RMJ Ramathibodi Medical Journal

Rama Med J | Review Article

การเปรียบเทียบชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่ใช้การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เพื่อวัตถุประสงค์หลากหลายในการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล

จิตติมา โชติวรานนท์[1], บุษบา ฤกษ์อำนวยโชค[1]

[1] ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ ประเทศไทย

การตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการพิสูจน์ความสัมพันธ์ระหว่างบุคคล โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปซึ่งผลิตบนหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอหลายตำแหน่งพร้อมกันในหลอดทดลองหนึ่งหลอดที่ตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมลำดับซ้ำ (Short tandem repeat, STR) ชุดน้ำยาสำเร็จรูปแต่ละชนิดมีความจำเพาะและข้อจำกัดที่แตกต่างกัน การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบจุดเด่นและข้อจำกัดของชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่นิยมใช้ในประเทศไทย จำนวน 8 ชุดน้ำยา (GlobalFiler Express, GlobalFiler™ IQC/GlobalFiler, Verifiler Express, Verifiler Plus, Investigator 24 Plex QS, Investigator 24 Plex Go, Investigator 26 Plex QS และ PowerPlex Fusion6C) รายงานนี้นำเสนอตัวอย่างการใช้งานของชุดน้ำยาสำเร็จรูปจำนวน 3 ชุดน้ำยา จากงานบริการพิสูจน์ความสัมพันธ์บิดา-มารดา-บุตร ของห้องปฏิบัติการมนุษย์พันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล พบว่าการใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่แตกต่างกันมากกว่า 1 ชุดน้ำยา สามารถแก้ปัญหาการแปลผลการตรวจวิเคราะห์ที่มีการกลายพันธุ์หรือพบข้อขัดแย้งได้ในบางสถานการณ์

คำสำคัญ: ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ พิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล เอสทีอาร์โปรไฟล์

Rama Med J: doi:10.33165/rmj.2022.45.1.253355

Received: October 7, 2021 **Revised:** March 9, 2022 **Accepted:** March 24, 2022

Corresponding Author:
บุษบา ฤกษ์อำนวยโชค
ภาควิชาพยาธิวิทยา
คณะแพทยศาสตร์
โรงพยาบาลรามาธิบดี
มหาวิทยาลัยมหิดล
270 ถนนพระรามที่ 6
แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี
กรุงเทพฯ 10400 ประเทศไทย
โทรศัพท์ +66 2201 1369
โทรสาร +66 2201 1267
อีเมล budsaba.rer@mahidol.ac.th

บทนำ

การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอสามารถประยุกต์ใช้ได้หลายวัตถุประสงค์ เช่น การทดสอบความสัมพันธ์บิดา-มารดา-บุตร การพิสูจน์ตัวบุคคลทางนิติวิทยาศาสตร์ การพิสูจน์พลเมืองในการสำรวจสำมะโนประชากร การติดตามผลการปลูกถ่ายไขกระดูกในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว การตรวจพิสูจน์กรณีอุ้มบุญ หรือคดีเกี่ยวกับการค้ามนุษย์ รวมทั้งสามารถใช้การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อพิสูจน์ความสัมพันธ์ระหว่างบุคคล และการพิสูจน์สัญชาติของบุคคล โดยอ้างอิงจากความสัมพันธ์ของสมาชิกในครอบครัว ปัจจุบันชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่นักนิติวิทยาศาสตร์นิยมใช้ในงานบริการมีหลายชนิด ซึ่งการตรวจด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูปแต่ละชุดมีจุดเด่นและข้อจำกัดที่แตกต่างกัน บทความนี้นำเสนอการเปรียบเทียบชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่ห้องปฏิบัติการมนุษย์พันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล ได้ทำการศึกษา ทดสอบการใช้งานและนำมาพัฒนาเป็นงานบริการ

ข้อมูลในบทความปริทัศน์นี้เป็นผลการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอในงานบริการของห้องปฏิบัติการมนุษยพันธุศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล และข้อมูลการทบทวนวรรณกรรมจากเอกสารอ้างอิงต่างๆ

เอกสารโครงการวิจัยนี้ได้รับการอนุมัติดำเนินการวิจัยโดยผ่านการพิจารณาและรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล เลขที่ 2564/319 เมื่อวันที่ 20 เมษายน พ.ศ. 2564

การตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

กระบวนการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอประกอบด้วยหลายขั้นตอน ได้แก่ ขั้นตอนสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างส่งตรวจ วัดปริมาณดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แยกขนาดดีเอ็นเอ วิเคราะห์ผล แปลผลการตรวจ และรายงานผล ปัจจุบันเทคโนโลยีมีการพัฒนาที่หลากหลายและจำเป็นในกระบวนการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ตลอดจนการพัฒนาอุปกรณ์การเก็บตัวอย่าง เช่น การใช้สารละลาย (Lysis buffer) เคลือบบนแผ่นเยื่อกระดาษซึ่งย่อยผนังเซลล์ ทำให้สารพันธุกรรมหลุดออกมานอกเซลล์ และยึดติดกับเยื่อกระดาษบนอุปกรณ์ โดยกระดาษจะทำหน้าที่ปกป้องดีเอ็นเอจากเอนไซม์นิวคลีเอส (Nuclease) การออกซิเดชั่น (Oxidation) ความเสียหายจากรังสียูวี จุลินทรีย์และเชื้อรา[1] ซึ่งเป็นการลดระยะเวลาในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอได้ ในตัวอย่างบางประเภท เช่น เลือดและเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้ม ทำให้สามารถลดขั้นตอนและสารเคมีในการสกัดดีเอ็นเอ วิธีนี้เรียกว่า Direct polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้วิธีเจาะแผ่นเยื่อกระดาษเป็นชิ้นแผ่นวงกลมขนาดเล็ก และนำไปใส่ในหลอดทดลองเพื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณเครื่องหมายพันธุกรรมเป้าหมายในหลอดทดลอง

การตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในห้องปฏิบัติการที่ให้บริการด้านนิติพันธุศาสตร์ปัจจุบันนิยมใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปเพื่อความรวดเร็ว แม่นยำ และง่ายต่อการเปรียบเทียบกับหน่วยงานอื่นทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ บริษัทผู้ผลิตชุดน้ำยาได้พัฒนาชุดน้ำยาสำเร็จรูปสำหรับตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อเพิ่มความสะดวกของผู้ใช้งานและเพิ่มความน่าเชื่อถือของผลการตรวจวิเคราะห์ในตำแหน่งเครื่องหมายพันธุกรรมของการตรวจวิเคราะห์ สำนักงานสอบสวนกลาง หรือ Federal Bureau of Investigation (FBI) ซึ่งเป็นหน่วยงานหนึ่งในสังกัดกระทรวงยุติธรรม ประเทศสหรัฐอเมริกา มีห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการสืบสวนคดีหลายห้องปฏิบัติการ สำหรับห้องปฏิบัติการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และสร้างระบบ CODIS (Combined DNA Index System) สำหรับเปรียบเทียบรูปแบบดีเอ็นเอ (DNA profile) ทางอิเล็กทรอนิกส์ระหว่างแต่ละพื้นที่ได้ ปัจจุบันตำแหน่งการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอตามคู่มือ National DNA Index System (NDIS) Operational Procedures Manual ของห้องปฏิบัติการ FBI (ฉบับที่ 9 เริ่มใช้งานเมื่อวันที่ 1 กรกฎาคม พ.ศ. 2563) ในหัวข้อ 4.2 Standards for Acceptance of PCR DNA Records at NDIS ระบุจำนวนตำแหน่ง PCR ที่จำเป็นและยอมรับได้ สามารถนำเข้าระบบ CODIS ซึ่งประกอบด้วยตำแหน่งเครื่องหมายดีเอ็นเอ

