การศึกษาปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอจากหยดเลือดบนกระดาษกรองในงานนิติเวช

ธนิตเชษฐ์ เขตคาม[1] และ ทศนัย พิพัฒน์โชติธรรม[2]

[1]สาขานิติเวช โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปทุมธานี 12120

[2]ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปทุมธานี 12120

บทคัดย่อ สาขานิติเวช โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ มีการเก็บหยดเลือดของผู้เสียชีวิตที่เสียชีวิตไม่เกิน 24 ชั่วโมง ลงบนกระดาษกรอง Whatman เพื่อลดพื้นที่ในการจัดเก็บและลดการเน่าเสียของวัตถุพยาน การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างเลือดบนกระดาษซับที่เก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลา 1-5 ปี จำนวน 49 ตัวอย่าง ผลการวัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260/280 nm พบมีความเข้มข้นในช่วง 6.10-200.60 ng/µl และความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอระหว่าง 1.04-1.56 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี real-time PCR พบมีความเข้มข้นดีเอ็นเอในช่วง 0.24-66.32 ng/µl โดยมีค่า degradation index ในช่วง 1.00-5.02 ค่า male degradation index ในช่วง 0.50-1.90 ซึ่งอยู่ในค่ายอมรับได้ แต่มีค่า inhibition index ในช่วง 7.26-34.88 และค่า mixture index ในช่วง 3.61-6.20 ซึ่งมากกว่ากว่าค่ายอมรับได้ ผลการศึกษานี้พบว่าดีเอ็นเอมีแนวโน้มเสื่อมสภาพเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาการเก็บตัวอย่างเลือดบนกระดาษซับที่มากขึ้นในช่วงการศึกษา 1-5 ปี แต่ยังมีปริมาณเพียงพอต่อการนำไปใช้การตรวจพิสูจน์ระบุตัวบุคคล การพัฒนาต่อเนื่องให้มีวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพเพื่อกำจัดสารยับยั้งจะช่วยให้การนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากการเก็บตัวอย่างเลือดบนกระดาษซับไปใช้งานทางนิติเวชได้อย่างมีคุณภาพมากยิ่งขึ้นต่อไป

คำสำคัญ: หยดเลือดบนกระดาษกรอง, การเสื่อมสภาพของดีเอ็นเอ, นิติเวช

Corresponding author E-mail: khetkhamtu@gmail.com

Received: 9 March 2023 *Revised: 23 August 2023* *Accepted: 24 August 2023*

บทนำ

การตรวจพิสูจน์บุคคล เป็นการใช้ความรู้ทางวิทยาศาสตร์แขนงต่าง ๆ เพื่อตรวจพิสูจน์และระบุตัวบุคคลทั้งผู้ที่มีชีวิตและเสียชีวิต โดยใช้ศพ โครงกระดูก ชิ้นเนื้อ และเลือด ตลอดจนคราบต่าง ๆ ที่เป็นสารคัดหลั่งของมนุษย์ เป็นวัตถุพยานทางชีวภาพที่ใช้สกัดดีเอ็นเอเพื่อการตรวจพิสูจน์บุคคลและตรวจหาความสัมพันธ์ทางสายเลือดในครอบครัวเดียวกันและในระดับเครือญาติ ซึ่งการดำเนินการทุกขั้นตอนในกระบวนการตรวจดีเอ็นเอต้องมีความน่าเชื่อถือ แม่นยำ เพื่อนำผลตรวจไปใช้ในกระบวนการยุติธรรมได้ คุณภาพของดีเอ็นเอจึงเป็นสิ่งสำคัญ ดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างต้องมีปริมาณเพียงพอ มีความบริสุทธิ์ และไม่มีสารหรือตัวอย่างอื่นปนเปื้อน สาขานิติเวช โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ ดำเนินการการเก็บตัวอย่างวัตถุพยาน โดยเก็บตัวอย่างเลือดผู้เสียชีวิตที่เสียชีวิตไม่เกิน 24 ชั่วโมง กรณีไม่สามารถเก็บเลือดได้จะเก็บชิ้นส่วนเนื้อเยื่อหรือกระดูกแทน ปัญหาที่พบจากการเก็บตัวอย่างวัตถุพยานทางชีวภาพ ได้แก่ การเสื่อมสลายของตัวอย่าง ที่มีผลต่อคุณภาพของดีเอ็นเอจากปัจจัยต่าง ๆ จึงเป็นข้อจำกัดและปัญหาในกรณีที่ต้องมีการรื้อคดีหรือการตรวจพิสูจน์วัตถุพยานใหม่อีกครั้ง การเน่าเสียของวัตถุพยานที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติระหว่างนำส่งวัตถุพยานให้กับพนักงานสอบสวน และการจัดเก็บวัตถุพยานชนิดหลอดเลือดที่ต้องใช้ตู้เย็นในการจัดเก็บใช้พื้นที่มากและสิ้นเปลืองพลังงานไฟฟ้าในการเก็บรักษา การเก็บตัวอย่างเลือดโดยใช้กระดาษพิเศษ FTA card จึงเป็นทางเลือกที่มีประสิทธิภาพ สามารถเก็บตัวอย่างเลือดจากศพไว้ได้นานมากกว่า 16 ปี[1] แต่มีราคาแพง

