รายงานการวิจัยเรื่อง

“การสร้างฐานข้อมูลพันธุศาสตร์ประชากรไทยในตำแหน่งดีเอ็นเอทางนิติพันธุศาสตร์
ด้วยเทคโนโลยีการตรวจลำดับสารพันธุกรรมรุ่นใหม่”

จัดทำโดย

รองศาสตราจารย์ นายแพทย์กรเกียรติ วงศ์ไพศาลสิน

กิตติกรรมประกาศ

(Acknowledgement)

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
(This Research is funded by Chulalongkorn University CU-GR(S)_61_37_30_02)
ข้อมูลการศึกษาอยู่ระหว่างการเตรียม manuscript สำหรับเผยแพร่ทางวารสารวิชาการระดับนานาชาติ ในวารสารวิชาการ Forensic science international:genetics, Journal of forensic and legal medicine, international journal legal medicine หรือ Legal medicine

บทคัดย่อ

การตรวจดีเอ็นเอทางนิติพันธุศาสตร์ด้วยเทคโนโลยีการตรวจสารพันธุกรรมรุ่นใหม่ เริ่มมีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยที่การตรวจนั้นประกอบด้วยตำแหน่งของดีเอ็นเอทางนิติพันธุศาสตร์หลากหลายชนิด เช่น autosomal STRs, X and Y chromosome STRs, identity SNPs, phenotypic SNPs และ ancestry SNPs เป็นต้น การบริหารจัดการข้อมูลดังกล่าวนับว่าเป็นเรื่องสำคัญ มีการใช้ระบบฐานข้อมูลดีเอ็นเอเพื่อการจัดเก็บ และวิเคราะห์ค่าทางสถิติต่าง ๆ ที่สำคัญทางนิติวิทยาศาสตร์แต่อย่างไรก็ตามฐานข้อมูลดีเอ็นเอนั้นจะได้รับผลกระทบหากข้อมูลดีเอ็นเอที่นำมาใช้ในการสร้างฐานข้อมูลนั้นคุณภาพไม่ดีพอ ดังนั้น การคัดกรองเชิงคุณภาพของดีเอ็นเอจึงเป็นขั้นตอนสำคัญในการสร้างฐานข้อมูล วัตถุประสงค์ของการศึกษาชิ้นนี้เพื่อการสร้างฐานข้อมูลดีเอ็นเอทางนิติพันธุศาสตร์ที่มีคุณภาพของข้อมูลสูงอีกทั้งประกอบด้วยเครื่องมือในการวิเคราะห์ค่าทางสถิติที่สำคัญต่างๆทางนิติพันธุศาสตร์ และพันธุศาสตร์ประชากร การศึกษาเริ่มต้นจากผลการตรวจดีเอ็นเอกว่า 500 ตัวอย่าง ภายหลังจากการคัดกรองด้านคุณภาพของผลการตรวจด้วยค่าต่างๆแล้วนั้น ผลของดีเอ็นเอจำนวน 244 ตัวอย่าง ถูกนำมาใช้ในการสร้างฐานข้อมูล ทีผู้วิจัยได้นำเสนอฐานข้อมูลในรูปแบบของเวปไซท์ และเชื้อเชิญผู้สนใจส่งข้อมูลเข้าร่วมในการสร้างฐานข้อมูล เพื่อทำให้ฐานข้อมูลนั้นขยายขนาดเพื่อประโยชน์ในกลุ่มผู้ใช้งานอย่างสูงสุด

Abstract

The forensic DNA applied to next-generation sequencing technology has wildly used in forensic research. This technology provides a huge forensic genetic information which includes autosomal STRs, X and Y chromosome STRs, identity SNPs, phenotypic SNPs and ancestry SNPs. To manage this information, the DNA database was introduced for both gathering and analyzing genetic data. The DNA database was affected by the quality and quantity of DNA results thus the quality screening was an important step. The objective of this study is to establish a high-quality DNA database that incorporates significant forensic parameters and population statistics. The first design was constructed with more than 500 DNA profiles. Using the quality index to filter each profile, there were 244 DNA profiles to generate the database. We introduced a forensic community with an open-access DNA database and invited colleagues to share for the rapid growth of the DNA database.

สารบัญตาราง

(List of Tables)

ตารางที่	รายการ	หน้า
1	แสดงค่า Probability of identity ของตำแหน่ง CODIS 13 และ CODIS 20 จำแนกตามเชื้อชาติ	8
2	ตัวอย่างจำนวนตำแหน่งของการตรวจบนพื้นฐานเทคโนโลยี NGS	9

สารบัญภาพ

(List of Illustration)

รูปที่	รายการ	หน้า
1	แสดงขั้นตอนในการตรวจทางห้องปฏิบัติการ	12
2	แสดงตัวอย่างผลการตรวจ autosomal STRs ที่ปรากฏในไฟล์ Sample genotype report	15
3	แสดงตัวอย่างผลการตรวจความครอบคลุมของจำนวนการอ่านสารพันธุกรรม (coverage) ของตำแหน่ง autosomal STRs ที่ปรากฏในไฟล์ Sample genotype report	15
4	แสดงตัวอย่างไฟล์ information sheet สำหรับการเตรียมเพื่อลงในระบบฐานข้อมูล	16
5	แสดงขั้นตอนในการนำข้อมูลดีเอ็นเอสู่ระบบการจัดการฐานข้อมูล	17
6	แสดงขั้นตอนในการนำข้อมูลเข้าสู่ระบบฐานข้อมูล	18
7	แสดงวิธีการนำข้อมูลเข้าสู่ระบบฐานข้อมูล	20
8	แสดงการนำเข้าข้อมูล Phenotype	21
9	แสดงผลการส่งข้อมูลโดยรอการประเมินของผู้ดูแลระบบ	22
10	แสดงตัวอย่างจำนวน 30 ตัวอย่าง (ตัวอย่างควบคุม positive control 1 ตัวอย่าง และ ตัวอย่างควบคุม negative control 1 ตัวอย่าง) ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (จำนวนการอ่านของสารพันธุกรรมในตัวอย่าง)เป็นภาพรวมของแต่ละรอบการปฏิบัติการ	24
11	แสดงคุณภาพของการวิเคราะห์ในแต่ละรอบของการตรวจ (run quality matrix) ของรอบการปฏิบัติการที่ B1-B19	25
12	Heatmap แสดงสัดส่วน ACR ตามตำแหน่งการตรวจ aSTRs จากผลการตรวจทั้งสิ้น 18 ครั้ง (B1-19)	26
13	Heatmap แสดงสัดส่วน ACR ตามตำแหน่งการตรวจ iSNPs จากผลการตรวจทั้งสิ้น 18 ครั้ง (B1-19)	28
14	แสดงแผนภาพขั้นตอนและผลการตรวจสอบข้อมูลเชิงคุณภาพก่อนการส่งข้อมูลเข้าสู่ระบบฐานข้อมูล	30
15	ตัวอย่างการแสดงผลการคำนวนค่าทางสถิติประชากรของตำแหน่ง Autosomal STR	32

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อ
(List of Abbreviations)

Cluster Density (K/mm²) แสดงถึงจำนวนกลุ่ม (cluster) ต่อตารางมิลลิเมตรที่ใช้ในการปฏิบัติการ โดยที่ค่าความหนาแน่นของกลุ่ม (cluster density) จะอยู่ในช่วง 400-1,650 K/mm^2 ซึ่งค่าที่ต่ำหรือสูงกว่าช่วงดังกล่าวจะส่งผลต่อการวิเคราะห์ในขั้นต่อไป

Clusters Passing Filter (%) แสดงค่าร้อยละของกลุ่มที่ผ่านค่าในการกรั่นกรองคุณภาพ ซึ่งสามารถตรวจสอบคุณภาพของการระบุตำแหน่งเบสของดีเอ็นเอ ข้อมูลจะถูกเริ่มนำมาวิเคราะห์ในช่วงรอบที่ 25 (โดยคำนวนดังนี้ the chastity of a base call = the intensity of the greatest signal / the sum of the 2- greatest signals หากมีตำแหน่งเบสของดีเอ็นเอมากกว่า 1 ตำแหน่งที่มีค่าต่ำกว่า 0.6 ในช่วง 25 รอบแรก จะส่งผลให้ระบบจะรายงานว่าไม่ผ่านการตรวจคุณภาพ (ช่วงการพิจารณา clusters passing filter value of ≥ 80%)

Phasing (%) เป็นการแสดงค่าจำนวนโมเลกุลในกลุ่ม (cluster) ในรอบปัจจุบันของการปฏิบัติการภายใน Read 1 และ Read 2 ค่าที่ต่ำแสดงถึงการปฏิบัติการที่ดี (ค่าในการอ้างอิง คือ น้อยกว่า ≤ 0.25%)

Prephasing (%) เป็นการแสดงค่าจำนวนโมเลกุลในกลุ่ม (cluster) ในรอบก่อนหน้าของการปฏิบัติการภายใน Read 1 และ Read 2 ค่าที่ต่ำแสดงถึงการปฏิบัติการที่ดี (ค่าในการอ้างอิง คือ น้อยกว่า ≤ 0.15%)

Index CV ภาพรวมแสดงจำนวนร้อยละของจำนวนการอ่านรหัสสารพันธุกรรมในแต่ละตัวอย่าง ซึ่งค่าดังกล่าวจะบ่งบอกถึงการกระจายของข้อมูลตัวอย่างที่ถูกอ่านค่าในการปฏิบัตการครั้งหนึ่งๆ

Analytical threshold (AT) เป็นการกำหนดค่าสำหรับการพิจารณา หากอัลลีลที่มีค่าต่ำกว่าค่าวิกฤตินี้จะไม่ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ โดยการคำนวนได้จาก AT = จำนวนการอ่านของอัลลีล / จำนวนการอ่านทั้งหมดของตำแหน่งนั้นๆ (โดยจำนวนการอ่านทั้งหมดของตำแหน่งนั้นๆต้องมีค่าอย่างน้อย 650) โดยค่า AT ในการศึกษานี้จะถูกกำหนดไว้ที่ 1.5%

Interpretation threshold (IT) เป็นการกำหนดค่าสำหรับการการพิจารณาอัลลีลที่จะนำมาแปลผลจะต้องมีค่าที่สูงกว่าค่าวิกฤตินี้ โดยเฉพาะตำแหน่งที่เป็น homozygous โดยค่า IT ในการศึกษานี้จะถูกกำหนดไว้ที่ 4.5%

Intralocus balance (heterozygous imbalance) เป็นการพิจารณาโอกาสการเกิดความไม่สมดุลของค่าอัลลีลชนิด hetrozygous โดยในการศึกษาจะกำหนไว้ที่ 50%

Stutter เป็นการพิจารณาตัดสินใจ อัลลีลที่ปรากฏในตำแหน่งนั้นๆเป็นอัลลีลของตัวอย่างจริงหรือไม่ โดยอาศัยการกำหนดค่าวิกฤติในการตัดสินใจ อีกทั้งมีความหลายหลายในการกไหนดค่าวิกฤติขึ้นอยู่กับตำแหน่งของการตรวจนั้นๆ คำนวนจากการใช้ค่าการอ่านทั้งหมดของอัลลีลที่สงสัย / ค่าการอ่านทั้งหมดของอัลลีลหลักที่ปรากฏในตำแหน่งนั้นๆ โดยในการศึกษานี้จะกำหนดในช่วง 0-25% ต่อตำแหน่งหนึ่งๆ

Low coverage (lc) คือ ปริมาณสัญญาณของการวิเคราะห์ว่าเป็นอัลลีล ไม่ผ่านค่าวิกฤติของการอ่านผล (interpretation threshold)

Imbalanced (i) คือ ความไม่สมดุลระหว่างอัลลีลในตำแหน่งนั้นๆ

Interpretation threshold (it) คือ ค่าวิกฤติของการอ่านผลอัลลีล ซึ่งจะมีค่ามากกว่าค่าวิกฤติของการวิเคราะห์ (analytical threshold)

Allele count (ac) คือ การระบุค่าอัลลีลที่มากกว่าค่าที่คาดว่าจะเป็นในตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่ง

Not detected (nd) คือ การไม่พบสัญญาณการอ่านค่าอัลลีลใดๆ ในตำแหน่งนั้นๆ

Inconclusive (INC) คือ การไม่รายงานข้อมูลในตำแหน่งนั้นๆ

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของการศึกษา

ดีเอ็นเอทางนิติพันธุศาสตร์ เป็นตำแหน่งทางพันธุกรรมที่สามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการ ระบุความเป็นบุคคล (individual) ที่มีความจำเพาะในบุคคลใดบุคคลหนึ่ง อีกทั้ง เนื่องจากรหัสพันธุกรรมเหล่านี้ถูกถ่ายทอดจากบุคคลรุ่นบรรพบุรุษ สู่ลูกหลาน จึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการระบุความสัมพันธ์ทางสายเครือญาติได้อีกด้วย ซึ่งในปัจจุบันดีเอ็นเอทางนิติพันธุศาสตร์นั้นนับเป็นเครื่องมือสากลที่นำไปเป็นใช้เป็นหลักฐานประกอบในกระบวนการยุติธรรม และทางนิติวิทยาศาตร์อย่างแพร่หลาย ในยุคแรกของการค้นพบตำแหน่งที่ใช้ในการตรวจพิสูจน์นั้น เริ่มจากการตรวจในตำแหน่งชนิดไมโครแซทเทิลไลท์ (microsatellite) หรือ STR (short tandem repeat) เพียงไม่กี่ตำแหน่ง แต่ด้วยกำลังในการคัดแยก หรือ ค่าทางคณิตศาสตร์ในการบอกความสัมพันธ์นั้น ไม่สูงพอต่อการแปลผลและนำไปใช้ประโยชน์ นักวิทยาศาสตร์จึงทำการศึกษาและรวบรวมตำแหน่งที่สามารถนำไปพัฒนา จนกระทั่ง ปี ค.ศ. 1988 หน่วยงานตำรวจสากล (FBI, Federal Bureau of Investigation) ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้นำตำแหน่ง microsatellite ไปใช้ทางกรณีศึกษา และในช่วงปี ค.ศ. 1998 ก็ได้ทำการพัฒนาการตรวจและฐานข้อมูลสากล ที่เรียกว่า CODIS (Combined DNA Index System) ซึ่งประกอบด้วย ตำแหน่ง microsatellite จำนวน 13 ตำแหน่ง (1) ดังนี้ CSF1PO, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11 และ FGA ซึ่งในระบบฐานข้อมูลที่ทำการจัดเก็บข้อมูลจะทำการประเมินคุณภาพของการตรวจและนำเข้าระบบฐานข้อมูลประเทศ อีกทั้งยังมีการจัดทำค่าทางสถิติประชากรจากทุกตำแหน่งที่ทำการตรวจเพื่อเป็นข้อมูลสำหรับนำไปใช้ในการคำนวนหาค่าทางสถิติตามสมติฐานของผู้นำไปใช้งาน เช่น การใช้ค่า Probability of identity ในการค้นหารูปแบบสารพันธุกรรมในฐานข้อมูลหนึ่งๆ **(ตารางที่ 1)** ซึ่งในการใช้งานพบว่าการมีตำแหน่งของการตรวจที่น้อยเกินไปจะไม่สามารถให้ค่าทางสถิติในการตัดสินใจที่นำไปใช้ได้ ซึ่งในปี ค.ศ. 2017 มีการปรับเพิ่มจำนวน CODIS จากเดิม 13 ตำแหน่ง เป็น 20 ตำแหน่ง (เพิ่มเติมตำแหน่ง D1S1656, D2S441, D2S1338, D10S1248, D12S391, D19S433 และ D22S1045) ส่งผลให้ค่าทางสถิติประชากรต่างๆมีค่าที่สูงขึ้นอีกด้วย

STR loci	Total N = 1,036	361 Caucasians	342 African Americans	236 Hispanics	97 Asians
CODIS 13	5.02×10^{-16}	2.97×10^{-15}	1.14×10^{-15}	1.36×10^{-15}	1.71×10^{-14}
CODIS 20	9.35×10^{-24}	7.32×10^{-23}	6.12×10^{-23}	8.43×10^{-23}	4.22×10^{-21}

ตารางที่ 1 แสดงค่า Probability of identity ของตำแหน่ง CODIS 13 และ CODIS 20 จำแนกตามเชื้อชาติ

การค้นพบตำแหน่งต่างๆของ STR นั้นต้องอยู่บนพื้นฐานของการพัฒนาเทคโนโลยีในการตรวจสารพันธุกรรมในช่วงเวลานั้นๆ ส่วนการนำไปใช้ประโยชน์จะต้องอาศัยการพัฒนาฐานข้อมูลสารพันธุกรรมในกลุ่มประชากรที่ต้องใช้ระยะเวลาในการตรวจ การใช้งานในชุดการตรวจที่อยู่บนพื้นฐานของ CODIS 13 และ CODIS 20 ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในช่วงเวลาหนึ่ง อีกทั้งการพัฒนาเป็นน้ำยาทางห้องปฏิบัติการ ชุดการตรวจสำเร็จรูปทำให้ลดขั้นตอนที่ซับซ้อนและระยะเวลาที่รวดเร็วขึ้น ส่งผลให้ ฐานข้อมูลประชากรทั่วโลกเกิดขึ้นในช่วงเวลาไม่นานมานี้ และอิงตามระบบตำแหน่งการตรวจนี้ขยายเป็นฐานข้อมูลระดับประเทศในเวลาอันรวดเร็ว ปัจจุบันด้วยเทคโนโลยีการตรวจสารพันธุกรรมนั้นได้มีการพัฒนาเป็นเทคนิคการตรวจสารพันธุกรรมรุ่นใหม่ (next generation sequencing, NGS) ที่สามารถให้ข้อมูลทางพันธุกรรมจำนวนมหาศาลด้วยการตรวจเพียงไม่นาน และใช้ตัวอย่างในการตรวจปริมาณไม่มาก ถูกใช้อย่างแพร่หลายในวิทยาศาสตร์การแพทย์ อีกทั้งข้อมูลสารพันธุกรรมที่ได้สามารถนำไปใช้เพื่อการตรวจวินิจฉัย รักษา รวมถึงการทำนายปัจจัยทางพันธุกรรมที่ก่อให้เกิดโรคได้อีกด้วย ทั้งนี้ ในการตรวจทางนิติพันธุศาตร์ ก็ได้มีการพัฒนาการตรวจที่อยู่บนพื้นฐานของ NGS ซึ่งสามารถให้ข้อมูลได้มากกว่าการตรวจ autosomal STR เดิม การพัฒนานี้ได้ทำให้การตรวจในหนึ่งครั้งในตัวอย่างหนึ่งๆ สามารถให้ข้อมูลสารพันธุกรรมในตำแหน่งต่างๆ ต่อไปนี้ **(ตารางที่ 2)** จะเห็นได้ว่าข้อมูลสารพันธุกรรมนั้นสามารถให้รายละเอียดในการระบุอัตลักษณ์บุคคลที่มีความละเอียดสูง (ค่าทางสถิติประชากรในการคำนวนที่สูงสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น) โดยใช้ปริมาณชีววัตถุตัวอย่างเริ่มต้นปริมาณน้อย ซึ่งเป็นผลดีต่องานด้านคดีต่างๆ ที่มีข้อจำกัดในดารเด็บตัวอย่างจากสถานที่เกิดเหตุฯ หรือ ศพที่เข้าสู่กระบวนการเน่า เนื้อเยื่อและตัวอย่างเลือดเน่า เป็นอุปสรรคในการตรวจสารพันธุกรรมเพื่อพิสูจน์อัตลักษณ์บุคคล

Feature	Number of markers	Amplicon size range (bp)
Autosomal STRs	27	61-467
Y-STRs	24	119-390
X-STRs	7	157-462
Identity SNPs	94	63-231

ตารางที่ 2 ตัวอย่างจำนวนตำแหน่งของการตรวจบนพื้นฐานเทคโนโลยี NGS

การนำข้อมูลจากสารพันธุกรรมดังกล่าวมาใช้เพื่อให้เกิดประโยชน์นั้นจะต้องทำการรวบรวมจากตัวอย่างจำนวนมากเพื่อการสร้างเป็นฐานข้อมูลของประชากรนั้นๆ ค่าทางสถิติต่างๆจะถูกสร้างและคำนวนเพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการนำไปใช้หาความสัมพันธ์ทางเครือญาติ การค้นหาบุคคลสูญหาย ฯลฯ อีกทั้งเพื่อการนำไปใช้อย่างแพร่หลายในวงกว้างทั้งทางด้านวิชาการหรือนิติพันธุศาสตร์ การทำให้ข้อมูลดังกล่าวสามารถเข้าถึงได้ โดยมีระบบการกรั่นกรองข้อมูลเพื่อการได้ข้อมูลที่แม่นยำสูง และระบบการป้องกันข้อมูลเพื่อการรักษาข้อมูลส่วนบุคคล จึงมีความจำเป็นในการออกแบบศึกษาพัฒนา โดยใช้พื้นฐานของระบบ computer web-database ที่มีการนำข้อมูลจัดเก็บและวิเคราะห์ผลผ่านระบบ cloud ที่สะดวกในการเข้าถึงและนำไปใช้ ดังนั้นการศึกษานี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อการตรวจสารพันธุกรรมในตำแหน่งที่หลากหลายทางนิติพันธุศาสตร์ และนำไปสร้างฐานข้อมมูลของประชากรไทยเพื่อใช้ในการศึกษาอ้างอิงต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อการสร้างและพัฒนาข้อมูลสารพันธุกรรมบุคคล ให้เป็นฐานข้อมูลสารพันธุกรรมของประชากรในระดับชาติและนานาชาติ
2. เพื่อสร้างระบบในการจัดการข้อมูลสารพันธุกรรมมนุษย์ ที่ได้จากการตรวจสารพันธุกรรมด้วยเทคโนโลยีใหม่
3. เพื่อสร้างฐานข้อมูลสารพันธุกรรมที่สามารถนำไปใช้ในระบบกระบวนกรยุติธรรมของประเทศ

ขอบเขตการวิจัย

- เป็นการศึกษาการตรวจรหัสพันธุกรรมของมนุษย์ ในประชากรไทยเพื่อการสร้างฐานข้อมูลสารพันธุกรรม
- สถานที่ในการทำการศึกษา ศูนย์อำนวยการชันสูตรศพ นิติเวชจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ หน่วยนิติเซโรวิทยา ภาควิชานิติเวช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ระยะเวลาการศึกษา 1 ปี

วิธีดำเนินการวิจัย (สรุปทฤษฎีแนวความคิด ที่นำมาใช้ในงานวิจัย)

- การตรวจสารพันธุกรรมด้วย NGS technology
- การพัฒนาระบบฐานข้อมูล
- การออกแบบพัฒนาระบบ web service โดยใช้ระบบ cloud
- การวิเคราะห์ค่าทางสถิติประชากร

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สร้างและพัฒนาระบบฐานข้อมูลนิติพันธุศาสตร์ เพื่อนำไปใช้ในกระบวนยุติธรรมและ การศึกษาวิจัย
2. การพัฒนาฐานข้อมูลฯ สู่การใช้งานในระดับภูมิภาคและนานาชาติ เพื่อเพิ่มศักยภาพของฐานข้อมูล
3. การพัฒนาบุคคลากรทางด้านนิติพันธุศาสตร์ ให้เชี่ยวชาญในการทำงานการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่ต้องอาศัยความชำนาญเฉพาะด้าน
4. การเผยแพร่ผลงานทางวิชาการผ่านการนำเสนอผลงานในที่ประชุมทางวิชาการ หรือการตีพิมพ์ผลงานในวารสารทางวิชาการในสาขาที่เกี่ยวข้องทั้งในระดับชาติและนานาชาติ