(DNA marker) ที่ตรวจจำนวน 20 ตำแหน่ง (CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, vWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, D1S1656, D2S441, D2S1338, D10S1248, D12S391, D19S433, และ D22S1045)[2] ซึ่งเดิมกำหนดจำนวนตำแหน่งเครื่องหมายดีเอ็นเอขั้นต่ำในการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอจำนวน 13 ตำแหน่ง ส่งผลให้เพิ่มค่าการแยกความแตกต่างระหว่างบุคคล (Power of discrimination)[3-5] ผู้ผลิตจึงได้วิจัยและพัฒนาชุดน้ำยาสำเร็จรูปเพื่อให้มีจำนวนตำแหน่งการทดสอบตามเกณฑ์มาตรฐานสากล

บทความนี้นำเสนอการเปรียบเทียบคุณสมบัติของชุดน้ำยาสำเร็จรูปจำนวน 8 ชุดน้ำยา จากบริษัทผู้ผลิตที่นำเข้ามาจำหน่ายในประเทศไทยและมีจำนวนตำแหน่งเครื่องหมายพันธุกรรมตามเกณฑ์ของระบบ CODIS (ตารางที่ 1)

แนวทางปฏิบัติทั่วไปในกระบวนการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป ต้องคัดเลือกชุดน้ำยาสำเร็จรูปตามคุณลักษณะของเป้าหมายของงาน ซึ่งขั้นตอนที่สำคัญของการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ คือ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง รายละเอียดของขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองมีหลายปัจจัยหลักที่ต้องคำนึงถึง ได้แก่ 1) ความเข้มข้นของดีเอ็นเอตั้งต้น 2) จำนวนรอบในการทำปฏิกิริยา 3) ปริมาตรน้ำยาสุดท้าย และ 4) ระยะเวลาโดยประมาณของการสิ้นสุดปฏิกิริยา รวมทั้งขั้นตอนการแยกขนาดของเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาเพิ่มจำนวนในหลอดทดลอง มีความสำคัญต่อข้อมูลผลการตรวจและการวิเคราะห์ข้อมูล[6]

สำหรับขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง ปัจจุบันสามารถใช้วิธี Direct amplification ซึ่งเป็นการใช้ตัวอย่างส่งตรวจที่เก็บบน Treated paper ที่มี Cell lysis buffer (น้ำยาย่อยเซลล์) เคลือบบนเยื่อกระดาษการ์ดสีชมพู (FTA) ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นสีขาวเมื่อมีตัวอย่างมาสัมผัส ทำให้อำนวยความสะดวกต่อการทำงานให้รวดเร็ว ลดขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้อุปกรณ์เจาะเยื่อกระดาษ (Puncher) ที่นิยมใช้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 ขนาด ได้แก่ ขนาด 1.2 มิลลิเมตร หรือ ขนาด 0.5 มิลลิเมตร ซึ่งขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเยื่อกระดาษที่นำมาใช้ มีผลต่อปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง

ผู้เขียนรวบรวมข้อมูลการใช้งานของชุดน้ำยาสำเร็จรูปจากคู่มือของชุดน้ำยาเกี่ยวกับประเภทตัวอย่าง ความเข้มข้นของดีเอ็นเอตั้งต้น กรณีเป็นสารละลายดีเอ็นเอ ขนาด Punch ของ Treated paper ที่ใช้เก็บตัวอย่างที่นิยมใช้บ่อยในการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็น (เลือดและเยื่อบุกระพุ้งแก้ม) ข้อมูลขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง จำนวนรอบปริมาตรน้ำยาสุดท้าย ระยะเวลาโดยประมาณ ข้อแนะนำการใช้เครื่อง Thermal Cycler (Applied Biosystems) ประเภทและปริมาณสารมาตรฐาน (Size standard) และ Spectral calibration/matrix standard สำหรับเครื่อง Genetic Analyzer (Applied Biosystems) แสดงผลการเปรียบเทียบการใช้งาน (ตารางที่ 2) และได้ใช้ประสบการณ์จากการปฏิบัติงานประจำและจากการวิจัย ในการนำเสนอข้อมูลในรายงานนี้ ตัวอย่างผลของการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยเปรียบเทียบจากตัวอย่างประเภทเลือดหรือเยื่อบุกระพุ้งแก้มที่สกัดจากตัวอย่างโดยตรง จุดเด่นคือ พบความเข้มข้นของดีเอ็นเอสม่ำเสมอทุกครั้งเมื่อนำไปใช้ แต่มีข้อจำกัดคือ ต้องผ่านกระบวนการสกัดและวัดปริมาณดีเอ็นเอ ต้องเจือจางความเข้มข้นให้เหมาะสมก่อนนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างประเภทเลือดหรือเยื่อบุกระพุ้งแก้มบน Treated paper จุดเด่นคือ ลดขั้นตอนลดค่าใช้จ่ายในขั้นตอนการสกัดและวัดปริมาณดีเอ็นเอ และสามารถเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้องได้โดยดีเอ็นเอไม่เสียสภาพ แต่มีข้อจำกัดคือ ความเข้มข้นของดีเอ็นเอไม่สม่ำเสมอ ขึ้นกับความหนาแน่นของเซลล์บนตำแหน่งกระดาษที่เจาะนำตัวอย่างไปใช้ สรุปได้ว่า หากวัตถุประสงค์การตรวจ ต้องการใช้สารละลายดีเอ็นเอร่วมกับการตรวจประเภทอื่นที่ไม่สามารถใช้การเพิ่มปริมาณโดยตรงจากตัวอย่างบน Treated paper เช่น วัตถุพยาน เส้นผม เส้นขน ชิ้นเนื้อ ฟัน กระดูก คราบอสุจิ เป็นต้น การสกัดตัวอย่างเหล่านี้ให้เป็นสารละลายดีเอ็นเอเป็นทางเลือกที่เหมาะสม

การเปรียบเทียบชุดน้ำยาสำเร็จรูป จำนวน 8 ชุด เมื่อนำมาใช้งานพบว่า แต่ละชุดน้ำยาสำเร็จรูปมีจุดเด่นและข้อจำกัดในรายละเอียดที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 3)