ในปี พ.ศ. 2556 สาขานิติเวช โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ เริ่มเก็บหยดเลือดบนกระดาษกรอง Whatman (dried blood spot: DBS) แทนการเก็บในหลอดเลือดและเก็บไว้ในซองสำหรับเตรียมนำส่งให้พนักงานสอบสวนต่อไป เพื่อลดพื้นที่ในการจัดเก็บและลดการเน่าเสียของวัตถุพยาน[2-7] คณะผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์ศึกษาคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างเลือดที่สกัดจากกระดาษกรองดังกล่าว มีช่วงการเก็บรักษา 1-5 ปี เพื่อให้ทราบถึงการเสื่อมสภาพของตัวอย่างดีเอ็นเอในระยะเวลาการเก็บเลือดสำหรับพัฒนามาตรฐานการจัดเก็บวัตถุพยาน

วัสดุและวิธีการ

กลุ่มตัวอย่าง

ตัวอย่างเลือดเก็บจากผู้เสียชีวิตที่เสียชีวิตไม่เกิน 24 ชั่วโมง เก็บรักษา ณ ห้องผ่าศพ สาขานิติเวช โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ระหว่างปี พ.ศ. 2558–2562 ปีละ 10 ตัวอย่าง (เพศชาย เท่ากับ เพศหญิง เท่ากับ 5 ตัวอย่าง) เมื่อครบ 5 ปี ได้ตัวอย่างเลือดจากศพเพศชาย จำนวน 25 ราย และเพศหญิง จำนวน 24 ราย รวม 49 ตัวอย่าง โดยการเก็บตัวอย่างเลือดจากการเจาะหลอดเลือดดำบริเวณขาหนีบ (femoral vein) ปริมาตร 3-5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่มี EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง (EDTA-blood) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเก็บ DBS โดยดูดเลือดจากหลอด EDTA-blood หยดลงบนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 (Cytiva, China) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 70 มิลลิเมตร จำนวน 5 หยด หยดละประมาณ 50 ไมโครลิตร และปล่อยไว้ให้แห้งในอุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บรักษาในอุณหภูมิห้อง (25–30 องศาเซลเซียส)

การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Germany) โดยตัด DBS ขนาด 3×3 มิลลิเมตร จำนวน 1 ชิ้น ต่อ 1 ราย ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทำการสกัดตามวิธีการของคู่มือชุดน้ำยาได้ตัวอย่างดีเอ็นเอ 50 μl และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่สกัดวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer (Biophotometer รุ่น Basic, Eppendorf, Germany) ที่ความยาวคลื่น 230, 260 และ 280 นาโนเมตร[8] จำนวน 3 ครั้ง หาค่าเฉลี่ย

ปริมาณดีเอนเอเป็นนาโนกรัมต่อไมโครลิตร และค่า 230/260 และ 260/280 ratio

การวิเคราะห์คุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธี real-time PCR

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณโดยวิธี real-time PCR โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) ต่อ autosomal short tandem repeat (STR) markers ตรงตำแหน่ง *4NS1C* gene[9,10] ด้วยชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูป Investigator® Quantiplex® Pro Kit (QIAGEN, Germany) และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง real-time PCR (Rotor-Gene®-Pure Detection, QIAGEN, Germany) ซึ่งมี software คำนวนอัตโนมัติสำหรับคุณภาพดีเอ็นเอใน parameter ต่าง ๆ ดังนี้

