติการ และสถานที่เกิดเหตุ และที่สำคัญ กระบวนการที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปใช้ในคดีอาชญากรรมต่างๆ เพราะตัวอย่างหลักฐานที่ ได้มานั้น บางครั้งมีปริมาณที่น้อยมาก ส่วนหนึ่งก็จะต้องนำไปทดสอบเบื้องต้นด้วยชุดน้ำยาทาง เคมีก่อน ซึ่งกระบวนการที่พัฒนานี้สามารถนำไปใช้ได้จริงและมีอัตราความสำเร็จที่สูง รวมถึง งานวิจัยนี้ยังช่วยประหยัดเวลา ประหยัดงบประมาณค่าใช้จ่าย และค่าสารเคมีที่ต้องใช้ใน กระบวนการสกัดดีเอ็นเอได้

บรรณานุกรม

- Ageno, M., Dore, E. and Frontali, C. 1969. The alkaline denaturation of DNA. *Biophysical journal*, 9(11), 1281–1311.
- Barni, F., Lewis, S. W., Berti, A., Miskelly, G. M. and Lago, G. 2007. Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection. *Talanta*, 72(3), 896–913.
- Brandão, E., Soares, S., Mateus, N. and de Freitas, V. 2014. Human saliva protein profile: Influence of food ingestion. *Food research international*, 64, 508–513.
- Brookes, C., Bright, J. A., Harbison, S. and Buckleton, J. 2012. Characterising stutter in forensic STR multiplexes. *Forensic Science International: Genetics*, 6(1), 58–63.
- Brownstein, M. J., Carpten, J. D. and Smith, J. R. 1996. Modulation of non-templated nucleotide addition by Taq DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping. *Biotechniques*, 20(6), 1004–1006.
- Burnouf, T., Chou, M. L., Goubran, H., Cognasse, F., Garraud, O. and Seghatchian, J. 2015. An overview of the role of microparticles/microvesicles in blood components: are they clinically beneficial or harmful?. *Transfusion and Apheresis Science*, 53(2), 137–145.
- Butler, J. M. 2005. *Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers*. Academic Press.
- Butler, J. M., Buel, E., Crivellente, F. and McCord, B. R. 2004. Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis. *Electrophoresis*, 25(10–11), 1397–1412.
- Butler, John M. 2010a. Chapter 1 - Overview and history of DNA typing. *Fundamentals of Forensic DNA Typing* (pp. 1–18). San Diego: Academic Press.
- Butler, John M. 2010b. Chapter 2 - Basics of DNA biology and genetics. *Fundamentals of Forensic DNA Typing* (pp. 19–41). San Diego: Academic Press.

- Butler, John M. 2012a. Chapter 5 - Short tandem repeat (STR) loci and kits. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology* (pp. 99–139). San Diego: Academic Press.
- Butler, John M. 2012b. Chapter 10 - Degraded DNA. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology* (pp. 293–309). San Diego: Academic Press.
- Colussi, A., Viegas, M., Beltramo, J. and Lojo, M. 2009. Efficiency of DNA IQ System® in recovering semen DNA from cotton swabs. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 2(1), 87–88.
- Cross, N. L. and Meizel, S. 1989. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biology of reproduction*, 41(4), 635–641.
- De Almeida, P. D. V., Gregio, A. M., Machado, M. A., De Lima, A. A. and Azevedo, L. R. 2008. Saliva composition and functions: a comprehensive review. *Journal of Contemporary Dental Practice*, 9(3), 72–80.
- Donachie, G. E., Dawnay, N., Ahmed, R., Naif, S., Duxbury, N. J. and Tribble, N. D. 2015. Assessing the impact of common forensic presumptive tests on the ability to obtain results using a novel rapid DNA platform. *Forensic Science International: Genetics*, 17, 87–90.
- Driessens, N., Versteyhe, S., Ghaddhab, C., Burniat, A., De Deken, X., Van Sande, J., Miot, F. and Corvilain, B. 2009. Hydrogen peroxide induces DNA single-and double-strand breaks in thyroid cells and is therefore a potential mutagen for this organ. *Endocrine-related cancer*, 16(3), 845–856.
- Elkins, K. M. 2012. *Forensic DNA biology: a laboratory manual*. Academic Press.
- Ghasemian, F., Mirroshandel, S. A., Monji-Azad, S., Azarnia, M. and Zahiri, Z. 2015. An efficient method for automatic morphological abnormality detection from human sperm images. *Computer methods and programs in biomedicine*, 122(3), 409–420.

- Gray, K., Crowle, D. and Scott, P. 2014. Direct amplification of casework bloodstains using the Promega PowerPlex® 21 PCR Amplification System. *Forensic Science International: Genetics*, 12, 86–92.
- Hasap, L., Thanakiatkrai, P., Singkhamanan, K., Linacre, A. and Kitpipit, T. 2013. Multiplex-direct PCR assay for foodborne pathogen identification: An application in forensic investigation. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 4(1), e103–e104.
- Hedman, J., Dalin, E., Rasmusson, B. and Ansell, R. 2011. Evaluation of amylase testing as a tool for saliva screening of crime scene trace swabs. *Forensic Science International: Genetics*, 5(3), 194–198.
- Hedman, J., Gustavsson, K. and Ansell, R. 2008. Using the new Phadebas® Forensic Press test to find crime scene saliva stains suitable for DNA analysis. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 1(1), 430–432.
- Jasinska, A. and Krzyzosiak, W. J. 2004. Repetitive sequences that shape the human transcriptome. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 567(1), 136–141.
- Kishore, R., Reef Hardy, W., Anderson, V. J., Sanchez, N. A. and Buoncristiani, M. R. 2006. Optimization of DNA extraction from low-yield and degraded samples using the BioRobot® EZ1 and BioRobot® M48. *Journal of forensic sciences*, 51(5), 1055–1061.
- Kitpipit, T., Sittichan, K. and Thanakiatkrai, P. 2014. Direct-multiplex PCR assay for meat species identification in food products. *Food Chemistry*, 163, 77–82.
- Kitpipit, T., Thanakiatkrai, P. and Chotigeat, W. 2013. Direct PCR-FINS: Wildlife species identification without DNA extraction. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 4(1), e364–e365.
- Legg, K. M. 2014. Development and testing of a rapid multiplex assay for the identification of biological stains. University of Denver.

- Lewis, J., Baird, A., McAlister, C., Siemieniuk, A., Blackmore, L., McCabe, B., Wheelhouse, M. and Wilson, N. 2013. Improved detection of semen by use of direct acid phosphatase testing. *Science & Justice*, 53(4), 385–394.
- Lima, D. P., Diniz, D. G., Moimaz, S. A. S., Sumida, D. H. and Okamoto, A. C. 2010. Saliva: reflection of the body. *International Journal of Infectious Diseases*, 14(3), e184–e188.
- Miller, M. T. 2014. Exercise M - Visualization and enhancement: biological evidence. *Crime scene investigation laboratory manual* (pp. 103–115). San Diego: Academic Press.
- Mitrowska, K., Posyniak, A. and Zmudzki, J. 2005. Determination of malachite green and leucomalachite green in carp muscle by liquid chromatography with visible and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1089(1), 187–192.
- Ottens, R., Taylor, D., Abarno, D. and Linacre, A. 2013. Optimising direct PCR from anagen hair samples. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 4(1), e109–e110.
- Phillips, Z., Kenline, J., Donley, M. and Kahn, R. 2011. The Effects of acid phosphatase mapping on and recovery. *22nd International Symposium on Human Identification*, MD, USA.
- Rychlik, W. J. S. W., Spencer, W. J. and Rhoads, R. E. 1990. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic acids research*, 18(21), 6409–6412.
- Saowaros, W. and Panyim, S. 1979. The formation of disulfide bonds in human protamines during sperm maturation. *Experientia*, 35(2), 191–192.
- Sato, I., Sagi, M., Ishiwari, A., Nishijima, H., Ito, E. and Mukai, T. 2002. Use of the “SMITEST” PSA card to identify the presence of prostate-specific antigen in semen and male urine. *Forensic science international*, 127(1), 71–74.