RMJ Ramathibodi Medical Journal

ตารางที่ 1. ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับคุณสมบัติของชุดน้ำยาที่นิยมใช้ในงานตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล จำนวน 8 ชุดน้ำยา (Applied Biosystems, QIAGEN, Promega)

ลำดับ	ชุดน้ำยาสำเร็จรูป (บาทต่อหน่วย)	เริ่มจำหน่าย	ปรับปรุงแก้ไขล่าสุด[a]	จำนวน		Sex Marker[b] และ Y-STR (Loci)	Extra Marker[c]	Probability of Identity[d]	Probability of Paternity Exclusion Value[e]	Match Probability[f]	บริษัทผู้ผลิต
				ตำแหน่งเครื่องหมายพันธุกรรม (Loci)	Autosomal STR (Loci)						
1	GlobalFiler Express (2,285)	ตุลาคม 2555	ตุลาคม 2563	24	21	amel+1 Y-STR (DYS391)	Y indel	3.34×10^{-24} (Asian, n = 153)	0.9999999972 (Asian, n = 153)	2.26×10^{-25} (Asian n = 153) (including the Y chromosome loci)	Applied Biosystems (USA)
2	GlobalFiler™ IQC GlobalFiler (2,275)	สิงหาคม 2556	ตุลาคม 2562				Y indel, IQC (quality check)				
3	Verifiler Express (1,615)	ตุลาคม 2559	เมษายน 2564	25	23	amel	Y indel	4.693×10^{-28} (Asian, n = 97)	0.999993438259661 (Asian, n = 97)	-	
4	Verifiler Plus (1,275)	พฤษภาคม 2561	สิงหาคม 2563	27	23	amel	Y indel, IQCS, IQCL (quality check)	-	-	3.09×10^{-28} (Asian-American, n = 376)	
5	Investigator 24 Plex QS (1,400)	-	กุมภาพันธ์ 2564	24	22	amel+ Y-STR (DYS391)	QS1, QS2	-	-	-	QIAGEN (Germany)
6	Investigator 24 Plex Go (1,400)	-	กุมภาพันธ์ 2564	24	22	amel+ Y-STR (DYS391)	QS1, QS2	-	-	-	
7	Investigator 26 Plex QS (1,360)	สิงหาคม 2562	กุมภาพันธ์ 2564	26	23	amel+ Y-STR (DYS391)	QS1, QS2	-	-	-	

ตารางที่ 1. ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับคุณสมบัติของชุดน้ำยาที่นิยมใช้ในงานตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล จำนวน 8 ชุดน้ำยา (Applied Biosystems, QIAGEN, Promega) (ต่อ)

ลำดับ	ชุดน้ำยาสำเร็จรูป (บาทต่อหน่วย)	เริ่มจำหน่าย	ปรับปรุงแก้ไขล่าสุด[a]	จำนวน		Sex Marker[b] และ Y-STR (Loci)	Extra Marker[c]	Probability of Identity[d]	Probability of Paternity Exclusion Value[e]	Match Probability[f]	บริษัทผู้ผลิต
				ตำแหน่งเครื่องหมายพันธุกรรม (Loci)	Autosomal STR (Loci)						
8	PowerPlex Fusion6C (1,252.95)	-	ธันวาคม 2561	27	23	amel+ Y-STR (DYS391, DYS576, DYS670)	-	9.09×10^{-31} (n = 1036 ไม่คำนวณ amelogenin และ Y-STRs)	-	-	Promega (USA)

PCR, polymerase chain reaction; STR, short tandem repeat.

[a] ข้อมูล ณ มิถุนายน 2564

[b] Sex marker เป็นตำแหน่งเครื่องหมายพันธุกรรมที่ใช้ระบุเพศ เป็นตำแหน่งพันธุกรรมของยีน amelogenin

[c] Extra marker Y indel คือ การกลายแบบ Insertion หรือ Deletion ของ polymorphic marker บน Y chromosome

IQC คือ Internal quality control marker เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่ใช้ในการประเมินประสิทธิภาพและสารยับยั้งในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง

QS คือ Quality sensor เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่ใช้ในการประเมินคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้จากขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง

[d] Probability of identity (PI) คือ ความน่าจะเป็นที่บุคคลสองคนที่ถูกเลือกโดยการสุ่มจะมีจีโนไทป์ที่เหมือนกันในตำแหน่งเครื่องหมายพันธุกรรม

[e] Probability of paternity exclusion value (PE) คือ ค่าความน่าจะเป็นโดยเฉลี่ยจากคู่มารดา-บุตรที่เป็นไปได้ทั้งหมด เมื่อเทียบกับบิดาที่เลือกแบบสุ่มจะถูกแยกออกจากความเป็นบิดา (Chakraborty, Stivers และ Zhong, 1996)

[f] Match probability คือ ความน่าจะเป็นที่ดีเอ็นเอของบุคคลที่สุ่มในกลุ่มประชากรมีจีโนไทป์เหมือนกับดีเอ็นเอของบุคคลที่ตรวจ

RMJ Ramathibodi Medical Journal

ตารางที่ 2. ข้อมูลประกอบการใช้งานของชุดน้ำยาสำเร็จรูป จำนวน 8 ชุดน้ำยา (Applied Biosystems, QIAGEN, Promega)

ลำดับ	ชุดน้ำยาสำเร็จรูป	ประเภทตัวอย่าง	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง					ข้อแนะนำการใช้เครื่อง Thermal Cycler	ประเภทและปริมาณ Size Standard สำหรับเครื่อง Genetic Analyzer	Spectral Calibration / Matrix Standard
			ความเข้มข้นของดีเอ็นเอตั้งต้น	ขนาด Punch ของ Treated Paper (mm)	จำนวนรอบ Cycle	ปริมาตรน้ำยาสุดท้าย (µL)	ระยะเวลาการทำปฏิกิริยาโดยประมาณ (นาที)			
1	GlobalFiler Express	เลือด หรือ เยื่อบุกระพุ้งแก้ม บน Treated paper	*	1.2	25 - 28	15	41	เครื่องรุ่น GeneAmp™ PCR System 9700 แนะนำ Max ramping mode ไม่ควรใช้ 9600 Emulation mode เครื่องรุ่น ProFlex™ ใช้ 9700 Simulation mode เครื่องรุ่น Veriti™ ใช้ 9700 Max mode ร่วมกับ Convert method	Size standard GeneScan 600 LIZ 0.4 - 0.5 µL	DS-36 matrix standard kit (dye set J6, 6-dye)
2	GlobalFiler™ IQC	สารละลายดีเอ็นเอ	> 1.0 ng	-	29	25	80			
			> 500 pg		30					
3	Verifiler Express	เลือด หรือ เยื่อบุกระพุ้งแก้ม บน Treated paper	*	1.2	25 - 28	25	45			
4	Verifiler Plus	ดีเอ็นเอที่สกัดแล้ว	0.5 ng	-	29 (2 + 27)	25	90			DS-37 matrix standard kit (dye set J6-T)
		เลือด หรือ เยื่อบุกระพุ้งแก้ม บน Treated paper	*	1.2 / 0.5	27	10	60			
5	Investigator 24 Plex QS	สารละลายดีเอ็นเอ	0.5 ng	-	30 (3 + 27)	25	60	เครื่องรุ่น GeneAmp™ PCR System 9700 aluminum block ใช้ Standard mode เครื่องรุ่น GeneAmp™ PCR System 9700 silver block or gold-plated silver block ใช้ Max mode	DNA size standard (BTO) หรือ DNA size standard 450 (BTO) 0.5 µL	Dye set BT6
6	Investigator 24 Plex Go	เลือด หรือ เยื่อบุกระพุ้งแก้ม บน Treated paper	*	1.2 / 0.5	25 (3 + 22) ถึง 27 (3 + 24)	20 - 23	45			
7	Investigator 26 Plex QS	สารละลายดีเอ็นเอ	0.5 ng	-	30	25	66			
		เลือด หรือ เยื่อบุกระพุ้งแก้ม บน Treated paper	*	1.2 / 0.5	27ww	25	61			

