

บทที่ 1

บทนำ

ในเซลล์ของมนุษย์มีนิวเคลียส ซึ่งดีเอ็นเอที่พบในนิวเคลียสจะอยู่ในโครโมโซม (Chromosome) ที่มีลักษณะเป็นเส้นใยขดตัวกันแน่น ซึ่งเกิดจากการพันของสายดีเอ็นเอกับโปรตีนฮิสโตน (Histones) ที่ทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมให้สายดีเอ็นเอที่พันรอบนั้นคงอยู่ได้ ในมนุษย์นั้นมีโครโมโซมร่างกาย 22 คู่ และโครโมโซมเพศอีก 1 คู่ ดังนั้นในมนุษย์จะต้องมี 46 โครโมโซม ในผู้ชายมีโครโมโซมเพศเป็น XY จากโครโมโซม X และ โครโมโซม Y ส่วนผู้หญิงมีโครโมโซมเพศเป็น XX ส่วนใหญ่การพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลมักใช้ตำแหน่งที่อยู่ในโครโมโซมร่างกาย และการระบุเพศมักใช้ตำแหน่งที่อยู่บนโครโมโซมเพศ

ดีเอ็นเอที่อยู่ในโครโมโซมจะประกอบไปด้วยส่วนที่เป็นรหัส (Coding) และส่วนที่ไม่ได้เป็นรหัส (Non coding) ในส่วนที่เป็นรหัสเรียกว่า ยีน (Gene) ที่บรรจุข้อมูลที่จำเป็นสำหรับการสร้างโปรตีน ความยาวของยีนมีขนาดตั้งแต่พันถึงหมื่นคู่เบส ยีนจะประกอบด้วยเอกซอน (Exons) ทำหน้าที่เป็นรหัสพันธุกรรมในการสร้างโปรตีน และอินทรอน (Introns) หรืออินเตอร์เวนิงซีควเन्ส (Intervening Sequence) ในมนุษย์ส่วนที่เป็นยีนจะมีอยู่ประมาณ 5% ของทั้งหมด ส่วนที่ไม่ได้เป็นรหัสคือส่วนที่เหลือในโครโมโซม เพราะส่วนดังกล่าวไม่ใช่ส่วนที่สร้างโปรตีน ในส่วนที่นำมาใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลจะเป็นส่วนที่ไม่ได้เป็นรหัส ซึ่งจะพบทั้งระหว่างยีนและที่อยู่ภายใน (Butler, 2003: 16)

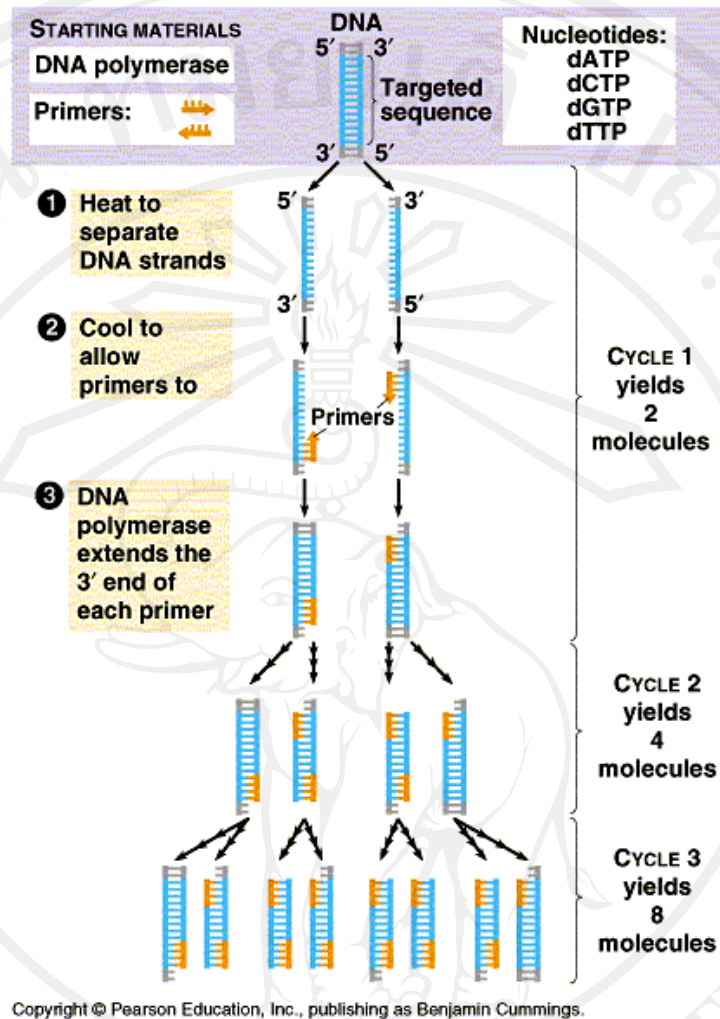
ในการตรวจวัดคุณภาพในคดีที่มีการกระทำความผิดทางเพศนั้น วิธีที่ใช้ในการตรวจเบื้องต้นถึงการมีอยู่ของสารคัดหลั่งจากเพศชาย (Semen) และตัวอสุจิ (Sperm) มีหลายวิธี วิธีหนึ่งเป็นการใช้วิธีทางชีวเคมี (Biochemical method) เพื่อตรวจหาส่วนประกอบที่มีอยู่ในสารคัดหลั่งเพศชาย ได้แก่ free choline, Zinc, Spermine, prostaglandin E อีกวิธีหนึ่งเป็นการสังเกตปฏิกิริยาของเอนไซม์