- Schlötterer, C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109(6), 365–371.
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L. and Johne, R. 2012. PCR inhibitors—occurrence, properties and removal. *Journal of applied microbiology*, 113(5), 1014–1026.
- Swaran, Y. C. and Welch, L. 2012. A comparison between direct PCR and extraction to generate DNA profiles from samples retrieved from various substrates. *Forensic Science International: Genetics*, 6(3), 407–412.
- Taylor, D., Bright, J. A. and Buckleton, J. 2013. The interpretation of single source and mixed DNA profiles. *Forensic Science International: Genetics*, 7(5), 516–528.
- Templeton, J., Ottens, R., Paradiso, V., Handt, O., Taylor, D. and Linacre, A. 2013. Genetic profiling from challenging samples: direct PCR of touch DNA. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 4(1), e224–e225.
- Tobe, S. S., Swaran, Y. C., Dennany, L., Sibbing, U., Johann, K. S., Welch, L. and Vennemann, M. 2017. A proof of principal study on the use of direct PCR of semen and spermatozoa and development of a differential isolation protocol for use in cases of alleged sexual assault. *International journal of legal medicine*, 131(1), 87–94.
- Tobe, S. S., Watson, N. and Daeid, N. N. 2007. Evaluation of six presumptive tests for blood, their specificity, sensitivity, and effect on high molecular-weight DNA. *Journal of forensic sciences*, 52(1), 102–109.
- Vandenberg, N. and Oorschot, R. A. 2006. The use of *polilight*® in the detection of seminal fluid, saliva, and bloodstains and comparison with conventional chemical-based screening tests. *Journal of forensic sciences*, 51(2), 361–370.
- Virkler, K. and Lednev, I. K. 2009. Analysis of body fluids for forensic purposes: from laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. *Forensic Science International*, 188(1), 1–17.

- Wang, Y., Prosen, D. E., Mei, L., Sullivan, J. C., Finney, M. and Vander Horn, P. B. 2004. A novel strategy to engineer DNA polymerases for enhanced processivity and improved performance in vitro. *Nucleic acids research*, 32(3), 1197–1207.
- Welsh, J. and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic acids research*, 18(24), 7213–7218.
- Yang, D., Li, Z., Diwu, Y. A., Fu, H., Liao, J., Wei, C. and Diwu, Z. 2008. A novel fluorogenic coumarin substrate for monitoring acid phosphatase activity at low pH environment. *Current chemical genomics*, 2, 48.

ภาคผนวก

ต้นฉบับสำหรับตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ



Research paper

Direct-STR typing from presumptively-tested and untreated body fluids



Phuvadol Thanakiatkrai^a, Krittika Raham^a, Jintana Pradutkanchana^b,
Sujettana Sotthibandhu^c, Thitika Kitpipit^{a,*}

^a Forensic Science Program, Department of Applied Science, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Thailand

^b Forensic Medicine and Toxicology Unit, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Prince of Songkla University, Thailand

^c Biology and DNA Subdivision, Central Police Forensic Science Division, Royal Thai Police, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 February 2017

Received in revised form 4 May 2017

Accepted 2 June 2017

Available online 6 June 2017

Keywords:

Biological evidence

Direct PCR

Presumptive test

STR profile

Triage

ABSTRACT

Body fluids provide key pieces of information for a forensic investigation. However, sometimes only a small amount of body fluids is found and/or DNA are also degraded by environmental factors at the crime scene. In extreme cases, a forensic analyst may have to decide whether to perform a presumptive test on the stains or proceed straightaway to DNA profiling, which could be wasteful for non-biological stains. Additionally, due to the inefficient DNA extraction process, the amount of DNA may not be enough for STR typing, especially if parts of the evidence had been subjected to presumptive testing. To overcome these problems, we developed a direct PCR method for STR profiling of stains (blood, saliva, and semen) that had been subjected to presumptive tests and also those that had not undergone presumptive tests. Using the optimized protocols, 86 of 90 untreated samples (95.6%) resulted in a full DNA profile. For presumptively-tested samples, both the type of presumptive test used and the surfaces where the stains are deposited affected the quality of the STR profiles. With blood, we obtained full STR profiles from 88% of samples tested with luminol and 78% with Hemastix. The acid phosphatase test for semen and Phadebas test for saliva resulted in full STR profiles from 85% and 73% of samples, respectively. Different substrates also affected the resulting STR profiles, but there was no clear trend based on absorbency or texture. The interactions of types of body fluids, presumptive tests, and substrates must be considered together. Our direct PCR protocol can be used to detect DNA even with 6 months-old biological samples. The benefits of the developed protocol include increasing amount of DNA obtained from evidence, decreasing chances of DNA contamination from complex or lengthy extraction steps, using minimal sample amount for analysis, and most importantly, improving STR profiles. Also, the process could save analysis time and cost due to the omission of DNA extraction and quantification. Our developed method could be beneficial to cases with limited stains available, as forensic analysts can perform indirect presumptive testing on the suspected stains and direct PCR could be carried out from the filter paper used, thus leaving the original stain for subsequent DNA extraction or re-analysis.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Body fluids are commonly found at crime scenes and are crucial to forensic investigations. The detection of body fluids and their subsequent identifications are important steps that allow them to be subjected to further analyses. Common body fluids associated with crimes include blood, semen, and saliva. Blood is found in violent and non-violent crimes; semen is commonly found in sexual assault cases; and saliva is frequently found in volume crime

and sexual assaults [1]. Presumptive testing can be used to locate and identify suspect stains, of which some are difficult to observe with unaided eyes [2]. It can also help to eliminate non-biological samples from subsequent DNA analysis. Exposure to presumptive test reagents can have detrimental effects of subsequent DNA analysis. For most cases, it is not necessary to perform presumptive testing directly on the stain available (i.e. non-direct method). However, in cases with extremely minute amounts of sample, forensic analysts may choose to proceed directly to DNA analysis, resulting in some non-biological stains also being processed.

Chemical based-presumptive testing of suspected body fluids is widely employed by forensic practitioners both at the crime scene

* Corresponding author.

E-mail addresses: thitika.k@psu.ac.th, four4_4@hotmail.com (T. Kitpipit).

and in the laboratory [1]. Typically, suspected stains are scraped with a folded edge of a sterile filter paper then the reagents are dropped onto the transferred stains. Common chemicals for blood screening test in forensic laboratories include luminol, leucomalachite green (LMG), Kastle-Meyer test (KM) [3], Hemastix [3], Combur3 Test E [4], and Bluestar luminol [5]. Luminol is the most sensitive and specific and it does not damage DNA [2,5–7]. Luminol test relies on the ability of hemoglobin to enhance the oxidation of luminol, resulting in blue chemiluminescence; however, the process must be carried out in the dark. LMG, KM, and Hemastix are less sensitive and specific, and the few studies performed show that they affect DNA profiling to various degrees [1,5,8,9]. These tests rely on the color change of the reagents (leucomalachite green, phenolphthalein, and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) in a heme-catalyzed reaction. Of all the presumptive tests for blood, Hemastix and Combur3 Test E is the easiest to carry and use, as it comes in paper-strip format with a shelf-life of six months to a year after opening. For semen and saliva detection, acid phosphatase (AP) test and Phadebas paper are usually applied, respectively [10,11]. The AP test reagents change color in the presence of acid phosphatase, an enzyme which is found in semen in higher amounts than other body fluids [10]. Limited data are available for the effect of AP test on subsequent DNA analysis. Direct spraying of AP reagents onto semen stains followed by DNA extraction showed no detrimental effect, but spiking of AP reagents post-extraction/pre-PCR had negative effects [10]. Phadebas paper contains blue dyes chemically bound to starch. In the presence of alpha-amylase enzyme, the starch is digested and the water-soluble dyes are released [11]. When used with typical DNA extraction protocol, Phadebas does not interfere with the subsequent PCR [11].

STR typing using direct PCR, the process of DNA amplification without DNA extraction, is increasingly employed and actively researched because of several benefits (e.g. see the availability of new direct PCR commercial kits such as the VeriFiler Direct and Investigator[®] STR Go! Kits and recent publications [12–15]). First, direct PCR is convenient, economical and rapid. Second, this process can reduce the risk of DNA contamination from a complex DNA extraction step. Third, it enhances possibility in obtaining an STR profile from trace DNA as it increases the amount of DNA recovered due to the omission of the inefficient DNA extraction step that can lose up to 70% of DNA [16,17]. Direct PCR has been successfully reported in various forensic sample types, including blood, semen, saliva, buccal swab, fingernails, hair, tissue, and touch DNA [12,15,18–23]. These studies were performed with untreated samples, i.e. samples that had not undergone presumptive testing, and methods vary from one study to the next. Only one study performed direct PCR from presumptively-tested blood, saliva, and semen and recovered about 90% of all alleles, but this was done only on cotton fabrics and with the ParaDNA rapid platform [7]. Previous studies have also shown that substrates affect subsequent DNA recovery and analysis for both conventional and direct PCR [19,24,25], but only two previous, limited studies investigated the effects of substrates and presumptive tests simultaneously [11,26]. As such, knowledge regarding performing direct PCR on untreated casework stains and presumptively-tested body fluids from different substrates are still lacking. If direct STR typing can be performed on filter papers used during presumptive tests, this will open up a new source of template DNA for STR typing. Also, the non-destructive nature of the indirect presumptive testing protocol should leave the original stain almost perfectly intact. As such, all stains could be presumptively tested, which would in turn reduce the number of non-biological stains submitted for DNA analysis.