ค่า degradation index เป็นค่าการเสื่อมสภาพของดีเอ็นเอ) จะเป็นการคำนวณอัตราส่วนระหว่าง human target แบบ large autos ที่มีขนาดของ PCR product เท่ากับ 353 base pair (bp) และ human target แบบ small autos ที่มีขนาดของ PCR product เท่ากับ 91 bp หากมีการแตกหักหรือการเสื่อมสภาพหรือการย่อยสลายของดีเอ็นเอมาก ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอจะมีขนาดเล็ก การคำนวณสัดส่วนของขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดใหญ่และขนาดเล็ก จึงใช้เป็นดัชนีชี้วัดการเสื่อมสภาพหรือการย่อยสลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอในการวิเคราะห์ในแต่ละรอบ โดยมีค่าตั้งอยู่ที่น้อยกว่า 10 (default threshold ≤ 10) ถือว่าดีเอ็นเอไม่มีการเสื่อมสภาพ

ค่า male degradation index เป็นค่าการเสื่อมสภาพของโครโมโซมเพศชาย เป็นการคำนวณอัตราส่วนระหว่างขนาดของ human male target แบบ large autos ที่มีขนาดของ PCR product ที่ 359 bp ที่ human male target แบบ small autos ที่ 81 bp กรณีที่ดีเอ็นเอไม่มีการแตกหักหรือมีการเสื่อมสภาพน้อย ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจะมีขนาดใหญ่ และได้ค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 (default threshold ≤ 10)

ค่า inhibition index เป็นค่าของปฏิกิริยายับยั้ง PCR โดยวัดจากค่า internal PCR control ที่มีขนาดของ PCR product เท่ากับ 434 bp ควรมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 1 (default threshold ≤ 1)

ค่า mixture index เป็นค่าการปนเปื้อนของดีเอ็นเอ โดยการคำนวณอัตราส่วนระหว่าง human target แบบ large autos ที่มีขนาดของ PCR product เท่ากับ 353 bp และ human male target แบบ large autos ที่มีขนาดของ PCR product เท่ากับ 359 bp ควรมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 2 (default threshold ≤ 2) ถือว่าไม่มีการปนเปื้อนหรือมีการปนเปื้อนน้อยมาก

การใช้สถิติในการวิเคราะห์

ใช้สถิติเชิงบรรยาย (descriptive statistics) ด้วยโปรแกรม microsoft excel for office 365 โดยใช้ค่าเฉลี่ย ค่าสูงสุด และค่าต่ำสุด ของค่าการเสื่อมสลายดีเอ็นเอ (degradation index) ค่าปฏิกิริยายับยั้งพีซีอาร์ (inhibition index) ค่าการเสื่อมสลายของโครโมโซม Y (male degradation index) และค่าการปนเปื้อนของดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ (mixture index)

จริยธรรมการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ทำการยื่นขอจริยธรรมวิจัยในคนมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์ และผ่านการรับรอง เมื่อวันที่ 30 กรกฎาคม พ.ศ. 2563 รหัสโครงการวิจัยที่ 027/2563

ผล

ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ

ค่าเฉลี่ยของปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดจาก DBS วิเคราะห์ด้วยอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสง 260 nm พบว่าความเข้มข้นของตัวอย่างดีเอ็นจาก DBS ที่เก็บในแต่ละปีมีความแตกต่างกัน โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ 6.10 ng/µl และสูงสุดที่ 200.60 ng/µl มีความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอต่ำสุดที่ 1.04 และสูงสุดที่ 1.56 พบความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (260/280 ratio) มีค่าเฉลี่ยในช่วง 1.15-1.29 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค real-time PCR พบว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยเฉลี่ยมีค่าต่ำกว่าวิธีการวัดการดูดกลืนแสง มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ 0.24 ng/µl และสูงสุดที่ 66.32 ng/µl ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่าความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากหยดเลือดบนกระดาษกรอง (DBS) ที่เก็บเป็นระยะเวลา 1 – 5 ปี

DBS Storage duration (year)	UV-VIS spectrophotometer					real-time RCR	
	Concentration (ng/µl)			Purity (260/280)		Concentration (ng/µl)	
	N	Average	Min–Max	Average	Min–Max	Average	Min–Max
5	10	25.76	8.60–49.80	1.19	1.11–1.40	1.89	0.35–4.11
4	10	47.76	14.70–200.60	1.17	1.10–1.34	8.32	0.29–66.32
3	10	26.27	6.60–107.00	1.29	1.12–1.56	3.33	0.85–12.13
2	9	30.07	6.70–153.00	1.15	1.09–1.23	0.94	0.19–2.11
1	10	14.26	6.10–64.60	1.20	1.04–1.50	1.27	0.24–4.01

คุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ พบว่าค่า degradation index มีค่าเฉลี่ยเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาเก็บ DBS ที่นานขึ้น โดยที่ 1 ปี มีค่าต่ำสุดเท่ากับ 1.00 และที่ 5 ปี มีค่าสูงสุดเท่ากับ 5.02 เช่นเดียวกับค่า male degradation index ที่มีค่าเฉลี่ยต่ำสุดเท่ากับ 0.500 เมื่อเก็บ DBS นาน 1 ปี และสูงสุดเท่ากับ 1.901 เมื่อเก็บ DBS นาน 5 ปี ทุกตัวอย่างมีค่าอยู่ในระดับยอมรับได้ (default threshold ≤ 10) ถือว่าดีเอ็นเอมีการเสื่อมสภาพน้อย ค่าเฉลี่ยคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดจาก DBS ดังแสดงในตารางที่ 2

ค่า inhibition index มีแนวโน้มลดลงเมื่อระยะเวลาการเก็บนานขึ้น โดยมีค่าเฉลี่ยต่ำสุดเท่ากับ 7.26 เมื่อเก็บ DBS นาน 1 ปี และสูงสุดเท่ากับ 34.88 เมื่อเก็บ DBS นาน 5 ปี ซึ่งเป็นค่าที่มากกว่าค่ายอมรับได้ (default threshold ≤ 1) เช่นเดียวกับค่า mixture index มีค่าเฉลี่ยต่ำสุดที่ 3.61 และสูงสุดที่ 6.20 โดยเป็นค่าที่มากกว่าค่ายอมรับได้ (default threshold ≤ 2 ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 คุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดจาก DBS เก็บระหว่างปี พ.ศ. 2558–2562 วิเคราะห์โดยเทคนิค real-time PCR แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของ degradation index, male degradation index, inhibition index, และ mixture index

Parameter	Default threshold	DBS storage (years)				
		5	4	3	2	1
Degradation index	≤ 10	5.02	2.10	1.80	1.66	1.00
Male degradation index	≤ 10	1.90	1.50	0.60	0.77	0.50
Inhibition index	≤ 1	7.26	9.91	12.90	12.52	34.88
Mixture index	≤ 2	3.61	4.70	6.20	6.00	5.70

วิจารณ์

การศึกษาความเข้มข้นเฉลี่ยของตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจาก DBS เก็บเป็นเวลา 1-5 ปี (ปี พ.ศ. 2558-2562) พบว่าแต่ละปีมีความแตกต่างกันโดยไม่สัมพันธ์กับระยะเวลา ทั้งนี้ปัจจัยที่มีผลต่อความเข้มข้นของตัวอย่างดีเอ็นเอมาจากความเข้มข้นของเลือดหรือปริมาณเม็ดเลือดขาวของผู้เสียชีวิต ซึ่งในแต่ละคนหรือแต่ละศพจะมีปริมาณที่แตกต่างกัน[11,12] เป็นข้อจำกัด

ของการศึกษานี้ที่ไม่สามารถเปรียบเทียบดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างเลือดของศพเดียวกันมีระยะเวลาเก็บรักษา DBS ต่างกันได้ เนื่องจากมีตัวอย่างที่จำกัดปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก DBS เก็บไว้ 5 ปี พบว่ามีความเข้มข้นด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 6.10 - 200.60 ng/ul และด้วยวิธี real-time PCR อยู่ในช่วง 0.24 ng/µl - 66.32 ng/µl ซึ่งโดยทั่วไปปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่นำไปใช้วิเคราะห์ทางนิติเวชควรอยู่ในช่วง 0.1-0.5 ng/µl[13] จึงจะสามารถตรวจพบ full profile ของการตรวจ short tandem repeat (STR) บนโครโมโซมทั้งหมด 13-24 ตำแหน่ง ตัวอย่างที่มีปริมาณน้อยมาก เรียกว่า trace DNA หรือ touch DNA ที่เก็บตัวอย่างมาจากสถานที่เกิดเหตุ อาจสกัดดีเอ็นเอได้เพียง 0.01 ng/µl แต่ยังตรวจพบ full profile ได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kangsanan W. et al.[14] ทำการเปรียบเทียบชุดน้ำยา Qiagen® Investigation® 24plex QS และชุดน้ำยา ampFISTR® Identifiler® Plus PCR Amplification ในการตรวจตัวอย่างดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 1.0, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.0625 ng/µl พบว่าร้อยละของ allele detection มีค่าลดลงตามความเข้มข้นของตัวอย่างที่ลดลง