(Enzyme activity) ได้แก่ Acid phosphatase, Gamma-glutamyl transpeptidase และวิธีทางอิมมูน (Immunological method) สำหรับตรวจหาโปรตีนจำเพาะ ได้แก่ Spermatozoid wall-specific antigens, Seminal vesicle-specific antigens (Semenogelins) และ Prostate specific antigen (PSA หรือ P30)

ซึ่งวิธีที่ห้องปฏิบัติการใช้ในการตรวจส่วนใหญ่ ได้แก่ Sperm Cytology (SC), Acid phosphatase activity (APA) และ Prostate specific antigen (PSA) แม้ว่าการทำ Sperm Cytology แล้วพบตัวอสุจินั้นจะสามารถตรวจพบและยืนยันได้ว่ามีสารคัดหลั่งจากเพศชายจริงแต่สามารถใช้ได้เฉพาะในกรณีที่ผู้กระทำความผิดมีปริมาณอสุจิปกติ (Normospermic) หรือมีปริมาณอสุจิน้อยกว่าปกติ (Oligospermic) เท่านั้น แต่ไม่สามารถยืนยันได้ถ้าหากผู้ที่กระทำความผิดไม่มีอสุจิในสารคัดหลั่ง (Azoospermic) หรือ เมื่อผู้กระทำความผิดได้รับการทำหมันมาแล้ว (Vasectomized) แต่อาจใช้วิธี Acid Phosphatase Activity และหรือ Prostate Specific Antigen มาช่วยในการตรวจเบื้องต้นได้ หากพบว่ามีผลเป็นบวกอย่างน้อย 1 จาก 3 เทคนิคก็สามารถนำตัวอย่างดังกล่าวมาทำ DNA Profiling โดยการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์เยื่อบุผนังต่างๆจากผู้กระทำความผิดเพศชาย (Lydia et al , 2011)

เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

ในกระบวนการทำ DNA typing ประกอบด้วยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม และการแยกแถบ ดีเอ็นเอด้วยวุ้นโดยผ่านกระแสไฟฟ้า (Gel Electrophoresis) เพื่อใช้ในการแปลผล ซึ่งการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมนั้นมีหลายเทคนิคที่ได้มีการคิดค้นขึ้นมา ในการตรวจพิสูจน์บุคคลส่วนมากนิยมใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยการสังเคราะห์ ดีเอ็นเอสายใหม่ (DNA replication) จากดีเอ็นเอต้นแบบในหลอดทดลองทำให้ดีเอ็นเอจำนวนเพียงเล็กน้อยถูกเพิ่มปริมาณจนเพียงพอที่จะตรวจสอบได้ ซึ่งในแต่ละรอบจะมีการเพิ่มจำนวนของเส้นดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการขึ้นเป็นสองเท่าไปเรื่อยๆ ตามทฤษฎีแล้วหลังจาก 30 รอบจะมีเส้นดีเอ็นเอที่ต้องการเป็นล้านเท่า (ชานินทร์, 2538)



ภาพที่ 1 แสดงกระบวนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยวิธี Polymerase chain reaction

