แนวปฏิบัติในการแปลผลการตรวจลำดับเบสบนไมโตคอนเดรีย

โดย....คณะทำงานวิทยาศาสตร์ด้านวิธีการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ (SWGDAM)

แปลจาก

Guidelines for Mitochondrial DNA (mtDNA) Nucleotide Sequence Interpretation

Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDAM)

http://www.fbi.gov/about-us/lab/forensic-science-communications/fsc/april2003/swgdammitodna.htm/

แปลโดย....สุคนธ์ ประดุจกาญจนา* และ ภูวดล ธนะเกียรติไกร**

*หน่วยนิติเวชศาสตร์และพิษวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์

**ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่ สงขลา 90110

วันที่ 14 สิงหาคม 2555

.....

บทนำ

การแปลผลการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสบนไมโตคอนเดรียในคดีพิสูจน์ศพทางนิติเวชเป็นเรื่องที่จำเป็นต้องใช้ความรู้ ความชำนาญเฉพาะทาง ถึงแม้จะมีแนวปฏิบัติสำหรับการตรวจวิเคราะห์ไมโตคอนเดรียมาบ้าง (Budowle et al. 1999; Carracedo et al. 2000; Holland and Parsons 1999; Tully et al. 2001) แต่ยังไม่มีกฎเกณฑ์เฉพาะใดสามารถหรือควรใช้อธิบายเหตุการณ์ต่างๆได้ทุกเรื่อง จึงเป็นความสำคัญอย่างยิ่งที่ห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งจะต้องกำหนดแนวปฏิบัติในการแปลผลการตรวจวิเคราะห์ไว้เป็นลายลักษณ์อักษร เอกสารชุดนี้จะเป็นกรอบโครงร่างแนวปฏิบัติในการแปลผลการตรวจไมโตคอนเดรีย โดยแนวปฏิบัติในการแปลผลการตรวจที่แต่ละห้องปฏิบัติการต้องจัดทำขึ้นนี้ต้องสรุปขึ้นจากข้อมูลการทวนสอบตามมาตรฐานรับรองคุณภาพสำหรับการทดสอบนิติพันธุศาสตร์และห้องปฏิบัติการที่มีฐานข้อมูลของผู้กระทำผิด (Quality Assurance Standards for Forensic DNA Testing and Convicted Offender Databasing Laboratories) แนวปฏิบัติในการทวนสอบตามข้อกำหนดของ SWGDAM และข้อมูลจากบทความวิชาการทางวิทยาศาสตร์ (เช่น ของ Wilson et al. 1995a) ควรนำมาใช้ร่วมด้วย

การประกันคุณภาพ / การรับรองคุณภาพ

การปฏิบัติที่สำคัญในการตรวจวิเคราะห์ไมโตคอนเดรียคือการลดและติดตามปัญหาการปนเปื้อนภายในห้องปฏิบัติการ ทั้งนี้เนื่องจากความไวของเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ ทำให้บางครั้งอาจพบการปนเปื้อนจากดีเอ็นเอปริมาณน้อยจากภายนอก และ/หรือ background อย่างไรก็ตามผลการทดสอบที่น่าเชื่อถือจะเกิดขึ้นได้เมื่อมีการใช้ตัวควบคุมคุณภาพที่ถูกต้องเหมาะสม

การปนเปื้อนเป็นปัญหาที่ต้องติดตาม ห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งต้องมีวิธีการในการนิยามและหาปริมาณการปนเปื้อน ห้องปฏิบัติการต้องกำหนดเกณฑ์ยอมรับได้สูงสุด (maximum allowable threshold) สำหรับปัญหาจากการปนเปื้อน โดยผ่านการศึกษาด้านการทวนสอบภายใน (internal validation studies) ห้องปฏิบัติการต้องมีระเบียบปฏิบัติ (standard operating procedures) ที่กล่าวถึงวิธีแก้ปัญหาจากการปนเปื้อน (Wilson et al. 1995b) แต่ละห้องปฏิบัติการต้องมีการประเมินตัวควบคุม รวมถึง ตัวควบคุมบวก ตัวควบคุมลบ และ ตัวควบคุมน้ำยาเปล่า ตัวควบคุมแต่ละตัวจะต้องมีการทำการวิเคราะห์ลำดับเบสร่วมไปด้วยกับตัวอย่างตรวจ นอกจากนั้นควรมีการวิเคราะห์รูปแบบดีเอ็นเอบนไมโตคอนเดรียของบุคลากรในห้องปฏิบัติการไว้ด้วยเพื่อใช้ค้นหาแหล่งกำเนิดของการปนเปื้อนได้