RMJ Ramathibodi Medical Journal

ตารางที่ 2. ข้อมูลประกอบการใช้งานของชุดน้ำยาสำเร็จรูป จำนวน 8 ชุดน้ำยา (Applied Biosystems, QIAGEN, Promega) (ต่อ)

ลำดับ	ชุดน้ำยาสำเร็จรูป	ประเภทตัวอย่าง	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง					ข้อแนะนำการใช้เครื่อง Thermal Cycler	ประเภทและปริมาณ Size Standard สำหรับเครื่อง Genetic Analyzer	Spectral Calibration / Matrix Standard
			ความเข้มข้นของดีเอ็นเอตั้งต้น	ขนาด Punch ของ Treated Paper (mm)	จำนวนรอบ Cycle	ปริมาตรน้ำยาสุดท้าย (µL)	ระยะเวลาการทำปฏิกิริยาโดยประมาณ (นาที)			
								ข้อแนะนำการใช้เครื่อง Thermal cycler สำหรับชุดน้ำยา Investigator 24 Plex QS, 24 Plex Go และ 24 Plex QS ไม่ควรใช้ 9600 emulation mode		
8	PowerPlex Fusion6C	สารละลายดีเอ็นเอ	1.0 ng	-	29	25	60	เครื่องรุ่น ProFlex™ PCR System ใช้ 9700 simulation mode เครื่องรุ่น Veriti® 96-Well ใช้ Ramping rate 100% เครื่องรุ่น GeneAmp™ PCR System 9700 ใช้ Max mode ร่วมกับ Silver หรือ Gold-plated silver sample block	WEN ILS 500 0.5 µL	PowerPlex® 6C matrix standard
		เลือด หรือเยื่อบุกระพุ้งแก้มบน Treated paper	*	1.2 / 0.5	23 - 27	25 หรือ 12.5				

* การตรวจแบบ Direct PCR ไม่ต้องใช้สารละลายดีเอ็นเอ สามารถนำ Punch ของกระดาษเก็บตัวอย่างไปทำปฏิกิริยาแบบ Direct PCR ได้เลย

ตารางที่ 3. การเปรียบเทียบจุดเด่นและข้อจำกัดของชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่นิยมใช้ในการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอจำนวน 8 ชุดน้ำยา

ลำดับ	ชุดน้ำยาสำเร็จรูป	จุดเด่น	ข้อจำกัด
1	GlobalFiler Express	- ใช้ระยะเวลาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบนเครื่อง Thermal Cycler น้อยที่สุด (41 นาที)	- มีค่าใช้จ่ายต่อการทดสอบมากที่สุด - มีอัตราการทดสอบซ้ำจากปริมาณดีเอ็นเอไม่สม่ำเสมอด้วยรูปแบบ Direct PCR
2	GlobalFiler™ IQC / GlobalFiler	- มีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากสารละลายดีเอ็นเอตั้งต้นด้วยความเข้มข้นต่ำกว่าชุดน้ำยาสำเร็จรูปชนิดอื่น (> 500 pg) จึงเหมาะสำหรับการนำไปใช้ในตัวอย่างประเภทวัตถุพยาน - มีตำแหน่ง IQC เพื่อประเมินประสิทธิภาพและสารยับยั้งในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ - มีรายงานค่าความถี่อัลลีลของประชากรไทย[7]	- ไม่รองรับการเพิ่มปริมาณโดยตรงจากอุปกรณ์เก็บตัวอย่าง (Direct amplification) เนื่องจากเมื่อรอบของขั้นตอนการเพิ่มปริมาณต่ำกว่า 29 รอบ IQC peak จะไม่สามารถตรวจสอบได้
3	Verifiler Express	- ใช้ระยะเวลาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบนเครื่อง Thermal Cycler น้อย (45 นาที)	- มีอัตราการทดสอบซ้ำจากปริมาณดีเอ็นเอไม่สม่ำเสมอด้วยรูปแบบ Direct PCR
4	Verifiler Plus	- มีเอกสารรับรองการใช้ปริมาตรน้ำยาสุดท้าย 10 µL ซึ่งทางห้องปฏิบัติการได้ตรวจสอบความถูกต้อง (Validate) และได้ผลการตรวจที่สมบูรณ์ ส่งผลให้เป็นชุดน้ำยาที่ประหยัดที่สุด - มีตำแหน่ง IQC เพื่อประเมินประสิทธิภาพและสารยับยั้งในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	- ระยะเวลาการเพิ่มปริมาณ จากดีเอ็นเอที่สกัดแล้วใช้เวลานานกว่าชุดน้ำยาอื่น (90 นาที) - Matrix standard เป็นคนละชนิดกับกลุ่มชุดน้ำยาที่ผลิตจากบริษัทเดียวกัน ไม่สามารถใช้ร่วมกันได้
5	Investigator 24 Plex QS	- เหมาะสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดแล้ว - มีตำแหน่ง QS เพื่อประเมินประสิทธิภาพและสารยับยั้งในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	- หากทดสอบด้วยรูปแบบ Direct PCR ต้องใช้ Punch buffer ประกอบ ซึ่งมีค่าใช้จ่ายเพิ่มเติม
6	Investigator 24 Plex Go	- เหมาะสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตรงกับอุปกรณ์เก็บตัวอย่าง - ใช้ระยะเวลาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบนเครื่อง Thermal Cycler น้อย (45 นาที) - มีตำแหน่ง QS เพื่อประเมินประสิทธิภาพและสารยับยั้งในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	- มีอัตราการทดสอบซ้ำจากปริมาณดีเอ็นเอไม่สม่ำเสมอด้วยรูปแบบ Direct PCR

ตารางที่ 3. การเปรียบเทียบจุดเด่นและข้อจำกัดของชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่นิยมใช้ในการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอจำนวน 8 ชุดน้ำยา (ต่อ)