ขั้นตอนการวิจัย

ขั้นตอนที่ 1 การตรวจสารพันธุกรรม

- **การคัดเลือกตัวอย่าง** ตัวอย่างในการตรวจทั้งหมดได้จากตัวอย่างเลือดจากผู้เสียชีวิตที่ได้เข้ารับการตรวจชันสูตรฯและเก็บตัวอย่างเลือดในระบบกระบวนการพิสูจน์อัตลักษณ์บุคคล ของศูนย์อำนวยการชันสูตรศพนิติเวช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยทำการคัดเลือกตัวอย่างเลือดนำมาใช้ในการตรวจสารพันธุกรรมในตำแหน่งของนิติพันธุศาสตร์ และเก็บข้อมูลรหัสบริการ เพศ สัญชาติ และถิ่นอาศัยของแต่ละตัวอย่าง
- **การเก็บตัวอย่างและสกัดสารพันธุกรรม** ตัวอย่างเลือดจะถูกจัดเก็บในกระดาษ FTA paper ในการรักษาสภาพของสารพันธุกรรมก่อนการใช้งาน โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนกว่าจะนำมาใช้งาน
- **การตรวจสารพันธุกรรมด้วยเทคโนโลยี NGS** ประกอบด้วยขั้นตอนทางห้องปฏิบัติการที่สำคัญ ดังต่อไปนี้
    - การเตรียม DNA library (DNA library preparation) ซึ่งประกอบด้วย สารเคมีสำหรับการทำปฏิกริยาในการเพิ่มปริมาณของตำแหน่งการตรวจทางนิติพันธุศาสตร์ ที่ประกอบด้วย ตำแหน่งของ autosomal STRs, X-STRs, Y-STRs, identity SNPs, และ phenotypically SNPs เป็นต้น
    - ขั้นตอนการเตรียม DNA library ประกอบด้วย **(รูปที่ 1)**
        - Amplify and Tag targets เป็นขั้นตอนกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และทำการติดดีเอ็นเอ (tags the gDNA) โดยการใช้ oligonucleotide primer mix ในตำแหน่งที่เราสนใจตรวจ
        - Enrich targets ในขั้นตอนดังกล่าวจะทำการเพิ่มปริมาณของ ดีเอ็นเอเป้าหมาย และเติม Index 1 (i7) adapters, Index 2 (i5) adapters สำหรับการทำ cluster amplification
        - Purify libraries ในขั้นตอนนี้จะใช้ SPB (Sample Purification Beads) ในการล้าง amplified libraries
        - Normalized Libraries เป็นขั้นตอนการเตรียมสารพันธุกรรมสำหรับการทำ cluster generation
        - Pool libraries เป็นขั้นตอนการรวม normalized library ในปริมาณเท่าๆกัน สำหรับการตรวจพร้อมๆกันบน flow cell

- Denature and dilute libraries ขั้นตอนดังกล่าวจะทำการเจือจาง librarie in HT1 (Hybridization Buffer), adds HSC (Human Sequencing Control) เพื่อเตรียมสำหรับการตรวจ sequencing

รูปที่ 1 แสดงขั้นตอนในการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

- **การตรวจสอบคุณภาพของลำดับสารพันธุกรรม (Quality metrics)** โดยการพิจารณาคุณภาพทั้งในภาพรวม และคุณภาพของแต่ละตัวอย่างตามเกณฑ์ต่างๆ ดังต่อไปนี้

<u>คุณภาพการตรวจโดยรวม</u>

- **Cluster Density (K/mm²)** แสดงถึงจำนวนกลุ่ม (cluster) ต่อตารางมิลลิเมตรที่ใช้ในการปฏิบัติการ โดยที่ค่าความหนาแน่นของกลุ่ม (cluster density) จะอยู่ในช่วง 400-1,650 K/mm^2 ซึ่งค่าที่ต่ำหรือสูงกว่าช่วงดังกล่าวจะส่งผลต่อการวิเคราะห์ในขั้นต่อไป

- **Clusters Passing Filter (%)** แสดงค่าร้อยละของกลุ่มที่ผ่านค่าในการกรั่นกรองคุณภาพ ซึ่งสามารถตรวจสอบคุณภาพของการระบุตำแหน่งเบสของดีเอ็นเอ ข้อมูลจะถูกเริ่มนำมาวิเคราะห์ในช่วงรอบที่ 25 โดยคำนวนดังนี้ the chastity of a base call = the intensity of the greatest signal / the sum of the 2-greatest signals หากมีตำแหน่งเบสของดีเอ็นเอมากกว่า 1 ตำแหน่งที่มีค่าต่ำกว่า 0.6 ในช่วง 25 รอบแรก จะส่งผลให้ระบบจะรายงานว่าไม่ผ่านการตรวจคุณภาพ (ช่วงการพิจารณา clusters passing filter value of ≥ 80%)
- **Phasing (%)** เป็นการแสดงค่าจำนวนโมเลกุลในกลุ่ม (cluster) ในรอบปัจจุบันของการปฏิบัติการภายใน Read 1 และ Read 2 ค่าที่ต่ำแสดงถึงการปฏิบัติการที่ดี (ค่าในการอ้างอิง คือ น้อยกว่า ≤ 0.25%)
- **Prephasing (%)** เป็นการแสดงค่าจำนวนโมเลกุลในกลุ่ม (cluster) ในรอบก่อนหน้าของการปฏิบัติการภายใน Read 1 และ Read 2 ค่าที่ต่ำแสดงถึงการปฏิบัติการที่ดี (ค่าในการอ้างอิง คือ น้อยกว่า ≤ 0.15%)

คุณภาพของแต่ละตัวอย่าง

- **Index CV** ภาพรวมแสดงจำนวนร้อยละของจำนวนการอ่านรหัสสารพันธุกรรมในแต่ละตัวอย่าง ซึ่งค่าดังกล่าวจะบ่งบอกถึงการกระจายของข้อมูลตัวอย่างที่ถูกอ่านค่าในการปฏิบัตการครั้งหนึ่งๆ

- **การวิเคราะห์และอ่านผล** โดยพิจารณาเกณฑ์ทางคุณภาพของแต่ละตำแหน่งตรวจในแต่ละตัวอย่าง ตามองค์ประกอบดังต่อไปนี้
    - Analytical threshold (AT) เป็นการกำหนดค่าสำหรับการพิจารณา หากอัลลีลที่มีค่าต่ำกว่าค่าวิกฤตินี้จะไม่ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ โดยการคำนวนได้จาก AT = จำนวนการอ่านของอัลลีล / จำนวนการอ่านทั้งหมดของตำแหน่งนั้นๆ (โดยจำนวนการอ่านทั้งหมดของตำแหน่งนั้นๆต้องมีค่าอย่างน้อย 650) โดยค่า AT ในการศึกษานี้จะถูกกำหนดไว้ที่ 1.5%
    - Interpretation threshold (IT) เป็นการกำหนดค่าสำหรับการการพิจารณาอัลลลที่จะนำมาแปลผลจะต้องมีค่าที่สูงกว่าค่าวิกฤตินี้ โดยเฉพาะตำแหน่งที่เป็น homozygous โดยค่า IT ในการศึกษานี้จะถูกกำหนดไว้ที่ 4.5%

- Intralocus balance (heterozygous imbalance) เป็นการพิจารณาโอกาสการเกิดความไม่สมดุลของค่าอัลลีลชนิด heterozygous โดยในการศึกษาจะกำหนไว้ที่ 50%
- Stutter เป็นการพิจารณาตัดสินใจ อัลลีลที่ปรากฏในตำแหน่งนั้นๆเป็นอัลลีลของตัวอย่างจริงหรือไม่ โดยอาศัยการกำหนดค่าวิกฤติในการตัดสินใจ อีกทั้งมีความหลายหลายในการกไหนดค่าวิกฤติขึ้นอยู่กับตำแหน่งของการตรวจนั้นๆ คำนวนจากการใช้ค่าการอ่านทั้งหมดของอัลลีลที่สงสัย / ค่าการอ่านทั้งหมดของอัลลีลหลักที่ปรากฏในตำแหน่งนั้นๆ โดยในการศึกษานี้จะกำหนดในช่วง 0-25% ต่อตำแหน่งหนึ่งๆ

ข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมจะผ่านการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมในการวิเคราะห์ผล โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

- **Alignment of STRs** เป็นขั้นตอนการนำสายดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณเป็นที่เรียบร้อยแล้วนำมาประเมินเพื่อการระบุชนิดและตำแหน่งของสายดีเอ็นเอนั้นๆ โดยการระบุตำแหน่งของ STR นั้นเกิดจากการนำจำนวนรูปแบบดีเอ็นเอที่ซ้ำๆบริเวณปลายสายที่เป็นจุดเริ่มและสิ้นสุด ไปเปรียบเทียบกับลำดับสารพันธุกรรมอ้างอิง และจะมีการนำไประบุจำนวนและตำแหน่งที่จำเพาะในขั้นตอนต่อไป
- **Alignment of SNPs** เป็นขั้นตอนการนำสายดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณเป็นที่เรียบร้อยแล้วนำมาประเมินระบุตำแหน่งของ SNP โดยการนำสายนั้นๆไปเปรียบเทียบกับลำดับสารพันธุกรรมอ้างอิง
- **Allele counting** เป็นขั้นตอนการนับจำนวนของชุดสารพันธุกรรมซ้ำเพื่อการระบุเป็นจำนวนอัลลีล (allele) โดยการใช้การวิเคราะห์ประมวลผลด้วยโปรแกรมและอัลกอลิที่มที่ออกแบบมา
- **STR genotype calling** เป็นการใช้ค่า allele counts ร่วมกับ parameters อีกหลายชนิดเพื่อการประเมินเรียกเป็นค่าอัลลีลที่ถูกต้อง โดยจะประเมินเฉพาะค่าที่ผ่าน analytical และ interpretation thresholds
- **SNP genotype calling** เป็นการระบุตำแหน่งของ SNP โดยจะประเมินเฉพาะค่าที่ผ่านการประเมิณคุณภาพของสารพันธุกรรมมาเป็นที่เรียบร้อยแล้ว

ขั้นตอนที่ 2 การเตรียมข้อมูล

- ข้อมูลรายงานรายละเอียดสารพันธุกรรม (Sample genotype report) **(รูปที่ 2)** ข้อมูลผลการตรวจสารพันธุกรรมในขั้นตอนที่ 1 ซึ่งผ่านการตรวจสอบคุณภาพเบื้องต้นของระบบมาแล้ว โดยภายในไฟล์ข้อมูลชัดนี้ จะประกอบด้วย รายงาน

ผลการตรวจ autosomal STRs, ความครอบคลุมของจำนวนการอ่านสารพันธุกรรม (coverage) ของตำแหน่ง autosomal STRs, รายงานผลการตรวจ Y-STRs, ความครอบคลุมของจำนวนการอ่านสารพันธุกรรม (coverage) ของตำแหน่ง Y-STRs, รายงานผลการตรวจ X-STRs, ความครอบคลุมของจำนวนการอ่านสารพันธุกรรม (coverage) ของตำแหน่ง X-STRs, รายงานผลการตรวจ iSNPs, ความครอบคลุมของจำนวนการอ่านสารพันธุกรรม (coverage) ของตำแหน่ง iSNPs **(รูปที่ 3)**

Autosomal STR Genotypes

Sample Name	De	Analysis Name	Sin	Inter	Gend	Amelogeni	D1S1656	TPOX	D2S441	D2S1338	D3S1358	D4S2408	FGA	D5S818	CSF1PO	D6S1043	D7S820	D8S1179	D9S1122
58D084-F	M	1.0 - 20170620 B2	Pass	Pass	XY	X,Y	14,16	8,8	11.3,14	23,24	16,16	9,9	18,25	10,12	12,12	12,12	8,11	14,16	11,12
58D091-F	M	1.0 - 20170620 B2	Pass	Pass	XY	X,Y (i)	13,17.3	8,9	11,12	18,23	16,17	10,10	23,24	11,12	10,12	13,14	10,11	10,13	12,12
58D098-F	M	1.0 - 20170620 B2	Pass	Pass	XY	X,Y (i)	15,16	8,12	11,11.3	20,25	14,16	9,10	22,24	12,13	10,11	10,18	8,11	10,15	13,13
58D100-F	M	1.0 - 20170620 B2	Pass	Pass	XY	X,Y	15,15	8,11	10,11.3	18,24	16,16	9,11	22,25	11,11	11,11	18,18	8,11 (ac)(it)	10,13	12,13
58D104-F	M	1.0 - 20170620 B2	Pass	Pass	XY	X,Y	13,15	8,8	11.3,14	24,24	15,15	11,11	23,24	12,13	12,12 (it)(s)	11,18	8,8 (it)	11,13	12,14
58D106-F	M	1.0 - 20170620 B2	Pass	Pass	XY	X,Y	11,15 (ac)(it)(s)	9,11	11,11.3	17,20	14,17	9,10	22,24	12,13	10,12	12,15	10,11	12,14	11,11
58D113-F	M	1.0 - 20170620 B2	Pass	Pass	XY	X,Y (i)	15,16	11,11	11,12	23,25	15,17	9,9	18,21	13,13	11,13	11,14	7,12	14,16	12,12
58D124-F	M	1.0 - 20170620 B2	Pass	Pass	XY	X,Y	14,18	8,8	9.1,11	17,23	17,17	10,10	21,24.2	10,12	11,13	14,19	7,10	12,14	10,11
59D122-F	M	1.0 - 20170620 B2	Pass	Pass	XY	X,Y	15,16	8,9	11,11.3	17,19	15,15	10,10	21,24	7,13 (i)	11,11	14,19	10,12	13,14	12,13
58D157-F	M	1.0 - 20170620 B2	Pass	Pass	XY	X,Y	15,18.3	8,11	11,11.3	24,26	16,16	9,10	22,22	10,12	11,12	11,12	10,13	14,15	13,13
59D123-F	M	1.0 - 20170620 B2	Pass	Pass	XY	X,Y (i)	17.3,18.3	9,11	11,13	17,19	16,16	10,10	21,23	12,13	12,13	12,13	8,8	14,15	10,12
58D193-F	M	1.0 - 20170620 B2	Pass	Pass	XY	X,Y	10,11	8,8	12,14	22,23	15,17	10,11	21,25	9,13	10,11	11,13	10,11	12,13	12,12
58D216-F	M	1.0 - 20170620 B2	Pass	Pass	XY	X,Y	11,17	8,11	11.3,14	19,22	15,17	8,10	21,23	10,11	10,10	11,13	10,11	13,15	12,13
58D228-F	M	1.0 - 20170620 B2	Pass	Pass	XY	X,Y	13,13	8,9	10,10	19,24	16,16	8,10	22,25	10,12	12,12	12,13	10,12	11,11	12,13
58D240-F	M	1.0 - 20170620 B2	Pass	Pass	XY	X,Y	15,15	9,11	11,14	19,25	14,16	9,10	19,21	11,12	11,12	11,13	11,11 (it)	13,15	12,14
58D245-F	M	1.0 - 20170620 B2	Pass	Pass	XY	X,Y (i)	16,17	8,8	11,12	18,19	17,17	10,11	23,23	10,12	10,12	11,14	11,12	13,14	12,13
59D009-F	M	1.0 - 20170620 B2	Pass	Pass	XY	X,Y (i)	14,17.3	8,8	11.3,12	20,23	16,16	9,11	24,25	12,12	9,11	12,18	8,8 (it)	13,15	11,13
59D014-F	M	1.0 - 20170620 B2	Pass	Pass	XY	X,Y	13,17	8,8	11,11	17,25	14,17	9,10	20,24	11,11	12,12	10,18	11,11 (it)	14,15	11,12
59D021-F	M	1.0 - 20170620 B2	Pass	Pass	XY	X,Y	15,16	8,11	10,14	17,24	16,16	9,10 (i)	20,21	10,11	11,11	19,20	8,11	13,15	12,12
59D033-F	M	1.0 - 20170620 B2	Pass	Pass	XY	X,Y	11,16	10,12	10,12	18,24	15,17	10,12	19,22	10,12 (i)	11,11	14,19	8,11 (ac)(it)	10,11	13,13
59D043-F	M	1.0 - 20170620 B2	Pass	Pass	XY	X,Y (i)	13,13	8,8	11,11	19,19	14,17	8,11	18,22	10,11	10,11	13,18	9,1,11	12,14	11,12
59D050-F	M	1.0 - 20170620 B2	Pass	Pass	XY	X,Y (i)	15,17	8,8	11.3,11.3	19,21	17,18	8,10	21,22	12,13	12,12	11,14	9,10	13,14	12,13
59D090-C3	M	1.0 - 20170620 B2	Pass	Pass	XY	X,Y	14,17	8,11	11.3,14	19,20	13,16	10,10	20,23	10,11	11,12	13,18	10,11	13,14	12,13
59D091-F	M	1.0 - 20170620 B2	Pass	Pass	XY	X,Y	13,17	8,8	11.3,11.3	20,22	14,18	8,9	22,26	10,13	12,12	11,12	10,11	11,12	12,12
59D096-F	M	1.0 - 20170620 B2	Pass	Pass	XY	X,Y	13,15	8,11	11,14	23,23	17,17	8,10	21,23.2	11,12	9,13	11,18	10,12	10,13	12,12
59D099-F	M	1.0 - 20170620 B2	Pass	Pass	XY	X,Y	13,15	8,11	11,14	24,25	16,16	8,9	21,26	11,12	11,12	13,19	8,10	10,15	11,11
59D101-F	M	1.0 - 20170620 B2	Pass	Pass	XY	X,Y	14,16	8,11	11,11.3	16,17	15,16	10,11	21,23	10,10	12,12	14,18	10,12	14,18	13,14
59D104-F	M	1.0 - 20170620 B2	Pass	Pass	XY	X,Y	15,17	8,10	11.3,14	17,19	14,15	10,10	19,24.2	10,12	11,12	14,20.3	8,11	13,14	12,13
59D108-F	M	1.0 - 20170620 B2	Pass	Pass	XY	X,Y	11,12	8,8	10,11	16,23	16,18	9,10	23,25	11,12	10,13	10,20	8,12	10,15	13,13
59D115-F	M	1.0 - 20170620 B2	Pass	Pass	XY	X,Y	16,17	9,9	10,10	17,19	15,16	8,9	21,22	9,12	11,12	14,19	9,12	13,14	12,13
59D165-F	M	1.0 - 20170627 B3	Pass	Pass	XY	X,Y (i)	14,14	8,11	11.3,11.3	19,19	16,17	8,9	25,26	10,11	11,12	14,18	11,12	12,14	11,13
58D026-F	M	1.0 - 20170627 B3	Pass	Pass	XY	X,Y	11,18.3	8,8	10,10	17,19	15,16	8,8	21,23	7,13 (i)	10,11	12,12	11,11 (it)	13,14	12,13

รูปที่ 2 แสดงตัวอย่างผลการตรวจ autosomal STRs ที่ปรากฏในไฟล์ Sample genotype report

58D084-F	1.0 - 20170620 B2	Amelogenin	6	243	AAAGTG
58D084-F	1.0 - 20170620 B2	D1S1656	14	229	TAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGGTGTGTGTGTG
58D084-F	1.0 - 20170620 B2	D1S1656	16	211	TAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGGTGTGTGTGTG
58D084-F	1.0 - 20170620 B2	TPOX	8	1240	AATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATG
58D084-F	1.0 - 20170620 B2	D2S441	11.3	1187	TCTATCTATCTATCTATCATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTA
58D084-F	1.0 - 20170620 B2	D2S441	14	1111	TCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATTTATCTATCTA
58D084-F	1.0 - 20170620 B2	D2S1338	23	1146	TGCCTGCCTGCCTGCCTGCCTGCCTGCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCGTCCTTCCTTCC
58D084-F	1.0 - 20170620 B2	D2S1338	24	959	TGCCTGCCTGCCTGCCTGCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCGTCCTTCCTTCC
58D084-F	1.0 - 20170620 B2	D3S1358	16	2836	TCTATCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTA
58D084-F	1.0 - 20170620 B2	D4S2408	9	1214	ATCTGTCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCT
58D084-F	1.0 - 20170620 B2	D4S2408	9	1064	ATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCT
58D084-F	1.0 - 20170620 B2	FGA	18	1420	TTTCTTTCTTTCTTTTTTCTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTCCTTCCTTCC
58D084-F	1.0 - 20170620 B2	FGA	25	885	TTTCTTTCTTTCTTTTTTCTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTCCTTCCTTCC
58D084-F	1.0 - 20170620 B2	D5S818	10	465	AGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGAG
58D084-F	1.0 - 20170620 B2	D5S818	12	445	AGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGAG
58D084-F	1.0 - 20170620 B2	CSF1PO	12	809	AGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGAT
58D084-F	1.0 - 20170620 B2	D6S1043	12	3601	AGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGAT
58D084-F	1.0 - 20170620 B2	D7S820	8	558	GATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGACAGATTGATAGTTT
58D084-F	1.0 - 20170620 B2	D7S820	11	409	GATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGACAGATTGATAGTTT
58D084-F	1.0 - 20170620 B2	D8S1179	14	1476	TCTATCTGTCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTA
58D084-F	1.0 - 20170620 B2	D8S1179	16	1231	TCTATCTATCTGTCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTA
58D084-F	1.0 - 20170620 B2	D9S1122	11	1357	TAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGA
58D084-F	1.0 - 20170620 B2	D9S1122	12	1475	TAGATCGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGA
58D084-F	1.0 - 20170620 B2	D10S1248	13	1207	GGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAA
58D084-F	1.0 - 20170620 B2	D10S1248	14	1079	GGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAA
58D084-F	1.0 - 20170620 B2	TH01	7	3181	AATGAATGAATGAATGAATGAATGAATG
58D084-F	1.0 - 20170620 B2	TH01	9	3182	AATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATG
58D084-F	1.0 - 20170620 B2	vWA	14	185	TCTATCTGTCTATCTGTCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCCATCTATCTATCTATCCATCCA
58D084-F	1.0 - 20170620 B2	vWA	17	156	TCTATCTGTCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCCATCTA
58D084-F	1.0 - 20170620 B2	D12S391	19	800	AGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGACAGACAGACAGACAGACAGACAGAT
58D084-F	1.0 - 20170620 B2	D12S391	20	1075	AGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGACAGACAGACAGACAGACAGACAGACAGAT
58D084-F	1.0 - 20170620 B2	D13S317	9	1133	TATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCAATCATCTATCTATCTTTCTGTCTGTC

รูปที่ 3 แสดงตัวอย่างผลการตรวจความครอบคลุมของจำนวนการอ่านสารพันธุกรรม (coverage) ของตำแหน่ง autosomal STRs ที่ปรากฏในไฟล์ Sample genotype report

- ข้อมูลคุณลักษณะของตัวอย่าง (Information sheet) **(รูปที่ 4)** เป็นการสร้างชุดข้อมูลซึ่งภายในจะประกอบด้วยคุณลักษณะของแต่ละตัวอย่างที่สอดคล้องกับลำดับของตัวอย่างในข้อมูลสารพันธุกรรมประกอบด้วย

    - Sample Name คือ ชื่อตัวอย่างที่ต้องสอดคล้องกับชื่อผลการตรวจในข้อมูลรายงานรายละเอียดสารพันธุกรรมข้างต้น
    - RUN คือ ชื่อรหัสการทำงานที่ปรากฏสอดคล้องกับในรายงานรายละเอียดสารพันธุกรรมข้างต้น
    - Reagent kit คือ ชื่อชุดการตรวจที่ใช้
    - Sex คือ ข้อมูลการระบุเพศของตัวอย่าง
    - Country คือ ข้อมูลประชากรในประเทศที่นำมาตรวจ
    - Region คือ ข้อมูลรายละเอียดของพื้นที่เป็นถิ่นกำเนิดของตัวอย่าง เช่น ภูมิภาค เป็นต้น
    - City คือ ข้อมูลรายละเอียดของเมืองที่เป็นถิ่นกำเนิดของตัวอย่าง
    - Ethinicity คือ ข้อมูลสัญชาติ
    - Language family คือ ข้อมูลตระกูลของภาษาในถิ่นกำเนิด
    - Sample type คือ การระบุชนิดของตัวอย่างที่เก็บมาศึกษาสารพันธุกรรม เช่น เลือด น้ำลาย เป็นต้น

    โดยสามารถ download ไฟล์ต้นแบบตัวอย่างการบันทึกได้ที่

    (https://diversid-public.s3-ap-southeast-1.amazonaws.com/webapp/information-sheet-v9.zip)

SampleName	Run	Reagent kit	Sex	Country	Region	City	Ethnicity	Language family	Sample type
58D023-F	20170704 reseq B1	Forenseq_B	M	Thailand	North	Chiang Mai	Thai	Thai-Kadai	FTA-blood
58D024-F	20170704 reseq B1	Forenseq_B	M	Thailand	Central	Bangkok	Thai	Thai-Kadai	FTA-blood

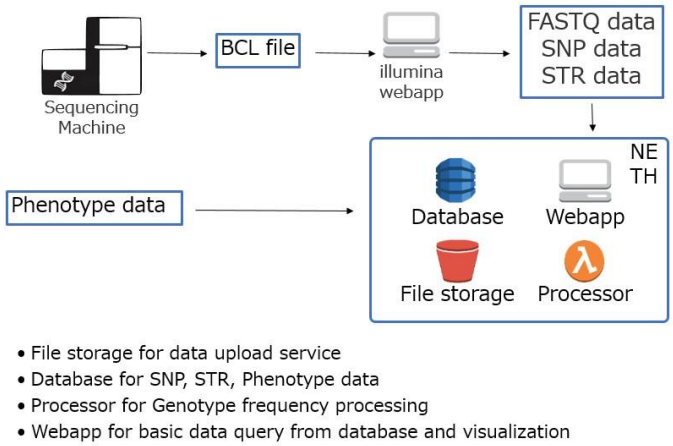
รูปที่ 4 แสดงตัวอย่างไฟล์ information sheet สำหรับการเตรียมเพื่อลงในระบบฐานข้อมูล