In this study, we therefore aimed to develop a common direct PCR-STR typing method for the three common biological fluids that have and have not undergone presumptive testing on the

standard forensic DNA analysis systems. Two factors (substrate and stain age) affecting quality of the obtained STR profile were also studied.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection and preparation

Each body fluid (blood, saliva, and semen) used in the experiments were donated by ten healthy volunteers using methods approved by the Prince of Songkla University Ethical Committee (ethical approval no. 59-297-19-9). Volunteers for blood and saliva included males and females, while volunteers for semen were all males. Informed written consents were obtained from all volunteers. Blood samples were drawn from the median cubital vein by a registered nurse and collected in a 10 mL EDTA-blood collection tube. Semen and saliva were collected in a sterile 10 mL tube.

Ten microliters of the three body fluids were pipetted onto their commonly found substrates then air dried for 24 h in a safety cabinet before further analysis. Supplementary Table 1 shows all the samples and the number of samples per treatment condition (i.e. sample type, pre-PCR dilution factor, presumptive test, substrate, and stain age). Substrates for blood included cotton fabric, tissue, wood, and knife blade. Substrates for semen included cotton fabric and tissue paper, and substrates for saliva included cotton fabric, tissue paper, and aluminum can. All substrates were washed with Clorox[®] Regular Bleach (CA, USA), air-dried in a clean fume hood, and irradiated with UV light for 1 h in a DNA cross-linker cabinet to ensure no background DNA contamination. Tissue papers were not washed but subjected to the same irradiation process. At least two negative collection controls were collected from all substrates and subjected to the same downstream protocol.

To study the effect of stain age, the three body fluids were pipetted onto cotton fabric, left to dry, and analyzed at the following time-points: 14 days, 30 days, 90 days, and 180 days.

2.2. Presumptive tests

2.2.1. Blood presumptive test

Four common presumptive tests: luminol, phenolphthalein KM, LMG, and Hemastix, were tested in this study. Luminol (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany), phenolphthalein KM (Merck Millipore, Massachusetts, USA), and LMG (Magle Life Sciences, Lund, Sweden) were prepared using either molecular biology grade or analytical grade chemicals. Luminol reagent was prepared by first mixing 0.19 g luminol with 0.1 g sodium carbonate. The mixture was dissolved in 10 mL of 3% hydrogen peroxide. KM reagent was prepared using the following formula: 2 g phenolphthalein, 20 g potassium hydroxide, 30 g zinc dust, and 100 mL water. The mixture was boiled until colorless then allowed to cool. One hundred mL of ethanol were added and the solution was stored at 4 °C over zinc dust. LMG reagent was prepared using the following formula: 0.25 g leucomalachite, 100 mL glacial acetic acid, 150 mL distilled water, and 5 g zinc dust. The mixture was boiled until colorless and stored over a little zinc dust at 4 °C in the dark. Hemastix[®] was purchased from Siemens Healthcare Diagnostics Inc. (USA).

Bloodstains on different substrates were scraped for 20 times in a zigzag pattern with the corner of a folded Whatman[™] #1 Qualitative 110 mm filter paper (GE Healthcare Life Sciences, PA, USA). The filter paper was then unfolded. Luminol was sprayed directly onto the paper. LMG and KM were dropped onto the filter paper followed by hydrogen peroxide. Hemastix was used as described by Poon et al. [3]. Briefly, the Hemastix strip was

moistened with deionized water, shaken to remove excess water, and pressed lightly onto the transferred stain on the filter paper.

Only two blood presumptive reagents – luminol and Hemastix – were used in the effect of stain age study as they provided higher quality STR profiles when compared to KM and LMG tests.

For all tests, a positive reaction was noted by the corresponding change in color for each test.

2.2.2. Semen presumptive test

An acid phosphatase reagent was used for this purpose. Two reagents (stock solution A and B) were prepared. The stock solution A was prepared by mixing 1 g o-dianisidine tetrazotised (Fast Blue B), 20 g sodium acetate, 10 mL acetic acid, and 100 mL water while the stock solution B was prepared by mixing 0.8 g sodium alpha-naphthyl phosphate and 10 mL water. The working solution of acid phosphatase reagent was then prepared by adding 10 mL of stock solution A to 89 mL of water added with 1 mL of stock solution B.

Similar to bloodstains, a folded filter paper was used to scrape the semen stains. The AP reagent was sprayed onto the filter paper and a positive reaction was noted by a color change within one minute.

2.2.3. Saliva presumptive test

Phadebas[®] paper (Magle AB, Lund, Sweden) was used for this purpose. 0.9 g Phadebas Amylase test tablet was dissolved in 100 mL water. The solution was sprayed onto one side of a sheet of filter paper. When dried, the treated paper had a speckled blue appearance. A clean, folded filter paper was used to scrape the saliva stains. Prepared Phadebas paper were pressed against the filter paper, sprayed with deionized water, and kept in contact for 20 min. A positive reaction was noted by a diffused blue appearance on the Phadebas paper.

2.3. Direct-STR amplification and detection

In this study, a pre-PCR protocol for direct amplification modified from Kitpipit et al. [27] was employed as it provided the highest amplification success rate from the three target biological samples based on our preliminary results (data not shown). For the untreated samples, one 1 × 1 mm² piece from the filter paper that had been used to scrape the body fluid stains was cut and put in a sterile 1.5 mL microcentrifuge tubes. For presumptively-tested samples, a 1 × 1 mm² piece from the filter paper at the area showing a positive reaction (i.e. color change) was cut and put in a sterile microcentrifuge tube. Twenty µL of phosphate-buffered saline (PBS) was added to each tube, followed by an incubation at 98 °C for 2 min and a brief spin-down. The supernatant was called the pre-PCR solution and used for subsequent amplification. The optimized dilution factors of the pre-PCR solutions were determined empirically in the optimization experiment with untreated samples and also used for the presumptively-tested samples.

The QIAGEN[®] Investigator IDplex[®] Plus Kit (Hilden, Germany) was used for STR amplification. All samples were typed only once. A reduced total reaction volume of 12.5 µL, consisting of 3.75 µL Fast Reaction Mix, 1.25 µL Primer Mix, 2.5 µL nuclease-free water, and 5.0 µL pre-PCR solution, was used. Amplifications were carried out using a T100[™] Bio-Rad thermal cycler with the following PCR condition: 95 °C for 5 min followed by 30 cycles of 96 °C for 10 s and 61 °C for 120 s. All batches were processed with at least one negative control (i.e. distilled water) and one positive control (i.e. 500 pg of control DNA supplied with the IDplex Plus Kit). PCR products were kept at 4 °C.

Approximately 1.0 µL PCR product was mixed with 12 µL Hi-Di formamide and 0.5 µL DNA Size Standard 550 (BTO). The mixture

was denatured at 95 °C for 3 min and placed on ice for 3 min. PCR fragments were resolved on a 3130xl Genetic analyzer (Life Technologies, CA, USA) using POP-4[®] Polymer and the manufacturer's recommended protocol. Raw data were analyzed with GeneMapper[®] ID software v.3.2.1 (Life Technologies, CA, USA). A peak detection threshold of 50 RFU was used. Single peaks over 200 RFU at any locus were declared as homozygous based on internal validation as having the probability of allelic drop-out of 0.01 (data not shown). Stutter thresholds were the default values provided by the manufacturer. Profiles were judged to be high quality if (1) over 24 alleles were detected, (2) the average heterozygous balance were above 60%, (3) fewer than two allelic drop-ins were present, and (4) fewer than four loci had stutter percentages over 15%. GeneMapper ID data were exported to Microsoft Excel.

2.4. Statistical analysis

All comparisons between different dilution factors, presumptive tests, substrates, and stain ages were carried out using Bayesian credible intervals. A 95% credible interval signifies a 95% probability that the true value lies in that interval. Non-overlapping credible intervals suggest a low probability of the means taking the same values between the groups, i.e. a significant difference in frequentist statistics. However, Bayesian credible intervals are superior to the frequentist confidence intervals, as credible intervals can directly provide probabilistic statements of the posterior distribution given the data accumulated [28,29]. Additionally, Bayesian estimates are robust to outliers, which make the method suitable for the sample size of ten per treatment used in this study.

