

การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการตรวจหาดีเอ็นเอจากการสัมผัสและเยื่อบุกระพุ้งแก้ม
บนก้านเก็บตัวอย่างหัวคอตตอน โดยใช้สีย้อม SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain
PRELIMINARILY STUDY OF TOUCH DNA DETECTION AND BUCCAL ON COTTON
SWAB BY USING SYBR® GREEN I NUCLEIC ACID GEL STAIN

ปานชีวา ปัญจะเรือง¹, สุนิษา โอบอ้อม^{2*}

Parncheewa Panjaruang¹, Sunisa Aobaom^{2}*

¹บัณฑิตศึกษา สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

¹Graduate Program in Forensic Science, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Rangsit Campus.

²ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

²Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Rangsit Campus.

*Corresponding author, e-mail: Sunisa.aobaom@gmail.com

Received: 17 May 2022; **Revised:** 14 February 2023; **Accepted:** 16 March 2023

บทคัดย่อ

ตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสัมผัสและเยื่อบุกระพุ้งแก้มเป็นตัวอย่างที่ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า และถือเป็นหนึ่งในตัวอย่างที่นิยมส่งเข้ามาตรวจพิสูจน์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในห้องปฏิบัติการ ซึ่งตัวอย่างเหล่านั้นไม่อาจทราบได้ว่ามีหรือไม่มีดีเอ็นเออยู่จนกว่าจะเข้าสู่กระบวนการตรวจพิสูจน์ โดยงานวิจัยครั้งนี้จึงได้ศึกษาการตรวจหาดีเอ็นเอจากการสัมผัสและเยื่อบุกระพุ้งแก้มบนก้านเก็บตัวอย่างหัวคอตตอนซึ่งเป็นก้านเก็บตัวอย่างที่ถูกใช้งานด้านนิติวิทยาศาสตร์ในปัจจุบัน โดยใช้สีย้อม SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain เพื่อใช้เป็นวิธีการคัดกรองตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสัมผัสเบื้องต้น สำหรับลดปริมาณตัวอย่าง ลดการสูญเสียทรัพยากรที่ใช้ในการตรวจพิสูจน์หลักฐานของประเทศไทย โดยเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสัมผัสจากอาสาสมัครชายและหญิง และเยื่อบุกระพุ้งแก้มจากอาสาสมัครหญิง ทำการย้อมสีลงบนหัวของก้านเก็บตัวอย่างด้วยสีย้อมที่มีความเข้มข้น 5X นำไปสังเกตการเรืองแสงภายใต้เครื่อง Gel Documentation System (Major Science, USA) และกล้องฟลูออเรสเซนซ์ จากนั้นวัดค่าการเรืองแสงด้วยโปรแกรม Image J เพื่อดูความแตกต่างของการเรืองแสงระหว่างก้านเก็บตัวอย่างที่มีดีเอ็นเอกับก้านเก็บตัวอย่างที่ไม่มีดีเอ็นเอ จากการทดลองพบว่า ก้านเก็บตัวอย่างหัวคอตตอนไม่เหมาะในการใช้ตรวจจับดีเอ็นเอจากการสัมผัส แต่สามารถใช้ได้กับการตรวจจับดีเอ็นเอจากกระพุ้งแก้มที่จะสามารถให้ผลการตรวจจับที่ชัดเจน วัดได้จากการเรืองแสงที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญหากเทียบระหว่างก้านเก็บตัวอย่างกระพุ้งแก้มที่ผ่านการย้อมสีกับก้านเก็บตัวอย่างเปล่าที่ผ่านการย้อมสี ที่ช่วงค่าความเชื่อมั่น 95% เมื่อทดสอบด้วย Paired Samples T-Test

คำสำคัญ: ดีเอ็นเอจากการสัมผัส; SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain; ก้านเก็บตัวอย่างหัวคอตตอน; นิติวิทยาศาสตร์

Abstract

Touch DNA and buccal samples are among the most common sample types submitted to DNA forensic laboratory. However, some Touch DNA samples and buccal collections don't realize DNA appears on the sample until the DNA detection processing is completed. This study aims to investigate the touch DNA and buccal sample detection on cotton swabs by using SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain. So, this screening method reduces samples and resources in Thailand DNA forensic laboratory processing. Touch DNA samples were collected from male and female volunteers. Buccal samples were collected from female volunteers. All samples were stained with 5x SYBR[®]Green I and detected using Gel Documentation System (Major Science, USA) and Fluorescence microscopy. Fluorescence levels were detected by Image J compared with a non-DNA cotton swab. The results showed that Cotton swabs are unsuitable for the touch DNA screening method However it can be used to detect DNA from Buccal swabs. Cotton swab that collect Buccal sample and stain it with 5X SYBR[®]Green I revealed that SYBR green I fluorescence was visualized significant differently from DNA-free swab at 95 % confidence interval when tested with Paired Samples T-Test (p-value > 0.05).