เมื่อเก็บตัวอย่าง DBS เป็นเวลานาน อาจเกิดการแตกหักของชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ตามธรรมชาติ พบว่าในช่วงระยะเวลา 1-5 ปี ค่า degradation index (ค่าการเสื่อมสภาพของดีเอ็นเอ) มีค่าเฉลี่ยเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เก็บ โดยที่ 5 ปี มีค่าสูงสุดที่ 5.02 ซึ่งต่ำกว่าค่ายอมรับ (default threshold ≤ 10) แสดงให้เห็นว่าตัวอย่าง DBS ที่เก็บไว้เป็นระยะเวลา 5 ปี มีการเสื่อมสภาพของดีเอ็นเอที่ไม่สูงมาก การเก็บ DBS จากหลอดเลือดที่มี EDTA เป็นสารกันการแข็งตัว มีข้อดีคือ EDTA ยับยั้งการทำงานของ DNase ช่วยปกป้องการทำลายจาก DNase ให้ดีเอ็นเอคงสภาพอยู่ได้ ปัจจัยการเสื่อมสภาพของดีเอ็นเออาจเกิดได้จาก programmed cell death[15] ที่เกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติและมีผลต่อความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ทั้งนี้ตัวอย่างประเภทชีววัตถุพยานจะมีการเสื่อมสภาพของเซลล์หรือการเสื่อมสภาพของดีเอ็นเอซึ่งเป็นเรื่องปกติที่พบได้ แต่จะพบมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น ระยะเวลา ความชื้น แสงแดด อุณหภูมิ และสารเคมี เป็นต้น[16-19] วิธีการเก็บตัวอย่าง DBS ไว้ในที่แห้ง ไม่ชื้น ไม่โดนแสงแดด และอุณหภูมิที่เหมาะสม มีส่วนช่วยรักษาสภาพดีเอ็นเอไม่ให้ถูกทำลาย อย่างไรก็ตามดีเอ็นเอมีการย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติหลังจากการเสียชีวิตหรือเก็บตัวอย่างออกจากร่างกาย จึงเป็นข้อกำหนดให้ผู้วิจัยเก็บตัวอย่างเลือดจากผู้เสียชีวิตที่เสียชีวิตไม่เกิน 24 ชั่วโมง

ค่า male degradation index จากกลุ่มตัวอย่างของเพศชาย ในช่วงระยะเวลาการเก็บ DBS นาน 1-5 ปี จากการศึกษา พบว่ามีค่าเฉลี่ยต่ำสุดที่ 0.50 และสูงสุดที่ 1.90 ซึ่งไม่เกินค่ายอมรับ (default threshold ≤ 10) ทำให้เห็นว่าตัวอย่าง DBS ที่เก็บไว้เป็นระยะเวลา 5 ปี มีการเสื่อมสภาพของดีเอ็นเอที่เป็นโครโมโซม Y ของเพศชายค่อนข้างน้อย แม้มีการแตกหักของชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ตามธรรมชาติ แต่ยังอยู่ในระดับที่สามารถนำไปใช้ในการระบุตัวบุคคลได้ ทั้งในกรณีคดีความผิดทางเพศหรือการหาความสัมพันธุ์ทางสายเลือดร่วมบิดาเดียวกัน