ขั้นตอนที่ 3 การออกแบบระบบฐานข้อมูล และการสร้างฐานข้อมูล

ระบบฐานข้อมูลพัฒนาและสร้างบนพื้นฐานของเวป โดยข้อมูลจะถูกจัดเก็บบน amazon cloud service **(รูปที่ 5)**

การสร้างฐานข้อมูลประกอบด้วย 2 ขั้นตอนสำคัญ คือ

- การกรั่นกรองข้อมูลสารพันธุกรรมก่อนการนำเข้าฐานข้อมูล
- การนำข้อมูลเข้าสู่ระบบ diversID



รูปที่ 5 แสดงขั้นตอนในการนำข้อมูลดีเอ็นเอสู่ระบบการจัดการฐานข้อมูล

<u>การกรั่นกรองข้อมูลสารพันธุกรรมก่อนการนำเข้าฐานข้อมูล</u>

ข้อมูลการตรวจสารพันธุกรรมจะถูกตรวจสอบคุณภาพก่อนการนำเข้าฐานข้อมูลทั้งนี้เพื่อลดโอกาสการเกิดความผิดพลาดในการวิเคราะห์ผล ค่าทางสถิติต่างๆ และลดโอกาสความผิดพลาดจากการส่งข้อมูลเข้าสู่ระบบของตัวอย่างชุดข้อมูลสารพันธุกรรมที่ซ้ำกัน ดังนั้น ผู้ส่งข้อมูลจะต้องตรวจสอบข้อมูลดัชนีคุณภาพ (quality index) ตามเกณฑ์ดังต่อไปนี้ก่อนการส่งสู่ระบบ

- Low coverage. (lc) คือ ปริมาณสัญญาณของการวิเคราะห์ว่าเป็นอัลลีล ไม่ผ่านค่าวิกฤติของการอ่านผล (interpretation threshold)
- Imbalanced (i) คือ ความไม่สมดุลระหว่างอัลลีลในตำแหน่งนั้นๆ
- Interpretation threshold (it) คือ ค่าวิกฤติของการอ่านผลอัลลีล ซึ่งจะมีค่ามากกว่าค่าวิกฤติของการวิเคราะห์ (analytical threshold)
- Allele count (ac) คือ การระบุค่าอัลลีลที่มากกว่าค่าที่คาดว่าจะเป็นในตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่ง

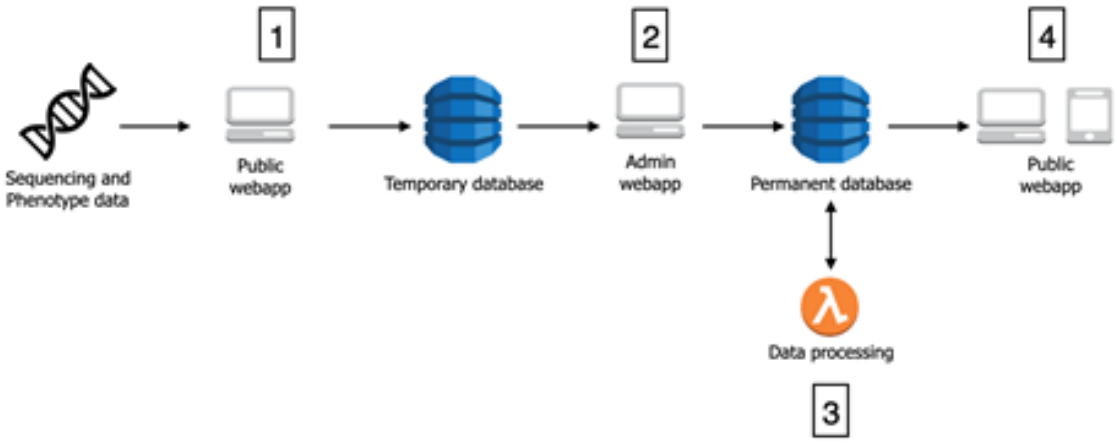
- Analytical threshold (at) คือ ค่าวิกฤติของการวิเคราะห์ จะเตือนเมื่อค่าสัญญาณของอัลลีล มีค่าสูงไม่ถึงเกณฑ์ค่าค่าวิกฤติของการวิเคราะห์
- Not detected (nd) คือ การไม่พบสัญญานการอ่านค่าอัลลีลใดๆ ในตำแหน่งนั้นๆ
- Stutter (s) คือ การเกิดสัญญาณขนาดเล็กซึ่งมักอยู่ก่อนหน้าหรือหลังจากสัญญาณอัลลีลหลัก
- Inconclusive (INC) คือ การไม่รายงานข้อมูลในตำแหน่งนั้นๆ

ผู้ดูแลระบบจะตรวจสอบและพิจารณา qc index ที่สำคัญอีกครั้งก่อนการส่งข้อมูล เช่น Imbalanced (i), Interpretation threshold (it) และ Stutter (s)

การนำข้อมูลสู่ระบบ diversID **(รูปที่ 5 และ 6)**

ขั้นตอนการนำข้อมูลเข้าสู่ระบบบ diversID ประกอบไปด้วยขั้นตอนทั้งหมด 4 ขั้นตอนด้วยกัน

1. อัปโหลดข้อมูล DNA ผ่านหน้าเว็บไซต์ www.diversid.info
2. การอนุมัติการนำเข้าข้อมูลเข้าสู้ระบบโดยผู้ดูแล
3. ระบบคำนวณข้อมูลสถิติเชิงพันธุศาสตร์ประชากร
4. การดูข้อมูลผ่านหน้าเว็บไซต์ www.diversid.info



รูปที่ 6 แสดงขั้นตอนในการนำข้อมูลเข้าสู่ระบบฐานข้อมูล

1. **อัปโหลดข้อมูล DNA ผ่านหน้าเว็บไซต์ www.diversid.info**

1.1 แสดงวิธีการนำข้อมูลเข้าสู่ระบบ **(รูปที่ 7)**

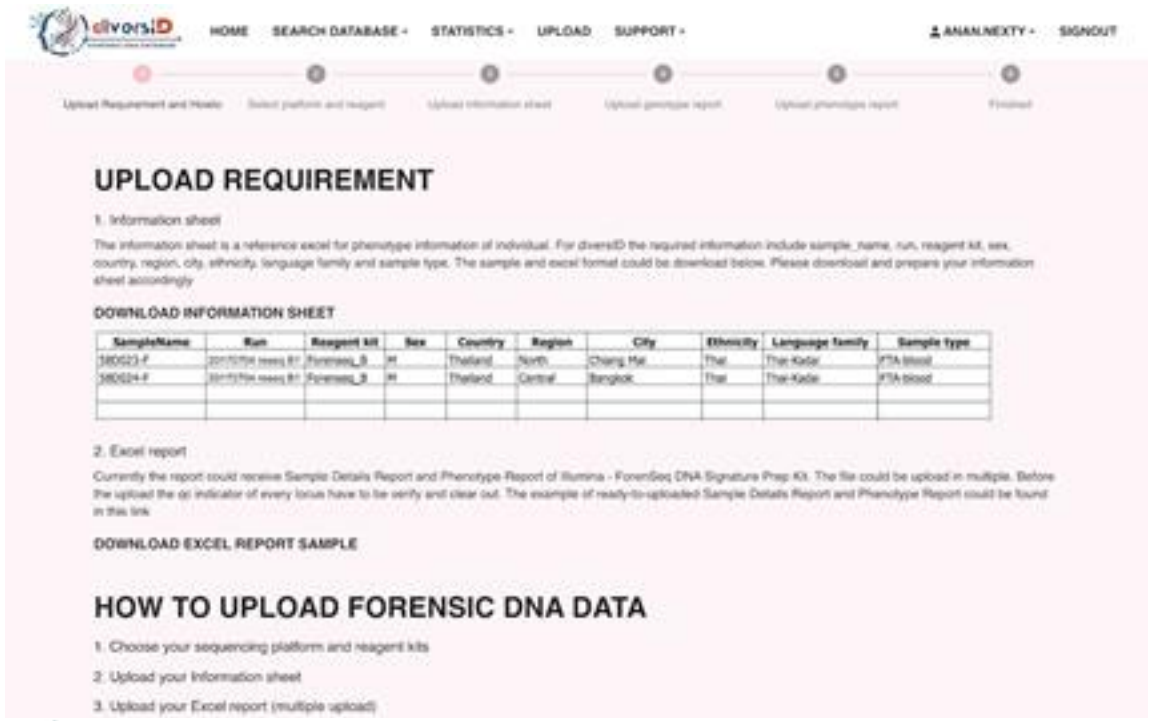
1.2 เลือกวิธีการ sequencing ของข้อมูล DNA

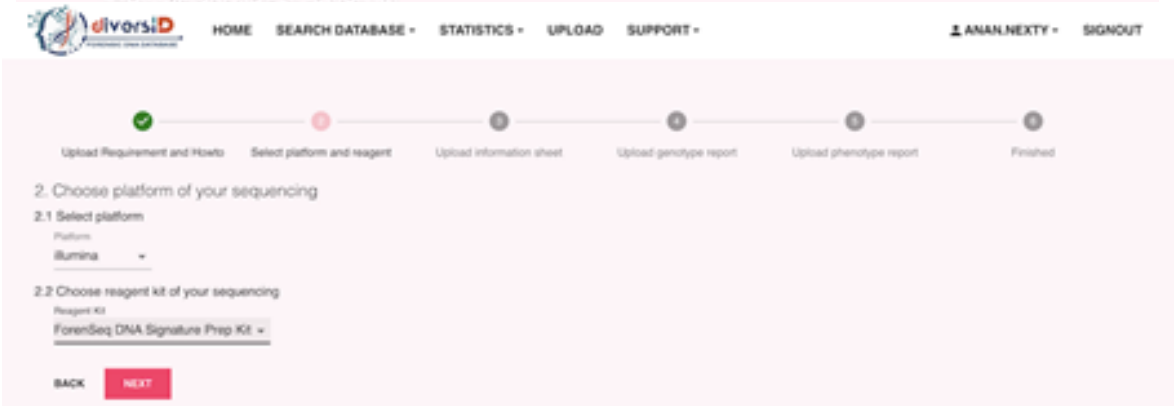
1.3 อัปโหลดข้อมูล information sheet เป็นไฟล์ excel ที่ใช้เป็นต้นแบบในการกรอกข้อมูลสามารถดาวน์โหลดได้จากข้อ 1.1 โดยในต้นแบบจะประกอบไปด้วย Sample Name, Run, Reagent kit, Sex, Country, Region, City, Ethnicity, Language family และ Sample type

1.4 อัปโหลดข้อมูล Genotype ไฟล์ข้อมูล Genotype จะต้อง มีข้อมูล Genotype โดยรวมตรงกันกับ information sheet และได้ผ่านการปรับปรุงข้อมูลให้ไม่มีค่า QC indicator อยู่ในไฟล์ ยกเว้นเพียงแต่กรณีที่เกิด QC indicator แบบ imbalance ในตำแหน่ง D22S1045 ของ Y STR และ rs6955448 rs338882 และ rs2111980 ใน iSNP ที่จะยอมให้ข้อมูลที่เป็น imbalance เข้าไปในระบบได้

1.5 อัปโหลดข้อมูล Phenotype (สามารถเลือกที่จะไม่นำข้อมูลประเภทนี้เข้าได้) **(รูปที่ 8)** ไฟล์ข้อมูล Phenotype ซึ่งก่อนการส่งข้อมูลสู่ฐานข้อมูล ผู้ใช้จะต้องทำการปรับปรุงข้อมูลให้ไม่มีค่า QC indicator อยู่ในไฟล์

1.6 ข้อมูลถูกบันทึกเข้าตารางเก็บข้อมูลชั่วคราว เพื่อรอการอนุมัติจากผู้ดูแลระบบ **(รูปที่ 9)**

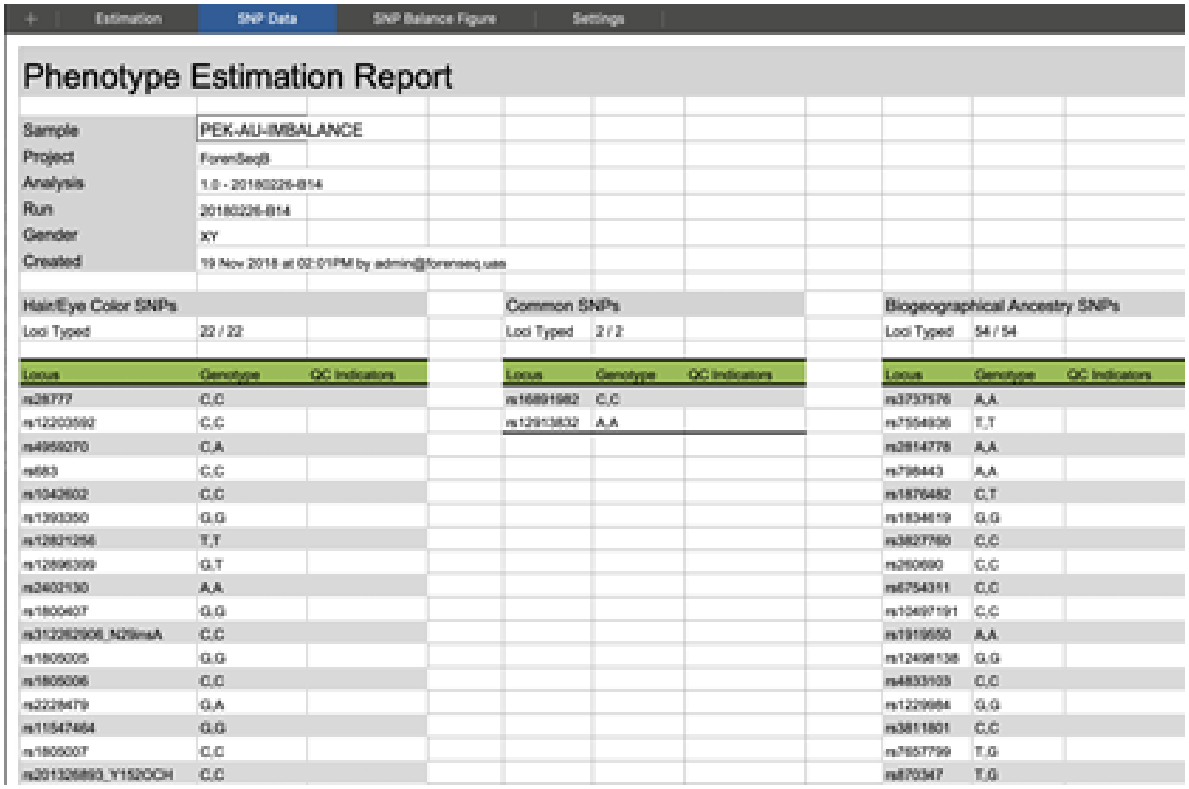




SampleName	Run	Reagent kit	Sex	Country	Region	City	Ethnicity	Language family	Sample type
58D023-F	20170704 reseq B1	Forenseq_B	M	Thailand	North	Chiang Mai	Thai	Thai-Kadai	FTA-blood
58D024-F	20170704 reseq B1	Forenseq_B	M	Thailand	Central	Bangkok	Thai	Thai-Kadai	FTA-blood

SampleName*	corresponding sample name on samplesheet
Run*	corresponding run name on MiSeq FGx system
Reagent kit*	Reagent kit
Sex*	M=Male, F=Female
Country*	sample information
Region	sample information
City	sample information
Ethnicity*	sample information
Language family*	
Sample type*	
*** required**	
NA for No available information	

รูปที่ 7 แสดงวิธีการนำข้อมูลเข้าสู่ระบบฐานข้อมูล



Estimation | SNP Data | SNP Balance Figure | Settings

Phenotype Estimation Report

Sample	PEK-AU-IMBALANCE
Project	ForenSeqB
Analysis	1.0 - 20180226-814
Run	20180226-814
Gender	XY
Created	19 Nov 2018 at 02:01PM by admin@forenseq.usa

Hair/Eye Color SNPs	
Loci Typed	22 / 22

Locus	Genotype	QC Indicators
rs28777	C,C	
rs12203592	C,C	
rs4959270	C,A	
rs683	C,C	
rs1042602	C,C	
rs1393350	G,G	
rs12821256	T,T	
rs12896399	G,T	
rs2402130	A,A	
rs1800407	G,G	
rs312262906_M29insA	C,C	
rs1805005	G,G	
rs1805006	C,C	
rs2228479	G,A	
rs11547464	G,G	
rs1805007	C,C	
rs201326893_Y152OCH	C,C	

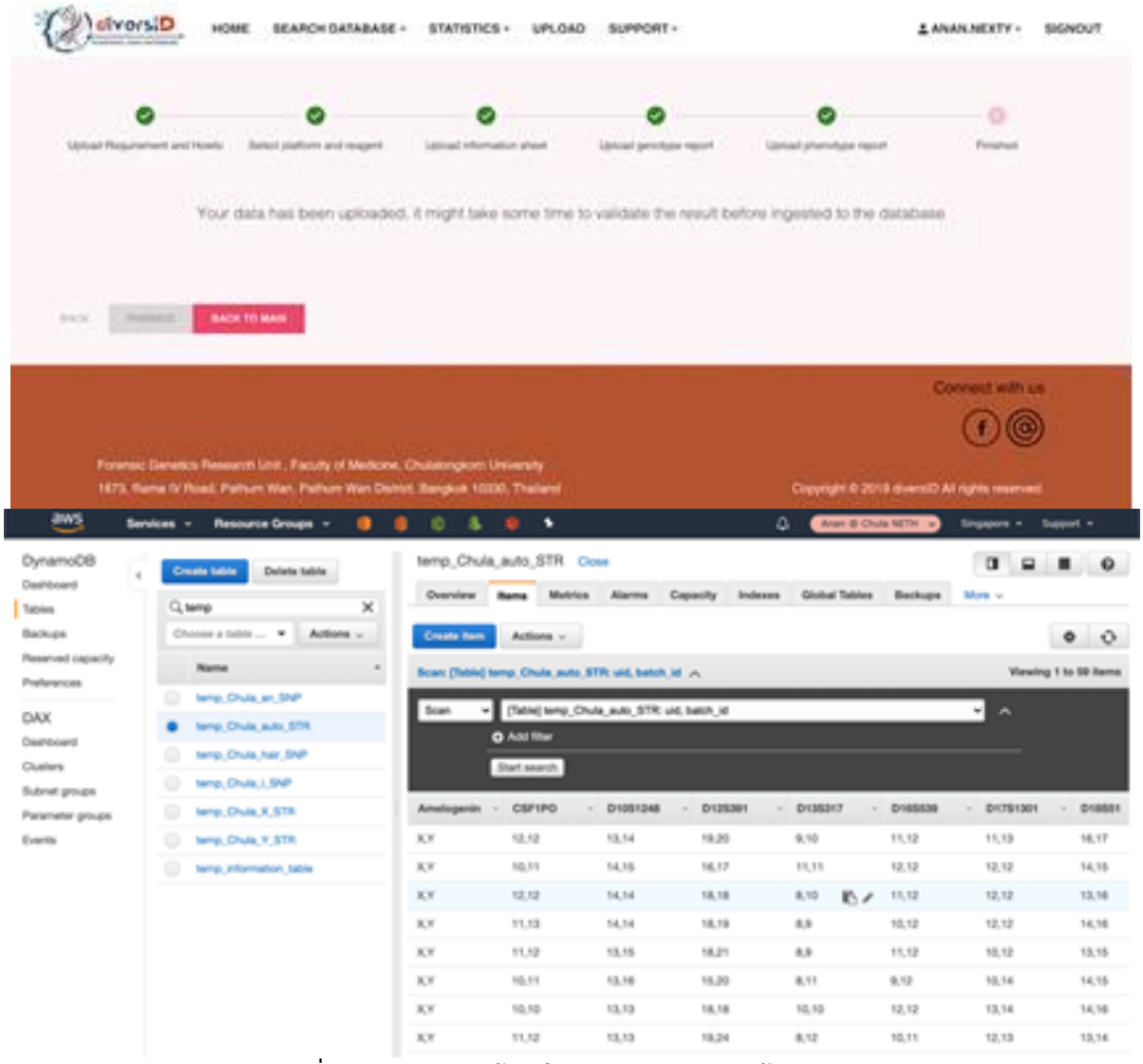
Common SNPs	
Loci Typed	2 / 2

Locus	Genotype	QC Indicators
rs16891982	C,C	
rs12913832	A,A	

Biogeographical Ancestry SNPs	
Loci Typed	54 / 54

Locus	Genotype	QC Indicators
rs3737576	A,A	
rs7554936	T,T	
rs2814778	A,A	
rs798443	A,A	
rs1876482	C,T	
rs1834619	G,G	
rs3827760	C,C	
rs260690	C,C	
rs6754311	C,C	
rs10497191	C,C	
rs1919550	A,A	
rs12498138	G,G	
rs4833103	C,C	
rs1229984	G,G	
rs3811801	C,C	
rs7657799	T,G	
rs870347	T,G	

รูปที่ 8 แสดงการนำเข้าข้อมูล Phenotype



รูปที่ 9 แสดงผลการส่งข้อมูลโดยรอการประเมินของผู้ดูแลระบบ

2. **การอนุมัติการนำเข้าข้อมูลเข้าสู่ระบบโดยผู้ดูแล**

2.1 ผู้ดูแลระบบทำการเลือก รอบการนำข้อมูลเข้าสู่ระบบ เพื่อทำการอนุมัติ

2.2 ทำการตรวจสอบคุณภาพข้อมูล

ค่าที่ผู้ดูแลระบบจะใช้เพื่อประกอบการตัดสินใจคุณภาพของข้อมูลประกอบด้วย

1. Total read ที่คิดจากการรวม Read ทั้งหมดของข้อมูล Genotype และ Phenotype ของแต่ละตัวอย่าง

2. ค่า Allele coverage ratios (ACRs) ของแต่ละตัวอย่าง

3. ค่า Sequence coverage ratios (SCRs) ของแต่ละตัวอย่าง

2.3 ข้อมูลถูกบันทึกเข้าตารางเก็บข้อมูลถาวร

3. **ระบบคำนวณข้อมูลสถิติเชิงพันธุศาสตร์ (ทำงานแบบอัตโนมัติ)**

3.1 นำข้อมูลจากตารางเก็บข้อมูลถาวร มาคำนวณค่าสถิติเชิงพันธุศาสตร์

- Expected Homozygosity
- P value of Exact test for Hardy-Weinberg Equilibrium
- Haplotype Diversity
- Expected Heterozygosity - (Liu BH, 1998)
- Mean Exclusion Chance
- Power of Discrimination
- Power of Exclusion
- Polymorphic Information Content - (Botstein D, White RI, Skolnick M and Davis RW, 1980)
- Match probability

3.2 นำข้อมูลเข้าตารางเก็บข้อมูลถาวร

4. **เว็บไซต์ www.diversid.info สามารถเข้าถึงข้อมูลสถิติเชิงพันธุศาสตร์ และค้นหาจำนวนข้อมูล Genotype และ Phenotype ได้**