Keywords: Touch DNA; SYBR Green I; Cotton Swab; Forensic Science

บทนำ

การตรวจพิสูจน์ด้านชีววิทยาและดีเอ็นเอ เป็นส่วนหนึ่งในสาขานิติวิทยาศาสตร์ที่มีบทบาทสำคัญในการช่วยสนับสนุนข้อเท็จจริงและการสืบสวนสอบสวน เพื่อใช้ในกระบวนการยุติธรรมทางอาญาเนื่องจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอมีความเป็นเอกลักษณ์ในแต่ละบุคคล จึงสามารถใช้บ่งชี้ตัวบุคคลและเชื่อมโยงผู้กระทำผิดเข้ากับสถานที่เกิดเหตุหรือผู้เสียหายได้ อีกทั้งยังสามารถช่วยยืนยันตัวผู้บริสุทธิ์พ้นข้อกล่าวหา การตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอเป็นการตรวจพิสูจน์ที่เป็นวิทยาศาสตร์ จึงมีความน่าเชื่อถือและได้รับความนิยมน่าเชื่อถือยิ่งขึ้น ส่งผลให้ปัจจุบันมีจำนวนตัวอย่างดีเอ็นเอถูกส่งเข้าสู่ห้องปฏิบัติการการตรวจพิสูจน์เป็นจำนวนมาก โดยตัวอย่างดีเอ็นเอที่พบได้บ่อยจากสถานที่เกิดเหตุที่ส่งตรวจพิสูจน์ในห้องปฏิบัติการทางชีววิทยาและดีเอ็นเอ นั้น ได้แก่ ตัวอย่างคราบโลหิต เยื่อบุกระพุ้งแก้ม คราบอสุจิ เส้นผมเส้นขน และดีเอ็นเอจากการสัมผัส โดยเฉพาะอย่างยิ่งตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสัมผัส เป็นตัวอย่างที่ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า และตัวอย่างเยื่อบุกระพุ้งแก้มที่มีความใสไม่มีสีซึ่งไม่สามารถเรืองแสงภายใต้แสงสีฟ้าที่ใช้ในการทดสอบการมีอยู่ของเนื้อเยื่อได้หากไม่ผ่านการย้อมสี [1] ซึ่งแตกต่างจากตัวอย่างดีเอ็นเอจากคราบโลหิตหรือคราบอสุจิ ที่สามารถมองเห็นสีและตำแหน่งที่อยู่ของตัวอย่างได้ ส่งผลให้การเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสัมผัสบนวัตถุพยานเป็นเพียงการคาดเดาว่ามีดีเอ็นเออยู่ ซึ่งบ่อยครั้งพบว่าตัวอย่างก้านสำลีที่เข็ดบริเวณวัตถุพยานมานั้น ไม่ได้มีดีเอ็นเออยู่จริง ซึ่งต้องผ่านกระบวนการทางห้องปฏิบัติการจนกว่าได้ทำการวัดปริมาณดีเอ็นเอหรือจนกระทั่งกระบวนการแล้วเสร็จจึงจะทราบผลดังกล่าว ทำให้เกิดการสูญเสียเวลาและทรัพยากรที่ไม่คุ้มค่าเกิดขึ้น

ปัจจุบันมีงานวิจัยมากมายที่ประยุกต์ใช้สีย้อมกรดนิวคลีอิกชนิดฟลูออเรสเซนต์กับตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสัมผัส อย่างงานวิจัยที่ศึกษาการใช้สีย้อม SYBR[®]Green I Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen, USA)

และ GelGreen™ (Biotium, USA) ย้อมลงบนรอยลายนิ้วมือที่อยู่บนแผ่นพาราฟิล์ม แผ่นกระจกสไลด์ และแผ่นพลาสติกสไลด์ เพื่อการเรืองแสงของสีย้อมเมื่อเข้าจับกับดีเอ็นเอ พบว่าสีย้อมทั้งสองชนิดสามารถใช้ระบุตำแหน่งดีเอ็นเอบนรอยลายนิ้วมือแฝงได้ แต่สีย้อม SYBR®Green I Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen, USA) จะให้การเรืองแสงที่มากกว่าสีย้อม GelGreen™ (Biotium, USA) เนื่องจากเป็นสีย้อมมีคุณสมบัติในการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์จึงสามารถเข้าไปจับกับดีเอ็นเอภายในเซลล์และให้การเรืองแสงที่มากกว่าการใช้สีย้อม GelGreen™ (Biotium, USA) ที่ไม่มีคุณสมบัติดังกล่าว [2] นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ประยุกต์ใช้สีย้อมกรดนิวคลีอิกชนิดฟลูออเรสเซนต์กับตัวอย่างในเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ อย่างการศึกษาการใช้สีย้อมกรดนิวคลีอิก ได้แก่ SYBR Green I, Diamond Nucleic Acid Dye, GelGreen , GelRed , EvaGreen และ RedSafe ในการย้อมลงบนตัวอย่างที่เป็นรากเส้นผม คราบน้ำลาย เซลล์ผิวหนังที่ตายแล้ว และรอยลายนิ้วมือแฝง ซึ่งจากงานวิจัยดังกล่าวพบว่า สีย้อมกรดนิวคลีอิกสามารถแบ่งออกเป็นสองประเภทตามคุณสมบัติในการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ โดยสีย้อมที่ไม่สามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ได้แก่ สีย้อม GelGreen™ (Biotium, USA) และ GelRed™ (Biotium, USA) และสีย้อมที่สามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้สามารถเข้าไปจับกับดีเอ็นเอที่อยู่ภายในเซลล์ได้ ได้แก่ สีย้อม SYBR®Green I (Invitrogen, USA) และ Diamond™Nucleic acid dye (Promega, AUS) ทำให้สีย้อมประเภทที่สองนี้เป็นที่นิยมในการนำมาใช้ตรวจจับดีเอ็นเอภายในเซลล์ [3] และยังมีงานวิจัยที่หาสีย้อมที่มีประสิทธิภาพและความเข้มข้นของสีย้อมที่เหมาะสมต่อการตรวจจับดีเอ็นเอจากการสัมผัสบนวัตถุประกอบระเบิดแสงเครื่องที่ใต้ทำการศึกษาสีย้อม 6 ชนิด ได้แก่ SYBR®Green I (Invitrogen, USA), SYBR™ Safe (Invitrogen, USA) SYTOX®Green (Thermofisher, USA), EvaGreen™ (Biotium, USA), Diamond™Nucleic Acid Dye (Promega, USA) และ GelRed™ (Biotium, USA) ซึ่งพบว่า SYBR®Green I (Invitrogen, USA) และ Diamond™ Nucleic Acid Dye (Promega, USA) มีประสิทธิภาพในการเข้าจับกับดีเอ็นเอและช่วยในการมองเห็นดีเอ็นเอวัตถุประกอบระเบิดแสงเครื่องใต้โดยที่ใช้ความเข้มข้นของสีย้อมที่น้อยกว่าสีย้อมชนิดอื่น และสีย้อม SYBR®Green I (Invitrogen, USA) ไม่ได้ยับยั้งกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบไคเรคพีซีอาร์อีกทั้งไม่มีผลต่อการสร้างภาพรวมดีเอ็นเอ (DNA Profile) จึงถูกแนะนำให้ใช้สำหรับการตรวจจับดีเอ็นเอที่มองไม่เห็นบนวัตถุพยานด้วยคุณสมบัติดังกล่าว [4] ซึ่งเหล่านี้ทำให้คณะผู้วิจัยสนใจศึกษาความสามารถในการตรวจจับดีเอ็นเอจากการสัมผัส โดยใช้สีย้อม SYBR®Green I Nucleic Acid Gel Stain ที่มีความไวสูงและให้ประสิทธิภาพในการตรวจจับดีเอ็นเอที่ดี ประกอบกับเมื่อศึกษางานวิจัยที่มีการประยุกต์ใช้สีย้อมกรดนิวคลีอิกชนิดฟลูออเรสเซนต์กับตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสัมผัสที่ยูบนก้านเก็บตัวอย่างที่พบว่าเมื่อทดลองย้อมลงบนก้านเก็บตัวอย่างหัวโพน หัวไนลอน และก้านเก็บคอตตอน ที่ผ่านการเช็ดเก็บดีเอ็นเอ โดยพบว่าไม่ใช่ก้านเก็บตัวอย่างทุกชนิดที่จะสามารถนำมาใช้เพื่อช่วยในการมองเห็นดีเอ็นเอได้ เนื่องจากก้านบางชนิดให้การเรืองแสงที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ระหว่างตัวอย่างที่มีหรือไม่มีดีเอ็นเออยู่ [5] จึงทำให้คณะผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาการประยุกต์ใช้สีย้อมกรดนิวคลีอิกชนิดฟลูออเรสเซนต์กับตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสัมผัสและดีเอ็นเอจากเยื่อบุกระพุ้งแก้มที่อยู่บนก้านเก็บตัวอย่าง ซึ่งปัจจุบันประเทศไทยมีการใช้ก้านเก็บตัวอย่างหัวคอตตอนในการเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอ ไม่ว่าจะเป็น จากกระพุ้งแก้มจากผู้ต้องสงสัยหรือผู้เสียหาย หยดเลือด หรือจากการสัมผัสวัตถุพยานในสถานที่เกิดเหตุ เนื่องจากใช้งานสะดวก และต้นทุนต่ำ