Bayesian 95% credible intervals of the means were calculated from 20000 iterations with non-informative priors using the yarr package in R [30]. The effect of presumptive tests on the resulting alleles recovered and peak heights obtained were calculated by constructing the posterior probability distribution of the differences in means between the untreated samples and the presumptively-tested samples on the same substrates. This was calculated using the BEST package in R [29], with a burn-in length and sampling length of 20,000 iterations each. Differences in means that are farther away from zero shows a more credible difference between the compared groups.

3. Results

3.1. Preliminary testing of pre-PCR dilution protocol

Initially, the possibility of direct amplification from the three target body fluids (known blood, semen, and saliva samples from three known donors) on cotton fabrics were evaluated using typical direct PCR protocol and by following the method of Kitpipit et al. [27,31]. Overall, more than fifty STR profiles were generated with various conditions, e.g. punch size, dilution buffer volume, amount of pre-PCR solution added to a PCR reaction, and PCR cycles. The STR profiles were in full concordance with the donors' reference profiles. However, a typical direct PCR protocol, i.e. cutting or punching the stain into the PCR reaction directly, yielded over-amplified profiles and split peaks even with punch sizes of less than 1 mm in a half-reaction volume. Low intra- and inter-locus balances were also obtained. On the other hand, some samples processed using the dilution protocol showed more balanced profiles with less over-amplified peaks and stutter peaks. As such, we chose to proceed with further optimizations using the dilution protocol.

3.2. Direct-STR typing from untreated biological fluids transferred to filter papers

Instead of cutting or punching the body fluid stains (blood, semen, and saliva) directly, the stains on different substrates were scraped with the folded edge of a sterile filter paper. By visual inspection, only traces (less than 0.5 μ L) of the original stain was transferred to the filter paper. Overall, preliminary results showed high rate of successful DNA amplification from the filter papers. However, the obtained STR profiles showed over-amplified peaks in almost all samples (data not shown), suggesting too much DNA template. Additional optimizations were performed by diluting the pre-PCR solutions with deionized water by 1:3, 1:5, and 1:10, before further analysis. Some undiluted pre-PCR solutions were omitted due to poor results in the preliminary study.

Fig. 1 shows the STR amplification results from all filter papers used to scrape the three body fluids on different substrates ($N=270$, double asterisk marked no amplifications performed). For all body fluids, diluting the pre-PCR solution with deionized water at 1:3 ratio was selected for direct-STR typing from untreated samples on all substrates. Samples amplified using the optimized dilution ratio (1:3 dilution) yielded average number of alleles obtained of 31 alleles and 86 full STR profiles from a total of 90 samples (95.6%).

All blood and saliva samples on all substrates prepared in this way provided full STR profiles (100%) with highest peak heights compared to other dilutions. For semen, nine full profiles and one high partial profile were obtained from 1:3 diluted pre-PCR solutions on cotton fabric (90%). On tissue paper, 1:3 diluted pre-PCR solutions gave seven full STR profiles and three low partial profiles (70%). The partial profiles obtained from semen had lower peak heights when compared with the full profiles, which was evident as the clusters of data at or near zero in Fig. 1. No inhibition pattern was observed. Thus, the partial profiles were likely due to insufficient DNA transferred to the filter paper.

Based on this optimization experiment, the 1:3 dilution protocol was selected for further studies.

3.3. Direct-STR typing from presumptively-tested biological fluids

Body fluid stains were subjected to various presumptive tests using an indirect approach, i.e. stains were scraped with folded filter papers then the filter papers were subjected to presumptive test. The resulting STR profiles showed that each presumptive reagent and substrate differently affected the profile quality obtained, both in terms of peak heights and alleles recovered. Overall, we were able to consistently produce high quality STR profiles from presumptively-tested body fluid stains using the dilution protocol. Of 210 amplifications across six presumptive tests and five substrates, 145 (69%) samples yielded full profiles. If one considered only the luminol test for blood, acid phosphatase for semen, and Phadebas for saliva, the percentage of full profiles increased to 82% (74/90 samples). Fig. 2 shows a typical full STR profile and a partial profile obtained in this study.

Fig. 3 shows the number of alleles recovered and the peak heights of STR profiles typed from presumptively-tested samples. For blood presumptive tests, full profiles were obtained from 35/40 (88%), 31/40 (78%), 20/40 (50%), and 20/40 (50%) samples for luminol, Hemastix, LMG, and KM, respectively. Luminol provided the highest alleles and peak height across all substrates, followed by Hemastix, LMG, and KM. Lower number of alleles and peak heights were observed from tissue paper, wood, and knife blade as compared to cotton fabric. However, the effect of substrate could not be separated from the presumptive reagents. For example, peak heights of profiles generated from bloodstains on knife blade were the lowest when tested with luminol, Hemastix, and KM, but not for LMG.

For saliva stains on cotton fabrics, tissue paper, and aluminum cans, full STR profiles were obtained from 22 of 30 (73%) filter paper samples that had been tested with Phadebas paper. All the eight partial profiles were from stains on tissue paper, demonstrating the effect of substrate on the resulting STR profile.

For semen stains, 17 of 20 (85%) of filter paper samples tested with AP reagents yielded full STR profiles. The other three STR profiles were missing only one allele and they were all from tissue paper.

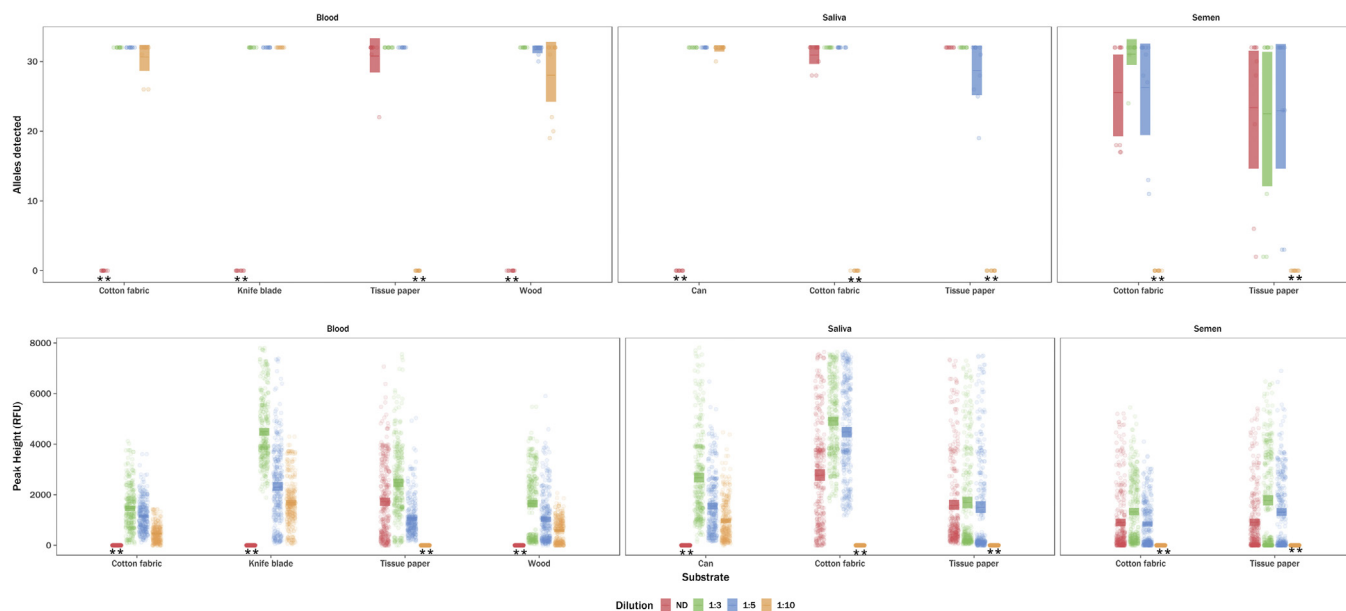


Fig. 1. Optimization results for untreated body fluids amplified using direct PCR from varying concentrations of pre-PCR solutions ($N=10$ per treatment). Each body fluid was deposited onto different substrates. The number of correct alleles detected and the peak heights are shown. Each dot represents one datum (number of allele in a profile or one peak height). The solid color lines show the means and the solid color blocks show the 95% Bayesian credible intervals. Non-overlapping intervals indicate significant difference. Double asterisks indicate no STR typing performed in that treatment.