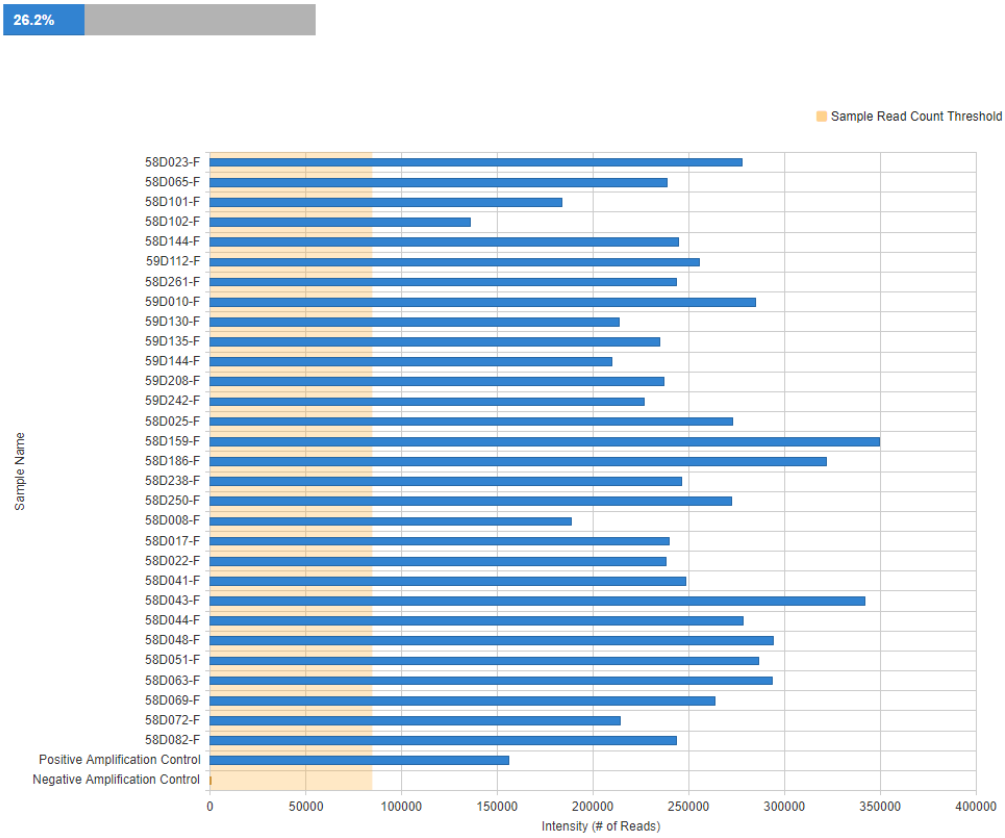
4.1 ข้อมูลสถิติเชิงพันธุศาสตร์

4.2 การค้นหาจำนวน Genotype และ Phenotype ที่มีอยู่ในระบบ

ผลการวิจัย

ข้อมูลสารพันธุกรรมจากการทำ NGS จัดเป็นกลุ่มการวิเคราะห์ตามประเภทของตำแหน่งตรวจ และทำการวิเคราะห์ประเด็นดังนี้

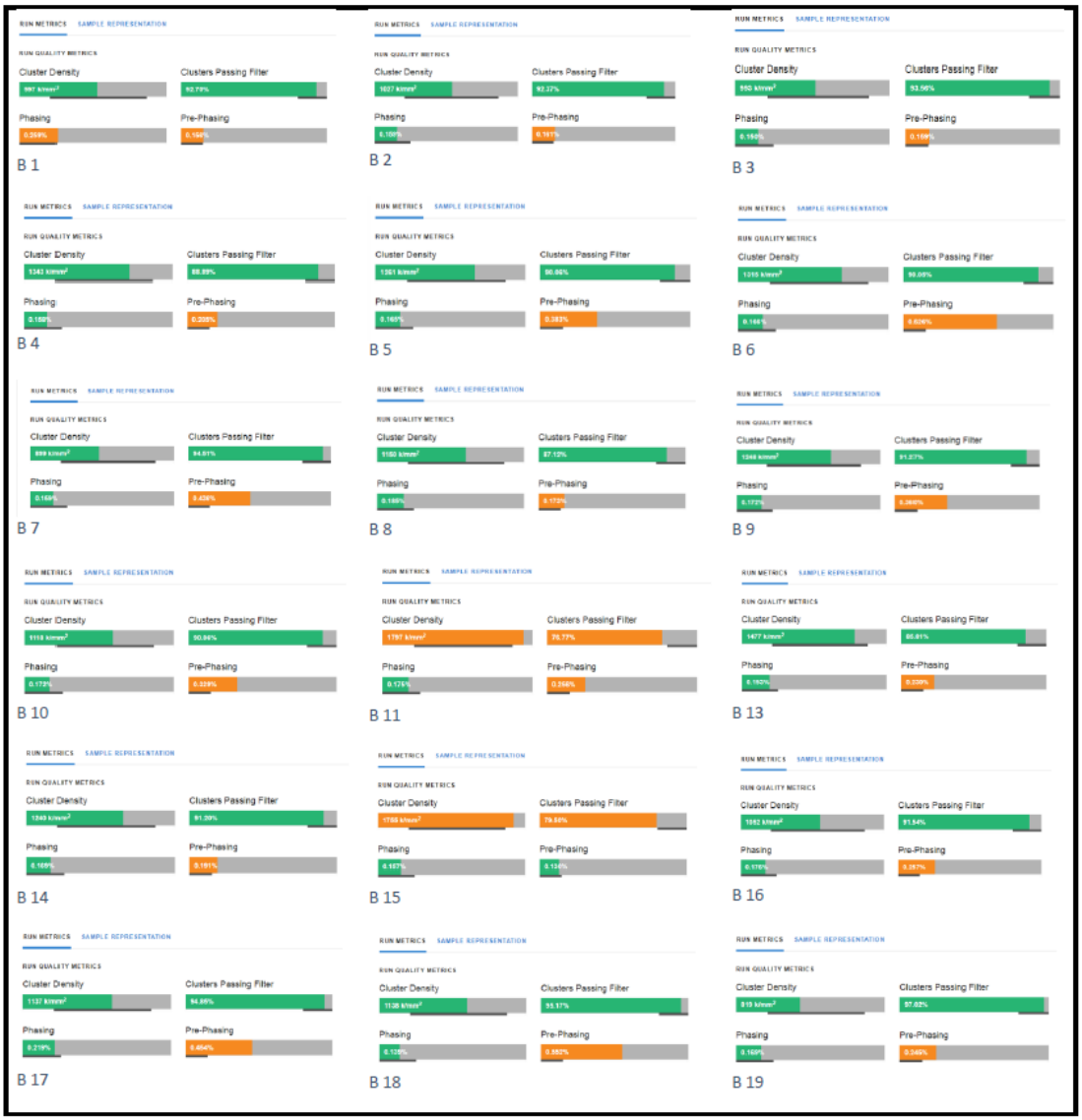
- ผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณ **(รูปที่ 10)**
    - การประเมินจำนวนการอ่านของสารพันธุกรรมในตัวอย่าง (read count) โดยมีค่า read count threshold เป็นเกณฑ์ในการประเมิน จากการตรวจทั้งหมด 19 ชุดการตรวจ (B1-B19) พบว่าคุณภาพของการอ่านนั้นสูงมากกว่าช่วงที่กำหนดในการอ่านค่า ยกเว้นการตรวจในตัวอย่างรอบการปฏิบัติการที่ B12 ซึ่งมีปริมาณสารพันธุกรรมอยู่ต่ำจึงคัดออกจากการศึกษาทั้งหมด



รูปที่ 10 แสดงตัวอย่างจำนวน 30 ตัวอย่าง (ตัวอย่างควบคุม positive control 1 ตัวอย่าง และ ตัวอย่างควบคุม negative control 1 ตัวอย่าง) ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (จำนวนการอ่านของสารพันธุกรรมในตัวอย่าง) เป็นภาพรวมของแต่ละรอบการปฏิบัติการ

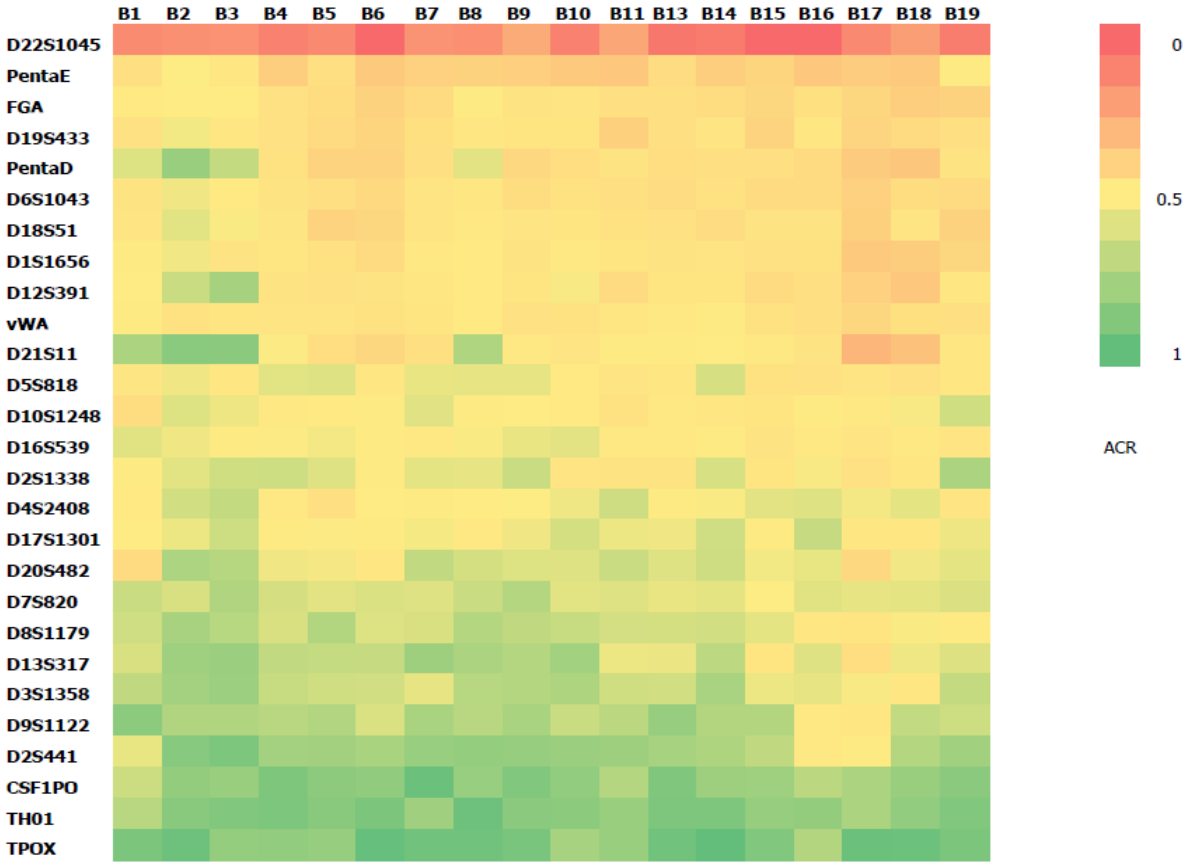
- ผลการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ **(รูปที่ 11)**

- คุณภาพของการวิเคราะห์ในแต่ละรอบของการตรวจ (run quality matrix) โดยการคำนวนค่า ความหนาแน่นของกลุ่มสารพันธุกรรมบน flow cell (cluster density) และค่าการพิจารณากรั่นกรองกลุ่มสารพันธุกรรมที่ผ่านเพื่อการวิเคราะห์ (cluster passing filter) พบว่า ทุกรอบการปฏิบัติการมีค่า cluster density, cluster passing filter และ Phasing ผ่านทุกตัวอย่าง ยกเว้น ในรอบการปฏิบัติการที่ B11 และ B15 ที่มีค่า over cluster density (ค่าที่สูงกว่าช่วงที่กำหนด) โดยที่ cluster density of B11 มีค่า 1,797 และ B15 มีค่า 1,755 ส่วน cluster passing filter ให้ค่าต่ำกว่าช่วงค่ากำหนด โดยที่ cluster passing filter of B11 มีค่า 76.77 และ B15 มีค่า 79.50 แต่ไม่ส่งผลต่อการทำการตรวจวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป **(ภาคผนวกที่ 3)**



รูปที่ 11 แสดงคุณภาพของการวิเคราะห์ในแต่ละรอบของการตรวจ (run quality matrix) ของรอบการปฏิบัติการที่ B1-B19

- Allele coverage ratio (ACR) ของตำแหน่ง autosomal STRs พบว่าตำแหน่งการตรวจทั้งหมดของ autosomal STRs มีค่าอัตราส่วนของ ACR สูงในช่วง 0.69-0.93 ยกเว้น ตำแหน่ง D22S1045 ที่ให้ค่าอัตราส่วน ACR รวมเพียง 0.28 **(รูปที่ 12)** สอดคล้องกับผลการทดลองในหลายรายงานที่เคยทำการทดสอบก่อนหน้า (6-9) **(ภาคผนวกที่ 4)**



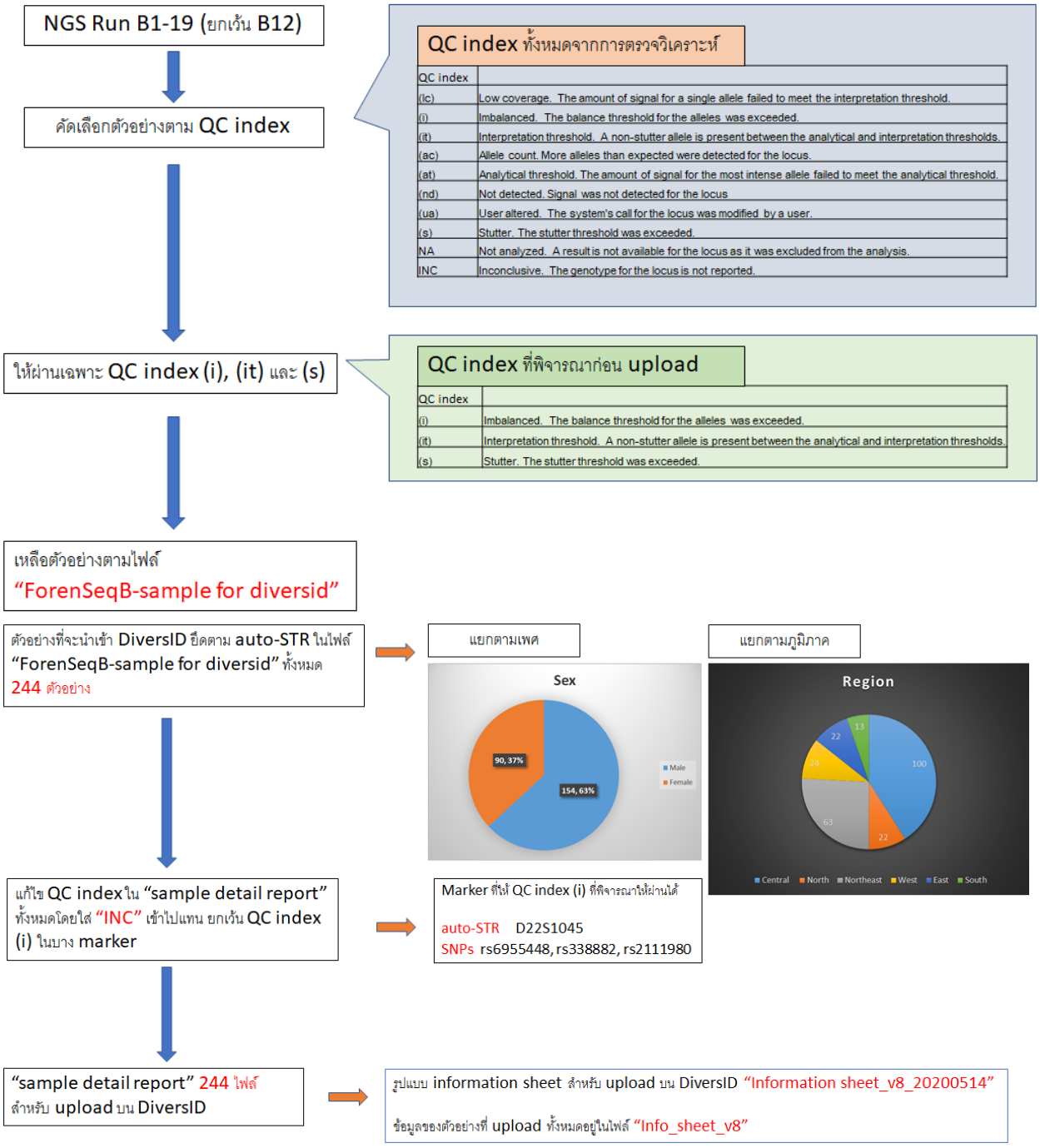
รูปที่ 12 Heatmap แสดงสัดส่วน ACR ตามตำแหน่งการตรวจ aSTRs จากผลการตรวจทั้งสิ้น 18 ครั้ง (B1-19)

- Allele coverage ratio ของตำแหน่ง iSNPs พบว่าตำแหน่งการตรวจทั้งหมดของ iSNPs มีค่าอัตราส่วนของ ACR สูงในช่วง 0.54-0.97 ยกเว้น ตำแหน่ง **(รูปที่ 13) (ภาคผนวกที่ 5)**

รูปที่ 13 Heatmap แสดงสัดส่วน ACR ตามตำแหน่งการตรวจ iSNPs จากผลการตรวจทั้งสิ้น 18 ครั้ง (B1-19)

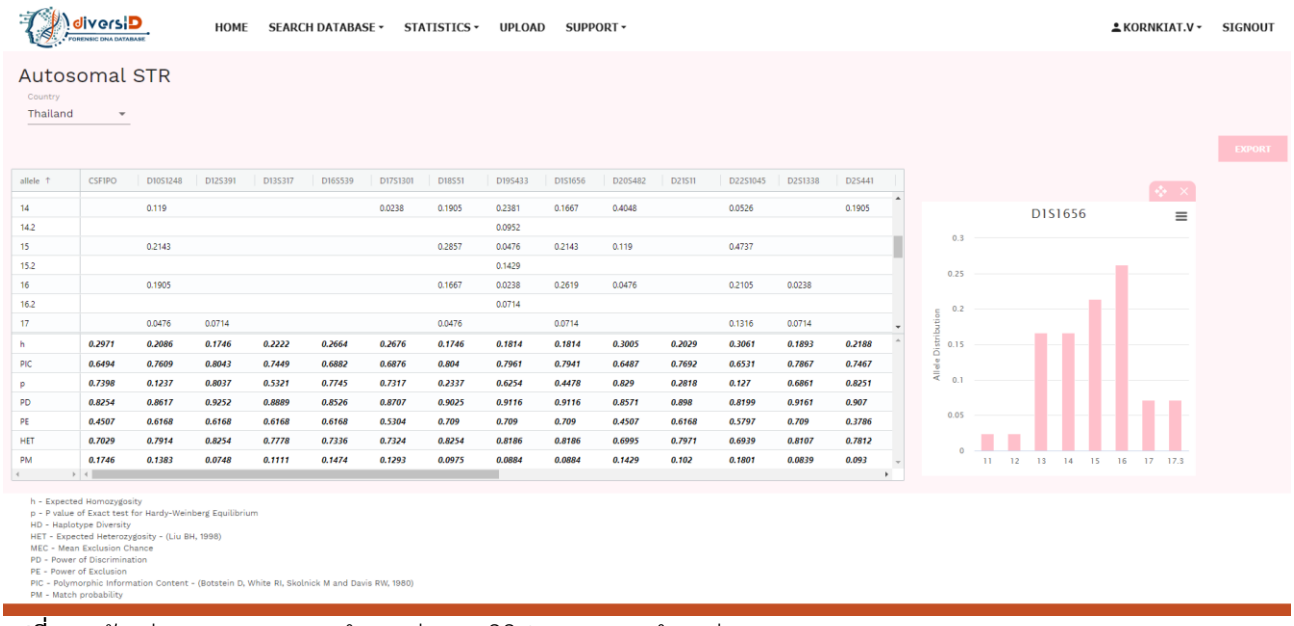
- Sequencing coverage ratio ของตำแหน่ง autosomal STRs **(ภาคผนวกที่ 6)** พบว่าค่าของ SCR อยู่ในช่วง 0.84-0.98 (เฉลี่ยที่ 0.91) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ดีสำหรับการวิเคราะห์ผล โดยที่ตำแหน่ง D22S1045 ให้ค่าต่ำที่สุด และ D5S818 ให้ค่าสูงที่สุด

- ผลการพิจารณา qc index ก่อนการ upload ข้อมูลเข้าสู่ระบบ **(รูปที่ 14)** จากการตรวจทั้งหมด 18 รอบการปฏิบัติการจะผ่านการประเมินเชิงปริมาณและคุณภาพครั้งที่ 1 ดังที่กล่าวในหัวข้อข้างต้น จากตัวอย่างที่เข้าตรวจเริ่มต้น 540 ตัวอย่าง หลังผ่านการการคัดกรองจะเหลือตัวอย่างประมาณ 500 ตัวอย่าง จากนั้นในระบบฐานข้อมูลจะทำการตรวจสอบคุณภาพครั้งที่ 2 โดยพิจารณาใน qc index ที่สำคัญ คือ allele imbalance, interpretation threshold และ stutter เท่านั้น โดยจากผลการทดสอบคุณภาพครั้งที่ 2 จะเหลือตัวอย่างจำนวน 244 ตัวอย่าง ทั้งนี้ จากผลการทดสอบคุณภาพพบว่าตำแหน่งของการตรวจที่มีค่าคุณภาพของการตรวจต่ำในบางตำแหน่ง เช่น D22S1045, rs6955448, rs338882 และ rs2111980 โดยเฉพาะในผลการตรวจหากพบว่าตำแหน่งดังกล่าวรายงานความไม่สมดุลของอัลลีล (allele imbalance) ขึ้นในรายงานการตรวจ จะอนุญาตให้ตำแหน่งดังกล่าวสามารถ upload ได้โดยทำการเปลี่ยน allele ที่มีค่าเตือนนั้นๆเป็น INC (inconclusive) ซึ่งระบบฐานข้อมูลจะเก็บข้อมูลโดยระบุการเตือนเรื่องคุณภาพกำกับไว้



รูปที่ 14 แสดงแผนภาพขั้นตอนและผลการตรวจสอบข้อมูลเชิงคุณภาพก่อนการส่งข้อมูลเข้าสู่ระบบฐานข้อมูล

- ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติประชากร Population statistics โดย แยกตามชนิดของตำแหน่งที่ใช้ในการตรวจ และแสดงผลรายละเอียดแยกตามชนิดของดีเอ็นเอ การแสดงผลจะปรากฏผลการคำนวนค่าทางสถิติประชากรชนิดต่างๆ (ในแนวนอน) เปรียบเทียบกับตำแหน่งการตรวจ (ในแนวตั้ง) ซึ่งผู้ใช้สามารถเลือกกลุ่มประชากรที่สนใจได้จากการเลือกประเทศ (Country) โดยประกอบด้วยค่าต่าง ๆ ดังต่อไปนี้
  - ค่าทางสถิติประชากรทางนิติพันธุศาสตร์ ประกอบด้วย
    a. Expected Homozygosity (h)
    b. Expected Heterozygosity (HET)
    c. Hardy-Weinberg equilibrium (p-value of Exact test, p)
    d. Power of Discrimination (PD)
    e. Power of Exclusion (PE)
    f. Polymorphic Information Content (PIC)
    g. Match probability (PM)
  - การแสดงผลในรูปของตารางความถี่ของอัลลีล เปรียบเทียบกับในแต่ละตำแหน่งของ autosomal STR **(รูปที่ 15)** และสามารถแสดงผลออกมาในรูปของกราฟแท่งของตำแหน่งที่สนใจโดยการลากเมาส์ชี้บนค่าสถิติที่ตำแหน่งที่สนใจนั้นๆ
  - สามารถดาว์นโหลดค่าทางสถิตที่ปรากฏทั้งหมด (โดยกดที่ตำแหน่ง export) ในรูปแบบของไฟล์ excel เพื่อนำข้อมูลไปใช้ต่อไป



allele	CSF1PO	D10S1248	D12S391	D13S317	D16S539	D7S1301	D18S51	D19S433	D1S1656	D20S482	D21S11	D22S1045	D2S1338	D2S441
14		0.119				0.0238	0.1905	0.2381	0.1667	0.4048		0.0526		0.1905
14.2								0.0952						
15		0.2143					0.2857	0.0476	0.2143	0.119		0.4737		
15.2								0.1429						
16		0.1905					0.1667	0.0238	0.2619	0.0476		0.2105	0.0238	
16.2								0.0714						
17		0.0476	0.0714				0.0476		0.0714			0.1316	0.0714	
h	0.2971	0.2086	0.1746	0.2222	0.2664	0.2676	0.1746	0.1814	0.1814	0.3005	0.2029	0.3061	0.1893	0.2188
PIC	0.6494	0.7609	0.8043	0.7449	0.6882	0.6876	0.804	0.7961	0.7941	0.6487	0.7692	0.6531	0.7867	0.7467
p	0.7398	0.1237	0.8037	0.5321	0.7745	0.7317	0.2337	0.6254	0.4478	0.829	0.2818	0.127	0.6861	0.8251
PD	0.8254	0.8617	0.9252	0.8889	0.8526	0.8707	0.9025	0.9116	0.9116	0.8571	0.898	0.8199	0.9161	0.907
PE	0.4507	0.6168	0.6168	0.6168	0.6168	0.5304	0.709	0.709	0.709	0.4507	0.6168	0.5797	0.709	0.3786
HET	0.7029	0.7914	0.8254	0.7778	0.7336	0.7324	0.8254	0.8186	0.8186	0.6995	0.7971	0.6939	0.8107	0.7812
PM	0.1746	0.1383	0.0748	0.1111	0.1474	0.1293	0.0975	0.0884	0.0884	0.1429	0.102	0.1801	0.0839	0.093