จากคุณสมบัติของสีย้อมกรดนิวคลีอิกที่มีประสิทธิภาพ และไม่รบกวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบไคเรคพีซีอาร์ ทางคณะผู้วิจัยจึงสนใจเลือกใช้สีย้อม SYBR®Green I Nucleic Acid Gel Stain (SYBR Green I : Invitrogen, USA) เพื่อตรวจจับดีเอ็นเอจากการสัมผัสและดีเอ็นเอเยื่อบุกระพุ้งแก้มบนก้านเก็บตัวอย่างหัวคอตตอนที่นิยมใช้ในกลุ่มงานตรวจชีววิทยาและดีเอ็นเอ กองพิสูจน์หลักฐานกลาง สำนักงานพิสูจน์หลักฐานตำรวจ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบการมีอยู่ของดีเอ็นเอ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นวิธีการคัดกรองก้าน

เก็บตัวอย่างที่มีหรือไม่มีดีเอ็นเอเบื้องต้น ที่จะสามารถช่วยลดปริมาณตัวอย่างที่จะต้องเข้าสู่กระบวนการทางห้องปฏิบัติการ ลดการเสียเวลาและเสียทรัพยากรที่ใช้ในกระบวนการตรวจพิสูจน์หลักฐานของประเทศไทยได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

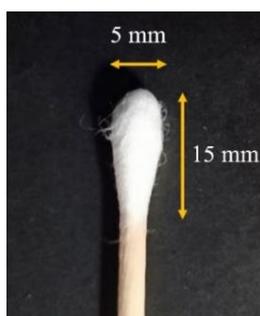
เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพเบื้องต้นจากการใช้สีย้อม SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain ในการตรวจหาการมีอยู่ของดีเอ็นเอจากการสัมผัสและดีเอ็นเอจากเยื่อบุกระพุ้งแก้ม บนก้านเก็บตัวอย่างคอตตอน

วิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการวิจัยในคน มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์ โดยใช้หลักการของ Declaration of Helsinki, the Belmont report, CIOMS guidelines และ the international practice (ICH-GCP) หมายเลขการรับรอง COA No. 088/2563

1. การเก็บตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างด้วยก้านเก็บตัวอย่างชนิดหัวคอตตอน EO cotton swab (Thai Gauze, TH) สีฟ้า ในอาสาสมัครชาย 1 ราย และ หญิง 1 ราย โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ มีวิธีการในการเก็บตัวอย่างดังนี้



ภาพที่ 1 ก้านเก็บตัวอย่างชนิดหัวคอตตอน EO cotton swab (Thai Gauze, TH)

1.1 การเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสัมผัส

ใช้ก้านเก็บตัวอย่างเช็ดเก็บดีเอ็นเอจากการสัมผัสจากอาสาสมัครชาย 1 ราย และหญิง 1 ราย โดยให้ทำการล้างมือด้วยน้ำเปล่า ทั้งไว้เป็นระยะ 1 ชั่วโมง โดยที่อาสาสมัครดำเนินชีวิตประจำวันตามปกติ จากนั้นอาสาสมัครแต่ละรายจะถูกเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสัมผัส จำนวน 2 ตัวอย่าง จากฝ่ามือซ้าย 1 ตัวอย่าง และจากฝ่ามือขวา 1 ตัวอย่าง โดยใช้ก้านเก็บตัวอย่างที่หยดน้ำกลั่นจำนวน 2 หยด เช็ดให้ทั่วบริเวณฝ่ามือซ้ายและใช้อีก 1 ก้าน เช็ดจากฝ่ามือขวา และตัวอย่างก้านสำลีทั้งสองตัวอย่างจะถูกทิ้งไว้ข้ามคืน ที่อุณหภูมิห้อง และทำการเก็บตัวอย่างด้วยวิธีการดังกล่าวอีกจำนวน 1 ก้าน ในวันต่อมาจนได้ตัวอย่างรวมทั้งสิ้น 3 ตัวอย่าง [1]