ตัวควบคุมบวก หมายถึงตัวอย่างตรวจที่รู้ลำดับเบสบนไมโตคอนเดรียแล้ว ใช้เพื่อติดตามผลสำเร็จของการตรวจวิเคราะห์ ตัวควบคุมบวกต้องเริ่มใช้ตั้งแต่ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (เช่น ดีเอ็นเอที่สกัดจากเซลล์เพาะเลี้ยง HL60 ใช้เป็นตัวควบคุมบวกในการสรุปผลข้อมูลการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสบนไมโตคอนเดรียทางนิติเวชศาสตร์ในระบบ Combined DNA Index System [CODIS])

ตัวควบคุมน้ำยาเปล่าและตัวควบคุมลบ ใช้เพื่อติดตามระดับของการปนเปื้อน ตัวควบคุมน้ำยาเปล่าใช้ติดตามปัญหาการปนเปื้อนตั้งแต่ขั้นตอนการสกัดจนถึงขั้นตอนสุดท้ายของการวิเคราะห์ลำดับเบส ตัวควบคุมลบใช้ติดตามปัญหาการปนเปื้อนจากขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจนถึงขั้นตอนสุดท้ายของการวิเคราะห์ลำดับเบส หากผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตัวควบคุมน้ำยาเปล่า และ/หรือ ตัวควบคุมลบให้ผลลำดับเบสเหมือนกับในตัวอย่างตรวจ ข้อมูลลำดับเบสทุกเส้นของตัวอย่างตรวจจะต้องถูกปฏิเสธ การวิเคราะห์ครั้งนั้นจะต้องถูกทำใหม่ โดยเริ่มต้นตั้งแต่ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอใหม่ ถ้าปัญหาการปนเปื้อนในตัวควบคุมน้ำยาเปล่าและ/หรือตัวควบคุมลบ มีระดับเกินกว่าเกณฑ์ที่กำหนดไว้โดยห้องปฏิบัติการ ข้อมูลลำดับเบสนั้นๆจะไม่สามารถนำมาใช้แปลผลการทดสอบได้ ตัวอย่างตรวจเหล่านั้นจะต้องนำกลับไปทำซ้ำตั้งแต่ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใหม่ หรือขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอใหม่

ข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากตัวอย่างในฐานข้อมูลประชากรต้องมีอย่างน้อยสองบริเวณ คือบริเวณ HV1 (ลำดับเบสที่ตำแหน่ง 16024-16365) และบริเวณ HV2 (ลำดับเบสที่ตำแหน่ง 73-340) ลำดับเบสจากตัวอย่าง

ตรวจอ้างอิงหรือตัวอย่างตรวจที่รู้ความสัมพันธ์ (K) แล้วควรมีทั้งบริเวณ HV1 (ตำแหน่ง 16024-16365) และบริเวณ HV2 (ตำแหน่ง 73-340) สำหรับตัวอย่างตรวจจากผู้สงสัย (Q) ไม่มีการกำหนดความยาวของลำดับเบสที่ได้ แต่ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทั้งสองสายต้องนำมาวิเคราะห์ลำดับเบสเพื่อลดความคลุมเครือในการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบส

การแปลผลข้อมูล

ห้องปฏิบัติการต้องกำหนดเกณฑ์การยอมรับลำดับเบสจากความสูงของสัญญาณหรือแถบที่เหมาะสมและตรวจสอบว่าผลการทดสอบมีคุณภาพที่ดีเพียงพอในการใช้แปลผลการทดสอบ คุณภาพรวมของข้อมูล electropherogram จะต้องมีการประเมิน ผลการทดสอบต้องมีการวิเคราะห์ว่าผ่านเกณฑ์ยอมรับให้ใช้วิเคราะห์ผลการทดสอบ และเกณฑ์ยอมรับให้ใช้แปลผลการทดสอบได้ โดยผ่านการศึกษาด้านการทวนสอบภายใน หากคุณภาพรวมของ electropherogram ไม่เหมาะที่จะใช้วิเคราะห์ต่อไป ข้อมูลเหล่านี้ควรถูกปฏิเสธและตัวอย่างตรวจควรต้องนำมาทำซ้ำ เริ่มจากขั้นตอนการสกัดใหม่ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใหม่ และ/หรือทำ sequence ใหม่