รูปที่ 15 ตัวอย่างการแสดงผลการคำนวนค่าทางสถิติประชากรของตำแหน่ง Autosomal STR

- การแสดงผลของหน้าฐานข้อมูล diversID และองค์ประกอบของหน้าเวปไซท์
  - หน้าแรก https://www.diversid.info ประกอบด้วย สถานะของฐานข้อมูลในปัจจุบัน ซึ่งเป็นข้อมูลแสดงจำนวนของตัวอย่างที่อยู่ในระบบซึ่งผ่านกระบวนการตรวจสอบคุณภาพทั้งหมดแล้ว โดยมีการนำจำนวนแยกตามชนิดของตำแหน่งการตรวจสารพันธุกรรมทางนิติวิทยาศาสตร์ เช่น autosomal STRs, X และ Y chromosomal STRs, iSNPs เป็นต้น **(ภาคผนวกที่ 7)** และให้ข้อมูลวัตถุประสงค์ของการจัดทำระบบฐานข้อมูลโดยคร่าว รวมถึงการเชื้อเชิญนักวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องเพื่อการแชร์ข้อมูลเข้าสู่ระบบฐานข้อมูล และรายละเอียดของทุนที่สนับสนุนการศึกษาและการติดต่อทีมคณะผู้จัดทำ
  - เมนู search database ประกอบด้วย การค้นหารูปแบบดีเอ็นเอตามที่ผู้ใช้ระบุผลของแต่ละตำแหน่งเพื่อการค้นหาภายในฐานข้อมูล ซึ่งในเบื้อต้นการศึกษานี้ตำแหน่งการตรวจชนิดที่สามารถใช้ระบบการค้นหาได้ ประกอบด้วย 24 ตำแหน่งของ Y chromosomal STRs และ ancestry SNPs (สำหรับการศึกษาในอนาคต) **(ภาคผนวกที่ 8)** ซึ่งผลจากการใส่ข้อมูลเพื่อการค้นหา ผลที่ได้ปรากฏ ดังนี้ **(ภาคผนวกที่ 9)**
    - Found match พบข้อมูลที่ตรงกับในฐานข้อมูลและรายงานจำนวนการพบ ต่อจำนวนตัวอย่างที่ปรากฏในฐานข้อมูลล่าสุด

- Search results in region เป็นการรายงานรายละเอียดที่จำเพาะในระดับภูมิภาคของตัวอย่างพบ และรายงานเป็นจำนวนการพบ ต่อจำนวนตัวอย่างที่ปรากฏในฐานข้อมูลล่าสุด
- Search results in country เป็นการรายงานรายละเอียดที่จำเพาะในหัวข้อประเทศของตัวอย่างพบ และรายงานเป็นจำนวนการพบ ต่อจำนวนตัวอย่างที่ปรากฏในฐานข้อมูลล่าสุด

- เมนู Statistics แบ่งตามชนิดของตำแหน่งการตรวจ
  - ตำแหน่งของ autosomal STRs **(ภาคผนวกที่ 10)**
  - ตำแหน่งของ Y STRs **(ภาคผนวกที่ 11)**
  - ตำแหน่งของ X STRs **(ภาคผนวกที่ 12)**
  - ตำแหน่งของ iSNPs **(ภาคผนวกที่ 13)**

อภิปราย และ ข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงกระบวนการสร้างฐานข้อมูลสารพันธุกรรม ซึ่งประกอบด้วยการเริ่มต้นทำข้อมูลสารพันธุกรรมบนพื้นฐานเทคโนโลยีการตรวจลำดับสารพันธุกรรมรุ่นใหม่ จะเห็นได้ว่าข้อดีของการใช้เทคโนโลยี NGS ในการตรวจสารพันธุกรรมบนตำแหน่งทางนิติพันธุศาสตร์นั้น คือ การได้ข้อมูลสารพันธุกรรมที่สำคัญจำนวนมาก จากการตรวจในตัวอย่างเพียงหนึ่งครั้ง ซึ่งนับเป็นประโยชน์ต่อการบริหารจัดการตัวอย่างสำหรับการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ มักมีข้อจำกัดของตัวอย่างที่มักมีคุณภาพต่ำ หรือ ปริมาณตัวอย่างมีอยู่อย่างจำกัด

แต่อย่างไรก็ตาม คุณภาพของผลการตรวจสารพันธุกรรมด้วยเทคโนโลยี NGS นั้น ยังพบว่ามีข้อมูลในบางตำแหน่งของการตรวจที่มีค่าประสิทธิผลของการตรวจต่ำ โดยจากผลการศึกษานี้พบว่า ตัวอย่างเพียงร้อยละ 45 (244 ตัวอย่างจากทั้งหมด 540 ตัวอย่าง) เท่านั้น ที่มีคุณสมบัติผ่านตาม quality index ในการศึกษานี้ หากพิจารณาโดยภาพรวมพบว่าปัจจัยที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์คุณภาพของสารพันธุกรรม เกิดจากคุณภาพและชนิดของตัวอย่างนั้น ๆ กล่าวคือ ตัวอย่างจำนวนมากที่ถูกคัดออกเป็นเลือดที่มีช่วงระยะเวลาหลังการเสียชีวิตที่ยาวเกินกว่า 12 ชั่วโมง ซึ่งปัจจัยของกระบวนการเน่าในเนื้อเยื่อและตัวอย่างส่งผลต่อการหักและฉีกขาดของโครโมโซมและดีเอ็นเอ ส่งผลให้โอกาสในการตรวจดีเอ็นเอสำเร็จลดลง อีกทั้ง อิทธิพลของสิ่งแวดล้อมที่ตัวอย่างนั้น ๆอยู่ อาจพบว่ามีสารที่ยับยั้งกระบวนการการเพิ่มจำนวนสายดีเอ็นเอ (PCR inhibitor) ในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบนตำแหน่งที่สนใจ การตรวจสอบคุณภาพมีเกณฑ์การประเมินที่สำคัญ คือ ACR, SCR และ stutter โดยจากผลการทดสอบคุณภาพตำแหน่งดีเอ็นเอที่มีค่าเหล่านี้ไม่ได้ตามเกณฑ์กำหนด จะไม่สามารถนำมาเข้าในระบบฐานข้อมูล ในการศึกษานี้พบว่าตำแหน่ง D22S1045 นั้นพบว่าเป็นตำแหน่งของ autosomal STR ที่มีค่า ACR ต่ำ (ค่าที่ได้คือ 0.22, ค่ากลาง คือ 0.81) สอดคล้องกับการรายงานก่อนหน้าของ Churchill และ คณะในปี ค.ศ. 2016 และ การศึกษาของ Sukawutthiya, Sathirapatya และ Vongpaisarnsin ในปี ค.ศ. 2017 (7, 10) จึงต้องมีการตัดค่าการกรองข้อมูลของตำแหน่งดังกล่าวก่อนการนำเข้าสู่ระบบฐานข้อมูล โดยให้ผู้ใช้พึงระวังในการนำค่าทางสถิติของตำแหน่งดังกล่าวไปใช้งาน โดยจะมีการเขียนระบุเตือนที่หน้าของการวิเคราะห์ ส่วนตำแหน่งของ iSNPs พบว่า rs6955448, rs338882 และ rs2111980 มักพบว่ามีการเตือนของค่าความไม่สมดุลของอัลลีล (allele imbalance) จึงต้องให้ผู้ใช้ทำการพิจารณาตัดสินใจในข้อมูลของตนเองก่อนว่าข้อมูลนั้นเป็น homozygous หรือเป็น imbalance heterozygous ก่อนการ upload ข้อมูล และจะมีการเตือนให้ผู้ใช้พึงระวังในการนำค่าทางสถิติของตำแหน่งดังกล่าวไปใช้งาน

ในขั้นตอนการเข้าใช้งานหากผู้ใช้งานต้องการเพียงดูข้อมูลและค่าทางสถิติที่มีอยู่ในระบบเดิม จะสามารถเข้าดูใช้งานได้แม้ยังไม่ผ่านการลงทะเบียนเข้าใช้ แต่ในกรณีที่ผู้ใช้งานต้องการเพิ่มข้อมูลของประชากรของตนเองเพื่อการศึกษา หรือ การเปรียบเทียบค่าทางสถิติต่าง ๆ กับกลุ่มประชากรในการศึกษานี้ จะต้องทำการลงทะเบียนเพื่อใช้ USERNAME และ รหัสผ่าน สำหรับการเข้าใช้งาน อีกทั้งสามารถ download ผลการศึกษาเพื่อการวิเคราะห์อื่น ๆ ได้อีกด้วย ส่วนในขั้นตอนการแจ้งเตือนค่าทางคุณภาพต่าง ๆ นั้น จะมีการเตือนโดยอัตโนมัติจากการตั้งในระบบ และทำการเตือนผู้ดูแลเพื่อเข้ามาตรวจสอบและตัดสิน ผู้ดูแลระบบจะส่งเมล์ในการตอบกลับถึงผลของการ upload ว่าสำเร็จหรือไม่ และคำแนะนำหากมีสิ่งที่ต้องแก้ไข

ทางทีมผู้วิจัย กำลังอยู่ในขั้นตอนการเผยแพร่ และประชาสัมพันธ์เพื่อให้เกิดการใช้งานในวงกว้าง และรับข้อเสนอแนะเพื่อการปรับปรุงระบบให้สามารถใช้งานได้ตามวัตถุประสงค์ของการศึกษา โดยสามารถติดตามสถานะของการปรับปรุงได้ที่เมนู news สิ่งที่ต้องวางแผนในอนาคต คือ หากข้อมูลในระบบฐานข้อมูลเริ่มมีมากขึ้น การเข้าถึงและการประมวลผลต่างๆจะต้องมีประสิทธิภาพสูงขึ้น และพื้นที่ในการจัดเก็บข้อมูลเพิ่มมากขึ้น อีกทั้ง ระบบการตรวจสอบข้อมูลเพื่องของความปลอดภัยในการป้องกันข้อมูลถูกรบกวนโดย bot, spyware หรือ virus ต่าง ๆ ซึ่งมีการตรวจสอบโดยอัตโนมัติในทุกรอบสองถึงสามวัน และจะมีการสำรองชุดข้อมูลอยู่เสมอในทุกๆ สองสัปดาห์ถึงหนึ่งเดือน

บรรณานุกรม (Bibliography) เอกสารอ้างอิง (ไทยและต่างประเทศ)

1. Budowle B, Moretti TR, Baumstark AL, Defenbaugh DA, Keys KM. Population data on the thirteen CODIS core short tandem repeat loci in African Americans, US Caucasians, Hispanics, Bahamians, Jamaicans, and Trinidadians. J Forensic Sci. 1999;44(6):1277-86.
2. Hill CR, Duewer DL, Kline MC, Coble MD, Butler JM. U.S. population data for 29 autosomal STR loci. Forensic Sci Int Genet. 2013;7(3):e82-3.
3. D'Amato ME, Ehrenreich L, Cloete K, Benjeddou M, Davison S. Characterization of the highly discriminatory loci DYS449, DYS481, DYS518, DYS612, DYS626, DYS644 and DYS710. Forensic Sci Int Genet. 2010 Feb;4(2):104-10.
4. Butler JM, Schoske R, Vallone PM, Kline MC, Redd AJ, Hammer MF. A novel multiplex for simultaneous amplification of 20 Y chromosome STR markers. Forensic Sci Int. 2002 Sep 10;129:10-24.
5. Short Tandem Repeat DNA Internet Database. SRM 2395-Human Y-Chromosome DNA Profiling Standard. National Institute of Standards and Technology (NIST). http://www.cstl.nist.gov/strbase/srm2395.htm. Updated December 15, 2009. Accessed June 9, 2015.
6. A.C. Jäger, M.L. Alvarez, C.P. Davis, et al., Developmental validation of the MiSeq FGx forensic genomics system for targeted next generation sequencing in forensic DNA casework and database laboratories, Forensic Sci. Int. 28 (2017) 52–70.
7. J.D. Churchill, S.E. Schmedes, J.L. King, et al., Evaluation of the Illumina® beta version ForenSeq DNA signature prep kit for use in genetic profiling, Forensic Sci. Int. 20 (2016) 20–29.
8. A.L. Silvia, N. Shugarts, Jenifer Smith, A preliminary assessment of the ForenSeq™ FGx System: next generation sequencing of an STR and SNP multiplex, Int. J. Legal Med. 131 (2017) 73–86.

9. K.B. Gettings, K.M. Kiesler, S.A. Faith, et al., Sequence variation of 22 autosomal STR loci detected by next generation sequencing, Forensic Sci. Int. 21 (2016) 15–21.
10. P. Sukawutthiya, T. Sathirapatya, K. Vongpaisarnsin, Considering a performance test of forensic genomics system on massively parallel sequencing technology, Forensic Science International: Genetics Supplement Series, Volume 6, 2017, Pages e599-e600

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1 ค่า %stutter, analytical และ interpretation thresholds ของตำแหน่ง autosomal STRs

Loci	% Stutter	% Analytical	% Interpretation
Amelogenin	0	> 1.5	> 4.5
CSF1P0	< 10	> 1.5	> 4.5
D1S1656	<25	> 1.5	> 4.5
D2S441	< 7.5	> 1.5	> 4.5
D2S1338	<20	> 1.5	> 4.5
D3S1358	<15	> 1.5	> 4.5
D4S2408	<7.5	> 1.5	> 4.5
D5S818	< 12.5	> 1.5	> 4.5
D6S1043	<12.5	> 1.5	> 4.5
D7S820	< 10	> 1.5	> 4.5
D8S1179	< 25	> 1.5	> 4.5
D9S1122	<12.5	> 1.5	> 4.5
D1051248	< 20	> 1.5	> 4.5
D125391	< 33	> 1.5	> 4.5
D135317	<12.5	> 1.5	> 4.5
D165539	< 20	> 1.5	> 4.5
D1751301	<20	> 1.5	> 4.5
D18551	<22	> 1.5	> 4.5
D195433	<12.5	> 1.5	> 4.5
D205182	< 15	> 1.5	> 4.5
D21511	<10	> 1.5	> 4.5
D2251045	< 20	> 1.5	> 4.5
FGA	<25	> 1.5	> 4.5
Penta D	< 7.5	> 1.5	> 4.5
Penta E	<10	> 1.5	> 4.5
THO1	<10	> 1.5	> 4.5
TPOX	<10	> 1.5	> 4.5
vWA	<22	> 1.5	> 4.5
DYS19	< 15	> 1.5	> 4.5

DYS385a-b	< 20	> 1.5	> 4.5
DYF387S1	<20	> 1.5	> 4.5
DYS389I	< 20	> 1.5	> 4.5
DYS389II	<35	>5	> 15
DYS390	<15	> 1.5	>4.5
DYS391	<20	> 1.5	>4.5
DYS392	< 30	> 1.5	>4.5
DYS437	<45	> 1.5	>4.5
DYS438	<15	> 1.5	>4.5
DY5439	< 15	> 1.5	>4.5
DYS448	<15	>3.3	>10
DYS460	<15	> 1.5	> 4.5
DYS481	< 50	> 1.5	> 4.5
DYS505	<15	> 1.5	> 4.5
DYS522	< 15	> 1.5	> 4.5
DYS533	<15	> 1.5	> 4.5
DYS549	<11	> 1.5	> 4.5
DYS570	< 22	> 1.5	> 4.5
DYS576	< 15	> 1.5	> 4.5
DYS612	<35	> 1.5	> 4.5
DYS635	< 15	> 3.3	> 10
DYS643	<20	>1.5	> 4.5
Y-GATA-H4	< 35	>1.5	> 4.5
HPRTB	<15	>1.5	> 4.5
DXS7132	< 22	>1.5	> 4.5
DIC37423	<15	>1.5	> 4.5
DXS8378	< 15	>1.5	> 4.5
DXS10074	<25	>1.5	> 4.5
DXS10103	<22	>1.5	> 4.5
DXS10135	<22	>1.5	> 4.5

ภาคผนวกที่ 2 ค่า analytical และ interpretation thresholds ของตำแหน่ง SNPs

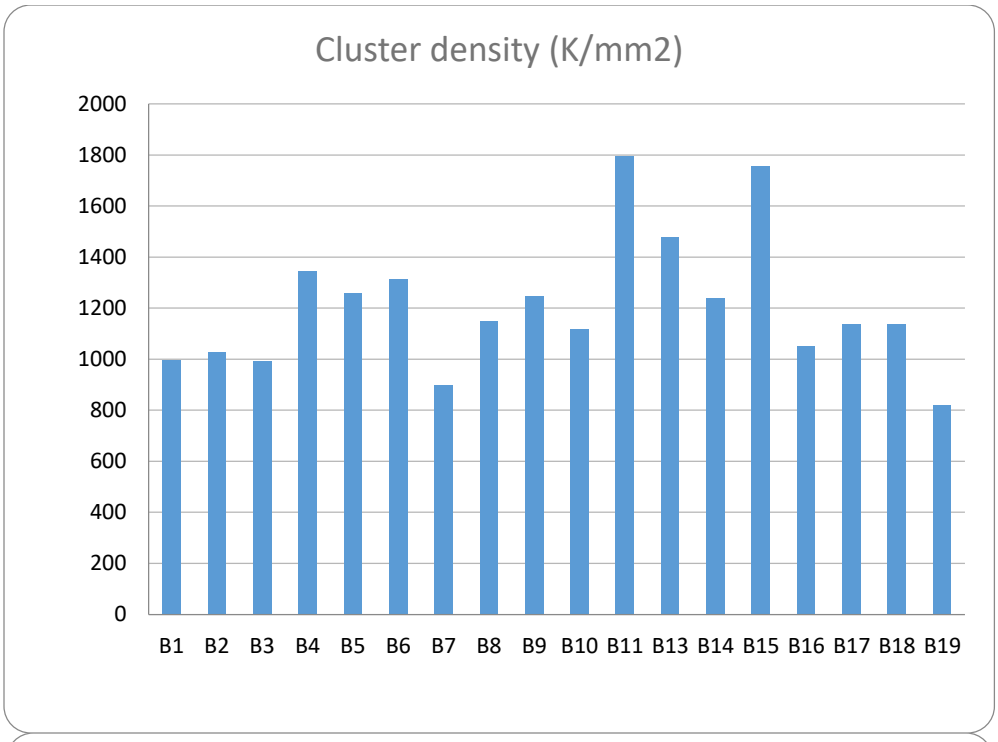
Loci	% Analytical	% Interpretation
rs3737576	> 1.5	> 4.5
rs7554936	> 1.5	> 4.5
rs2814778	> 1.5	> 4.5
rs798443	> 1.5	> 4.5
rs1876482	> 1.5	> 4.5
rs1834619	> 1.5	> 4.5
rs3827760	> 1.5	> 4.5
rs260690	> 1.5	> 4.5
rs6754311	> 1.5	> 4.5
rs10497191	> 1.5	> 4.5
rs1919550	> 1.5	> 4.5
rs12498138	> 1.5	> 4.5
rs4833103	> 1.5	> 4.5
rs1229984	> 1.5	> 4.5
rs3811801	> 1.5	> 4.5
rs7657799	> 1.5	> 4.5
rs870347	> 1.5	> 4.5
rs7722456	> 1.5	> 4.5
rs192655	> 1.5	> 4.5
rs3823159	> 1.5	> 4.5
rs917115	> 1.5	> 4.5
rs1462906	> 1.5	> 4.5
rs6990312	> 1.5	> 4.5
rs2196051	> 1.5	> 4.5
rs1871534	> 1.5	> 4.5
rs3814134	> 1.5	> 4.5
rs4918664	> 1.5	> 4.5
rs174570	> 1.5	> 4.5

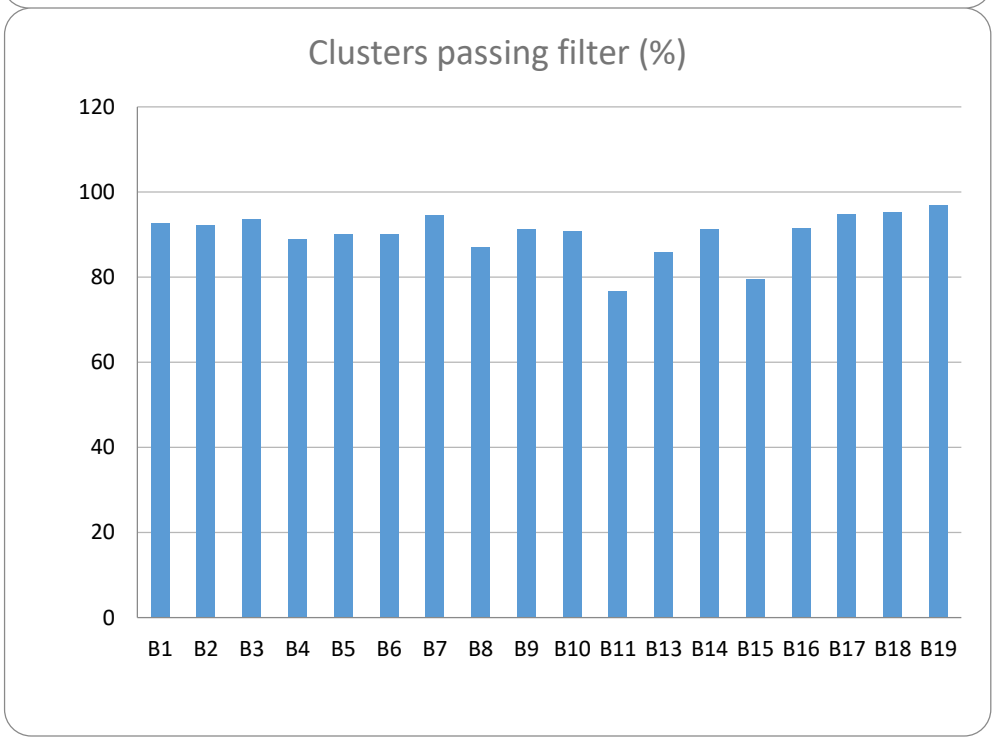
rs727811	>1.5	>4.5
rs6955448	>1.5	>4.5
rs917118	>1.5	>4.5
rs321198	>1.5	>4.5
rs737681	>1.5	>4.5
rs763869	>1.5	>4.5
rs10092491	>1.5	>4.5
rs2056277	>1.5	>4.5
rs4606077	>1.5	>4.5
rs1015250	>1.5	>4.5
rs7041158	>1.5	>4.5
rs1463729	>1.5	>4.5
rs1360288	>1.5	>4.5
rs10776839	>1.5	>4.5
rs826472	>1.5	>4.5
rs735155	>1.5	>4.5
rs3780962	>1.5	>4.5
rs740598	>1.5	>4.5
rs964681	>1.5	>4.5
rs1498553	>1.5	>4.5
rs901398	>1.5	>4.5
rs10488710	>1.5	>4.5
rs2076848	>1.5	>4.5
rs2107612	>1.5	>4.5
rs2269355	>1.5	>4.5
rs2920816	>1.5	>4.5
rs2111980	>1.5	>4.5
rs10773760	>1.5	>4.5
rs1335873	>1.5	>4.5
rs1886510	>1.5	>4.5
rs1058083	>1.5	>4.5
rs354439	>1.5	>4.5