1.2 การเก็บตัวอย่างเยื่อบุกระพุ้งแก้ม

เก็บจากอาสาสมัครหญิง 1 ราย โดยให้อาสาสมัครบ้วนปากด้วยน้ำสะอาด จากนั้นใช้ก้านเก็บตัวอย่างถูวนบริเวณเยื่อบุกระพุ้งแก้ม 1 ซ้ำ โดยการหมุนวนข้างแก้ม 5 รอบ ภายในระยะเวลา 5 วินาที จากนั้นทิ้งก้านเก็บตัวอย่างไว้ข้ามคืนในแห้ง ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำเข้าสู่กระบวนการย้อมสี

1.3 ตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสกัด

ก้านสำลีที่เช็ดเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอจากเยื่อบุกระพุ้งแก้ม จำนวน 1 ก้าน จะถูกนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยา QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, USA) และทำการวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยา Quantifiler[®]HP DNA Quantification Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) ด้วยเครื่อง Applied Biosystems[®]7500 Real-time PCR system ทำการวัดปริมาณจำนวน 3 ซ้ำ แล้วใช้ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นดีเอ็นเอในการคำนวณเพื่อเจือจางดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.01 นาโนกรัมต่อ 150 µl จากนั้นใช้ปิเปตดูดปล่อยลงบนหัวก้านเก็บตัวอย่างในปริมาตร 150 µl

1.4 ชุดควบคุมการทดลอง

ใช้ก้านเก็บตัวอย่างเปล่าที่ไม่ผ่านการเช็ดเก็บตัวอย่างและการย้อมสี และก้านเก็บตัวอย่างที่ถูกย้อมด้วยสี SYBR Green I (Invitrogen, USA) ที่มีความเข้มข้น 5X

2. การย้อมสีบนหัวก้านเก็บตัวอย่าง

ทำการเจือจางสีย้อม 10,000X SYBR Green I (Invitrogen, USA) โดยใช้ Nuclease Free Water ให้สีย้อมพร้อมใช้งานอยู่ที่ความเข้มข้น 5X ใช้ปิเปตดูดปล่อยสีย้อมปริมาตร 150 µl ลงบนหัวก้านเก็บตัวอย่าง จากนั้นทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 5 นาที เพื่อให้หัวสำลีแห้ง นำไปบันทึกภาพการเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ที่กำลังขยาย 40X และเครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล Gel Documentation System (Major Science, USA) ซึ่งเป็นแหล่งกำเนิดแสงสีฟ้าความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร และตัวกรองแสงสีส้ม

3. การบันทึกภาพการเรืองและวิเคราะห์ค่าการเรืองแสง

ก้านเก็บตัวอย่าง จะถูกบันทึกภาพการเรืองแสงด้วยเครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล Gel Documentation System (Major Science, USA) รุ่น SmartView Pro Imager UVCI - 1100 ใช้ค่าการเปิดรับแสง (Exposure time) 2 วินาที และส่องดูการเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ Olympus BX60 (Olympus, China) ที่กำลังขยาย 40X ซึ่งทั้งสองเครื่องมือเป็นแหล่งกำเนิดแสงสีฟ้าความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร และตัวกรองแสงสีส้ม จากนั้นนำภาพการเรืองแสงไปวิเคราะห์ค่าความสว่างของแสงด้วยโปรแกรม ImageJ ฟังก์ชัน ROI Manager เพื่อให้ได้ค่าเฉลี่ยความสว่างของการเรืองแสง จากนั้นนำไปวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ Paired Samples T-Test

4. การวิเคราะห์ภาพรวมดีเอ็นเอด้วยเทคนิคแคพิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Capillary Electrophoresis)

ตัวอย่างก้านเก็บดีเอ็นเอจากการสัมผัสจากอาสาสมัครชายและหญิงที่ผ่านการย้อมสี ตัวอย่างเยื่อบุกระพุ้งแก้มที่ผ่านการย้อมสี และตัวอย่างก้านเก็บตัวอย่างเปล่าที่ผ่านการย้อมสี จะถูกสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยาสกัด QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, USA) โดยทำตามขั้นตอนจากคู่มือการใช้งานของชุดน้ำยา QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook โดยการเติมบัฟเฟอร์ AL ใช้ปริมาตร 200 µl และปม ที่ 56 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง จากนั้นตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสกัดจะถูกวัดปริมาณด้วยเทคนิค Real time Polymerase Chain Reaction (Real-time PCR) ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป Quantifiler[®]HP DNA Quantification Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) โดยทำตามขั้นตอน Quantifiler[™]HP and Trio DNA Quantification Kits USER GUIDE [6] จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส Polymerase Chain Reaction (PCR) ด้วยชุดน้ำยา VeriFiler[™] Plus PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) โดยวิธีการเตรียมสารแบบ Half volume reaction นำตัวอย่างเข้าเครื่อง GeneAmp[®] PCR system 9700 gold plated silver 96 well block ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจะถูกวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคแคพิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส เครื่อง Applied Biosystems[®] 3500 Genetic analyzer จะได้ข้อมูลดิบและถูกวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม GeneMapper[®]ID-X ที่ Analytical Threshold 100 RFU ดูจำนวนการปรากฏของพีคแอลลิล

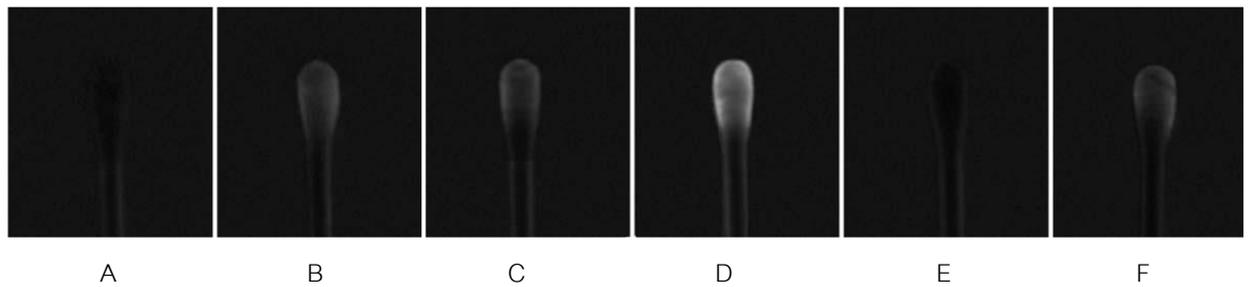
งานวิจัยนี้ได้รับการอนุมัติทางจริยธรรมการวิจัยในคน มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ หมายเลข 096/2563