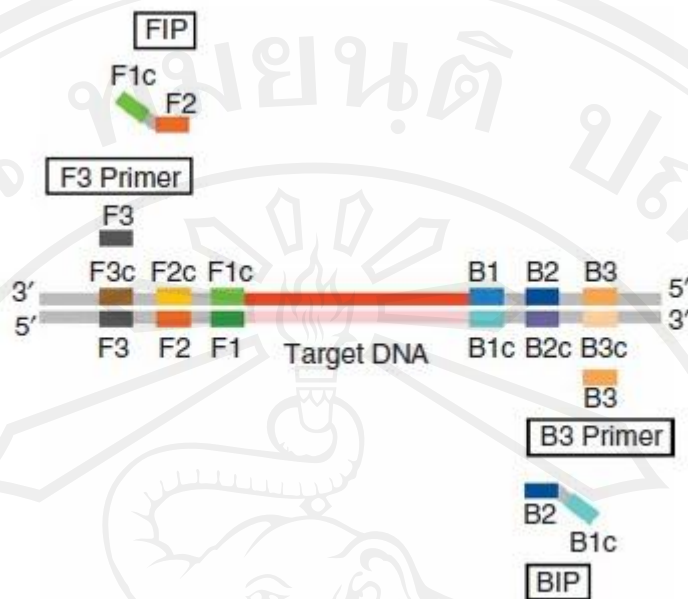
ในงานบริการประจำวันตรวจพิสูจน์บุตรโดยดีเอ็นเอนั้น มีการตรวจดีเอ็นเอในตำแหน่ง D10S2325, D13S317, D16S539, D19S2325, D3S1358, D5S818, D8S1179, TH01, TpoX, vWA ซึ่งมีกำลังการคัดออกโดยเฉลี่ยรวมกัน ~99% และกำลังการแยกแยะ >1 ใน 70 ล้าน(ในประเทศไทย) ในการตรวจพิสูจน์บุคคลด้วยดีเอ็นเอ จะตรวจในลักษณะเดียวกับพิสูจน์บุตร แต่เป็นการเทียบดูว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้จากวัตถุพยาน เช่น คราบเลือด คราบอสุจิ อสุจิที่เก็บได้จากช่องคลอดของผู้เสียหาย รากผมที่ได้จากที่เกิดเหตุ เปรียบเทียบกับกับตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้ต้องสงสัย หรือตัวผู้เสียหายเอง หากไม่ตรงกันในตำแหน่งหนึ่งใด จะแปลผลว่าวัตถุพยานนั้นไม่ได้มาจากบุคคลนั้น

ซึ่งต้องระวังการปนเปื้อนเป็นอย่างยิ่ง และเมื่อพบว่ารูปแบบดีเอ็นเอตรงกันจะต้องมีการคำนวณโอกาสที่จะตรงกันโดยบังเอิญ (วิฑูรย์ และ ธานีทร, 2005)

แต่ในกระบวนการทำ PCR นั้น จำเป็นต้องใช้อุณหภูมิถึงสามอุณหภูมิ ต้องอาศัยความแม่นยำของเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Thermal Cycler) ที่มีราคาแพงและมีขั้นตอนในการทำหลายขั้นตอนทำให้ใช้เวลานานกว่าจะถึงการแปลผล

เทคนิค Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)

เทคนิคลูปมีเดียเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน (LAMP) พัฒนาขึ้นโดย Notomi และคณะ ในกระบวนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมนั้นจะอาศัยกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายยาว จากจำนวนเพียงเล็กน้อยไปสู่จำนวนกว่า 10^9 ภายในเวลาไม่ถึงหนึ่งชั่วโมง ภายใต้สภาวะอุณหภูมิเดียว โดยจะใช้เอนไซม์ Bst polymerase และใช้ไพรเมอร์ (Primers) 2 แบบด้วยกันคือ อินเนอร์ไพรเมอร์ (Inner primer) ได้แก่ Forward Inner Primer (FIP) และ Backward Inner Primer (BIP) ซึ่งอินเนอร์ไพรเมอร์แต่ละตัวจะมีสองชุดเบสที่แตกต่างกันต่อเข้าด้วยกัน และ เอาท์เตอร์ไพรเมอร์ (Outer primer) ได้แก่ F3 และ B3 ในการใช้ไพรเมอร์ถึงสี่ตัว (หกชุดเบส) ในการเริ่มต้นเพื่อให้ได้ตัวต้นแบบสำหรับการเพิ่มปริมาณ ดังภาพที่ 1 เพราะฉะนั้นเทคนิคนี้จึงมีความจำเพาะกับดีเอ็นเอต้นแบบสูง และสามารถแปลผลจากการสังเกตด้วยตาเปล่าได้จากการทำปฏิกิริยาของ Magnesium ion จับกับ Pyrophosphate ion จะทำให้เกิดตะกอน Magnesium pyrophosphate สีขาวขุ่น ซึ่งการเกิดตะกอนสีขาวขุ่นขึ้นมาแสดงว่ามีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Notomi et al, 2000)