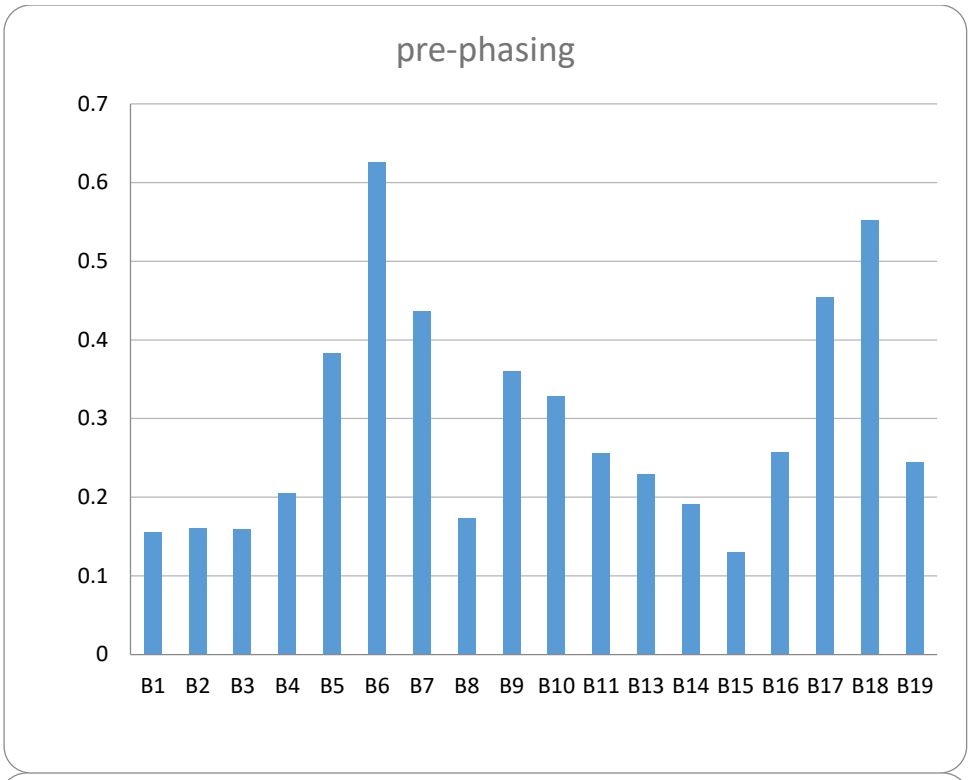
rs1454361	> 1.5	> 4.5
rs722290	> 1.5	> 4.5
rs873196	> 1.5	> 4.5
rs4530059	> 1.5	> 4.5
rs1821380	> 1.5	> 4.5
rs8037429	> 1.5	> 4.5
rs1528460	> 1.5	> 4.5
rs729172	> 1.5	> 4.5
rs2342747	> 1.5	> 4.5
rs430046	> 1.5	> 4.5
rs1382387	> 1.5	> 4.5
rs9905977	> 1.5	> 4.5
rs740910	> 1.5	> 4.5
rs938283	> 1.5	> 4.5
rs8078417	> 1.5	> 4.5
rs1493232	> 1.5	> 4.5
rs9951171	> 1.5	> 4.5
rs1736442	> 1.5	> 4.5
rs1024116	> 1.5	> 4.5
rs719366	> 1.5	> 4.5
rs576261	> 1.5	> 4.5
rs1031825	> 1.5	> 4.5
rs445251	> 1.5	> 4.5
rs1005533	> 1.5	> 4.5
rs1523537	> 1.5	> 4.5
rs722098	> 1.5	> 4.5
rs2830795	> 1.5	> 4.5
rs2831700	> 1.5	> 4.5
rs914165	> 1.5	> 4.5
rs221956	> 1.5	> 4.5
rs733164	> 1.5	> 4.5
rs987640	> 1.5	> 4.5
rs2040411	> 1.5	> 4.5
rs1028528	> 1.5	> 4.5

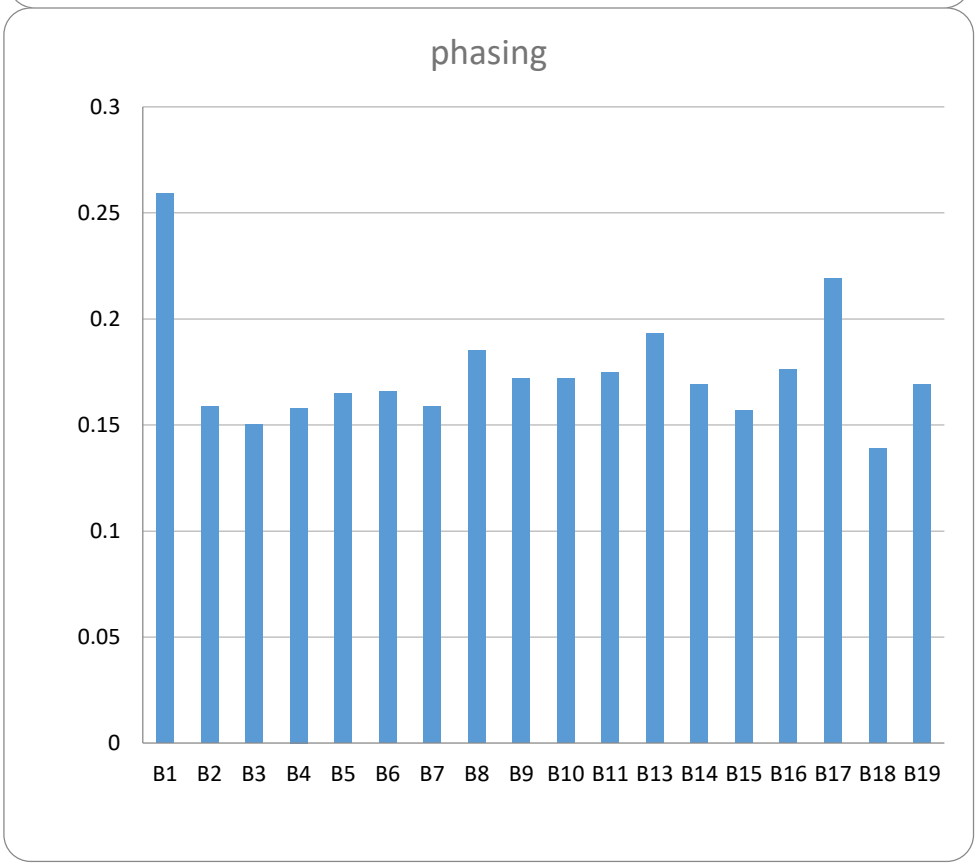
ภาคผนวกที่ 3 ตารางและภาพแสดงผลการวิเคราะห์เชิงคุณภาพในแต่ละรอบของการตรวจ

Run	Cluster density (K/mm2)	Clusters passing filter (%)	pre-phasing	phasing
B1	997	92.70	0.16	0.26
B2	1027	92.37	0.16	0.16
B3	993	93.56	0.16	0.15
B4	1343	88.89	0.21	0.16
B5	1261	90.06	0.38	0.17
B6	1315	90.05	0.63	0.17
B7	899	94.51	0.44	0.16
B8	1150	87.12	0.17	0.19
B9	1248	91.27	0.36	0.17
B10	1118	90.86	0.33	0.17
B11	1797	76.77	0.26	0.18
B13	1477	85.81	0.23	0.19
B14	1240	91.20	0.19	0.17
B15	1755	79.50	0.13	0.16
B16	1052	91.54	0.26	0.18
B17	1137	94.85	0.45	0.22
B18	1138	95.17	0.55	0.14
B19	819	97.02	0.25	0.17
Average	1209.22	90.18	0.29	0.17


Cluster density (K/mm2)
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
B1 B2 B3 B4 B5 B6 B7 B8 B9 B10 B11 B13 B14 B15 B16 B17 B18 B19


Clusters passing filter (%)
120
100
80
60
40
20
0
B1 B2 B3 B4 B5 B6 B7 B8 B9 B10 B11 B13 B14 B15 B16 B17 B18 B19


pre-phasing
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
B1 B2 B3 B4 B5 B6 B7 B8 B9 B10 B11 B13 B14 B15 B16 B17 B18 B19


phasing
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
B1 B2 B3 B4 B5 B6 B7 B8 B9 B10 B11 B13 B14 B15 B16 B17 B18 B19

ภาคผนวกที่ 4 แสดงค่าของ ACR ของตำแหน่ง autosomal STRs ของแต่ละรอบของการปฏิบัติการ

STR loci	ACR B1	ACR B2	ACR B3	ACR B4	ACR B5	ACR B6	ACR B7	ACR B8	ACR B9	ACR B10	ACR B11	ACR B13	ACR B14	ACR B15	ACR B16	ACR B17	ACR B18	ACR B19
D22S1045	0.22	0.25	0.27	0.16	0.21	0.00	0.27	0.25	0.43	0.16	0.40	0.10	0.12	0.00	0.00	0.21	0.35	0.13
PentaE	0.77	0.84	0.82	0.65	0.76	0.62	0.67	0.68	0.66	0.62	0.60	0.74	0.65	0.69	0.61	0.64	0.63	0.84
FGA	0.82	0.84	0.84	0.77	0.75	0.68	0.73	0.83	0.79	0.79	0.77	0.76	0.75	0.71	0.77	0.71	0.65	0.68
D19S433	0.78	0.85	0.82	0.77	0.73	0.70	0.77	0.81	0.80	0.80	0.67	0.76	0.79	0.68	0.81	0.69	0.73	0.77
PentaD	0.86	0.91	0.88	0.78	0.69	0.68	0.76	0.86	0.72	0.76	0.79	0.75	0.77	0.76	0.73	0.64	0.60	0.78
D6S1043	0.79	0.85	0.82	0.79	0.76	0.73	0.79	0.81	0.75	0.78	0.76	0.74	0.78	0.73	0.73	0.67	0.75	0.74
D18S51	0.80	0.86	0.84	0.80	0.68	0.71	0.79	0.82	0.79	0.80	0.78	0.77	0.74	0.79	0.79	0.66	0.79	0.68
D1S1656	0.83	0.85	0.79	0.81	0.78	0.73	0.82	0.83	0.79	0.82	0.80	0.79	0.79	0.77	0.78	0.62	0.64	0.70
vWA	0.83	0.78	0.80	0.79	0.79	0.78	0.80	0.83	0.78	0.78	0.81	0.82	0.83	0.78	0.76	0.71	0.77	0.77
D12S391	0.84	0.88	0.90	0.79	0.78	0.79	0.81	0.82	0.80	0.84	0.73	0.80	0.80	0.73	0.76	0.67	0.61	0.81
D21S11	0.90	0.93	0.93	0.84	0.75	0.71	0.76	0.90	0.82	0.79	0.83	0.83	0.84	0.82	0.79	0.50	0.57	0.82
D5S818	0.80	0.85	0.81	0.86	0.86	0.80	0.85	0.85	0.86	0.83	0.80	0.81	0.87	0.78	0.77	0.79	0.78	0.81
D10S1248	0.75	0.86	0.85	0.82	0.83	0.83	0.86	0.83	0.84	0.83	0.78	0.82	0.81	0.80	0.83	0.82	0.84	0.87
D16S539	0.86	0.85	0.83	0.84	0.84	0.83	0.82	0.84	0.85	0.86	0.82	0.82	0.83	0.79	0.82	0.80	0.82	0.80
D4S2408	0.82	0.87	0.88	0.82	0.77	0.84	0.83	0.84	0.84	0.85	0.87	0.83	0.84	0.86	0.86	0.84	0.86	0.80
D2S1338	0.83	0.86	0.87	0.88	0.86	0.83	0.86	0.85	0.88	0.79	0.79	0.79	0.87	0.80	0.84	0.78	0.81	0.90
D17S1301	0.84	0.85	0.87	0.83	0.84	0.83	0.84	0.82	0.85	0.87	0.85	0.85	0.87	0.83	0.88	0.81	0.81	0.85
D20S482	0.73	0.90	0.89	0.85	0.84	0.81	0.88	0.87	0.86	0.86	0.88	0.86	0.87	0.85	0.85	0.72	0.85	0.86
D7S820	0.88	0.87	0.90	0.87	0.86	0.86	0.86	0.88	0.89	0.86	0.86	0.85	0.86	0.84	0.86	0.86	0.86	0.86
D8S1179	0.87	0.90	0.89	0.86	0.90	0.86	0.87	0.89	0.88	0.88	0.87	0.87	0.87	0.86	0.81	0.80	0.84	0.83
D13S317	0.87	0.91	0.91	0.88	0.88	0.88	0.91	0.90	0.89	0.91	0.85	0.85	0.89	0.80	0.86	0.76	0.85	0.86
D3S1358	0.88	0.91	0.91	0.88	0.87	0.87	0.85	0.89	0.89	0.90	0.87	0.87	0.90	0.85	0.85	0.84	0.81	0.88
D9S1122	0.92	0.90	0.90	0.89	0.90	0.86	0.90	0.89	0.90	0.88	0.89	0.92	0.89	0.89	0.82	0.81	0.88	0.87
D2S441	0.85	0.93	0.94	0.91	0.91	0.90	0.92	0.92	0.92	0.91	0.91	0.90	0.90	0.88	0.82	0.83	0.89	0.91
CSF1PO	0.88	0.92	0.91	0.93	0.92	0.92	0.95	0.92	0.93	0.92	0.89	0.93	0.91	0.91	0.89	0.90	0.91	0.93
TH01	0.89	0.93	0.93	0.94	0.93	0.94	0.91	0.95	0.93	0.92	0.91	0.94	0.94	0.92	0.92	0.90	0.92	0.93
TPOX	0.94	0.95	0.92	0.92	0.92	0.95	0.95	0.95	0.94	0.90	0.91	0.95	0.96	0.93	0.89	0.95	0.95	0.94

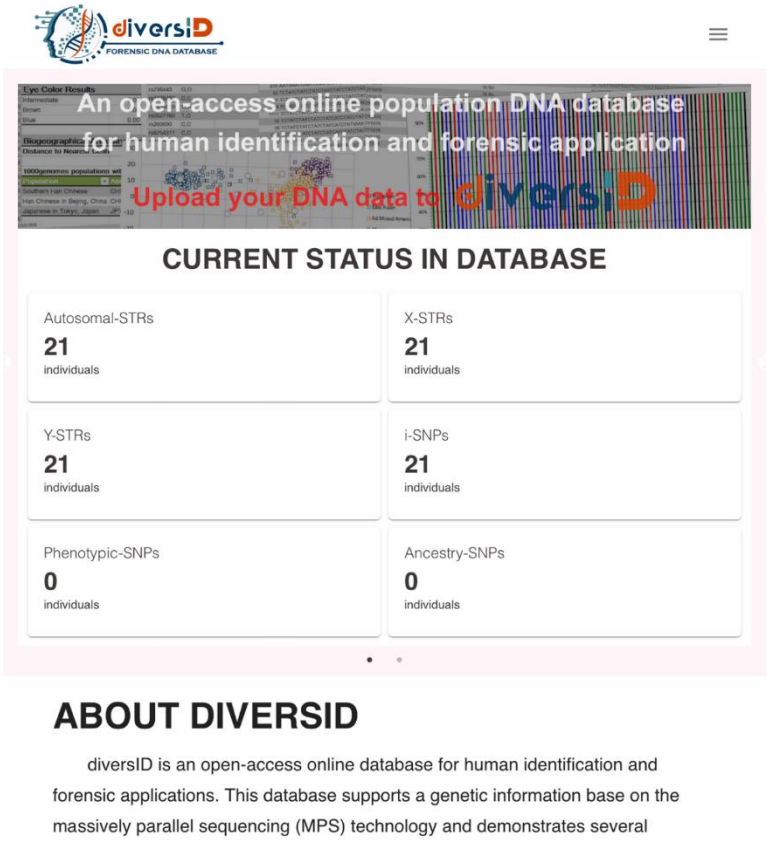
ภาคผนวกที่ 5 แสดงค่าของ ACR ของตำแหน่ง iSNPs ของแต่ละรอบของการปฏิบัติการ

SNPs	B1 ACI	B2 ACI	B3 ACI	B4 ACI	B5 ACI	B6 ACI	B7 ACI	B8 ACI	B9 ACI	B10 AC	B11 AC	B13 AC	B14 AC	B15 AC	B16 AC	B17 AC	B18 AC	B19 AC
rs1736442	0.00	0.91	0.96	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.78	0.00	0.93	0.90	0.83
rs6955448	0.40	0.43	0.42	0.28	0.28	0.28	0.34	0.35	0.34	0.30	0.30	0.32	0.32	0.29	0.27	0.23	0.27	0.23
rs826472	0.87	0.86	0.85	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.89	0.00	0.74	0.92	0.79	0.80	0.89
rs1493232	0.78	0.73	0.73	0.51	0.00	0.00	0.71	0.00	0.82	0.00	0.54	0.00	0.00	0.59	0.39	0.66	0.94	0.00
rs338882	0.57	0.45	0.42	0.49	0.46	0.49	0.51	0.46	0.48	0.50	0.46	0.53	0.44	0.51	0.54	0.46	0.43	0.50
rs2111980	0.67	0.66	0.67	0.43	0.42	0.42	0.49	0.48	0.44	0.45	0.52	0.43	0.45	0.43	0.53	0.41	0.42	0.42
rs1294331	0.84	0.85	0.81	0.55	0.62	0.59	0.70	0.69	0.60	0.64	0.61	0.56	0.66	0.61	0.57	0.00	0.00	0.00
rs7041158	0.85	0.87	0.83	0.00	0.76	0.90	0.00	0.90	0.76	0.00	0.73	0.77	0.91	0.79	0.84	0.00	0.78	0.00
rs876724	0.89	0.87	0.86	0.62	0.56	0.62	0.69	0.73	0.64	0.68	0.69	0.67	0.63	0.55	0.63	0.51	0.62	0.60
rs4530059	0.79	0.80	0.78	0.59	0.53	0.55	0.49	0.81	0.76	0.67	0.55	0.73	0.65	0.75	0.72	0.84	0.95	0.69
rs2920816	0.89	0.81	0.88	0.00	0.97	0.84	0.00	0.92	0.80	0.79	0.95	0.81	0.97	0.76	0.87	0.85	0.90	0.00
rs2342747	0.81	0.81	0.81	0.67	0.68	0.61	0.72	0.68	0.64	0.72	0.66	0.72	0.74	0.64	0.67	0.86	0.69	0.89
rs993934	0.91	0.91	0.89	0.70	0.72	0.66	0.71	0.77	0.74	0.71	0.75	0.68	0.74	0.70	0.68	0.63	0.67	0.64
rs8037429	0.92	0.93	0.93	0.71	0.70	0.66	0.76	0.74	0.72	0.76	0.73	0.70	0.68	0.57	0.62	0.65	0.65	0.61
rs1357617	0.80	0.83	0.71	0.91	0.88	0.00	0.90	0.77	0.86	0.00	0.82	0.87	0.93	0.81	0.66	0.79	0.89	0.98
rs907100	0.81	0.82	0.80	0.81	0.72	0.78	0.79	0.75	0.74	0.73	0.73	0.76	0.78	0.76	0.72	0.65	0.71	0.73
rs1413212	0.88	0.83	0.91	0.77	0.74	0.76	0.80	0.78	0.72	0.73	0.79	0.78	0.75	0.79	0.61	0.71	0.71	0.69
rs2399332	0.94	0.93	0.95	0.76	0.77	0.71	0.83	0.84	0.76	0.76	0.78	0.76	0.74	0.69	0.67	0.65	0.67	0.66
rs576261	0.90	0.87	0.85	0.78	0.76	0.77	0.84	0.83	0.82	0.79	0.83	0.80	0.77	0.80	0.82	0.77	0.84	0.75
rs2269355	0.89	0.88	0.83	0.89	0.81	0.83	0.00	0.90	0.85	0.97	0.80	0.84	0.79	0.82	0.00	0.89	0.90	0.92
rs717302	0.84	0.73	0.82	0.79	0.64	0.82	0.81	0.82	0.88	0.84	0.84	0.91	0.78	0.91	0.70	0.89	0.82	0.79
rs1028528	0.83	0.78	0.89	0.82	0.77	0.85	0.83	0.78	0.79	0.85	0.80	0.87	0.74	0.85	0.81	0.90	0.79	0.81
rs1355366	0.83	0.89	0.89	0.87	0.89	0.85	0.94	0.83	0.91	0.92	0.91	0.84	0.90	0.82	0.84	0.83	0.00	0.89
rs10092491	0.86	0.85	0.84	0.81	0.83	0.82	0.88	0.78	0.81	0.80	0.82	0.76	0.87	0.81	0.81	0.79	0.84	0.83
rs1454361	0.78	0.77	0.88	0.80	0.71	0.86	0.83	0.80	0.93	0.79	0.89	0.91	0.72	0.92	0.89	0.92	0.85	0.87
rs10495407	0.93	0.85	0.90	0.82	0.86	0.82	0.86	0.81	0.83	0.82	0.84	0.86	0.84	0.83	0.78	0.78	0.81	0.80
rs2056277	0.77	0.84	0.73	0.88	0.77	0.79	0.87	0.96	0.88	0.83	0.91	0.74	0.88	0.82	0.85	0.90	0.87	0.83
rs740598	0.88	0.89	0.87	0.81	0.77	0.84	0.84	0.82	0.83	0.89	0.93	0.82	0.83	0.79	0.81	0.83	0.88	0.77
rs1024116	0.87	0.88	0.92	0.80	0.82	0.79	0.80	0.92	0.87	0.83	0.92	0.90	0.91	0.70	0.71	0.70	0.88	0.70
rs1015250	0.85	0.89	0.85	0.81	0.73	0.93	0.77	0.82	0.90	0.81	0.93	0.85	0.88	0.85	0.81	0.80	0.88	0.89
rs873196	0.90	0.91	0.93	0.88	0.82	0.84	0.81	0.84	0.84	0.83	0.84	0.86	0.82	0.82	0.49	0.82	0.84	0.83
rs727811	0.84	0.83	0.81	0.84	0.83	0.81	0.88	0.85	0.90	0.86	0.85	0.87	0.86	0.81	0.80	0.85	0.88	0.87
rs4606077	0.83	0.84	0.83	0.85	0.90	0.86	0.87	0.89	0.84	0.87	0.82	0.90	0.86	0.84	0.77	0.78	0.84	0.85
rs1031825	0.86	0.88	0.87	0.80	0.82	0.87	0.87	0.86	0.88	0.92	0.85	0.90	0.88	0.81	0.81	0.81	0.82	0.84
rs763869	0.90	0.90	0.87	0.91	0.82	0.88	0.85	0.90	0.81	0.84	0.89	0.88	0.83	0.84	0.85	0.77	0.82	0.88
rs12997453	0.90	0.90	0.89	0.71	0.88	0.86	0.86	0.89	0.91	0.87	0.93	0.79	0.83	0.81	0.81	0.86	0.86	0.87
rs13218440	0.90	0.84	0.88	0.84	0.88	0.85	0.89	0.85	0.85	0.92	0.85	0.85	0.85	0.85	0.83	0.84	0.87	0.84
rs2076848	0.88	0.90	0.84	0.89	0.93	0.86	0.85	0.86	0.83	0.87	0.81	0.84	0.84	0.73	0.81	0.86	0.90	0.90
rs2831700	0.92	0.90	0.93	0.86	0.91	0.86	0.88	0.88	0.89	0.85	0.83	0.84	0.86	0.82	0.85	0.82	0.86	0.84
rs10488710	0.90	0.84	0.88	0.80	0.80	0.81	0.85	0.93	0.95	0.93	0.83	0.91	0.94	0.80	0.82	0.91	0.81	0.87
rs354439	0.86	0.89	0.86	0.88	0.84	0.90	0.89	0.92	0.87	0.86	0.90	0.89	0.90	0.88	0.84	0.85	0.80	0.86
rs1523537	0.91	0.90	0.91	0.89	0.83	0.90	0.84	0.83	0.87	0.84	0.82	0.90	0.81	0.85	0.82	0.91	0.91	0.90
rs1336071	0.86	0.90	0.89	0.87	0.87	0.89	0.90	0.88	0.87	0.85	0.87	0.85	0.84	0.86	0.88	0.84	0.89	0.90
rs251934	0.91	0.86	0.94	0.78	0.96	0.91	0.73	0.95	0.94	0.91	0.81	0.81	0.84	0.88	0.76	0.85	0.91	0.91
rs321198	0.88	0.86	0.89	0.92	0.91	0.82	0.88	0.88	0.88	0.85	0.92	0.88	0.86	0.92	0.83	0.88	0.86	0.88
rs891700	0.91	0.88	0.90	0.86	0.83	0.84	0.86	0.89	0.88	0.83	0.88	0.91	0.90	0.92	0.92	0.88	0.92	0.89
rs2107612	0.90	0.97	0.94	0.90	0.82	0.88	0.83	0.89	0.90	0.87	0.84	0.90	0.83	0.89	0.90	0.83	0.91	0.88
rs729172	0.87	0.94	0.86	0.86	0.79	0.82	0.87	0.85	0.93	0.91	0.88	0.85	0.84	0.91	0.91	0.96	0.95	0.90
rs2040411	0.95	0.92	0.94	0.91	0.87	0.77	0.93	0.92	0.91	0.89	0.85	0.90	0.86	0.66	0.87	0.81	0.81	0.89
rs1528460	0.90	0.92	0.93	0.89	0.88	0.87	0.91	0.85	0.85	0.89	0.86	0.86	0.91	0.85	0.83	0.89	0.87	0.88
rs2046361	0.93	0.94	0.93	0.90	0.87	0.89	0.88	0.91	0.87	0.90	0.86	0.87	0.88	0.84	0.90	0.79	0.88	0.89
rs13182883	0.93	0.93	0.90	0.89	0.89	0.86	0.92	0.89	0.85	0.82	0.88	0.90	0.90	0.87	0.84	0.83	0.92	0.89
rs901398	0.92	0.84	0.83	0.89	0.86	0.84	0.92	0.88	0.90	0.88	0.96	0.91	0.86	0.93	0.80	0.91	0.93	0.88
rs719366	0.79	0.87	0.91	0.90	0.91	0.90	0.91	0.94	0.88	0.92	0.88	0.89	0.94	0.90	0.88	0.85	0.88	0.85
rs8078417	0.90	0.93	0.92	0.90	0.88	0.91	0.90	0.90	0.90	0.89	0.90	0.88	0.87	0.85	0.82	0.85	0.86	0.84
rs1360288	0.89	0.88	0.88	0.87	0.90	0.86	0.87	0.93	0.87	0.89	0.89	0.90	0.90	0.91	0.82	0.91	0.93	0.88
rs4364205	0.95	0.91	0.93	0.89	0.87	0.84	0.90	0.92	0.92	0.85	0.92	0.93	0.90	0.89	0.81	0.83	0.85	0.85
rs740910	0.90	0.88	0.83	0.85	0.92	0.89	0.85	0.91	0.86	0.88	0.80	0.93	0.95	0.94	0.89	0.93	0.96	0.92
rs10773760	0.90	0.88	0.89	0.89	0.85	0.89	0.92	0.88	0.93	0.93	0.94	0.91	0.85	0.95	0.89	0.87	0.90	0.85
rs964681	0.87	0.87	0.92	0.90	0.90	0.88	0.82	0.91	0.92	0.88	0.91	0.91	0.89	0.92	0.94	0.90	0.91	0.93
rs6811238	0.91	0.90	0.90	0.90	0.87	0.89	0.89	0.85	0.92	0.91	0.91	0.90	0.92	0.89	0.82	0.89	0.89	0.88
rs2830795	0.88	0.88	0.91	0.89	0.89	0.90	0.90	0.89	0.91	0.92	0.89	0.92	0.90	0.92	0.91	0.88	0.88	0.90
rs1886510	0.90	0.93	0.94	0.91	0.93	0.91	0.88	0.91	0.90	0.88	0.89	0.86	0.90	0.89	0.96	0.89	0.89	0.87
rs279844	0.92	0.87	0.87	0.91	0.91	0.89	0.81	0.91	0.94	0.89	0.92	0.92	0.94	0.93	0.78	0.90	0.91	0.88
rs560681	0.94	0.92	0.93	0.90	0.87	0.88	0.87	0.94	0.89	0.89	0.90	0.94	0.87	0.90	0.87	0.87	0.90	0.89
rs1498553	0.89	0.88	0.88	0.92	0.92	0.91	0.90	0.92	0.91	0.88	0.90	0.91	0.93	0.84	0.78	0.88	0.90	0.88
rs1979255	0.90	0.86	0.89	0.87	0.88	0.90	0.85	0.90	0.90	0.91	0.93	0.93	0.91	0.87	0.84	0.94	0.94	0.90
rs722098	0.95	0.95	0.95	0.90	0.87	0.89	0.88	0.92	0.92	0.89	0.94	0.90	0.93	0.92	0.92	0.87	0.86	0.83
rs445251	0.88	0.86	0.83	0.90	0.92	0.88	0.93	0.92	0.92	0.94	0.93	0.91	0.94	0.77	0.89	0.93	0.91	0.86
rs917118	0.90	0.85	0.91	0.90	0.86	0.91	0.87	0.91	0.93	0.91	0.90	0.94	0.90	0.92	0.83	0.94	0.92	0.90
rs10776839	0.86	0.91	0.87	0.92	0.90	0.94	0.87	0.94	0.92	0.91	0.91	0.93	0.90	0.91	0.92	0.92	0.88	0.92
rs1109037	0.92	0.92	0.96	0.93	0.86	0.87	0.89	0.93	0.84	0.91	0.93	0.88	0.92	0.82	0.88	0.84	0.94	0.95
rs159606	0.89	0.91	0.94	0.91	0.91	0.93	0.94	0.91	0.91	0.85	0.85	0.91	0.93	0.95	0.84	0.90	0.91	0.90
rs722290	0.91	0.91	0.93	0.92	0.85	0.86	0.87	0.93	0.92	0.90	0.93	0.92	0.92	0.89	0.91	0.93	0.93	0.92
rs733164	0.94	0.94	0.91	0.93	0.91	0.92	0.89	0.91	0.87	0.91	0.90	0.91	0.89	0.93	0.88	0.89	0.95	0.89
rs214955	0.92	0.91	0.95	0.90	0.92	0.91	0.89	0.91	0.92	0.85	0.92	0.95	0.89	0.90	0.89	0.91	0.91	0.91
rs221956	0.90	0.94	0.95	0.91	0.91	0.92	0.95	0.89	0.92	0.92	0.89	0.92	0.87	0.90	0.92	0.90	0.92	0.85
rs914165	0.92	0.87	0.92	0.94	0.91	0.91	0.90	0.90	0.94	0.89	0.92	0.91	0.91	0.86	0.86	0.94	0.90	0.91
rs735155	0.93	0.93	0.92	0.93	0.92	0.94	0.87	0.91	0.92	0.89	0.89	0.95	0.86	0.94	0.89	0.93	0.96	0.95
rs9951171	0.91	0.93	0.94	0.92	0.93	0.89	0.89	0.94	0.92	0.92	0.90	0.94	0.92	0.93	0.92	0.92	0.93	0.88
rs1490413	0.87	0.91	0.95	0.92	0.89	0.95	0.88	0.91	0.95	0.92	0.93	0.93	0.91	0.96	0.86	0.94	0.95	0.91
rs6444724	0.92	0.92	0.92	0.92	0.91	0.84	0.96	0.93	0.94	0.93	0.94	0.96	0.90	0.89	0.88	0.91	0.94	0.90
rs987640	0.94	0.94	0.92	0.92	0.89	0.83	0.92	0.92	0.94	0.93	0.95	0.92	0.94	0.81	0.91	0.91	0.93	0.95
rs1821380	0.94	0.92	0.95	0.91	0.90	0.94	0.88	0.95	0.94	0.92	0.94	0.89	0.88	0.86	0.83	0.94	0.93	0.95
rs3780962	0.89	0.88	0.92	0.95	0.91	0.92	0.94	0.94	0.94	0.90	0.92	0.93	0.94	0.86	0.80	0.93	0.92	0.92
rs1005533	0.92	0.92	0.93	0.95	0.95	0.93	0.91	0.95	0.91	0.92	0.90	0.92	0.93	0.89	0.83	0.91	0.93	0.93
rs938283	0.93	0.91	0.95	0.90	0.94	0.95	0.93	0.92	0.93	0.92	0.95	0.93	0.92	0.81	0.77	0.93	0.94	0.94
rs1463729	0.95	0.90	0.95	0.95	0.94	0.94	0.91	0.95	0.95	0.93	0.91	0.94	0.95	0.88	0.89	0.93	0.92	0.91
rs430046	0.93	0.89	0.95	0.93	0.90	0.93	0.95	0.95	0.92	0.93	0.94	0.95	0.97	0.90	0.79	0.91	0.95	0.93
rs1058083	0.94	0.92	0.94	0.95	0.88	0.96	0.93	0.92	0.94	0.94	0.95	0.93	0.93	0.90	0.95	0.96	0.96	0.96
rs1335873	0.93	0.96	0.95	0.96	0.95	0.89	0.94	0.94	0.96	0.94	0.93	0.96	0.94	0.96	0.90	0.94	0.94	0.93
rs9905977	0.94	0.95	0.93	0.94	0.87	0.96	0.95	0.95	0.96	0.93	0.94	0.95	0.95	0.95	0.93	0.95	0.96	0.95
rs737681	0.91	0.96	0.93	0.93	0.86	0.94	0.98	0.96	0.95	0.96	0.93	0.95	0.96	0.87	0.95	0.96	0.95	0.95
rs1382387	0.94	0.97	0.93	0.95	0.95	0.95	0.95	0.97	0.93	0.94	0.92	0.96	0.95	0.75	0.87	0.96	0.92	0.92