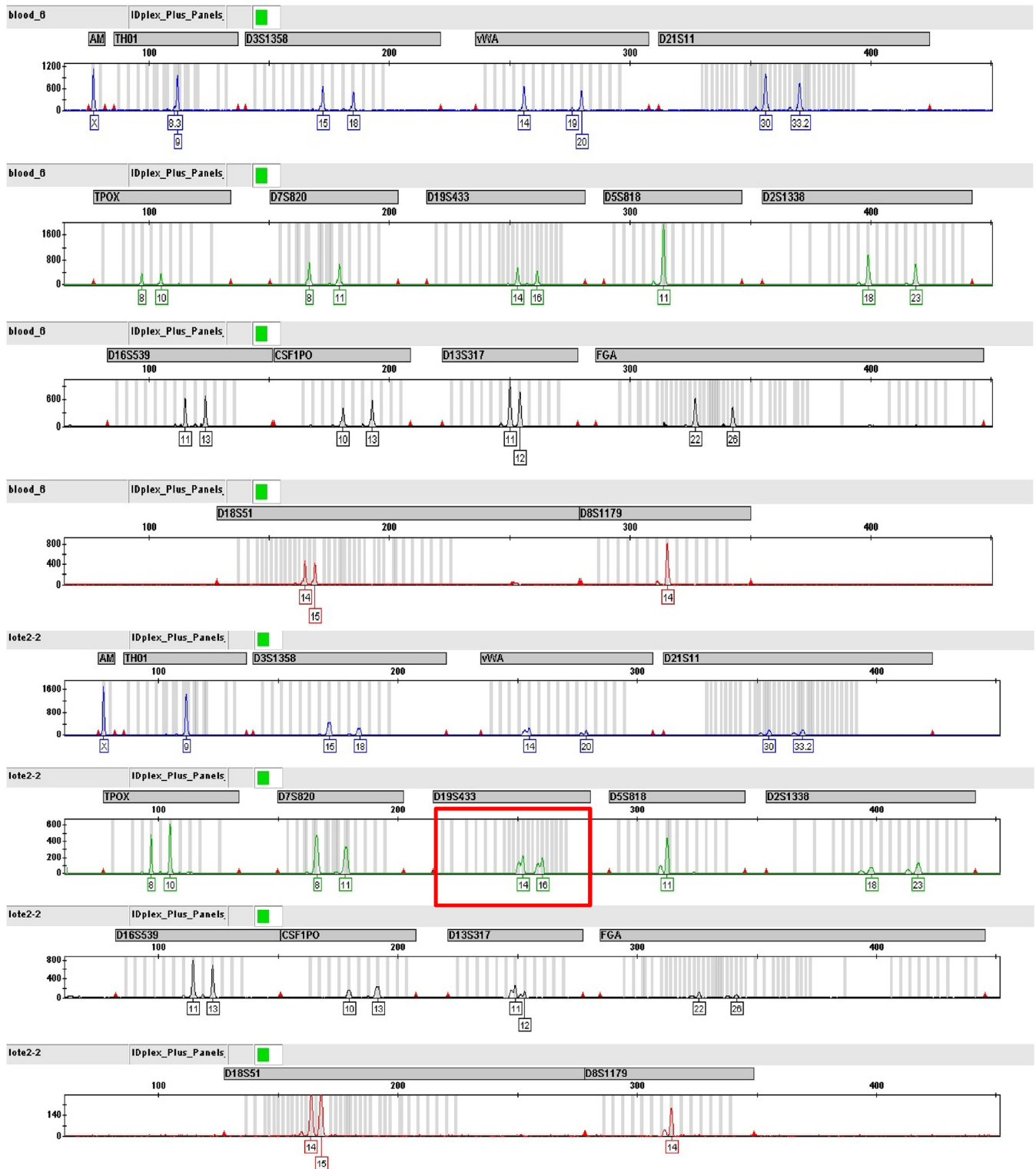


Fig. 2. (A) A typical full profile obtained from a presumptively-tested sample. This profile shows all 32 alleles correctly typed with no artifact present. (B) A partial profile showing signs of inhibition and other artifacts from direct STR typing of blood tested with KM reagent.

In order to investigate the effect of each presumptive test and substrate on the direct STR profiles generated with the proposed dilution protocol, we calculated the difference in means of number of alleles and the peak heights between the untreated samples and the presumptively-tested samples. Fig. 4 shows that luminol, AP reagents, and Phadebas paper (except when testing from filter paper scrapes of tissue paper) had no significant effect

on the number of alleles recovered. With bloodstains, KM and LMG tests had a more pronounced negative effect on the resulting STR profiles compared to luminol and Hemastix. These samples showed significant reductions in the number of alleles detected. Additionally, the effect of substrate was evident – all body fluid stains on cotton fabrics yielded full profiles while knife blade, wood, and tissue paper reduced the number of alleles recovered.

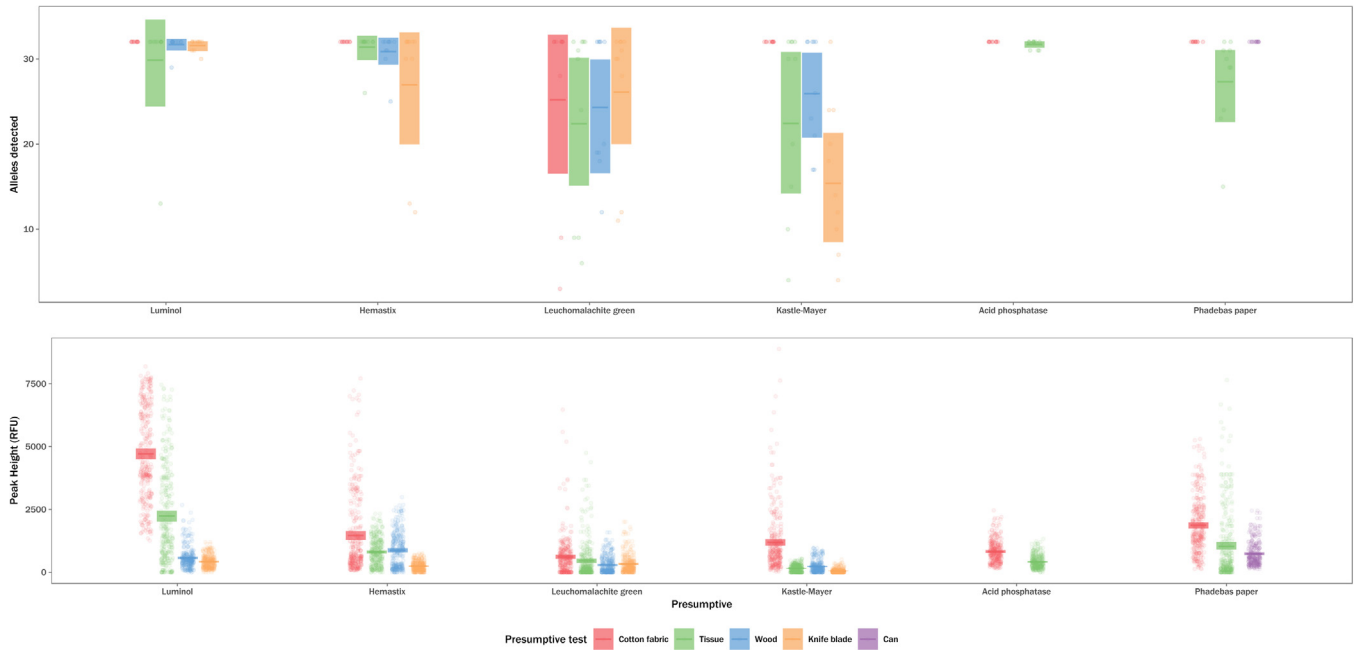


Fig. 3. The numbers of allele and peak heights of STR profiles from blood, saliva, and semen samples on various substrates that had undergone various presumptive testing ($N = 10$ for each treatment).

The reduction in the number of alleles recovered correlated with a larger decrease in peak heights.

In terms of peak heights, all presumptive tests decreased the peak heights of the STR profiles obtained, except for Phadebas paper test from saliva stains on tissue paper and luminol test from bloodstains on cotton fabric. Interestingly, all presumptive tests for blood reduced the peak heights obtained almost equally (i.e. the differences in means of peak heights were highly similar in Fig. 4), but only KM and LMG reduced the number of alleles recovered.