ลำดับเบสที่สอดคล้องกันที่ได้รับจากตัวอย่างตรวจจะต้องนำมาเปรียบเทียบกับลำดับเบสอ้างอิง (Revised Cambridge Reference Sequence, rCRS) ซึ่งศึกษาโดย Andrews และคณะ (Andrews et al. 1999; rCRS ใช้ทดแทน Cambridge Reference Sequence (CRS) ซึ่งศึกษาโดย Anderson and co-workers (Anderson et al. 1981). บันทึกความแตกต่างระหว่างลำดับเบสสายอ้างอิงกับลำดับเบสที่ได้จากตัวอย่างตรวจ โดยบันทึกตำแหน่งของลำดับเบสและชนิดของเบสที่แตกต่างจากสายอ้างอิง (เช่น ตำแหน่ง 16089 C) (หมายเหตุ รายการของลำดับเบสที่แตกต่างจากลำดับเบสอ้างอิงต้องมีการแสดงไว้เพื่อใช้สรุปผลข้อมูลไมโตคอนเดรียในระบบ CODIS)

การกลายพันธ์แบบเพิ่มขึ้น (Insertion) ต้องมีการจดบันทึกตำแหน่งตามทิศทาง 3’ ของสาย light strand ของลำดับเบสอ้างอิง rCRS ตามด้วย จุด และเลข 1 สำหรับการเพิ่มขึ้นหนึ่งเบสแรก ตัวเลขนี้จะเพิ่มขึ้นตามจำนวนเบสที่เพิ่มขึ้นแต่ละตัว สำหรับบริเวณที่มีการซ้ำของเบสชนิดเดียวกันจำนวนมาก (homopolymeric regions) การกลายพันธุ์แบบเพิ่มขึ้นจะระบุด้วยตัวเลขสุดท้ายที่สิ้นสุดช่วง homopolymeric region ตามลำดับเบสอ้างอิง rCRS โดยไม่เปลี่ยนแปลงเลขลำดับตามจำนวนเบสที่เพิ่มขึ้น (อธิบายเพิ่มเติม เช่น ตำแหน่ง 309.1C, 309.2C, 309.3C เป็นต้น) ลำดับเบสที่แตกต่างจาก rCRS ควรบันทึกให้สอดคล้องตามแนวทางที่เสนอโดย Wilson et al. 2002a และ Wilson et al. 2002b.

การเรียกชื่อเบสของดีเอ็นเอควรกำหนดตามระบบการเรียกชื่อที่กำหนดตาม International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) ตำแหน่งที่มีความคลุมเครือที่ผ่านการตรวจสอบแล้ว ควรใช้รหัส IUPAC ดังนี้

G/T = K	A/C = M
A/G = R	A/G/T = D
G/C = S	A/C/T = H
A/T = W	A/C/G = V
C/T = Y	C/T/G/ = B
A/C/G/T = N	

แนวทางการเรียกชื่อแบบอนุรักษ์นิยม อาจกำหนดให้เบสที่ยังคลุมเครืออยู่ เรียกเป็น “N” ส่วนการขาดหายไป (deletion) ให้แทนด้วยสัญลักษณ์ “-“

ลำดับเบสที่เกี่ยวพันกันทั้งหมดของตัวอย่างตรวจเดียวกันต้องนำมาวิเคราะห์ในโปรแกรมสำหรับการวิเคราะห์และจัดเรียงลำดับเบส ลำดับเบสสาย heavy strand ควรมีการปรับเป็นเบสคู่สมและกลับด้านเพื่อให้สามารถจัดเรียงเทียบกันในทิศทางเดียวกับสาย light strand ดีเอ็นเอบนสายเหล่านี้จะต้องถูกเปรียบเทียบและกำหนดเป็นลำดับเบสที่สอดคล้องกัน (ดีเอ็นเอบนสายเหล่านี้มีลำดับเบสเหมือนกันแสดงว่าที่ตำแหน่งนั้นเป็นลำดับเบสนั้นจริง) heteroplasmy หมายถึง การพบรูปแบบดีเอ็นเอบนไมโตคอนเดรียมากกว่าหนึ่งรูปแบบในคนเดียวกัน ซึ่งเป็นการพบในระดับปฏิบัติการ heteroplasmy สามารถพบได้เป็น point heteroplasmy ซึ่งหมายถึงการพบเบส 2 ชนิดที่ตำแหน่งเดียวกัน หรืออาจพบเป็น length heteroplasmy ซึ่งมีลักษณะเฉพาะที่พบเป็นการเปลี่ยนแปลงในจำนวนเบสชนิดเดียวกันบริเวณ homopolymeric region (เช่น บริเวณ C-stretch) ห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งควรกำหนดการตรวจพบ heteroplasmy ไว้ในระดับปฏิบัติงานของระบบการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสไว้ด้วย เมื่อพบว่าตัวอย่างตรวจคู่ใดที่กำลังเปรียบเทียบความสัมพันธ์แล้วพบว่ามีลำดับเบสแตกต่างกันเพียงแค่ตำแหน่งเดียว ควรมีการทำซ้ำในตัวอย่างตรวจใหม่เพื่อให้สามารถแปลผลนี้ได้