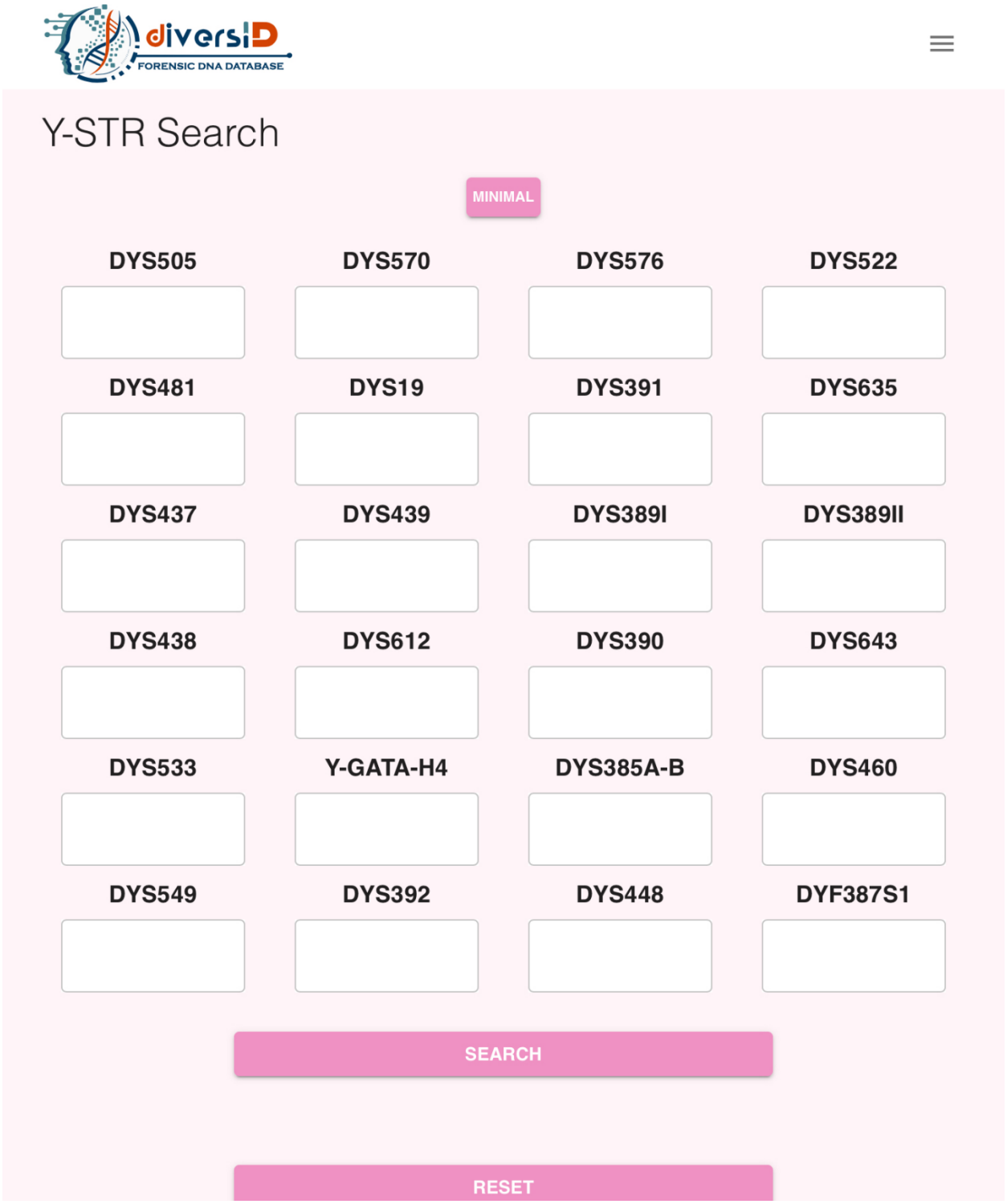
ภาคผนวกที่ 6 แสดงค่าของ SCR ของตำแหน่ง autosomal STRs ของแต่ละรอบของการปฏิบัติการ

STR loci	SCR B1	SCR B2	SCR B3	SCR B4	SCR B5	SCR B6	SCR B7	SCR B8	SCR B9	SCR B10	SCR B11	SCR B13	SCR B14	SCR B15	SCR B16	SCR B17	SCR B18	SCR B19
D22S1045	0.89	0.90	0.90	0.73	0.77	0.74	0.79	0.93	0.90	0.77	0.79	0.86	0.88	0.75	0.94	0.82	0.91	0.82
D12S391	0.82	0.84	0.85	0.86	0.85	0.87	0.84	0.87	0.87	0.79	0.88	0.88	0.88	0.88	0.84	0.81	0.77	0.82
D21S11	0.91	0.93	0.94	0.91	0.87	0.87	0.85	0.91	0.89	0.73	0.90	0.90	0.91	0.92	0.91	0.59	0.52	0.94
FGA	0.83	0.87	0.87	0.87	0.85	0.85	0.87	0.86	0.87	0.77	0.87	0.86	0.86	0.87	0.87	0.85	0.83	0.85
PentaE	0.94	0.97	0.97	0.87	0.82	0.71	0.97	0.97	0.86	0.87	0.90	0.91	0.96	0.55	0.60	0.75	0.77	0.58
D8S1179	0.87	0.88	0.88	0.88	0.87	0.86	0.87	0.88	0.86	0.86	0.87	0.86	0.87	0.87	0.87	0.86	0.87	0.87
D2S1338	0.86	0.89	0.89	0.88	0.86	0.87	0.88	0.88	0.87	0.83	0.89	0.87	0.87	0.89	0.83	0.85	0.86	0.87
D1S1656	0.90	0.90	0.90	0.90	0.89	0.89	0.90	0.89	0.89	0.82	0.91	0.90	0.90	0.91	0.86	0.85	0.87	0.91
D18S51	0.87	0.90	0.89	0.90	0.88	0.89	0.89	0.90	0.90	0.86	0.89	0.89	0.89	0.90	0.88	0.89	0.90	0.89
D17S1301	0.87	0.90	0.90	0.90	0.89	0.89	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.89	0.89	0.89
D3S1358	0.88	0.91	0.93	0.92	0.91	0.90	0.92	0.91	0.91	0.81	0.91	0.91	0.91	0.91	0.92	0.90	0.90	0.91
D19S433	0.90	0.93	0.92	0.88	0.92	0.88	0.92	0.90	0.91	0.89	0.88	0.87	0.90	0.88	0.90	0.96	0.95	0.90
D20S482	0.88	0.92	0.92	0.92	0.91	0.92	0.92	0.91	0.92	0.90	0.92	0.92	0.92	0.93	0.92	0.90	0.91	0.90
D16S539	0.88	0.90	0.92	0.92	0.92	0.91	0.92	0.92	0.92	0.93	0.92	0.91	0.91	0.92	0.91	0.92	0.91	0.91
D10S1248	0.88	0.92	0.92	0.91	0.91	0.92	0.92	0.92	0.91	0.90	0.92	0.92	0.91	0.92	0.91	0.92	0.92	0.92
D6S1043	0.90	0.92	0.92	0.92	0.92	0.91	0.91	0.93	0.92	0.89	0.93	0.92	0.92	0.93	0.92	0.93	0.93	0.93
TH01	0.94	0.94	0.94	0.94	0.93	0.93	0.93	0.94	0.94	0.92	0.93	0.93	0.94	0.93	0.93	0.93	0.94	0.94
vWA	0.95	0.95	0.95	0.92	0.94	0.94	0.93	0.93	0.94	0.96	0.93	0.94	0.93	0.94	0.90	0.94	0.93	0.90
D9S1122	0.93	0.94	0.94	0.95	0.94	0.95	0.95	0.94	0.94	0.95	0.94	0.94	0.94	0.94	0.94	0.96	0.95	0.97
PentaD	0.99	0.99	0.99	1.00	1.00	0.98	1.00	1.00	0.99	0.88	1.00	1.00	1.00	0.99	0.96	0.74	0.67	0.93
D7S820	0.94	0.96	0.96	0.95	0.95	0.96	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95	0.96
CSF1PO	0.97	0.97	0.97	0.97	0.96	0.96	0.94	0.97	0.97	0.94	0.97	0.96	0.96	0.96	0.96	0.97	0.96	0.97
D4S2408	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.95	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.96	0.96	0.96
D2S441	0.94	0.98	0.97	0.97	0.97	0.96	0.97	0.97	0.97	0.95	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97
D13S317	0.93	0.98	0.98	0.97	0.97	0.97	0.97	0.98	0.97	0.94	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.98	0.97	0.98
TPOX	0.97	0.98	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.98	0.98	0.92	0.98	0.97	0.98	0.90	0.97	0.97	0.98	0.94
D5S818	0.95	0.96	0.97	0.97	0.99	0.98	0.99	0.98	0.99	1.00	0.99	0.99	0.99	0.99	0.91	0.96	0.96	0.98

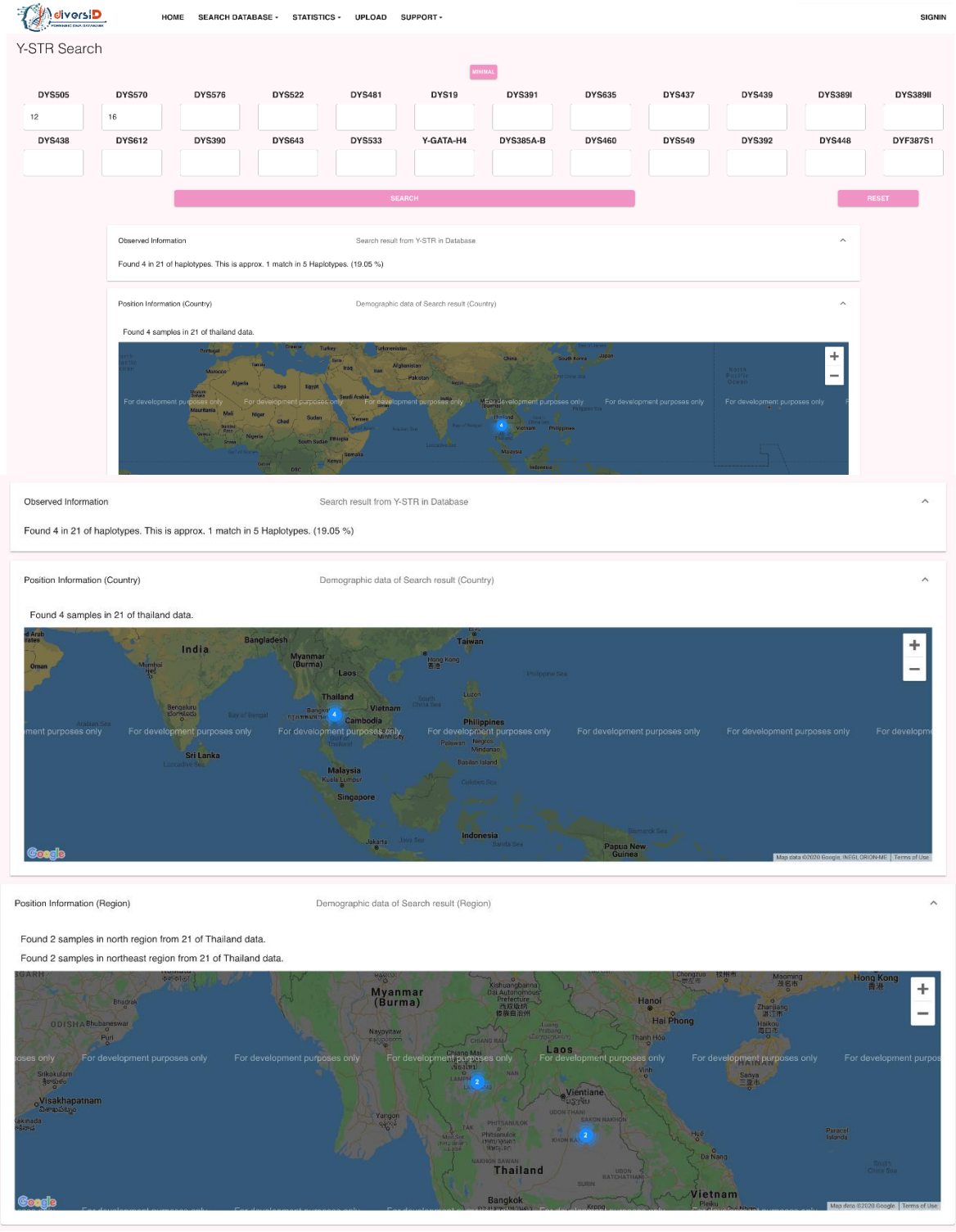
ภาคผนวกที่ 7 หน้าแรกของ www.diversid.info



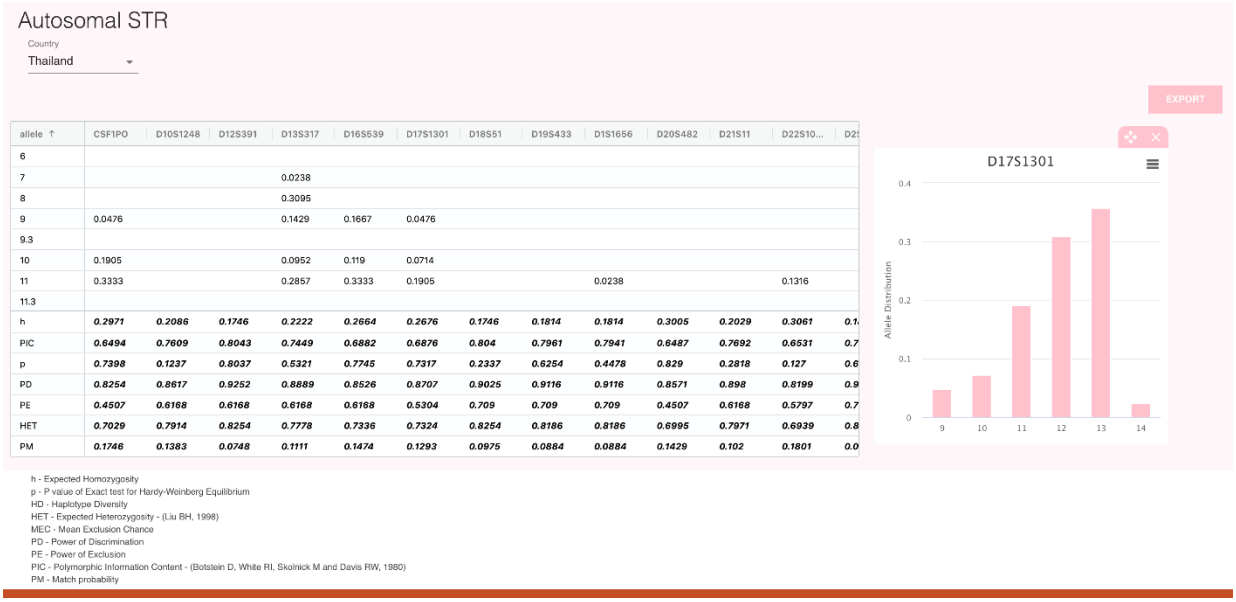
ภาคผนวกที่ 8 แสดงหน้าจาการค้นหาในเมนู search database ในตำแหน่ง 24 loci Y-chromosomal STRs