3.4. Effect of stain age on direct-STR typing from presumptively-tested samples

Fig. 5 shows the number of alleles recovered and the peak heights from presumptively-tested stains of different ages ($N = 80$). As expected, increasing stain age resulted in reduced number of alleles recovered and peak heights. Full STR profiles were obtained from up to 30-day old blood and saliva stains and 90-day old semen stains. Older stains yielded more partial profiles, except for saliva

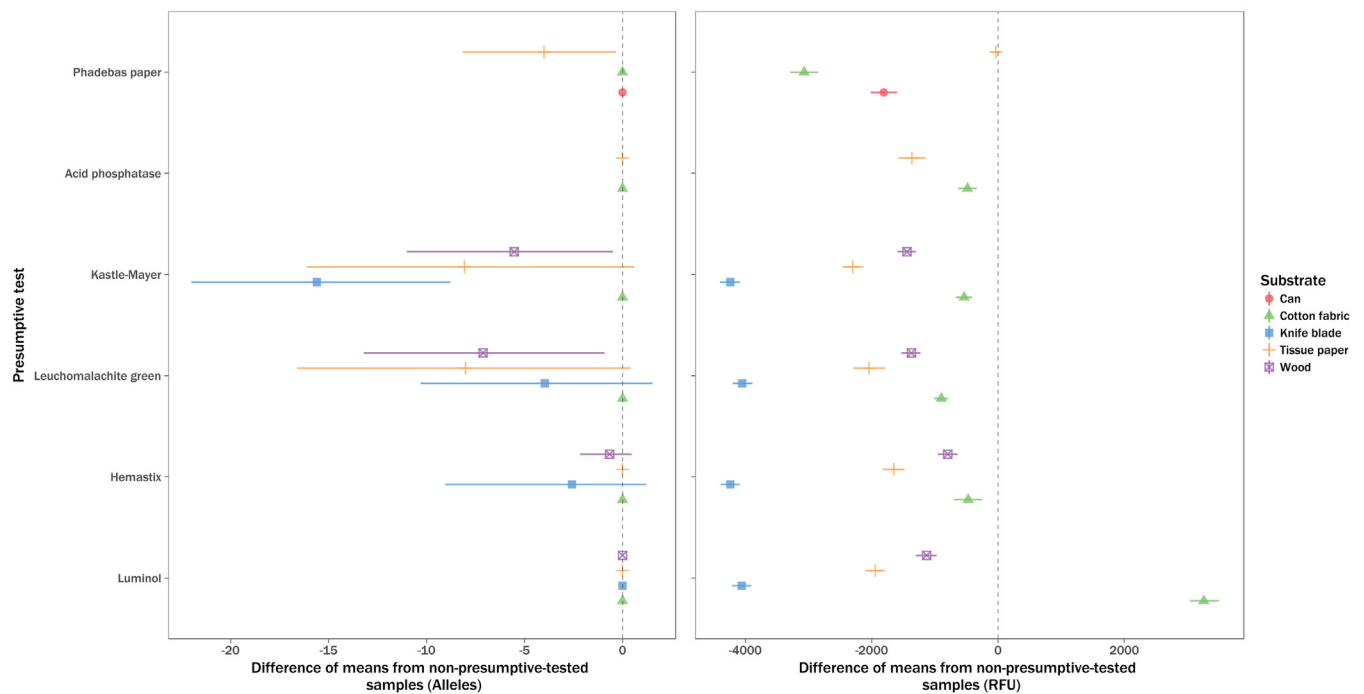


Fig. 4. The means and 95% Bayesian credible intervals of the differences in means between untreated samples and presumptively-tested samples on the same substrates. Both differences in alleles and peak heights are shown. Credible intervals not overlapping zero suggest high credibility in the differences (i.e. $p < 0.01$ in frequentist statistics). Negative values show that untreated samples resulted in higher alleles and peak heights and vice versa.

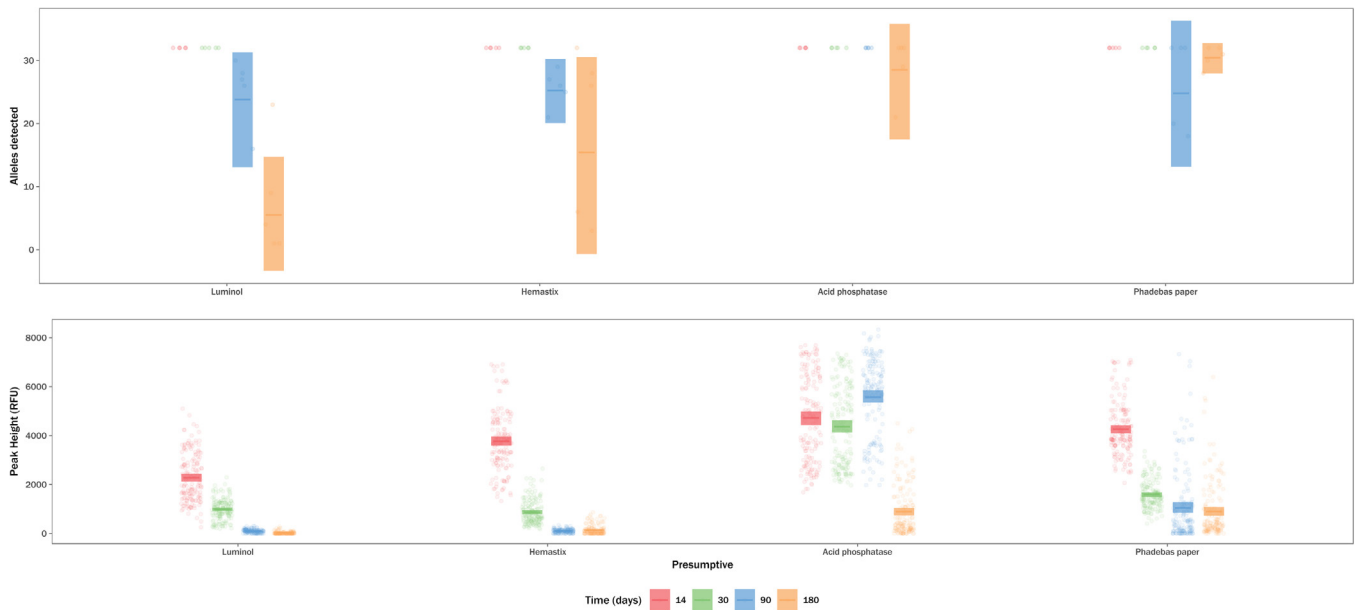


Fig. 5. The numbers of allele recovered and peak heights of STR profiles from blood, saliva, and semen samples of different age that had undergone presumptive testing and subjected to direct PCR ($N=5$ per treatment).

samples, of which the 180-day old samples provided higher number of allele than 90-day old samples.

3.5. STR artifacts and controls

Of the total 620 STR amplifications performed in all parts of this study (560 samples, 12 negative collection controls, 24 amplification negative controls and 24 amplification positive controls), we observed 156 profiles with pull-ups; 33 profiles with stutters whose peak heights were over 15% of corresponding peaks; 30 profiles with split peaks; 24 allelic drop-ins and the occasional expected dye blobs. Comparing the profiles generated from optimized protocols, presumptive tests did not increase the incidences of any particular artifact (38% vs. 32% of all profiles with at least one artifact in untreated samples and presumptively-tested samples, respectively). If pull-ups were discounted, the percentages came down to 12% and 6%. Almost all pull-ups, high stutters, split peaks, drop-ins, and dye blobs were from unoptimized reactions and they did not interfere with calling the correct alleles in the optimized conditions and in the study of presumptive tests.

Judging from the STR profile characteristics of the four partial profiles obtained with the optimized protocols (1:3 dilution; $N=90$), all exhibited allelic/loci drop-outs consistent with insufficient DNA. The partial profiles from the presumptive test experiment were mainly due to insufficient DNA (47/65 profiles) and also due to PCR inhibition or DNA degradation (18/65 profiles). About half of the inhibited or degraded profiles (8/18 profiles) were from Phadebas-treated samples.

There was no evidence of contamination in the negative controls, and all positive controls yielded full STR profiles.

4. Discussion

In this study, an efficient direct amplification protocol for the three common body fluids (blood, semen, and saliva) on their relevant substrates was successfully developed. High quality full STR profiles were obtained from all body fluid samples when

appropriate dilutions were used. The method was also applied to presumptively-tested body fluid stains, and a high amplification success rate was obtained across all substrates. As only minimal sample amount ($<0.5 \mu\text{L}$) is required to be transferred to the filter paper, forensic scientists could use the indirect presumptive testing method even on any stain size. Our developed protocol also opens up the possibility of STR profiling from these filter papers, which are normally discarded during standard presumptive testing protocol. Combined with direct amplification, the possibility of receiving a useable STR profile from crime scene evidence is also increased as no DNA is loss through the extraction process.