นอกจากนี้ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ถือเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการตรวจทางนิติเวชว่ามีสิ่งปนเปื้อนหรือมีแนวโน้มที่จะเกิดการยับยั้งปฏิกิริยา PCR หรือไม่ โดยความบริสุทธิ์ (260/280 ratio) ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ควรอยู่ในช่วง 1.5-2.0[20] หากต่ำกว่า 1.5 แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้อาจปนเปื้อนโปรตีน และฟีนอล แต่ถ้ามากกว่า 2.0 แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีการปนเปื้อนอาร์เอ็นเอ จากผลการทดลองช่วงระยะเวลา 1-5 ปีที่ผ่านมา พบว่าตัวอย่างทั้งหมดมีความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 1.04-1.56 สอดคล้องกับค่า inhibion indext ที่มากกว่า 1 และ mixture index ที่มากกว่า 2 ซึ่งแสดงว่าตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจาก DBS มีการปนเปื้อนของโปรตีนและ/หรือฟีนอล เนื่องจากตัวอย่างเลือดหรือองค์ประกอบต่าง ๆ ที่มีอยู่ในกระดาษกรองอาจมีสารที่ยับยั้งปฏิกิริยาและ PCR ดังนั้นก่อนการนำตัวอย่างดีเอ็นเอไปทดสอบในขั้นตอนการตรวจทางนิติเวชระดับที่ละเอียดขึ้น ควรทำให้ดีเอ็นเอที่สกัดได้ในครั้งแรกมีความบริสุทธิ์มากขึ้น โดยการทำ re-extraction หรือพิจารณาเลือกชุดสกัด

ที่สามารถกำจัดการปนเปื้อนที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น การศึกษานี้ไม่ได้นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปตรวจวิเคราะห์ STR จึงไม่มีข้อมูลว่าดีเอ็นเอมีคุณภาพเพียงพอกับการตรวจหรือไม่ ซึ่งควรมีการศึกษาต่อในอนาคต

ในการพัฒนากระบวนการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อระบุตัวบุคคลให้มีคุณภาพและประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้น ด้วยวิธีการเพิ่มจำนวนตำแหน่งบนโครโมโซมให้มีความหลากหลายและมีความน่าเชื่อถือมากขึ้น โดยหลักการตรวจเพื่อระบุตัวบุคคลจะเป็นไปตามหลักสากล Combined DNA Index System (CODIS)[21] ซึ่งในปัจจุบันมีการใช้ตัวอย่างเพื่อการสกัดดีเอ็นเอที่หลากหลาย เช่น เลือด เนื้อเยื่อ เส้นผม โครงกระดูก เซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้ม หรือเนื้อเยื่อต่าง ๆ เป็นต้น ทำให้ปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้แตกต่างกัน ทั้งนี้การเลือกชุดน้ำยาสกัดดีเอ็นเอมีส่วนทำให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอมีความเข้มข้นที่พอเหมาะหรือปริมาณน้อยมาก หรือเป็นดีเอ็นเอในกลุ่ม touch DNA หรือ trace DNA ที่เก็บจากผิวสัมผัสที่มีตัวอย่างเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เช่น จากเซลล์ผิวหนังที่หลงเหลืออยู่บนวัตถุหลังจากการสัมผัสหรือหยิบจับโดยไม่ตั้งใจ ในทางปฏิบัติตามห้องปฏิบัติการมีวิธีการแก้ปัญหาด้วยการเพิ่มจำนวนตำแหน่งของ STR ให้มีตำแหน่งมากขึ้นจาก 16 เป็น 19, 24 หรือ 32 ตำแหน่ง เพื่อให้มีความถูกต้องแม่นยำและมีความน่าเชื่อถือเพิ่มขึ้น เนื่องจากอาจมีบางตำแหน่งขาดหายไปหรือเกิด allele drop out ขึ้น เพราะปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้เริ่มต้นมีปริมาณน้อยและส่งผลต่อการแปลผล ดังนั้นการเพิ่มตำแหน่งของ STR จึงเป็นสิ่งสำคัญในการระบุเอกลักษณ์บุคคล[22-27] แต่การเพิ่มตำแหน่ง STR ต้องใช้ชุดทดสอบที่มีราคาสูงขึ้น

เนื่องจากงานวิจัยนี้ไม่มีผลการศึกษาของเลือดที่เก็บใหม่ day 0 จึงทำให้ไม่สามารถตรวจเปรียบเทียบได้ ในแต่ละปีจะมีตัวอย่างเลือดของผู้เสียชีวิตที่ผ่านหลักเกณฑ์การคัดเลือกตัวอย่างที่น้อยดังนั้นเพื่อข้อมูลที่สมบูรณ์ควรมีการคัดเลือกตัวอย่างหรือปรับเกณฑ์การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างใหม่ เพื่อให้ได้จำนวนตัวอย่างที่มากขึ้น ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นการนำตัวอย่างที่มีอยู่มาทำการศึกษา ดังนั้นเพื่อให้งานวิจัยสมบูรณ์ที่สุดผู้วิจัยควรมีการนำตัวอย่างที่เก็บในระยะเวลา day 0 มาตรวจเปรียบเทียบต่อไปในอนาคต