ลำดับ	ชุดน้ำยาสำเร็จรูป	จุดเด่น	ข้อจำกัด
7	Investigator 26 Plex QS	- เหมาะสำหรับทั้งสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดแล้ว และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตรงกับอุปกรณ์เก็บตัวอย่าง - มีตำแหน่ง QS เพื่อประเมินประสิทธิภาพและสารยับยั้งในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	- หากทดสอบด้วยรูปแบบ Direct PCR ต้องใช้ Punch buffer ประกอบ ซึ่งมีค่าใช้จ่ายเพิ่มเติม
8	PowerPlex Fusion6C	- มีจำนวนตำแหน่ง Y-STR รวม Rapidly mutating loci เป็น 3 ตำแหน่ง (DYS391, DYS576, DYS670) ซึ่งสามารถวิเคราะห์ความสัมพันธ์สายบิดาในเบื้องต้นได้ - ค่า Probability of identity ต่ำที่สุด หมายความว่า โอกาสที่บุคคล 2 คน ที่ถูกเลือกโดยการสุ่มจะมีจีโนไทป์ที่เหมือนกันน้อยที่สุด - มีค่าใช้จ่ายต่อการทดสอบน้อยที่สุด	- ไม่มี Quality control/ quality sensor ในการประเมินประสิทธิภาพและสารยับยั้งของขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ต้องวิเคราะห์จากกราฟของดีเอ็นเอเพียงอย่างเดียว ซึ่งในกรณีตัวอย่างจากบุคคลเดียวที่ไม่เสื่อมสภาพจึงอาจไม่จำเป็น - มีอัตราการทดสอบซ้ำจากปริมาณดีเอ็นเอไม่สม่ำเสมอด้วยรูปแบบ Direct PCR

IQC, internal quality control marker; PCR, polymerase chain reaction; QS, quality sensor; STR, short tandem repeat.

ห้องปฏิบัติการต้องดำเนินการตรวจสอบความถูกต้อง (Validate) จำนวนรอบของขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตรง (Direct amplification) จากอุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ให้ได้วิธีการทำงานที่เหมาะสมจะช่วยลดขั้นตอนการทำซ้ำ เพื่อให้ได้ผลที่สมบูรณ์ แต่ละชุดน้ำยาสำเร็จรูปมีจุดเด่นแตกต่างกัน ขึ้นกับเป้าหมายของการใช้งานของหน่วยงาน เพื่อให้ใช้ตัวอย่างได้ประสิทธิภาพสูงสุดและลดระยะเวลาการทำงานรวมทั้งงบประมาณได้

เมื่อตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างในงานบริการด้วยน้ำยาสำเร็จรูปชุดหลักแล้วพบปัญหา เช่น พบการกลายพันธุ์ (Mutation) หรือลักษณะของ Peak ที่ไม่ตรงเกณฑ์การตรวจวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการ การยืนยันโดยทำการตรวจวิเคราะห์ซ้ำตั้งแต่ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยาอีกชุดหนึ่ง เพื่อยืนยันความถูกต้องก่อนการรายงานผล ดังตัวอย่างต่อไปนี้

ตัวอย่างที่ 1 กรณี Peak ไม่สมดุลโดยพบลักษณะ Heterozygous imbalance peak แต่เมื่อตรวจซ้ำด้วยชุดน้ำยาอีกชุดหนึ่ง ปรากฏว่าพบลักษณะ Heterozygous balance peak และสามารถยืนยันรายงานผลตำแหน่ง D10S1248 มีอัลลีล (Allele) คือ 12, 13 (ภาพที่ 1A)

ตัวอย่างที่ 2 ครอบครัวหนึ่งพิสูจน์ความสัมพันธ์บิดา-บุตร พบข้อขัดแย้ง เพียง 1 ตำแหน่ง เมื่อตรวจซ้ำด้วยชุดน้ำยาอื่นอีก 2 ชุด พบว่า ตำแหน่งที่ตรวจไม่ขัดแย้งสันนิษฐานได้ว่า ตำแหน่งที่พบมีการกลายพันธุ์ ซึ่งชุดน้ำยาสำเร็จรูปชุดที่ 1 ไม่สามารถเพิ่มปริมาณบริเวณนั้นได้ แต่ชุดน้ำยาสำเร็จรูปชุดที่ 2 และชุดที่ 3 ออกแบบตำแหน่ง

Primer จำเพาะแตกต่างออกไป ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณได้ จากภาพที่ 1B แถวบนคือ ดีเอ็นเอของบิดา แถวล่างคือ ดีเอ็นเอของบุตร กราฟในแนวตั้งคือ ผลดีเอ็นเอตำแหน่ง D8S1179 จากการใช้น้ำยาชุดที่ 1 ชุดที่ 2 และชุดที่ 3 ตามลำดับ ผลของการใช้น้ำยาชุดที่ 1 พบลักษณะอัลลีลไม่สมบูรณ์ (Allele dropout) ซึ่งเกิดจากความผิดพลาดในการต่อสายดีเอ็นเอของขั้นตอนเพิ่มปริมาณ เกิดขึ้นได้จากความแตกต่างของลำดับเบส (Single nucleotide variant, SNV) ที่ไม่สามารถเข้าคู่ได้กับ Primer จำเพาะของชุดน้ำยาสำเร็จรูป หากวิเคราะห์ตามข้อมูลที่พบจะทำให้ได้ Profile บิดาและบุตร คือ 15, 15 และ 10, 10 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์คัดออก แต่เมื่อนำมาตรวจวิเคราะห์ซ้ำ ด้วย Primer ที่แตกต่างไปจากเดิมคือ ใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปอีก 2 ชุด พบว่า รูปแบบ Profile คือ 13, 15 และ 10, 13 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ไม่สามารถคัดออกได้

เมื่อตรวจสอบเพิ่มเติมจากคู่มือของชุดน้ำยา พบความแตกต่างของชุดน้ำยา เช่น ตำแหน่งบนโครโมโซม (Chromosomal location) และ Repeat sequence ของ Primer จำเพาะตำแหน่ง D8S1179 คือ 8q24.13-TCTA Complex (19)8 ส่วนอีกชุดคือ 8q23.1-23.2 [TCTA]129 และรูปแบบ Primer ที่พบความแตกต่างกันตามรายงาน คือ 5'-TTTTTGTATTTCATGTGTACATTCG-3' และ 5'-ATTGCAACTTATATGTATTTTTGTATTTCATG-3'[10]