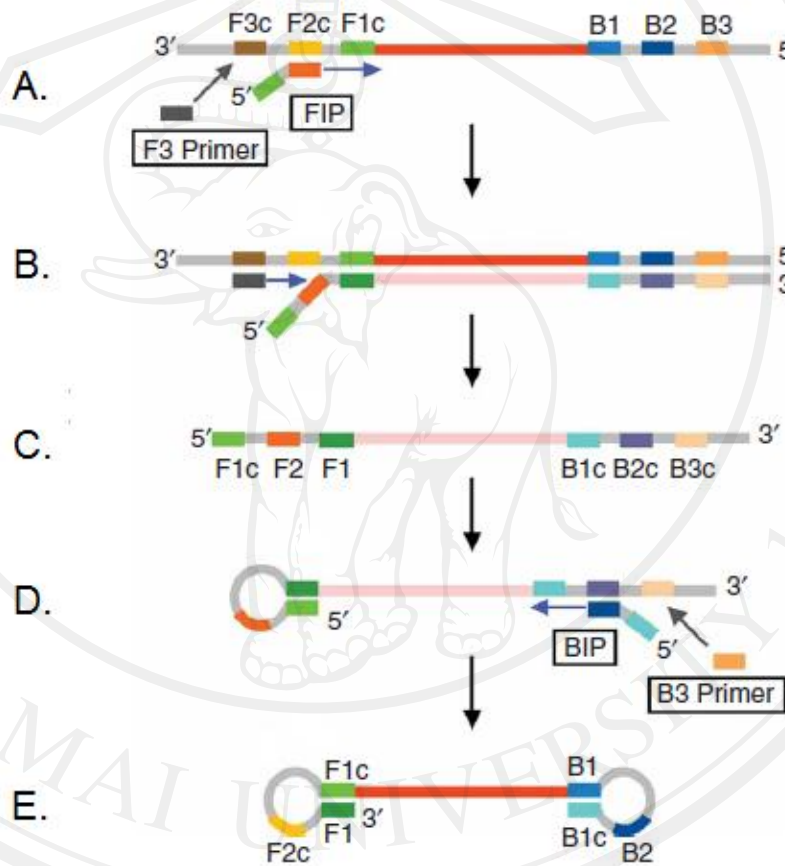
ภาพที่ 2 แสดงตำแหน่งการเข้าสู่ของไพรเมอร์บนดีเอ็นเอแม่แบบ

การทำงานของ LAMP จะแบ่งออกเป็นสองขั้นตอนใหญ่ คือ ขั้นแรก Starting structure producing step เป็นการสร้างรูปแบบของดีเอ็นเอที่มีรูปร่างคล้ายคัมเบล (dumbbell-like DNA structure) หรือเรียกว่า stem-loops เป็นตัวเริ่มในกระบวนการ ขั้นที่สอง Cycle amplification step จะเป็นขั้นตอนการเพิ่มดีเอ็นเอจาก stem-loops โดยเอนไซม์ *Bst* DNA polymerase