สรุป

จากผลการศึกษาคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอจากหยดเลือดบนกระดาษกรอง พบว่าหยดเลือดที่เก็บไว้บนกระดาษกรองยี่ห้อ Whatman เบอร์ 1 มีช่วงระยะเวลาการเก็บ 1-5 ปี ตัวอย่างทั้งหมดมีการเสื่อมสภาพของดีเอ็นเอในปริมาณน้อย มีปริมาณและคุณภาพเพียงพอต่อการนำไปใช้ในกระบวนการระบุตัวบุคคลสำหรับงานนิติเวชได้ต่อไป โดยมีประเด็นเรื่องความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ต้องพิจารณาวิธีการสกัดหรือวิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่มีผลกระทบจากความปนเปื้อนของดีเอ็นเอ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย ขอขอบคุณ ผศ.นพ.ทศนัย พิพัฒนโชติธรรม ในการตรวจสอบความถูกต้องและให้คำปรึกษา เพื่อให้ผลงานสมบูรณ์ และขอขอบคุณบุคลากรสาขานิติเวช โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ ทุกท่าน สำหรับการให้ความอนุเคราะห์ช่วยเหลือจนงานวิจัยสำเร็จด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Rahikainen AL, Palo JU, de Leeuw W, Budowle B, Sajantila A. DNA quality and quantity from up to 16 years old post-mortem blood stored on FTA cards. Forensic Sci Int 2016; 261: 148-53.
2. Chaisomchit S, Wichajarn R, Chowpreecha S, Chareonsiriwatana W. A simple method for extraction and purification of genomic DNA from dried blood spots on filter paper. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2003; 34(3): 641-5.
3. Choi EH, Lee SK, Ihm C, Sohn YH. Rapid DNA extraction from dried blood spots on filter paper: potential applications in biobanking. Osong Public Health Res Perspect 2014; 5(6): 351-7.

4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Blood collection on filter paper for newborn screening program; approved standard-sixth edition. CLSI document NBS01-A6. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.
5. Lin Z, Suzow JG, Fontaine JM, Naylor EW. A simple automated DNA extraction method for dried blood specimens collected on filter paper. JALA: J Assoc Lab Autom 2005; 10(5): 310-4.
6. Hue NT, Chan ND, Phong PT, Linh NT, Giang ND. Extraction of human genomic DNA from dried blood spots and hair roots. Int J Biosci Biochem Bioinforma 2012; 2(1): 21-6.
7. Fischer A, Lejczak C, Lambert C, Servais J, Makombe N, Rusine J, et al. Simple DNA extraction method for dried blood spots and comparison of two PCR assays for diagnosis of vertical human immunodeficiency virus type 1 transmission in Rwanda. J Clin Microbiol 2004; 42(1): 16-20.
8. Chathirat N. Predicting the UV spectrum of single stranded DNA. Appl Mech Mater 2015; 804: 163-6.
9. US 2014/0234834 A1. Method for quantifying human DNA. Patent Application Publication. [online]. 2014; [16 screens]. Available from: URL: https://patentimages.storage.googleapis.com/fe/3b/41/28b4f9b2bdcbe5/US20140234834A1.pdf.
10. Lee SB, McCord B, Buel E. Advances in forensic DNA quantification: a review. Electrophoresis 2014; 35(21-22): 3044-52.
11. Wilantho A, Mokmak W, Jenwitheesuk E. Genomics DNA extraction from clotted blood of cattle. KKU Vet J 2009; 19(1): 16-29.
12. St Julien KR, Jelliffe-Pawlowski LL, Shaw GM, Stevenson DK, O'Brodovich HM, Krasnow MA, Stanford BPD Study Group. High quality genome-wide genotyping from archived dried blood spots without DNA amplification. PLoS One 2013; 8(5): e64710. (7 pages).
13. Moretti TR, Moreno LI, Smerick JB, Pignone ML, Hizon R, Buckleton JS, et al. Population data on the expanded CODIS core STR loci for eleven populations of significance for forensic DNA analyses in the United States. Forensic Sci Int Genet 2016; 25: 175-81.
14. Kangsanan W, Somboonngern O, Pitileartpanya S, Pipatsatitpong D. Comparisons of DNA analysis using Qiagen® Investigator® 24plex QS kit and AmpFlSTR® Identifiler® Plus PCR amplification kit. Science & Technology Asia 2020; 25(2): 75-85.
15. Nagata S. DNA degradation in development and programmed cell death. Annu Rev Immunol 2005; 23: 853-875.
16. Chadatong P, Lomthaisong K, Muisuk K. The effect of the sunlight on autosomal STR analysis of bloodstains on different types of clothes. In: The 19th National and international graduate research conference; 2018 March 9. Khon Kaen, Thailand: Khon Kaen University; 2018. p. 635-641.
17. Al-Kandari NM, Singh J, Sanger VC. Time-dependent effects of temperature and humidity on quantity of DNA in samples of human saliva, blood and semen in Kuwait. IJPSR 2016; 7(7): 2852-73.
18. Garvin AM, Holzinger R, Berner F, Krebs W, Hostettler B, Lardi E, et al. The forensiX evidence collection tube and its impact on DNA preservation and recovery. BioMed Res Int 2013; 2013: 105797. (7 pages).
19. Agetsuma-Yanagihara Y, Inoue E, and Agetsuma N. Effects of time and environmental conditions on the quality of DNA extracted from fecal samples for genotyping of wild deer in a warm temperate broad-leaved forest. Mamm Res 2017; 62: 201-7.
20. Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. Biotechniques 1997; 22(3): 474-81.