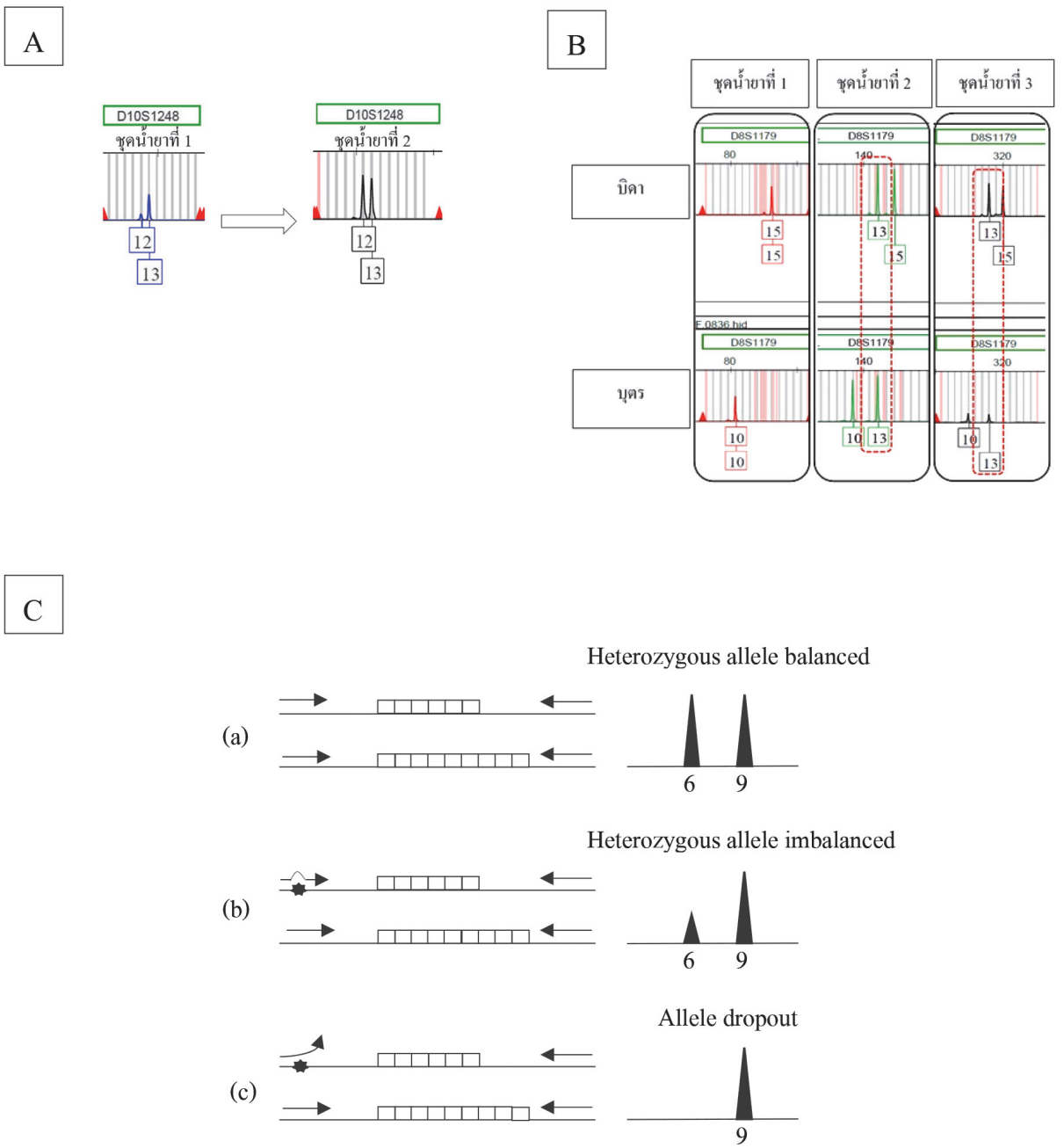
การแปลผลจึงต้องพิจารณาให้ละเอียดและยืนยันผลตรวจให้ชัดเจนก่อนการรายงานผล แม้ว่าจะเป็นผลที่ทำให้ต้องวิเคราะห์เพิ่มเติม แต่เป็นรูปแบบดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะของบุคคลนั้น หากมีการเปรียบเทียบในคดีหรืออุบัติภัยหมู่ จะเป็นการแสดงเอกลักษณ์บุคคลได้ประการหนึ่ง (ภาพที่ 1B และ 1C)

ลักษณะของ Peak ที่สมบูรณ์จะได้สัดส่วนของ Heterozygous peak ที่มีความสูงของ Peak ใกล้เคียงกัน [ภาพที่ 1C(a)] องค์ประกอบที่ส่งผลต่อการเกิดลักษณะ Peak ไม่สมดุล หรือผิดปกติ เช่น สัดส่วนของดีเอ็นเอตั้งต้นที่ไม่สมดุลในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ หากน้อยเกินไปอาจส่งผลให้เกิดลักษณะ Imbalanced peak ปัจจัยที่สันนิษฐานอีกประการหนึ่งคือ บนสายดีเอ็นเอตั้งต้นที่ตำแหน่ง Primer binding site มีการกลายพันธุ์ บางส่วน แต่ Primer ยังสามารถจับและต่อสายดีเอ็นเอได้ จะยังคงพบผลผลิตของการทำ PCR (PCR product) ได้ แต่เป็นอัลลีลที่ไม่สมบูรณ์ ทำให้เกิด Peak เป็นลักษณะ Heterozygous allele imbalanced [ภาพที่ 1C(b)] และในกรณีที่ Primer ไม่สามารถจับและไม่ต่อสายดีเอ็นเอ จะพบอัลลีลลักษณะไม่สมบูรณ์ [ภาพที่ 1C(c)][11]

ตัวอย่างที่ 3 ค่าสถิติในการถ่ายทอดทางพันธุกรรมประกอบเกณฑ์การคัดเข้า เพื่อใช้คำนวณค่าความเชื่อมั่นของโอกาสความน่าจะเป็นบิดา-บุตร หรือ มารดา-บุตร เมื่อเทียบกับบุคคลอื่นในประชากร (Probability of paternity) ซึ่งคำนวณจากค่าความถี่ของอัลลีลที่พบในประชากรนั้นๆ (อ้างอิงจากงานวิจัยความถี่ประชากรที่เผยแพร่แล้ว เช่น DNA database of populations from different parts in the Kingdom of Thailand)[12] และรูปแบบการถ่ายทอดซึ่งใช้รูปแบบการคำนวณที่แตกต่างกัน[13-15] การเพิ่มตำแหน่งตรวจโดยชุดน้ำยาสำเร็จรูปอื่น เป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการเพิ่มค่าความเชื่อมั่นทางสถิติ เนื่องจากตำแหน่งที่ตรวจสอบเพิ่มจะเป็นการเพิ่มค่า PI และส่งผลให้ค่า Combined paternity index (CPI) เพิ่มขึ้น หากพบลักษณะอัลลีลที่หายาก (Rare allele) ในฐานข้อมูลประชากร

ตัวอย่างเลขที่อ้างอิง No.1262 และ No.1263 ซึ่งมีความสัมพันธ์ มารดา-บุตร ตรวจได้ผล DNA typing (ตารางที่ 4) มีการคำนวณค่าความเชื่อมั่นของโอกาสที่ตัวอย่าง No.1263 น่าจะเป็นบุตรของตัวอย่าง No.1262 เมื่อเปรียบเทียบกับบุคคลอื่นในประชากรจากตัวอย่างเป็นประชากรจีนซึ่งได้ใช้ค่าอ้างอิง Genetic polymorphism of 29 STR loci in the Hunan Han population from China[16] โดยคำนวณค่า Combined paternity index (CPI) จำนวน 15 ตำแหน่ง และ 19 ตำแหน่ง ได้เท่ากับ 502.42557 และ 49,287.042 ค่า Probability of paternity ได้ร้อยละ 99.80 และ 99.9980 ตามลำดับ อธิบายได้ว่า ตัวอย่าง No.1262 มีโอกาสเป็นบุตรของตัวอย่าง No.1263 มากกว่าบุคคลอื่นที่มีรูปแบบดีเอ็นเอในลักษณะเดียวกันในประชากรอ้างอิง ร้อยละ 99.80 เมื่อคำนวณ 15 ตำแหน่ง และร้อยละ 99.9980 เมื่อคำนวณ 19 ตำแหน่ง