ขั้นตอน Starting structure producing

1. เมื่อแช่อบที่อุณหภูมิประมาณ $60 - 65^{\circ}\text{C}$ สายดีเอ็นเอแม่แบบจะอยู่ในสภาวะที่บางส่วนยังเป็นสายคู่และบางส่วนจะคลายออกเป็นสายเดี่ยว และเริ่มกระบวนการจากการที่มี Forward inner primer (FIP) เข้าไปจับกับดีเอ็นเอแม่แบบโดยตำแหน่ง F2 บนไพรเมอร์จะจับกับตำแหน่ง F2c บนดีเอ็นเอแม่แบบ หลังจากนั้นจะมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอคู่สมสายใหม่ขึ้นมาดังภาพที่ 3A
2. ไพรเมอร์ F3 จะเข้าจับที่บริเวณ F3c บนดีเอ็นเอแม่แบบ และสายดีเอ็นเอแล้วเกิดการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอใหม่โดยอาศัยคุณสมบัติของ DNA polymerase with strand displacement ดังภาพที่ 3B
3. สายดีเอ็นเอสายแรกที่สังเคราะห์เมื่อถูกเลาะออกมา ทางด้านปลาย 5' จะเกิดรูปแบบของ loop ขึ้น โดยตำแหน่ง F1c จะโค้งเข้าจับกับตำแหน่ง F1 ดังภาพที่ 3D

4. ไพร์เมอร์ Backward inner primer (BIP) เข้าจับดีเอ็นเอสายที่ถูกเลาะ โดยตำแหน่ง B2 บนไพร์เมอร์จะจับกับตำแหน่ง B2c บนสายดีเอ็นเอ หลังจากนั้น ไพร์เมอร์ B3 จะเข้าจับกับตำแหน่ง B3c เพื่อเลาะสายดีเอ็นเอออกมาเช่นเดียวกัน ดังภาพที่ 3D
5. สายดีเอ็นเอที่ถูกเลาะออกมานั้นทางด้านปลาย 3' จะเกิดรูปแบบของ loop ขึ้น โดยตำแหน่ง B1c จะโค้งเข้าจับกับตำแหน่ง B1 ทำให้ดีเอ็นเอเกิดรูปแบบคล้ายคัมเบล (dumbbell-like DNA structure) เรียกว่า stem-loops ดังภาพที่ 3E