ผลการวิจัย

จากการตรวจสอบความสามารถในการเรืองแสงบนหัวของก้านเก็บตัวอย่างหัวคอตตอน (ภาพที่ 2) พบว่าก้านเก็บตัวอย่างหัวคอตตอนที่ไม่ถูกย้อมสี ได้แก่ ตัวอย่างก้านเก็บตัวอย่างเปล่า และก้านเก็บตัวอย่างที่มีตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสัมผัสที่ไม่ถูกย้อมสี ไม่มีการเรืองแสงเกิดขึ้น ส่วนในก้านเก็บตัวอย่างหัวคอตตอนที่ถูกย้อมสี ได้แก่ ก้านเก็บตัวอย่างเปล่าที่ถูกย้อมสี ก้านเก็บตัวอย่างที่มีตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสกัดที่ถูกย้อมสี และก้านเก็บตัวอย่างที่เซ็ดเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสัมผัสที่ถูกย้อมสีนั้นให้ผลความสว่างของการเรืองแสงมากกว่าก้านเก็บตัวอย่างที่ไม่ถูกย้อมสีเพียงเล็กน้อย แต่ทั้งนี้ในก้านเก็บตัวอย่างหัวคอตตอนที่เซ็ดเก็บตัวอย่างเยื่อกระดูกงูที่ก้านเก็บตัวอย่างให้ผลการเรืองแสงที่มากกว่าก้านตัวอย่างอื่น ๆ ที่กล่าวมาอย่างเห็นได้ชัด แต่ในส่วนของความสว่างของการเรืองแสงบนหัวก้านเก็บตัวอย่างคอตตอนที่เซ็ดเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสัมผัสที่ถูกย้อมสีเมื่อเทียบกับความสว่างของการเรืองแสงบนก้านเก็บตัวอย่างหัวคอตตอนเปล่าที่ถูกย้อมสีนั้นไม่พบความแตกต่าง และเมื่อนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ที่กำลังขยาย 40X พบว่า สามารถสังเกตเห็นจุดการเรืองแสงได้ชัดเจนในก้านเก็บเยื่อกระดูกงูที่ก้านเก็บตัวอย่างที่ก้านเก็บตัวอย่างที่เซ็ดเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสัมผัสที่ถูกย้อมสี (ภาพที่ 3: C-D) ซึ่งผลมีความสอดคล้องกับการสังเกตการเรืองแสงภายใต้เครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล Gel Documentation System (Major Science, USA) ซึ่งเมื่อทำการตรวจสอบค่าเฉลี่ยความสว่างของการเรืองแสงด้วยโปรแกรม Image J (ตารางที่ 1) พบว่าก้านเก็บตัวอย่างหัวคอตตอนที่ไม่ถูกย้อมสี ได้แก่ ตัวอย่างก้านเก็บตัวอย่างเปล่า ก้านเก็บตัวอย่างที่มีตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสัมผัสที่ไม่ถูกย้อมสีของอาสาสมัครชาย และอาสาสมัครหญิง มีค่าเฉลี่ยของการเรืองแสงเท่ากับ 17.61 ± 0.26 , 21.41 ± 1.06 และ 22.87 ± 0.49 ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าความสว่างที่น้อยกว่าในส่วนของก้านเก็บตัวอย่างหัวคอตตอนที่ถูกย้อมสี ได้แก่ ก้านเก็บตัวอย่างเปล่าที่ถูกย้อมสี ก้านเก็บตัวอย่างที่มีตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสกัดที่ถูกย้อมสี ก้านเก็บตัวอย่างที่เซ็ดเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสัมผัสที่ถูกย้อมสี ของอาสาสมัครชาย และอาสาสมัครหญิง ซึ่งมีค่าเฉลี่ยของการเรืองแสงเท่ากับ 45.18 ± 2.67 , 46.80 ± 2.95 , 39.14 ± 2.26 , 48.58 ± 1.50 ตามลำดับ โดยที่ค่าเฉลี่ยของการเรืองแสงในก้านเก็บตัวอย่างหัวคอตตอนที่เซ็ดเก็บตัวอย่างเยื่อกระดูกงูที่ก้านเก็บตัวอย่างให้ค่าการเรืองแสงที่มากกว่าก้านตัวอย่างอื่น ๆ ที่กล่าวมาอย่างชัดเจนโดยมีค่าเท่ากับ 121.56 ± 11.34 สอดคล้องกับภาพการเรืองแสงของก้านเก็บตัวอย่างหัวคอตตอน (ภาพที่ 2) ที่ผ่านการบันทึกภาพการเรืองแสงด้วยเครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล Gel Documentation System (Major Science, USA)