ภาพที่ 1. กราฟ Electropherogram แสดง DNA Profile ผลการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ



A, ตำแหน่ง D10S1248 ซึ่งมีลักษณะ Imbalance peak เมื่อใช้ชุดน้ำยาที่ 1 และ Balance peak เมื่อใช้ชุดน้ำยาที่ 2

B, ตำแหน่ง D8S1179 มีลักษณะ Allele dropout ที่ตรวจพบจากการใช้น้ำยาสำเร็จรูปชุดที่ 1 และ ลักษณะ Heterozygous allele ในน้ำยาสำเร็จรูปชุดที่ 2 และ 3

C, ลักษณะการเกิด Primer binding site mutation

ตารางที่ 4. ผลการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ แสดงตำแหน่งที่ตรวจวิเคราะห์ (STR locus) ข้อมูล DNA Profile ของตัวอย่างเลขที่ No.1262 และ No.1263 และค่า PI ที่ได้จากการคำนวณ ความสัมพันธ์มารดา-บุตร โดยเปรียบเทียบระหว่างคำนวณ 15 ตำแหน่ง และ 19 ตำแหน่ง ตามลำดับ

STR Locus	No. 1262		No. 1263		PI 15 Loci	PI 19 Loci
Amelogenin	X	X	X	X	-	-
D3S1358	15	17	15	17	1.76799	1.76799
D1S1656	15	15	11	15	-	-
D2S441	11	11	11	11	-	-
D10S1248	15	17	15	15	-	-
D13S317	8	11	8	8	1.69492	1.69492
Penta E	18	20	17	20	-	6.25
D16S539	11	11	11	13	2.00803	2.00803
D18S51	14	18	14	19	1.21359	1.21359
D2S1338	19	25	19	20	1.28866	1.28866
CSF1PO	10	11	10	11	2.10269	2.10269
Penta D	9	10	9	11	-	0.72046
TH01	7	8	6	7	0.91241	0.91241
vWA	14	17	14	15	0.88968	0.88968
D21S11	29	31.2	29	29	1.79211	1.79211
D7S820	11	11	10	11	1.3587	1.3587
D5S818	12	13	11	12	1.11607	1.11607
TPOX	8	11	11	12	0.78864	0.78864
D8S1179	13	15	14	15	1.66667	1.66667
D12S391	20	20	15	20	-	2.71739
D19S433	14	14	14	14	3.90625	3.90625
SE33	26.2	26.2	15	26.2	-	7.69231
D22S1045	15	16	15	16	-	-
DYS391	-	-	-	-	-	-
FGA	21	22	21	25	2.33645	2.33645
DYS576	-	-	-	-	-	-
DYS570	-	-	-	-	-	-
Combined Paternity Index					502.42557	49287.042
Probability of Paternity					**99.80%**	**99.9980%**

PI, paternity index; STR, short tandem repeat.

จากข้อมูลสถิติของงานบริการในช่วงระยะเวลา 7 ปี (พ.ศ. 2558 - 2564) การตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ระหว่างบิดา-มารดา-บุตร การพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลในงานทางนิติวิทยาศาสตร์ การตรวจวัตถุพยานในคดีความ และการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ Cell line ในงานวิจัย เพื่อการศึกษาลักษณะดีเอ็นเอที่เปลี่ยนแปลง โดยใช้หลักการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จำนวนตัวอย่างส่งตรวจทั้งหมด 8,251 ตัวอย่าง พบครอบครัวที่ขัดแย้ง จำนวน 540 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 7 พบการกลายพันธุ์ จำนวน 185 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 2 และพบอัลลีลไม่สมบูรณ์ จำนวน 9 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 0.11 ซึ่งตัวอย่างเหล่านี้ในทางปฏิบัติของห้องปฏิบัติการจะดำเนินการทดสอบซ้ำเพื่อยืนยันผลก่อนการรายงานผลการตรวจ ตามคู่มือปฏิบัติงาน (Work instruction) งานวิจัยนี้เก็บข้อมูลจากงานบริการที่มีการควบคุมคุณภาพห้องปฏิบัติการตามมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025

อย่างไรก็ตาม การตรวจวิเคราะห์ด้านนิติพันธุศาสตร์นอกจากจะมีการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอซึ่งปัจจุบันนิยมใช้ตรวจจากเครื่องหมายพันธุกรรมประเภทดีเอ็นเอลำดับซ้ำชนิดไมโครแซตเทลไลต์ (Microsatellite) หรือ STR ที่อยู่บนออโตโซม (Autosome) แล้ว ยังมีวิธีการตรวจดีเอ็นเอประเภทอื่นที่ใช้ในการพิสูจน์สายพันธุ์เพื่อเพิ่มความชัดเจนนอกเหนือจากการตรวจบนออโตโซม[6] ได้แก่

1) การตรวจไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ (Mitochondrial DNA, mtDNA) ซึ่งใช้ตรวจเอกลักษณ์ของดีเอ็นเอสายพันธุ์มารดา (Maternal lineage marker)

2) การตรวจ STR บน X chromosome (X-STR) ซึ่งใช้ตรวจดีเอ็นเอลำดับซ้ำบนโครโมโซมเอ็กซ์ ในการพิสูจน์ความสัมพันธ์ระหว่างบิดา-บุตรสาว ระหว่างย่า-หลานสาว และระหว่างพี่สาว-น้องสาวร่วมบิดาเดียวกัน

3) การตรวจ STR บน Y chromosome (Y-STR) ซึ่งใช้ตรวจดีเอ็นเอลำดับซ้ำบนโครโมโซมวาย สำหรับพิสูจน์ความสัมพันธ์ในสายพันธุ์บิดา (Paternal lineage marker) ในการพิสูจน์ความสัมพันธ์ระหว่างบิดา-บุตรชาย ระหว่างปู่-หลานชาย เป็นต้น