21. Hares DR. Selection and implementation of expanded CODIS core loci in the United States. Forensic Sci Int Genet 2015; 17: 33-4.
22. Zahra A, Hussain B, Jamil A, Ahmed Z, Mahboob S. Forensic STR profiling based smart barcode, a highly efficient and cost effective human identification system. Saudi J Biol Sci 2018; 25(8): 1720-3.
23. Fan GY, Wang DP, Song DL, Zheng XK, Zhu J, Long B. Developmental validation study of a 32-plex STR direct amplification system for forensic reference samples. Forensic Sci Int 2021; 327: 110977. (8 pages).
24. Phua CH, Kitpipit T, Pradutkanchana J, Duangsuwan P, Samai W, Thanakiatkrai P. Direct STR typing from human bones. Forensic Sci Int 2022; 330: 111099.
25. Xiao C, Yang X, Liu H, Liu C, Yu Z, Chen L, et al. Validation and forensic application of a new 19 X-STR loci multiplex system. Leg Med 2021; 53: 101957. (4 pages).
26. Emery MV, Bolhofner K, Winingear S, Oldt R, Montes M, Kanthaswamy S, et al. Reconstructing full and partial STR profiles from severely burned human remains using comparative ancient and forensic DNA extraction techniques. Forensic Sci Int Genet 2020; 46: 102272. (8 pages).
27. Hall CL, Kesharwani RK, Phillips NR, Planz JV, Sedlazeck FJ, Zascavage RR. Accurate profiling of forensic autosomal STRs using the Oxford Nanopore Technologies MinION device. Forensic Sci Int Genet 2022; 56: 102629. (10 pages).

A Study on the Quality and Quantity of DNA from Dried Blood Spots in Forensic Case Work

Thanitchet Khetkham[1] **and Tossanai Pipatchotitham**[2]

[1]*Division of Forensic Medicine, Thammasat University Hospital, Patumtani 12120, Thailand*

[2]*Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine Thammasat University, Patumtani 12120, Thailand*

ABSTRACT The Division of Forensic Medicine at Thammasat University Hospital collected dried blood spots (DBS) on Whatman filter paper from deceased individuals who had died within 24 hours. To reduce sample storage space in collecting biological evidence, sample spoilage and biodegradation, which frequently occur, this study was undertaken aiming to explore the DNA content and quality of 49 DBS specimens that had been kept for 1–5 years. The results showed that DNA concentrations as measured by 260/280 nm absorbances were 6.10-200.60 ng/μL with DNA purity of 1.04-1.56. In addition, as analyzed with real-time PCR, the DNA concentrations were 0.24-66.32 ng/μL. Other DNA quality parameters or indices were found: Degradation index, 1.000-5.020; Inhibition index, 7.266-34.882; Mixture index, 3.613-6.200, and Male degradation index, 0.500-1.901. In conclusion, DNA degradation values increased more over time during the period of 1–5 years, but the DNA quantity was sufficient for forensic human identification. Further development efforts should be made to create a method for effective DNA extraction and inhibitive substance elimination; then the DNA samples extracted from DBS filter paper would be better used in forensic medicine.

Keywords: Dried blood spot on filter paper, DNA degradation, Forensic medicine