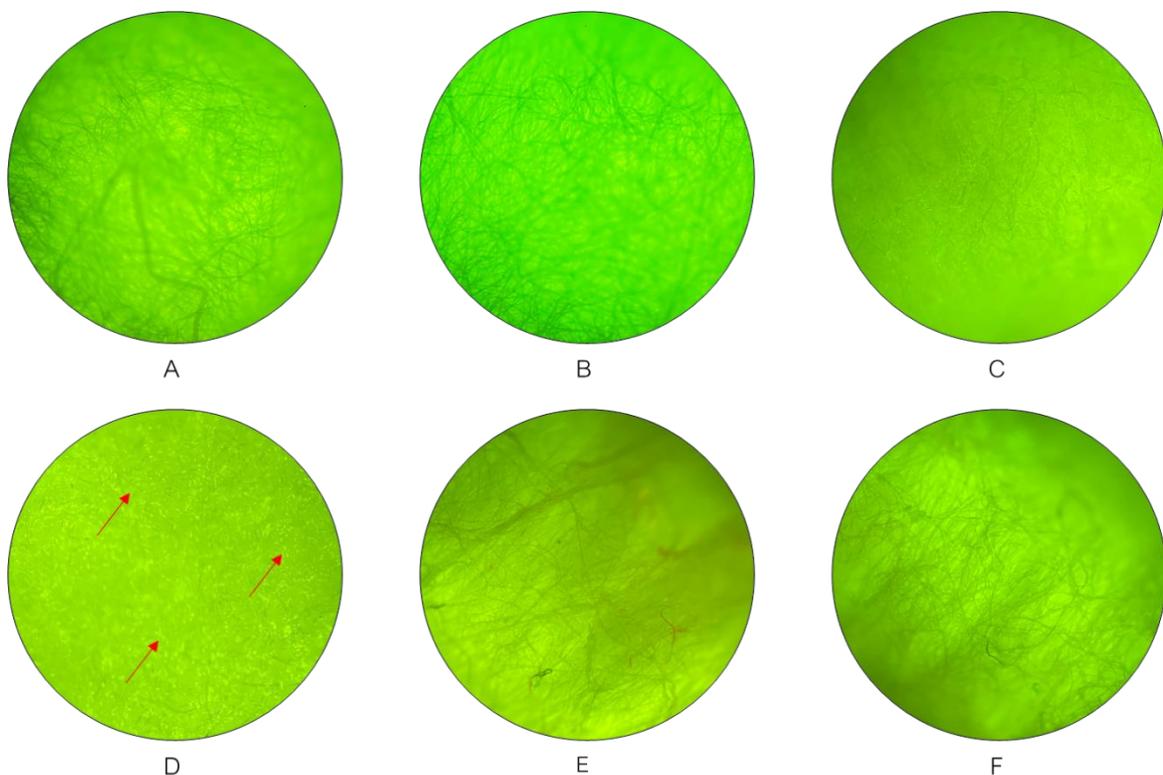
และเมื่อนำค่าดังกล่าวไปทดสอบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2) พบ ค่าความสว่างของการเรืองแสงของก้านเก็บตัวอย่างหัวคอตตอนที่เซ็ดเก็บตัวอย่างเยื่อกระดูกงูที่ก้านเก็บตัวอย่างเมื่อเทียบกับค่าความสว่างของการเรืองแสงของก้านเก็บตัวอย่างหัวคอตตอนเปล่าที่ถูกย้อมสี มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยค่า p-value เท่ากับ 0.006 แต่ในส่วนของก้านเก็บตัวอย่างที่เซ็ดเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสัมผัสที่ถูกย้อมสีของทั้งอาสาสมัครชาย และอาสาสมัครหญิง เมื่อเปรียบเทียบกับก้านเก็บตัวอย่างหัวคอตตอนเปล่าที่ถูกย้อมสีพบว่า ทั้งจากอาสาสมัครชายและหญิงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยค่า p-value เท่ากับ 0.132 และ 0.170 ตามลำดับ

เมื่อนำตัวอย่างดีเอ็นเอจากก้านเก็บดีเอ็นเอจากการสัมผัสย้อมสีที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างของการเรืองแสงกับก้านเก็บตัวอย่างเปล่าย้อมสีได้นั้น พบว่าทุกก้านมีดีเอ็นเออยู่ เช่นเดียวกันกับก้านเก็บตัวอย่างเยื่อกระดูกงูที่ก้านเก็บตัวอย่างที่สามารถตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอได้ (ตารางที่ 3) โดยก้านเก็บดีเอ็นเอจากการสัมผัสที่ถูกย้อมสีเมื่อนำไปสร้างเป็นภาพรวมของดีเอ็นเอโดยพบว่าทุกตัวอย่างสามารถสร้างภาพรวมดีเอ็นเอออกมาได้ (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 2 การเรืองแสงของก้านเก็บตัวอย่างหัวคอตตอน

[A: ก้านเก็บตัวอย่างเปล่า, B: ก้านเก็บตัวอย่างเปล่าย้อมสี, C: ก้านเก็บดีเอ็นเอจากการสกัดย้อมสี, D: ก้านเก็บเยื่อกระดูกงูแกมย้อมสี, E: ก้านเก็บดีเอ็นเอจากการสัมผัส, F: ก้านเก็บดีเอ็นเอจากการสัมผัสย้อมสี]



ภาพที่ 3 ภาพการเรืองแสงของก้านเก็บตัวอย่างหัวคอตตอนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ที่กำลังขยาย 40X

[A: ก้านเก็บตัวอย่างเปล่าย้อมสี, B: ก้านเก็บดีเอ็นเอจากการสกัดย้อมสี, C: ก้านเก็บเยื่อกระดูกงูแกมย้อมสี, D: ก้านเก็บเยื่อกระดูกงูแกมย้อมสี กำลังขยายภาพ 150%, E: ก้านเก็บดีเอ็นเอจากการสัมผัสเพศชายย้อมสี, F: ก้านเก็บดีเอ็นเอจากการสัมผัสเพศหญิงย้อมสี, ลูกศร: การเรืองแสงของเยื่อกระดูกงูแกมที่ผ่านการย้อมสี]

ตารางที่ 1 ค่าความสว่างของการเรียงแสงบนหัวของก้านเก็บตัวอย่างหัวคอตตอนโดยโปรแกรม Image J

ImageJ (ROI)	ก้านเก็บตัวอย่างหัวคอตตอน				อาสาสมัครชาย		อาสาสมัครหญิง	
	ก้านเก็บตัวอย่างเปล่า	ก้านเก็บตัวอย่างเปล่า ย้อมสี	ดีเอ็นเอจากการสกัด ย้อมสี	เยื่อบุกระพุ้งแก้ม ย้อมสี	ดีเอ็นเอจากการสัมผัส	ดีเอ็นเอจากการสัมผัส ย้อมสี	ดีเอ็นเอจากการสัมผัส	ดีเอ็นเอจากการสัมผัส ย้อมสี
1	17.71	43.61	49.10	108.54	21.40	41.74	22.35	46.95
2	17.80	43.66	43.47	129.30	20.36	37.74	22.93	49.90
3	17.32	48.26	47.84	126.83	22.47	37.94	23.33	48.89
Mean±SD	17.61 ±0.26	45.18 ±2.67	46.80 ±2.95	121.56 ±11.34	21.41 ±1.06	39.14 ±2.26	22.87 ±0.49	48.58 ±1.50