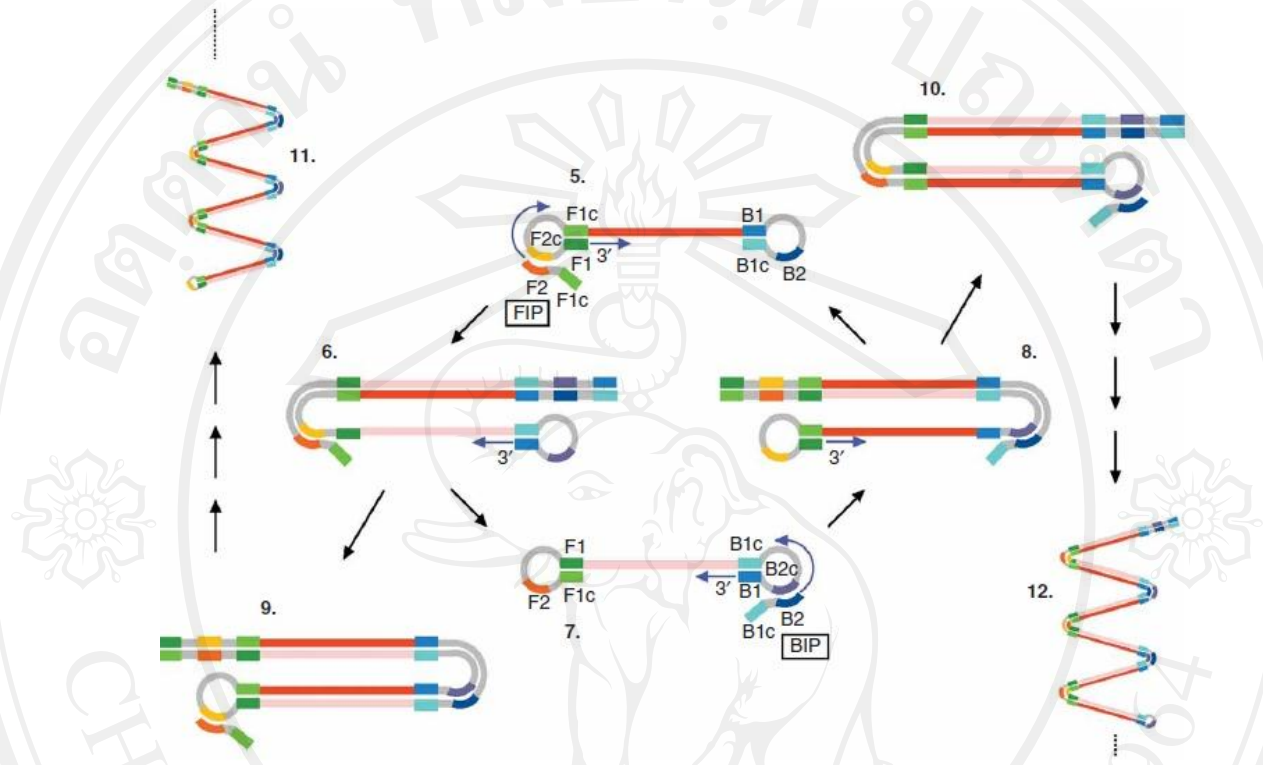


ภาพที่ 3 แสดงกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในขั้น Starting structure producing

ขั้นตอน Cycle amplification (ภาพที่ 4)

ในขั้นตอนนี้สามารถเกิด cycle amplification step ด้านปลายของ loop forward ก่อน คือ สามารถมี self primed strand displacement DNA synthesis จาก F1 ต่อไปเรื่อยๆ จนถึง B1c ขณะเดียวกัน FIP primer ก็สามารถไปจับกับ F2c ที่ loop forward(6) และสร้าง DNA สายใหม่ 3 ซ้ำ (9) และมี stem loop แบบ dumbbell(7) ที่สามารถเกิด cycle amplification ด้าน backward ขึ้นได้ (7)

การทำงานจะเกิดขึ้นต่อเนื่องกันตลอดเวลาจนทำให้ target DNA ขาวขึ้นหลายๆซ้ำ (อมรัตน์, 2554)



ภาพที่ 4 แสดงกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในขั้น Cycle amplification

การตรวจสอบผลของเทคนิค LAMP

1. สามารถทำได้ในหลายวิธีเช่น สามารถดูได้จากความขุ่นของตะกอน Magnesium pyrophosphate ซึ่งเป็นผลผลิตที่เกิดขึ้นในระหว่างการสร้างสายดีเอ็นเอ โดยนำหลอดทดสอบไปปั่นให้ตกตะกอน ถ้าเกิดการเพิ่มขยายขึ้น จะพบตะกอนสีขาวขุ่น (Yasuyoshi et al, 2001)
2. ดูการเรืองแสง ในกรณีที่ใช้สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ เช่น SYBR GREEN I เดิมเมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยาแล้ว เมื่อมีสารพันธุกรรมสังเคราะห์ขึ้น สีของสารจะเปลี่ยนจากสีส้มเป็นสีเขียวภายใต้แสง UV (Norihito et al, 2008)

3. การใช้เจลอิเล็กโตรโฟลิซิส โดยนำ LAMP product ไปทำ gel electrophoresis จะปรากฏแถบดีเอ็นเอหลายแถบคล้ายขั้นบันไดในกรณีที่ให้ผลบวก
4. การวิเคราะห์หาปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง Real-time turbidimeter (Yasuyoshi et al, 2004)

อเมโลจีนิน (Amelogenin)

อเมโลจีนิน (Amelogenin) คือโปรตีนชนิดหนึ่งที่พบได้ในเคลือบฟัน ถูกกำหนดลักษณะจากยีนที่มีอยู่ทั้งในโครโมโซม X และ Y หากไม่มียีนดังกล่าวแล้วจะทำให้เกิดโรค X-linked amelogenesis imperfecta ซึ่งเป็นโรคทางพันธุกรรมที่มีผลต่อการสร้างเคลือบฟัน และยีนดังกล่าวอาจเรียกว่า AMELX และ AMELY มีจำนวนคู่เบสและลำดับเบสที่ต่างกัน โดยยีนทั้งสองสามารถนำมาใช้ในการระบุเพศได้ อย่างไรก็ตาม การนำไปใช้จะจำกัดเฉพาะในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ โบราณคดี และการระบุเพศของทารกในครรภ์ (Francès et al, 2007)

วัตถุประสงค์

นำเทคนิค LAMP ที่มีความจำเพาะสูงและรวดเร็ว มาประยุกต์ใช้ในการตรวจเบื้องต้น จากตำแหน่งของยีนอเมโลจีนิน ในโครโมโซมเพศชาย สำหรับวัตถุพยานในคดีความผิดทางเพศ เพื่อพิสูจน์ถึงการมีอยู่ของสารพันธุกรรมจากเพศชาย