ภาคผนวกที่ 9 แสดงผลการตรวจในเมนู search database



ภาคผนวกที่ 10 แสดงค่าทางสถิติของตำแหน่ง autosomal STR ในฐานข้อมูล diversID



Autosomal STR

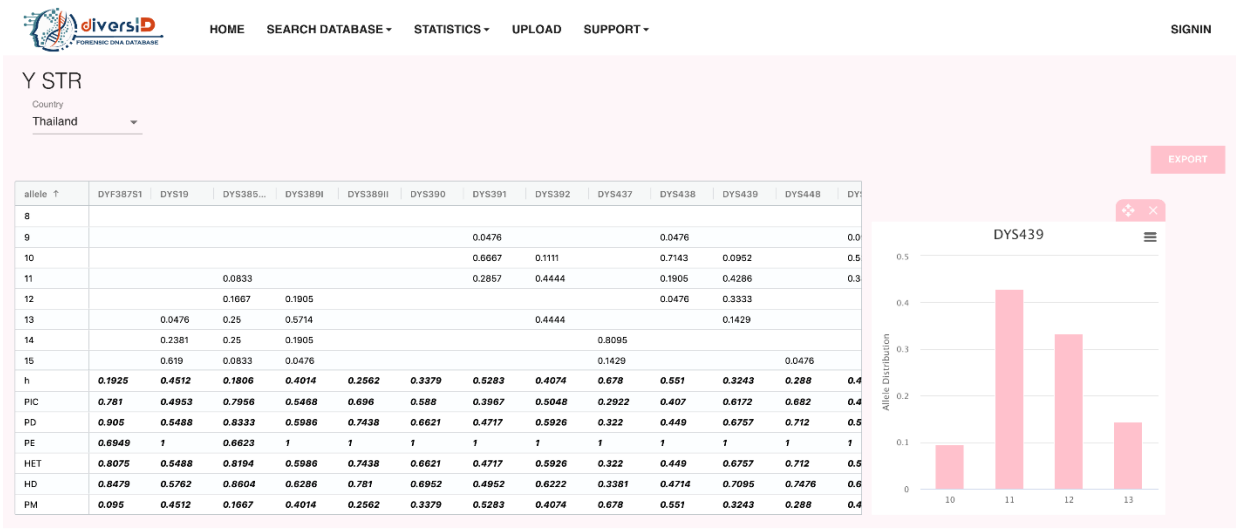
Country: Thailand

EXPORT

allele ↑	CSF1PO	D10S1248	D12S391	D13S317	D16S539	D17S1301	D18S51	D19S433	D1S1656	D20S482	D21S11	D22S10...	D2
6													
7				0.0238									
8				0.3095									
9	0.0476			0.1429	0.1667	0.0476							
9.3													
10	0.1905			0.0952	0.119	0.0714							
11	0.3333			0.2857	0.3333	0.1905			0.0238			0.1316	
11.3													
h	*0.2971*	*0.2086*	*0.1746*	*0.2222*	*0.2664*	*0.2676*	*0.1746*	*0.1814*	*0.1814*	*0.3005*	*0.2029*	*0.3061*	*0.1*
PIC	*0.6494*	*0.7609*	*0.8043*	*0.7449*	*0.6882*	*0.6876*	*0.804*	*0.7961*	*0.7941*	*0.6487*	*0.7692*	*0.6531*	*0.7*
p	*0.7398*	*0.1237*	*0.8037*	*0.5321*	*0.7745*	*0.7317*	*0.2337*	*0.6254*	*0.4478*	*0.829*	*0.2818*	*0.127*	*0.6*
PD	*0.8254*	*0.8617*	*0.9252*	*0.8889*	*0.8526*	*0.8707*	*0.9025*	*0.9116*	*0.9116*	*0.8571*	*0.898*	*0.8199*	*0.9*
PE	*0.4507*	*0.6168*	*0.6168*	*0.6168*	*0.6168*	*0.5304*	*0.709*	*0.709*	*0.709*	*0.4507*	*0.6168*	*0.5797*	*0.7*
HET	*0.7029*	*0.7914*	*0.8254*	*0.7778*	*0.7336*	*0.7324*	*0.8254*	*0.8186*	*0.8186*	*0.6995*	*0.7971*	*0.6939*	*0.8*
PM	*0.1746*	*0.1383*	*0.0748*	*0.1111*	*0.1474*	*0.1293*	*0.0975*	*0.0884*	*0.0884*	*0.1429*	*0.102*	*0.1801*	*0.0*

h - Expected Homozygosity
p - P value of Exact test for Hardy-Weinberg Equilibrium
HD - Haplotype Diversity
HET - Expected Heterozygosity - (Liu BH, 1998)
MEC - Mean Exclusion Chance
PD - Power of Discrimination
PE - Power of Exclusion
PIC - Polymorphic Information Content - (Botstein D, White RI, Skolnick M and Davis RW, 1980)
PM - Match probability

ภาคผนวกที่ 11 แสดงค่าทางสถิติของตำแหน่ง Y-STR ในฐานข้อมูล diversID



diversID FORENSIC DNA DATABASE

HOME SEARCH DATABASE STATISTICS UPLOAD SUPPORT SIGNIN

Y STR

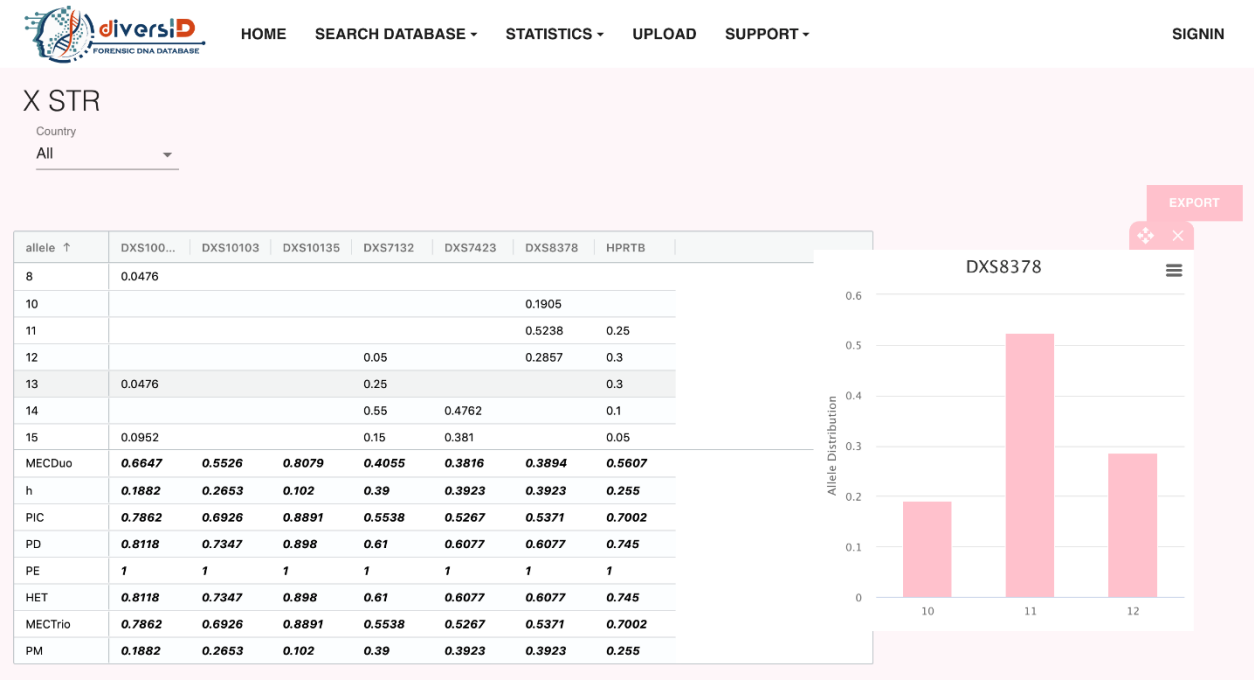
Country: Thailand

EXPORT

allele ↑	DYF387S1	DYS19	DYS385...	DYS389I	DYS389II	DYS390	DYS391	DYS392	DYS437	DYS438	DYS439	DYS448	DY
8													
9							0.0476			0.0476			0.0
10							0.6667	0.1111		0.7143	0.0952		0.5
11			0.0833				0.2857	0.4444		0.1905	0.4286		0.3
12			0.1667	0.1905						0.0476	0.3333		
13		0.0476	0.25	0.5714				0.4444			0.1429		
14		0.2381	0.25	0.1905					0.8095				
15		0.619	0.0833	0.0476					0.1429			0.0476	
h	*0.1925*	*0.4512*	*0.1806*	*0.4014*	*0.2562*	*0.3379*	*0.5283*	*0.4074*	*0.678*	*0.551*	*0.3243*	*0.288*	*0.4*
PIC	*0.781*	*0.4953*	*0.7956*	*0.5468*	*0.696*	*0.588*	*0.3967*	*0.5048*	*0.2922*	*0.407*	*0.6172*	*0.682*	*0.4*
PD	*0.905*	*0.5488*	*0.8333*	*0.5986*	*0.7438*	*0.6621*	*0.4717*	*0.5926*	*0.322*	*0.449*	*0.6757*	*0.712*	*0.5*
PE	*0.6949*	*1*	*0.6623*	*1*	*1*	*1*	*1*	*1*	*1*	*1*	*1*	*1*	*1*
HET	*0.8075*	*0.5488*	*0.8194*	*0.5986*	*0.7438*	*0.6621*	*0.4717*	*0.5926*	*0.322*	*0.449*	*0.6757*	*0.712*	*0.5*
HD	*0.8479*	*0.5762*	*0.8604*	*0.6286*	*0.781*	*0.6952*	*0.4952*	*0.6222*	*0.3381*	*0.4714*	*0.7095*	*0.7476*	*0.6*
PM	*0.095*	*0.4512*	*0.1667*	*0.4014*	*0.2562*	*0.3379*	*0.5283*	*0.4074*	*0.678*	*0.551*	*0.3243*	*0.288*	*0.4*

h - Expected Homozygosity
p - P value of Exact test for Hardy-Weinberg Equilibrium
HD - Haplotype Diversity
HET - Expected Heterozygosity - (Liu BH, 1998)
MEC - Mean Exclusion Chance
PD - Power of Discrimination
PE - Power of Exclusion
PIC - Polymorphic Information Content - (Botstein D, White RI, Skolnick M and Davis RW, 1980)
PM - Match probability

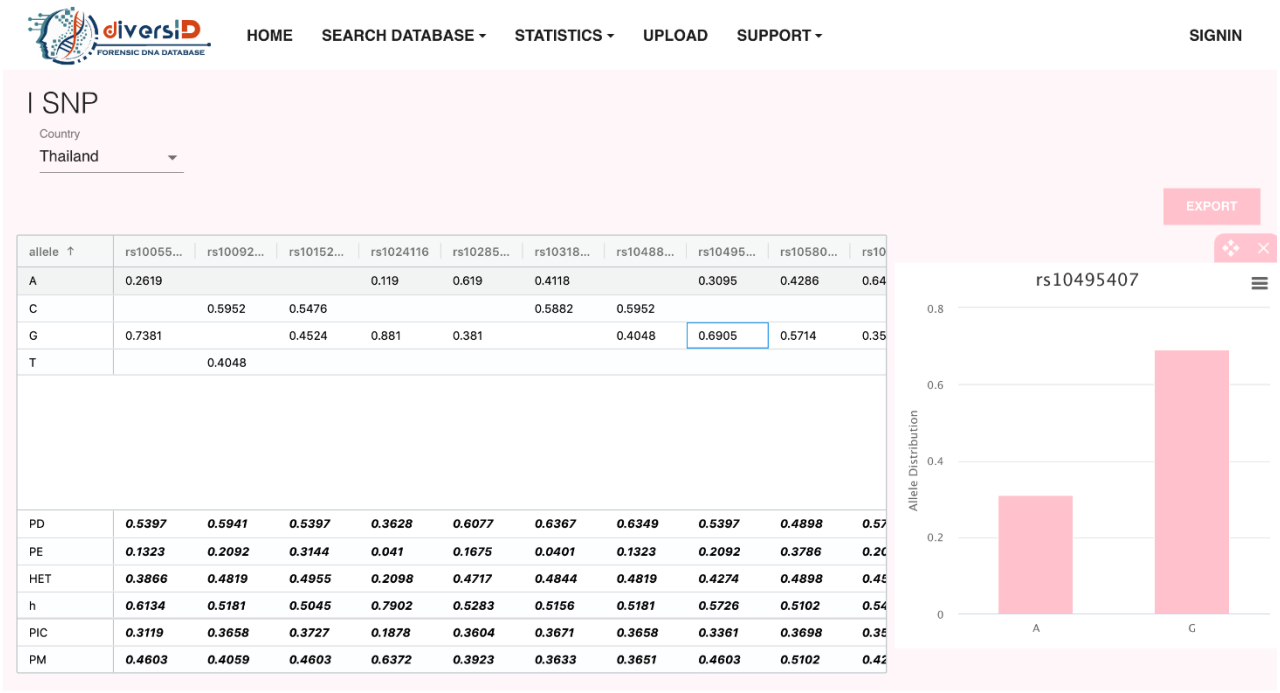
ภาคผนวกที่ 12 แสดงค่าทางสถิติของตำแหน่ง X-STR ในฐานข้อมูล diversID



allele ↑	DXS100...	DXS10103	DXS10135	DXS7132	DXS7423	DXS8378	HPRTB
8	0.0476						
10						0.1905	
11						0.5238	0.25
12				0.05		0.2857	0.3
13	0.0476			0.25			0.3
14				0.55	0.4762		0.1
15	0.0952			0.15	0.381		0.05
MECDuo	***0.6647***	***0.5526***	***0.8079***	***0.4055***	***0.3816***	***0.3894***	***0.5607***
h	***0.1882***	***0.2653***	***0.102***	***0.39***	***0.3923***	***0.3923***	***0.255***
PIC	***0.7862***	***0.6926***	***0.8891***	***0.5538***	***0.5267***	***0.5371***	***0.7002***
PD	***0.8118***	***0.7347***	***0.898***	***0.61***	***0.6077***	***0.6077***	***0.745***
PE	***1***	***1***	***1***	***1***	***1***	***1***	***1***
HET	***0.8118***	***0.7347***	***0.898***	***0.61***	***0.6077***	***0.6077***	***0.745***
MECTrio	***0.7862***	***0.6926***	***0.8891***	***0.5538***	***0.5267***	***0.5371***	***0.7002***
PM	***0.1882***	***0.2653***	***0.102***	***0.39***	***0.3923***	***0.3923***	***0.255***

h - Expected Homozygosity
p - P value of Exact test for Hardy-Weinberg Equilibrium
HD - Haplotype Diversity
HET - Expected Heterozygosity - (Liu BH, 1998)
MEC - Mean Exclusion Chance
PD - Power of Discrimination
PE - Power of Exclusion
PIC - Polymorphic Information Content - (Botstein D, White RI, Skolnick M and Davis RW, 1980)
PM - Match probability

ภาคผนวกที่ 13 แสดงค่าทางสถิติของตำแหน่ง i-SNP ในฐานข้อมูล diversID



allele ↑	rs10055...	rs10092...	rs10152...	rs1024116	rs10285...	rs10318...	rs10488...	rs10495...	rs10580...	rs10
A	0.2619			0.119	0.619	0.4118		0.3095	0.4286	0.64
C		0.5952	0.5476			0.5882	0.5952			
G	0.7381		0.4524	0.881	0.381		0.4048	0.6905	0.5714	0.35
T		0.4048								
PD	***0.5397***	***0.5941***	***0.5397***	***0.3628***	***0.6077***	***0.6367***	***0.6349***	***0.5397***	***0.4898***	***0.57***
PE	***0.1323***	***0.2092***	***0.3144***	***0.041***	***0.1675***	***0.0401***	***0.1323***	***0.2092***	***0.3786***	***0.20***
HET	***0.3866***	***0.4819***	***0.4955***	***0.2098***	***0.4717***	***0.4844***	***0.4819***	***0.4274***	***0.4898***	***0.45***
h	***0.6134***	***0.5181***	***0.5045***	***0.7902***	***0.5283***	***0.5156***	***0.5181***	***0.5726***	***0.5102***	***0.54***
PIC	***0.3119***	***0.3658***	***0.3727***	***0.1878***	***0.3604***	***0.3671***	***0.3658***	***0.3361***	***0.3698***	***0.35***
PM	***0.4603***	***0.4059***	***0.4603***	***0.6372***	***0.3923***	***0.3633***	***0.3651***	***0.4603***	***0.5102***	***0.42***

h - Expected Homozygosity
p - P value of Exact test for Hardy-Weinberg Equilibrium
HD - Haplotype Diversity
HET - Expected Heterozygosity - (Liu BH, 1998)
MEC - Mean Exclusion Chance
PD - Power of Discrimination
PE - Power of Exclusion
PIC - Polymorphic Information Content - (Botstein D, White RI, Skolnick M and Davis RW, 1980)
PM - Match probability

ประวัตินักวิจัย และคณะฯ พร้อมหน่วยงานต้นสังกัด

ประวัตินักวิจัย

ชื่อหัวหน้าโครงการ (ภาษาไทย) กรเกียรติ วงศ์ไพศาลสิน

(ภาษาอังกฤษ) KORNKIAT VONGPAISARNSIN, MD.

ตำแหน่งทางวิชาการ รองศาสตราจารย์ นายแพทย์

ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 022564269, 0869071616

E-mail kornkiat.v@chula.ac.th

ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ (ระบุแหล่งพิมพ์และปีที่พิมพ์)

1. **Kornkiat Vongpaisarnsin.** Prevalence of autopsied bodies that are anti-HIV positive, distributed according to various basic factors identified at Chulalongkorn Forensic Center. Chula Med J.2004 Nov; 48(11): 717-722

2. **Kornkiat Vongpaisarnsin.** Review Article: Injuries and death from the electricity. Chula Med J.2005 Aug; 49(8): 467-474

3. **Kornkiat Vongpaisarnsin.** Suicide by low-voltage electrocution. Chula Med J.2005 Jun; 49(6): 351-355

4. Tansrisawad N, Jongsakul T, Hoonwijit U, **Vongpaisarnsin K.** Mean time spent on gross exam of complete forensic autopsy at Chulalongkorn Forensic Medicine Center. Med J 2006 Nov. 2011;50(11):769-75.

5. **Vongpaisarnsin K.** 2007. Forensic DNA. Forensic Medicine Journal 1, 2 (Aug-Nov): 91-96.

6. **Vongpaisarnsin Kornkiat**, et al. 2008 A case report of fatal anaphylaxis by nonionic contrastmedia. Forensic Medicine Journal 1, 3 (Dec-Mar): 129-133

7. **Vongpaisarnsin K.** 2008. Update in forensic molecular issue. Forensic Medicine Journal 1, 3 (Dec-Mar): 161.

8. **Vongpaisarnsin K**, Charito W, Boonlert A, Tonsrisawat N, Jongsakul T. Synovial fluid: An alternative source for forensic DNA. Forensic Science International: Genetics Supplement Series. 2011;3(1):e323-e4.

9. **Vongpaisarnsin K**, Saengkaeotrakul P, Boonlert A, Tansrisawad N. Gene and haplotype diversity of 23 Y-chromosomal short tandem repeat loci in the central Thai population. Forensic science international Genetics. 2014;14:191-3.

10. **Vongpaisarnsin K,** Tansrisawad N, Hoonwijit U, Jongsakul T. Pseudomonas aeruginosa septicemia causes death following liposuction with allogenic fat transfer and gluteal augmentation. Int J Legal Med [Internet]. 2015 Aug 9 [cited 2014 Sep 22];129(4):815–8.

11. **Vongpaisarnsin K**, Tansrisawad N, Hoonwijit U, Jongsakul T. A study of 17 short tandem repeat loci mutation in Thai population. 2014.

12. **Vongpaisarnsin K**, Vongpaisarnsin K. Eye colour single nucleotide polymorphisms (SNPs) variants in Thai population. Forensic Science International: Genetics Supplement Series. 2013;4(1):e198-e9.

13. **Vongpaisarnsin K**, Listman JB, Malison RT, Gelernter J. Ancestry informative markers for distinguishing between Thai populations based on genome-wide association datasets. Leg Med (Tokyo) [Internet]. 2015 Feb 25 [cited 2015 Jun 19];17(4):245–50.

14. **Vongpaisarnsin K**, Boonlert A, Rasmeepaisarn K, Dangkao P. Genetic variation study of 12 X chromosomal STR in central Thailand population. International Journal of Legal Medicine. 2016:1-3

15. Sukawutthiya, P., Sathirapatya, T., **Vongpaisarnsin, K.** Considering a performance test of forensic genomics system on massively parallel sequencing technology (2017) Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 2017;6:e599-e600.

16. Menathung, P., Saengkaeotrakul, P., Rasmeepaisarn, K., **Vongpaisarnsin, K.** Circulatory microrna in acute myocardial infarction: A candidate biomarker for forensic investigation (2017) Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 2017;6:e294-e5.

17. Sathirapatya, T., Sukawutthiya, P., **Vongpaisarnsin, K.** Massively parallel sequencing of 24 YSTR loci in Thai population (2017) Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 2017;6:e310-e3.

18. **Vongpaisarnsin, K.,** Saengkaeotrakul, P., Rasmeepaisarn, K. Ancestry informative markers for Asian subcontinent (2017) Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 2017;6:e260-e2.

19. Sathirapatya T, Sukawutthiya P, **Vongpaisarnsin K.** AB040. Preliminary study of chimerism detection in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using massively parallel sequencing. Annals of Translational Medicine. 2017;5(Suppl 2)

20. Sukawutthiya P, Sathirapatyaa T, **Vongpaisarnsina K.** AB103. A sequence variation of short tandem repeat observed in paternity cases using massively parallel sequencing technology. Annals of Translational Medicine. 2017;5(Suppl 2)

21. Rungtip Madee KM, **Kornkiat Vongpaisarnsin,** Postmortem detection of acute hypoxia using miR-155. Recent Advances in Genomics and Genetics Conference 2018 (RAGG2018): Innovative Genomics and Genetics; 2018.

22. Pitiwararom R, **Vongpaisarnsin K,** Hoonwijit U. SCN5A gene exome sequencing profile in sudden unexplained nocturnal death syndrome in Thai population. Chulalongkorn Medical Journal. 2019;63(2):111-8.

23. Sathirapatya T, Worrapitirungsi W, Sukawutthiya P, Rasmeepaisarn K, **Vongpaisarnsin K.** A SNP panel for early detection of artificial chimerism in HSCT patients using TaqMan technology. Int J Legal Med. 2020 Apr . doi:10.1007/s00414-020-02276-2. PMID: 32248307.

ประวัตินักวิจัย

ชื่อนักวิจัย (ภาษาไทย) ทิฆัมพร สถิรแพทย์

(ภาษาอังกฤษ) **TIKUMPHORN SATHIRAPATYA**

ตำแหน่งทางวิชาการ

ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 022564269, 0819985545

E-mail: tikumphorn.s@gmail.com

ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ (ระบุแหล่งพิมพ์และปีที่พิมพ์)

1. Sathirapatya T, Sukawutthiya P, Vongpaisarnsin K. Massively parallel sequencing of 24 Y-STR loci in Thai population. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 2017.
2. Sathirapatya T, Sukawutthiya P, Vongpaisarnsin K. Preliminary study of chimerism detection in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using massively parallel sequencing. Ann Transl Med 2017;5 (Suppl2):AB040. doi: 10.21037/atm.2017.s040
3. Sathirapatya T, Bandhaya A., Jai-nhuknan J., Panvisavas N., Sojikul P. Human Sex Identification by MALDI-TOF MS (*manuscript on preparation*)
4. Sukawutthiya P, Sathirapatya T, Vongpaisarnsin K. Minimal CpGs sites of ELOVL2 gene for a chronological age estimation on postmortem blood (*manuscript on preparation*)
5. Sathirapatya T, Worrapitirungsi W., Sukawutthiya P., Rasmeepaisarn K., Vongpaisarnsin K. A SNP panel for early detection of artificial chimerism in HSCTpatients using TaqMan technology. *International Journal of Legal Medicine.* 2020.

ประวัตินักวิจัย

ชื่อนักวิจัย (ภาษาไทย) ปุณยภัทร สุขวุฒิยา

(ภาษาอังกฤษ) **Poonyapat Sukawutthiya**

ตำแหน่งทางวิชาการ

ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 022564269, 0857669079

E-mail: poonyapat185@gmail.com

ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ (ระบุแหล่งพิมพ์และปีที่พิมพ์)

1. Sukawutthiya P, Waengsothorn S, Phonsena P, Triwitayakorn K. Microsatellite markers specific to *Marcania grandiflora* Imlay, Thailand endemic plant. Thai Journal of Botany. 2014;6(Special):227-34.
2. Sukawutthiya P, Sathirapatya T, Vongpaisarnsin K. Considering a performance test of forensic genomics system on massively parallel sequencing technology. Forensic Science International: Genetics Supplement Series (2017), http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigss.2017.10.007

ประวัตินักวิจัย

ชื่อนักวิจัย (ภาษาไทย) ฮัสนีย์ โนะ

(ภาษาอังกฤษ) **Hasnee Noh**

ตำแหน่งทางวิชาการ

ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 022564269

E-mail: hasneenoh@gmail.com

ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ (ระบุแหล่งพิมพ์และปีที่พิมพ์)

1. K. Rasmeepaisarn, H. Noh, P. Varrathyarom and K. Vongpaisarnsin. 2019. Y-chromosomal haplogroup determination using Y-SNPs in Thai population. Poster sessions presented at the 11th AFSN Annual Meeting and Symposium 2019 (AFSN2019). Ho Chi Minh. Vietnam.
2. H. Noh, A. Nakkaew, A. Phongdara and U. Sangket. 2016. Comparative analysis of SSR associated with high-yield oil palm (Elaeis guineensis Jacq.) from transcriptome. The proceeding of the 5th International Biochemistry and Molecular Biology Conference 2016 (BMB2016). Songkhla. Thailand.
3. S. Vijasika, H. Noh, W. Rutvisuttinunt and U. Sangket. 2015. The comparison of signature sequences among different viral population. The proceeding of Genomics, Bioinformatics, and System Biology Conference (GBSBC2015). Bangkok. Thailand.

ประวัตินักวิจัย

ชื่อนักวิจัย (ภาษาไทย) รัชติพรรณ ปิติวรารมย์

(ภาษาอังกฤษ) **Rachtipan Pitiwararom**

ตำแหน่งทางวิชาการ

ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 022564269

E-mail: Pitiwararom.R@gmail.com

ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ (ระบุแหล่งพิมพ์และปีที่พิมพ์)

1. Pitiwararom R., Vongpaisarnsin K., Hoonwijit U. SCN5A gene exome sequencing profile in sudden unexplained nocturnal death syndrome in Thai population. Chula Med J Vol. 63 No. 2 April - June 2019; 111 - 118