ตารางที่ 2 แสดงค่าการทดสอบความแตกต่างทางสถิติ Paired Samples T-Test ของการเรียงแสงของก้านเก็บตัวอย่างหัวคอตตอน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ก้านเก็บตัวอย่างหัวคอตตอน	ตัวอย่าง			อาสาสมัครชาย		อาสาสมัครหญิง	
	ก้านเก็บตัวอย่างเปล่า ย้อมสี	ดีเอ็นเอจากการสกัด ย้อมสี	เยื่อบุกระพุ้งแก้ม ย้อมสี	ดีเอ็นเอจากการสัมผัส	ดีเอ็นเอจากการสัมผัส ย้อมสี	ดีเอ็นเอจากการสัมผัส	ดีเอ็นเอจากการสัมผัส ย้อมสี
ก้านเก็บตัวอย่างเปล่า	0.004*	0.004*	0.004*	0.037*	0.003*	0.006*	0.001*
ก้านเก็บตัวอย่างเปล่า ย้อมสี		0.489	0.006*	0.002*	0.132	0.003*	0.170
ดีเอ็นเอจากการสกัด ย้อมสี			0.110	0.030*	0.024*	0.006*	0.551
เยื่อบุกระพุ้งแก้ม ย้อมสี				0.004*	0.009*	0.004*	0.006*
ดีเอ็นเอจากการสัมผัสอาสาสมัครชาย					0.006*	0.119	0.002*
ดีเอ็นเอจากการสัมผัสอาสาสมัครชาย ย้อมสี						0.009*	0.048*
ดีเอ็นเอจากการสัมผัสอาสาสมัครหญิง							0.001*

* ค่าการเรียงแสงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ค่าความเชื่อมั่น 95% (p-value < 0.05)

■ ค่าสถิติการเรียงแสงของก้านเก็บตัวอย่างคอตตอนเปล่าที่ถูกย้อมสี เทียบกับก้านเก็บดีเอ็นเอจากเยื่อบุกระพุ้งแก้มย้อมสี ก้านเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสัมผัสย้อมสีในอาสาสมัครชายและหญิง

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณของดีเอ็นเอที่วัดได้จากการสกัดตัวอย่างก้นเก็บดีเอ็นเอจากการสัมผัสย้อมสี

ก้นเก็บตัวอย่าง หัวคอตตอน	ปริมาณดีเอ็นเอที่วัดได้ (ng/μl)		
	ดีเอ็นเอจากการสัมผัส ย้อมสี (อาสาสมัครชาย)	ดีเอ็นเอจากการสัมผัส ย้อมสี (อาสาสมัครหญิง)	ดีเอ็นเอจากเยื่อบุกระพุ้ง แก้มย้อมสี
1	0.8223	0.0173	4.0253
2	0.6691	0.0472	4.7779
3	0.3484	0.4309	6.1951



ภาพที่ 4 ภาพรวมดีเอ็นเอจากตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสัมผัสของอาสาสมัครชายและหญิง ย้อมสี ที่มีปริมาณดีเอ็นเอต่ำที่สุดวิเคราะห์ด้วยชุดน้ำยา VeriFiler™ Plus PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific, USA)
 [A: ภาพรวมดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสัมผัสของอาสาสมัครชายที่ถูกย้อมสี โดยมีปริมาณดีเอ็นเอ 0.3484 ng/μl, B: ภาพรวมดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสัมผัสของอาสาสมัครหญิงที่ถูกย้อมสี โดยมีปริมาณดีเอ็นเอ 0.0173 ng/μl]

สรุปและอภิปรายผล

จากการตรวจสอบความสามารถในการเรืองแสงบนหัวของก้านเก็บตัวอย่างหัวคอตตอน เมื่อย้อมด้วยสี SYBR Green I (Invitrogen, USA) ที่มีความเข้มข้น 5X พบว่าก้านเก็บตัวอย่างหัวคอตตอน ยี่ห้อ EO cotton swab (Thai Gauze, TH) ไม่สามารถนำไปใช้ในการตรวจจับดีเอ็นเอจากการสัมผัสได้เนื่องจากให้การเรืองแสงที่แยกความแตกต่างได้ยากระหว่างก้านที่มีตัวอย่างดีเอ็นเอและไม่มีตัวอย่างดีเอ็นเอ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่มีการทำงานวิจัยโดยใช้สีย้อม Diamond™ Nucleic acid dye (Promega, USA) เพื่อช่วยในการมองเห็นดีเอ็นเอจากการสัมผัสบนก้านเก็บตัวอย่าง ชนิดต่าง ๆ ซึ่งก็พบว่า หัวคอตตอนก็เป็นหนึ่งในก้านเก็บตัวอย่างที่ไม่สามารถเรืองแสงได้ หากในงานวิจัยดังกล่าวมีการทดลองในด้านสาลีหัวคอตตอนสีดำและมีสารไคโตซาน (Chitosan) เคลือบอยู่บนสาลี ซึ่งด้วยลักษณะสีดำของหัวสาลีและสารเคลือบดังกล่าวทำให้เมื่อนำไปย้อมสีเพื่อสังเกตดีเอ็นเอจากการสัมผัสสามารถมองเห็นการเรืองแสงเกิดขึ้นได้ ซึ่งเป็นผลที่ต่างออกไปจากการเก็บตัวอย่างหัวคอตตอนทั่วไป [5] ซึ่งจะต้องทำการศึกษาวิจัยต่อไป ในทางกลับกันเมื่อนำก้านเก็บตัวอย่างที่เก็บเยื่อกระดาษมาสังเกตการเรืองแสง พบว่าสามารถมองเห็น หรือมีการเรืองแสง เนื่องจากเป็นตัวอย่างที่มีลักษณะเป็นเซลล์เยื่อกระดาษและเป็นแหล่งดีเอ็นเอจำนวนมาก อีกทั้งด้วยลักษณะของก้านเก็บตัวอย่างหัวคอตตอน ที่เกิดจากการพันตัวของเส้นใยซึ่งทำให้ในการดูดซับตัวอย่างจะแทรกไปในตัวของร่องเส้นใย [7] ซึ่งหากเป็นตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสัมผัสที่มักมีดีเอ็นเออยู่ในปริมาณน้อย และแหล่งของดีเอ็นเอจากการสัมผัสส่วนใหญ่เป็นดีเอ็นเอภายนอกนิวเคลียสที่เกิดจากการผลัดตัวของเซลล์ผิวหนัง [8] ซึ่งเมื่อใช้ก้านเก็บตัวอย่างแบบหัวคอตตอนจะทำให้ตัวอย่างดีเอ็นเอแทรกเข้าสู่เส้นใยจึงไม่สามารถมองเห็นการเรืองแสงซึ่งแตกต่างกับดีเอ็นเอจากเซลล์เยื่อกระดาษที่แหล่งของดีเอ็นเอจะอยู่รวมกันในนิวเคลียสภายในเซลล์และมีปริมาณของดีเอ็นเอที่มากทำให้ในการเก็บดีเอ็นเอโดยใช้ก้านเก็บตัวอย่างหัวคอตตอนจะยังคงสามารถมองเห็นการเรืองแสงได้ และด้วยคุณสมบัติของสีย้อม SYBR Green I (Invitrogen, USA) ที่สามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อเข้าจับกับดีเอ็นเอและให้การเรืองแสงเพิ่มขึ้นถึง 1,000 เท่า จากการเรืองแสงปกติ [9] จึงทำให้ในตัวอย่างดีเอ็นเอเยื่อกระดาษสามารถมองเห็นการเรืองแสงได้ชัดเจน และเมื่อศึกษาถึงผลกระทบด้านการใช้สีย้อม SYBR Green I (Invitrogen, USA) ที่มีความเข้มข้นถึง 5X พบว่ายังสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ และสามารถทำการวิเคราะห์ภาพรวมดีเอ็นเอ โดยไม่มีการรบกวนหรือยับยั้งการทำงานซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่มีการใช้ชนิดเดียวกัน แม้จะมีความเข้มข้นของสารต่างกันถึง 5.5 เท่า [4]