บทสรุป

เทคโนโลยีการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ก้าวหน้าและพัฒนาไปอย่างรวดเร็ว บทความนี้รวบรวมข้อมูลชุดน้ำยาสำเร็จรูปเพื่อตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลบน Autosomal STR เพื่อนำเสนอข้อมูลประกอบการพิจารณา และเปรียบเทียบข้อมูลที่บริษัทผู้ผลิตทำการตลาด การนำไปใช้จึงขึ้นกับวัตถุประสงค์การบริหารจัดการของหน่วยงาน หากผู้ใช้งานต้องการพิสูจน์ความสัมพันธ์โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้ค่า Probability of paternity สูง การเลือกชุดน้ำยาที่มีจำนวน Autosomal STR สำหรับการคำนวณค่า PI ได้จะเหมาะสมที่สุด บทความนี้ประกอบด้วย 4 ชุดน้ำยาคือ Verifiler Express, Verifiler Plus, Investigator 26 Plex QS และ PowerPlex Fusion6C ซึ่งมีตำแหน่งเครื่องหมายพันธุกรรมจำนวน 23 ตำแหน่ง หากต้องการตรวจสอบตำแหน่ง Y-STR พร้อมกับตำแหน่ง Autosomal STR ชุดน้ำยาประเภทนี้ ได้แก่ PowerPlex Fusion6C, Investigator 24 Plex QS, Investigator 24 Plex GO, Investigator 26 Plex QS, GlobalFiler Express และ GlobalFiler IQC GlobalFiler หากผู้ใช้งานต้องปฏิบัติงานกับตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอน้อยและมีโอกาสเสื่อมสภาพสูง เช่น วัตถุพยาน ชุดน้ำยาที่เป็นทางเลือกเหมาะสำหรับความเข้มข้นต่ำและมีตำแหน่งตรวจสอบคุณภาพเพื่อวิเคราะห์สารยับยั้งและความเสื่อมสภาพของดีเอ็นเอ ได้แก่ GlobalFiler IQC, Verifiler Plus, Investigator 24 Plex QS และ Investigator 26 Plex QS ทั้งนี้ ผู้ใช้งานควรศึกษาข้อมูลของผลิตภัณฑ์ก่อนใช้งานเพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อผู้รับบริการ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณบุคลากรห้องปฏิบัติการมนุษย์พันธุศาสตร์ในการบริหารจัดการงานบริการได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่งผลให้ระบบงานบริการเป็นไปตามมาตรฐาน สามารถนำข้อมูลมาต่อยอดหรือผู้ที่สนใจสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานประจำได้เป็นอย่างดี

References

1. Jignal P, Shaikh MG, Darshan M. Forensic conception: DNA typing of FTA spotted samples. *J Appl Biol Biotech*. 2014;2(4):021-029. doi:10.7324/JABB.2014.2404
2. Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDAM). SWGDAM Interpretation Guidelines for Autosomal STR Typing by Forensic DNA Testing Laboratories. SWGDAM; 2017. Updated July 13, 2021. Accessed March 9, 2022. https://1ecb9588-ea6f-4feb-971a-73265dbf079c.filesusr.com/ugd/4344b0_3f94c9a6286048c3924c58e2c230e74e.pdf
3. Butler JM. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Interpretation*. Academic Press; 2014.
4. Butler JM. *Fundamentals of Forensic DNA Typing.* Academic Press/ Elsevier; 2010.
5. Butler JM. *Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers*. 2nd ed. Elsevier Academic Press; 2005.
6. Rerkamnuaychoke B. *Recent Advances in Forensic Genetics*. Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University; 2018.
7. Boonderm N, Suriyanratakorn D, Sangpueng S, Onthong N, Nettakul A, Waiyawuth W. Population genetic data of 21 STR markers in Thais of southern border provinces of Thailand. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser*. 2017;6: e523-e525. doi:10.1016/j.fsigss.2017.09.205
8. Promega Corporation. PowerPlex® Fusion 6C System for Use on the Applied Biosystems® Genetic Analyzers, Technical Manual, 2018. Accessed March 9, 2022. https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/powerplex-fusion-6c-system-protocol.pdf?rev=a8d2566e44ca493db6da4c0256baee53&sc_lang=en
9. QIAGEN®. Investigator® 26plex QS Handbook, 2019. Accessed March 9, 2022. https://dev04.qiagen.com/gb/resources/download.aspx?id=88978064-d8b6-4c33-8350-418d90ef42bb&lang=en
10. National Institute of Standards and Technology. Commercially Available STR Multiplex Kits. Updated December 31, 2009. Accessed March 9, 2022. https://strbase.nist.gov/str_D8S1179.htm
11. Buckleton JS, Bright JA, Taylor D, eds. *Forensic DNA Evidence Interpretation.* 2nd ed. CRC Press; 2018.
12. Shotivaranon J, Chirachariyavej T, Leetrakool N, Rerkamnuaychoke B. DNA database of populations from different parts in the Kingdom of Thailand. *Forensic Sci Int Genet.* 2009;4(1):e37-e38. doi:10.1016/j.fsigen.2009.02.009
13. Dawid AP, Mortera J, Pascali VL. Non-fatherhood or mutation? a probabilistic approach to parental exclusion in paternity testing. *Forensic Sci Int.* 2001; 124(1):55-61. doi:10.1016/s0379-0738(01)00564-3
14. Ayres KL, Balding DJ. Paternity index calculations when some individuals share common ancestry. *Forensic Sci Int.* 2005;151(1):101-103. doi:10.1016/j.forsciint.2004.10.007
15. Gjertson DW, Brenner CH, Baur MP, et al. ISFG: recommendations on biostatistics in paternity testing. *Forensic Sci Int Genet*. 2007;1(3-4):223-231. doi:10.1016/j.fsigen.2007.06.006
16. Liu Y, Liu Y, Guo J, et al. Genetic polymorphism of 29 STR loci in the Hunan Han population from China. *Forensic Sci Res.* 2017;4(4):351-353. doi:10.1080/20961790.2017.1306430

RMJ Ramathibodi Medical Journal

Rama Med J | Review Article

Commercial DNA Typing Test Kit Comparison for Multipurpose of Human Identification

Jittima Shotivaranon[1], Budsaba Rerkamnuaychoke[1]

[1] Department of Pathology, Faculty of Medicine, Ramathibodi hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand

Human identification is applied to prove interpersonal relationships by using commercial test kits of a single tube multiplex PCR on DNA repeated sequence (short tandem repeat, STR) genetic markers. Each commercial test kit has different limitation and advantage. The objective of this report is to compare the advantage and limitation of 8 commercial test kits (GlobalFiler Express, GlobalFiler™ IQC / GlobalFiler, Verifiler Express, Verifiler Plus, Investigator 24 Plex QS, Investigator 24 Plex Go, Investigator 26 Plex QS, and PowerPlex Fusion6C). We not only reviewed and compared the strengths and limitations of these 8 commercial test kits but also compared DNA profiles generated by 3 commercial test kits which were used in routine paternity service of Human Genetic Laboratory, Department of Pathology, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University. The data demonstrated that combined results of different commercial test kits was able to solve the interpretation of mutation or exclusion cases in some situations.

Keywords: DNA fingerprint, Human identification, STR profile

Rama Med J: doi:10.33165/rmj.2022.45.1.253355

Received: October 7, 2021 **Revised:** March 9, 2022 **Accepted:** March 24, 2022

Corresponding Author:
Budsaba Rerkamnuaychoke
Department of Pathology,
Faculty of Medicine
Ramathibodi Hospital,
Mahidol University,
270 Rama VI Road, Ratchathewi,
Bangkok 10400, Thailand.
Telephone: +66 2201 1369
Fax: +66 2201 1267
E-mail: budsaba.rer@mahidol.ac.th