การที่มีเบสเดียวกันเรียงติดต่อกันเรียกว่า homopolymeric tract ในบริเวณ HV1 พบการเรียงต่อกันของเบส C เป็นสายยาวเริ่มจากตำแหน่งที่ 16184 และในบริเวณ HV2 การเรียงต่อกันของเบส C เป็นสายยาวนี้พบระหว่างตำแหน่งที่ 303 ถึง 315 การเรียงต่อกันเป็นสายยาวของเบสเดียวกันอาจมีความยาวแตกต่างกันได้ในคนเดียวกัน การตรวจส่วนใหญ่จึงไม่ต้องพยายามวิเคราะห์เพื่อหาจำนวนเบสที่แน่นอนบริเวณ HV1 C-stretch อย่างไรก็ตามห้องปฏิบัติการต้องพัฒนาแนวปฏิบัติในการแปลผลการทดสอบของตนเองสำหรับความยาวของเบสชนิดเดียวกันที่แตกต่างกันบริเวณ HV2 โดยทั่วไปความยาวของเบสชนิดเดียวกันที่ไม่เท่ากันบริเวณ

HV2 นี้อยู่ในวิสัยที่สามารถวิเคราะห์ได้ อย่างไรก็ตาม ความแตกต่างด้านความยาวของเบสที่แตกต่างกันเพียงอย่างเดียวไม่สามารถใช้แปลผลการทดสอบเป็นการคัดออกได้ (Stewart et al. 2001)

การรายงานผลการทดสอบ

ห้องปฏิบัติการต้องกำหนดสภาพของข้อมูลว่าสามารถนำมาใช้สรุปผลว่าบุคคลต้องสงสัยนั้นสามารถหรือไม่สามารถถูกคัดออกจากการเป็นต้นกำเนิดของดีเอ็นเอบนไมโตคอนเดรียที่ถูกเปรียบเทียบได้ นอกจากนั้นห้องปฏิบัติการควรกำหนดแนวปฏิบัติในการประเมินกรณีที่พบว่าในตัวอย่างตรวจมี heteroplasmy ซึ่งอาจรวมถึงการตรวจหาจำนวน ตำแหน่ง และเบสที่ตำแหน่งที่แตกต่างนั้นๆ

แนวทางในการแปลผลตามข้อแนะนำนี้ อาจใช้ได้ในกรณีส่วนใหญ่

คัดออก -- เมื่อเปรียบเทียบตัวอย่างตรวจที่สงสัยกับตัวอย่างตรวจอ้างอิง แล้วพบว่ามีลำดับเบสที่แตกต่างจากลำดับเบสอ้างอิงตั้งแต่สองตำแหน่งหรือมากกว่า แสดงว่าตัวอย่างตรวจที่สงสัยสามารถคัดออกจากการเป็นของบุคคลเดียวกัน หรือ มีความสัมพันธ์ร่วมบรรพบุรุษสายมารดาเดียวกัน

ไม่สามารถสรุปผลได้ -- เมื่อเปรียบเทียบตัวอย่างตรวจที่สงสัยกับตัวอย่างตรวจอ้างอิง แล้วพบว่ามีลำดับเบสที่แตกต่างจากลำดับเบสอ้างอิงเพียงหนึ่งตำแหน่ง ผลการทดสอบจะไม่สามารถสรุปผลได้