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพเบื้องต้นจากการใช้สีย้อม SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain ในการตรวจหาการมีอยู่ของดีเอ็นเอจากการสัมผัสและดีเอ็นเอจากเยื่อกระดาษบนก้านเก็บตัวอย่างคอตตอน ซึ่งจากการตรวจสอบเบื้องต้นพบว่าความสามารถในการเรืองแสงบนหัวของก้านเก็บตัวอย่างหัวคอตตอน EO cotton swab (Thai Gauze, TH) เมื่อย้อมด้วยสี SYBR Green I (Invitrogen, USA) ที่มีความเข้มข้น 5X นั้น พบว่าก้านเก็บตัวอย่างหัวคอตตอน เหมาะสำหรับการตรวจหาดีเอ็นเอที่มีปริมาณมากอย่างดีเอ็นเอจากเยื่อกระดาษ แต่ไม่เหมาะกับการนำมาช่วยตรวจหาดีเอ็นเอจากการสัมผัสที่มีปริมาณค่อนข้างน้อย โดยหากจะนำวิธีการดังกล่าวไปใช้เป็นวิธีการคัดกรองตัวอย่างดีเอ็นเอจากการสัมผัสเบื้องต้นก่อนเข้าสู่กระบวนการได้มาของภาพรวมดีเอ็นเอในห้องปฏิบัติการจำเป็นจะต้องศึกษาโดยใช้ก้านเก็บตัวอย่างชนิดอื่นต่อไป อย่างไรก็ตามวิธีการนี้สามารถใช้สำหรับการคัดกรองตัวอย่างดีเอ็นเอจากเยื่อกระดาษได้

งานวิจัยนี้เป็นผลงานวิชาการซึ่งมิได้มีผลประโยชน์ทับซ้อนกับกลุ่มใด ๆ ทางด้านธุรกิจทั้งสิ้น

กิตติกรรมประกาศ

เป็นผลงานวิจัยที่ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนวิจัยคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2563

เอกสารอ้างอิง

- [1] Theda, C., Hwang, S. H., Czajko, A., Loke, Y. J., Leong, P., and Craig, J. M. (2018). Quantitation of the cellular content of saliva and buccal swab samples. *Scientific reports*, 8(1), Article 6944.
- [2] Haines, A. M., Tobe, S. S., Kobus H., and Linacre, A. (2013). Detection of DNA within fingerprints. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 4(1), e290-e291.
- [3] Haines, A. M., Tobe, S. S., Kobus, H., and Linacre, A. (2015). Finding DNA: Using fluorescent in situ detection. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 5, e501-e502.
- [4] Tonkrongjun, P., Phetpeng, S., Asawutmangkul, W., Sothhibandhu, S., Kitpipit, T., and Thanakiatkrai, P. (2019). Improved STR profiles from improvised explosive device (IED): fluorescence latent DNA detection and direct PCR. *Forensic Science International: Genetics*, 41, 168-176.
- [5] Kanokwongnuwut, P., Kirkbride, P., and Linacre, A. (2018). Visualising latent DNA on swabs. *Forensic Science International*, 291, 115-123.
- [6] Thermo Fisher Scientific. (2017). Quantifiler™HP and Trio DNA QuantificationKits USER GUIDE. Retrieved from <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/4485354.pdf>
- [7] Brownlow, R. J., Dagnall, K. E., and Ames, C. E. (2012). A Comparison of DNA Collection and Retrieval from Two Swab Types (Cotton and Nylon Flocked Swab) when Processed Using Three QIAGEN Extraction Methods. *Journal of Forensic Sciences*, 57(3), 713-717.
- [8] Burrill, J., Daniel, B., and Frascione, N., (2019). A review of trace “Touch DNA” deposits: Variability factors and an exploration of cellular composition. *Forensic Science International: Genetics*, 39, 8-18.
- [9] Dragan, A. I., Pavlovic, R., McGivney, J. B., Casas-Finet, J. R., Bishop, E. S., Strouse, R. J., Schenerman, M. A., and Geddes, C. D. (2012). SYBR Green I: Fluorescence Properties and Interaction with DNA. *Journal of Fluorescence*, 22, 1189-1199.