Both presumptive test reagents and substrates were found to affect the STR profile quality. The only other study that investigated the possibility of direct STR typing from presumptively-tested samples was carried out with the five loci non-standard ParaDNA[®] rapid platform [7]. Our dilution protocol achieved more complete STR profiles from the same treatment condition (i.e. same reagents on cotton fabric) even with a full STR panel of 16 loci. The results also agree with studies that include a DNA extraction step prior to STR typing. Among the blood presumptive tests, luminol had the least negative effect [2,8,9,31]. The Hemastix test only slightly affected the STR profiles in this study. However, the obsolete benzidine test, of which the Hemastix is based on, had been shown to speed-up DNA degradation [2]. This means that either the 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) in Hemastix did not interfere with STR amplification (as shown in [5] with conventional DNA typing) or our dilution protocol overcame the slight inhibitory effect of Hemastix. Also, unlike the other three tests and the obsolete benzidine test, Hemastix is not sprayed or applied directly to the filter papers, which minimizes the transfer of the reagents onto the filter paper. KM and LMG tests severely affected the STR profiles obtained in this study and in other previous studies [5]. It could be due to the chromogens interfering with fluorescent detection, but more likely the adverse effects were due to hydrogen peroxide and the pH of the reagents. Luminol, KM, and LMG tests involves the use of hydrogen peroxide, a strong oxidizer that induces DNA strand breakages [32], but hydrogen peroxide is used as part of the luminol formulation itself while KM and LMG tests

call for direct droppings of hydrogen peroxide onto the suspected bloodstains. The high pH in KM and LMG reagents (pH 9 and 13, respectively) could also have contributed to both denaturation and degradation of DNA via deprotonation and hydrolysis of phosphodiester bonds [33].

In this study, the Phadebas test and AP test only slightly affected STR profile quality when compared to untreated samples. Two limited studies on the effect the Phadebas press test on DNA analysis showed no inhibition from treated samples [34,35], while our Phadebas-treated samples showed STR profiles consistent with PCR inhibition or degradation. This difference could be due to the direct PCR protocol used in our study. As for semen stains, Phillips et al. observed slight decrease in DNA amount when suspected semen stains were tested with AP reagents [26]. Lewis et al. also found detrimental effects of AP tests on semen stains from various fabrics as well as when spiking the reagents onto extracted DNA [10]. However, our preparation method achieved a higher number of alleles recovered, which is probably due to the dilution of AP reagents and omission of the inefficient DNA extraction process [16,17].

Previous studies have shown that substrates affect the amount of DNA recovered from stains, using conventional DNA extraction [24,25] and direct PCR [18,20,22], but they were not performed on presumptively-tested samples. We initially expected that untreated samples deposited on non-porous substrates (e.g. knife blade and aluminum can) to yield higher peak heights or more alleles compared to porous substrates, given that the same dilution factor was used. Our data indicated that one dilution factor (1:3) could accommodate the different substrates and body fluids. We assumed that the dilution protocol helped to normalize the differences in characteristics between the substrates, but still high variations in peak heights were observed. This could be due to (1) variation in the amount of sample transferred through scraping, (2) variation in the amount of presumptive reagent added, and (3) person-to-person variation in the number of cells. An interaction between the body fluids and the substrates was also observed. For example, cotton fabric and tissue paper yielded similar peak heights for blood and semen, while higher peak heights were seen from cotton fabric for saliva. Phillips et al. demonstrated that the amount of DNA recovered from AP-tested semen stains differed for different substrates [26], and Hedman et al. suggested that less absorbent or inert substrates are more prone to transfer cells and DNA to Phadebas paper [11]. The addition of presumptive reagents did not change the trend observed in the untreated samples of semen and saliva. In the case of blood, knife blade now resulted in the lowest peak heights. As the same amount of presumptive reagents was used regardless of the substrates, the reduced peak heights could be due to the increased interactions between the higher volume of blood in the filter paper scraped from knife blade than from other substrates.

Aged stains kept in our evidence examination room conditions (i.e. unregulated temperature and humidity) could be scraped, presumptively-tested, subjected to direct PCR, and still yielded high partial profiles. This confirmed that our direct STR typing protocol from presumptively-tested filter papers could be applied to a casework scenario in which the crime is found or reported after some time has passed. It is presumed that stains properly stored in cold conditions should be able to yield higher quality profiles because degradation is slower at lower temperature. We did not test stains that had been subjected to presumptive tests and kept for long period, as this is not a typical workflow for our forensic laboratory. We surmised that higher success rates of semen at later time-points compared to blood and saliva was due the additional DNA being released through degradation of the acrosomes.

Two main factors could account for the successful generations of STR profiles in this study: the combined use of PBS and heat in

the dilution protocol and the proprietary buffer and polymerase in the STR amplification kit. Compared to the direct protocol commonly used in forensic DNA analysis, the dilution protocol provided a higher amplification efficiency and success rate according to our preliminary experiments. This finding agrees with previous studies by Kitpipit et al. [27,36] on a variety of wildlife forensic samples and meat species in food. The use of PBS could help to dilute the PCR inhibitors present in the body fluids (e.g. heme) and the presumptive test reagents, as well as neutralize the pH of the reagents and maintain it during PCR cycles [27]. No dithiothreitol was necessary for direct PCR from semen, a finding that agrees with Tobe et al. who showed that the PCR process was enough to lyse spermatozoa [18]. Compared with Tobe et al.'s direct protocol, the developed indirect-dilution protocol here achieved lower number of full STR profiles from semen stains, but our protocol is less destructive. The apparent gap in the peak heights between the full and partial STR profiles (Fig. 1) suggests variation in scraping from dried stains, which could be improved upon by slightly wetting either the stain or the filter paper. Additionally, the IDplex Plus kit is also highly resistant to inhibitors [37]. These reasons could account for the higher success rates in this study as compared with Gray et al., who performed direct PCR from mock casework bloodstains and achieved full STR profiles from 80% of samples [22]. However, it must be kept in mind that Gray et al. used over 40 substrates for the mock casework samples.

The strength of this study lies in the development of a simple, single protocol that could be used on the three common body fluid stains with no change to standard presumptive testing protocol. The multiple factors investigated also contributed to the understanding of the process of direct PCR and effect of presumptive tests and substrates on STR profiles. Using the same 10 volunteers for each presumptive test and substrate allows a robust comparison as it minimizes between-group variations while acknowledging that some variations in the number of cells per mL of body fluid exist. Further studies on more substrates commonly found in crime scenes, such as synthetic fabrics, as well as other presumptive test reagents, such as Hemident™ and Combur3 Test E for blood or the SERATEC PSA kit for semen, should provide a more complete picture and help forensic practitioners decide on a presumptive test for his or her laboratory.

5. Conclusion

This study developed a direct STR typing protocol from untreated and presumptively-tested biological evidence and investigated the effects of different presumptive tests, substrates, and stain age on the STR profiles. High quality profiles were consistently obtained, proving that direct STR typing from minute amount of sample, even in the presence of presumptive test reagents, was possible. The best presumptive blood test in this research was luminol. It did not interfere with the generation of STR profiles. Hemastix slightly affected the STR profiles but is easier to use and carry. Acid phosphatase test did not reduce the number of alleles detected, and Phadebas paper only slightly reduced the number of alleles detected when used with tissue paper. The characteristics of the substrates also affected the STR profiles obtained, but there was no clear trend (e.g. smooth non-porous surface did not always yield lower quality profiles). As for stain age, older stains resulted in more allelic drop-outs – but useable profiles were sometimes obtainable up to 180 days even in the presence of presumptive reagents. In conclusion, forensic laboratories can use the information from this study and the developed protocol to make informed decisions whether to employ presumptive testing and whether they want to follow up with a direct PCR from the filter paper used during presumptive testing.

Acknowledgements

This work was supported by the Faculty of Science Research Fund, Faculty of Science, Prince of Songkla University [grant number 160002]. iScience Technology Co., Ltd., Thailand, donated the Qiagen IDplex Plus kits for this study. The Department of Molecular Biology and Bioinformatics, Faculty of Science, Prince of Songkla University provided access to equipment. We also acknowledge the help of Pol. Col. Watee Asawutmangkul, Pol. Col. Weawgarn Duangshatome, and Pol. Capt. Sukanya Phetpeng.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.06.001>.