ไม่สามารถคัดออกได้ -- เมื่อเปรียบเทียบตัวอย่างตรวจที่สงสัยกับตัวอย่างตรวจอ้างอิง แล้วพบว่าลำดับเบสทั่วไปที่แต่ละตำแหน่ง หรือ ความยาวของเบส C-stretch บริเวณ HV2 ไม่แตกต่างกัน แสดงว่าตัวอย่างตรวจนั้นไม่สามารถคัดออกจากการเป็นตัวอย่างตรวจของบุคคลเดียวกันหรือมีความสัมพันธ์ร่วมบรรพบุรุษสายมารดาเดียวกัน

น้ำหนักของวัตถุพยาน

รูปแบบดีเอ็นเอบนไมโตคอนเดรียของตัวอย่างตรวจอ้างอิงและตัวอย่างตรวจจากวัตถุพยานที่ไม่สามารถคัดออกได้ แสดงว่าเป็นไปได้ว่าตัวอย่างตรวจทั้งสองมาจากแหล่งกำเนิดเดียวกัน ซึ่งสามารถค้นได้จากฐานข้อมูลประชากร โดยฐานข้อมูลประชากรที่ใช้ในการประเมินค่าน้ำหนักของวัตถุพยานทางนิติเวชศาสตร์ เช่น mtDNA population database หรือ CODIS (Miller and Budowle 2001; Monson et al. 2002) จะต้องมีการระบุไว้ในรายงานให้ชัดเจน

เอกสารอ้างอิง

Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., deBruijin, M. H. L., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J. H., Staden, R., and Young, I. G. Sequence and organization of the human mitochondrial genome, Nature (1981) 290:457-465.

Andrews, R. M., Kubacka, I., Chinnery, P. F., Lightowlers, R. N., Turnbull, D. M., and Howell, N. Reanalysis and revision of the Cambridge Reference Sequence for human mitochondrial DNA, Nature Genetics (1999) 23:147.

Budowle, B., Wilson, M. R., DiZinno, J. A., Stauffer, C., Fasano, M. A., Holland, M. M., and Monson, K. L. Mitochondrial DNA regions HV1 and HV2 population data, Forensic Science International (1999) 103:23-35.

Carracedo, A., Bar, W., Lincoln, P., Mayr, W., Morling, N., Olaisen, B., Schneider, P., Budowle, B., Brinkman, B., Gill, P., Holland, M., Tully, G., and Wilson, M. DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: Guidelines for mitochondrial DNA typing, Forensic Science International (2000) 110:79-85.

Holland, M. M. and Parsons, T. J. Mitochondrial DNA sequence analysis: Validation and use for forensic casework, Forensic Science Review (1999) 11:22-50.

Miller, K. W. P. and Budowle, B. A compendium of human mitochondrial DNA control region sequences: Development of an international standard forensic database, Croatian Medical Journal (2001) 42:315-327.

Monson, K. L., Miller, K. W. P., Wilson, M. R., DiZinno, J. A., and Budowle, B. The mtDNA population database: An integrated software and database resource, Forensic Science Communications [Online]. Available: www.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/april2002/miller1.htm

Stewart, J. E. B., Fisher, C. L., Aagaard, P. J., Wilson, M. R., Isenberg, A. R., Polanskey, D., Pokorak, E., DiZinno, J. A., and Budowle, B. Length variation in HV2 of the human mitochondrial DNA control region, Journal of Forensic Sciences (2001) 46:862-870.

Tully, G., Bar, W., Brinkmann, B., Carracedo, A., Gill, P., Morling, N., Parson, W., and Schneider, P. Considerations by the European DNA profiling (EDNAP) group on the working practices, nomenclature, and interpretation of mitochondrial DNA profiles, Forensic Science International (2001) 124: 83-91.

Wilson, M. R., DiZinno, J. A., Polanskey, D., Replogle, J., and Budowle, B. Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic casework analysis, International Journal of Legal Medicine (1995a) 108:68-74.

Wilson, M. R., Polanskey, D., Butler, J., DiZinno, J. A., Replogle, J., and Budowle, B. Extraction, PCR amplification, and sequencing of mitochondrial DNA from human hair shafts, Biotechniques (1995b) 18:662-669.

Wilson, M. R., Allard, M. W., Monson, K., Miller, K. W. P., and Budowle, B. Recommendations for consistent treatment of length variants in the human mitochondrial DNA control region, Forensic Science International (2002a) 129:35-42.

Wilson, M. R., Allard, M. W., Monson, K., Miller, K. W. P., and Budowle, B. Further discussion of the consistent treatment of length variants in the human mitochondrial DNA control region, Forensic Science Communications [Online]. Available: www.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/oct2002/wilson.htm