References

- [1] K. Virkler, I.K. Lednev, Analysis of body fluids for forensic purposes: from laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene, *Forensic Sci. Int.* 188 (2009) 1–17.
- [2] J.P. De Almeida, N. Glesse, C. Bonorino, Effect of presumptive tests reagents on human blood confirmatory tests and DNA analysis using real time polymerase chain reaction, *Forensic Sci. Int.* 206 (2011) 58–61.
- [3] H. Poon, J. Elliott, J. Modler, C. Fregeau, The use of Hemastix and the subsequent lack of DNA recovery using the Promega DNA IQ system, *J. Forensic Sci.* 54 (2009) 1278–1286.
- [4] E. De Vittori, F. Barni, S.W. Lewis, G. Antonini, C. Rapone, A. Berti, Forensic application of a rapid one-step tetramethylbenzidine-based test for the presumptive trace detection of bloodstains at the crime scene and in the laboratory, *Forensic Chem.* 2 (2016) 63–74.
- [5] S.S. Tobe, N. Watson, N.N. Daeid, Evaluation of six presumptive tests for blood their specificity, sensitivity, and effect on high molecular-weight DNA, *J. Forensic Sci.* 52 (2007) 102–109.
- [6] F. Barni, S.W. Lewis, A. Berti, G.M. Miskelly, G. Lago, Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection, *Talanta* 72 (2007) 896–913.
- [7] G.E. Donachie, N. Dawnay, R. Ahmed, S. Naif, N.J. Duxbury, N.D. Tribble, Assessing the impact of common forensic presumptive tests on the ability to obtain results using a novel rapid DNA platform, *Forensic Sci. Int. Genet.* 17 (2015) 87–90.
- [8] C.J. Jakovich, STR analysis following latent blood detection by luminol fluorescein, and BlueStar, *J. Forensic Ident.* 57 (2007) 193–198.
- [9] A.M. Gross, K.A. Harris, G.L. Kaldun, The effect of luminol on presumptive tests and DNA analysis using the polymerase chain reaction, *J. Forensic Sci.* 44 (1999) 837–840.
- [10] J. Lewis, A. Baird, C. Mcalister, A. Siemieniuk, L. Blackmore, B. McCabe, P. O'rouke, R. Parekh, E. Watson, M. Wheelhouse, N. Wilson, Improved detection of semen by use of direct acid phosphatase testing, *Sci. Justice* 53 (2013) 385–394.
- [11] J. Hedman, K. Gustavsson, R. Ansell, Using the new Phadebas[®] Forensic Press test to find crime scene saliva stains suitable for DNA analysis, *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser. 1* (2008) 430–432.
- [12] H. Altshuler, R. Roy, Evaluation of direct PCR amplification using various swabs and washing reagents, *J. Forensic Sci.* 60 (2015) 1542–1552.
- [13] D.E. Hall, R. Roy, An evaluation of direct PCR amplification, *Croat. Med. J.* 55 (2014) 655–661.
- [14] M. Caputo, M.C. Bobillo, A. Sala, D. Corach, Optimizing direct amplification of forensic commercial kits for STR determination, *J. Forensic Leg. Med.* 47 (2017) 17–23.
- [15] S. Verheij, J. Hartevelde, T. Sijen, A protocol for direct and rapid multiplex PCR amplification on forensically relevant samples, *Forensic Sci. Int. Genet.* 6 (2012) 167–175.
- [16] A. Colussi, M. Viegas, J. Beltramo, M. Lojo, Efficiency of DNA IQ System[®] in recovering semen DNA from cotton swabs, *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Series 2* (2009) 87–88.
- [17] R. Kishore, W. Reef Hardy, V.J. Anderson, N.A. Sanchez, M.R. Buoncristiani, Optimization of DNA extraction from low-yield and degraded samples using the BioRobot EZ1 and BioRobot M48, *J. Forensic Sci.* 51 (2006) 1055–1061.
- [18] S.S. Tobe, Y.C. Swaran, L. Dennany, U. Sibbing, K. Schulze Johann, L. Welch, M. Vennemann, A proof of principal study on the use of direct PCR of semen and spermatozoa and development of a differential isolation protocol for use in cases of alleged sexual assault, *Int. J. Legal Med.* 131 (2017) 87–94.
- [19] Y.C. Swaran, L. Welch, A comparison between direct PCR and extraction to generate DNA profiles from samples retrieved from various substrates, *Forensic Sci. Int. Genet.* 6 (2012) 407–412.
- [20] A. Dargay, R. Roy, Direct Y-STR amplification of body fluids deposited on commonly found crime scene substrates, *J. Forensic Leg. Med.* 39 (2016) 50–60.
- [21] E.L. Romsos, P.M. Vallone, Rapid PCR of STR markers: applications to human identification, *Forensic Sci. Int. Genet.* 18 (2015) 90–99.
- [22] K. Gray, D. Crowle, P. Scott, Direct amplification of casework bloodstains using the Promega PowerPlex^(R) 21 PCR amplification system, *Forensic Sci. Int. Genet.* 12 (2014) 86–92.
- [23] R. Ottens, D. Taylor, D. Abarno, A. Linacre, Successful direct amplification of nuclear markers from a single hair follicle, *Forensic Sci. Med. Pathol.* 9 (2013) 238–243.
- [24] T.J. Verdon, R.J. Mitchell, R.A. Van Oorschot, Swabs as DNA collection devices for sampling different biological materials from different substrates, *J. Forensic Sci.* 59 (2014) 1080–1089.
- [25] S. Phetpeng, T. Kitpipit, P. Thanakiatkrai, Systematic study for DNA recovery and profiling from common IED substrates: from laboratory to casework, *Forensic Sci. Int. Genet.* 17 (2015) 53–60.
- [26] Z. Phillips, J. Kenline, M. Donley, R. Kahn, The effects of acid phosphatase mapping on DNA recovery, 22nd International Symposium on Human Identification, MD, USA, 2011.
- [27] T. Kitpipit, W. Chotigeat, A. Linacre, P. Thanakiatkrai, Forensic animal DNA analysis using economical two-step direct PCR, *Forensic Sci. Med. Pathol.* 10 (2014) 29–38.
- [28] J.K. Kruschke, Bayesian data analysis, *Wiley Interdisciplinary Reviews. Cognitive Science*, 1(2010), pp. 658–676.
- [29] J.K. Kruschke, Bayesian estimation supersedes the *t*-test, *J. Exp. Psychol. Gen.* 142 (2013) 573–603.
- [30] N.D. Phillips. Yarr! The pirate's guide to R, <http://thepiratesguidetor.com>, Online, 2016.
- [31] A. Barbaro, P. Cormaci, A. Teatino, A. Barbaro, Validation of forensic DNA analysis from bloodstains treated by presumptive test reagents, *Int. Congr.* 1261 (2004) 631–633.
- [32] N. Driessens, S. Versteijhe, C. Ghaddhab, A. Burniat, X. De Deken, J. Van Sande, J. E. Dumont, F. Miot, B. Corvilain, Hydrogen peroxide induces DNA single- and double-strand breaks in thyroid cells and is therefore a potential mutagen for this organ, *Endocr. Relat. Cancer* 16 (2009) 845–856.
- [33] M. Ageno, E. Dore, C. Frontali, The alkaline denaturation of DNA, *Biophys. J.* 9 (1969) 1281–1311.
- [34] N. Roda, S.B. Lee, B. Barloewen, T. Mehmet, DNA typing compatibility with a one step saliva screening test, *Themis: Res. J. Justice Stud. Forensic Sci.* 2 (2014).
- [35] J. Hedman, E. Dalin, B. Rasmusson, R. Ansell, Evaluation of amylase testing as a tool for saliva screening of crime scene trace swabs, *Forensic Sci. Int. Genet.* 5 (2011) 194–198.
- [36] T. Kitpipit, K. Sittichan, P. Thanakiatkrai, Direct-multiplex PCR assay for meat species identification in food products, *Food Chem.* 163 (2014) 77–82.
- [37] D. Mattayat, T. Kitpipit, S. Phetpeng, W. Asawutmangkul, P. Thanakiatkrai, Comparative performance of AmpFLSTR^(R) Identifier^(R) plus PCR amplification kit and QIAGEN^(R) Investigator^(R) IDplex plus kit, *Sci. Justice* 56 (2016) 468–474.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวกฤติกา ระเหม
 รหัสประจำตัวนักศึกษา 5710220013
 วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เคมี-ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2555

ทุนการศึกษา

1. ทุนอุดหนุนการศึกษาเป็นผู้ช่วยวิจัย (Research Assistant) ปีการศึกษา 2557 (สัญญาเลขที่ 1-2557-02-009) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
2. ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ประจำปีงบประมาณ 2558 มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
3. ทุนอุดหนุนการศึกษาเป็นผู้ช่วยสอน (Teaching Assistantship) ปีการศึกษา 2559 ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Thanakiatkrai, P., Raham, K., Pradutkanchana, J., Sothibandhu, S., and Kitpipit, T.
 2017. Direct-STR typing from presumptively-tested and untreated body fluids.
 Forensic Science International: Genetics, 30, 1–9.