

## บทที่ 2

### งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Lydia และคณะ (2011) ได้เปรียบเทียบถึงความไวในแต่ละเทคนิคที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ตัวอย่างจากอาสาสมัคร 2 คน ที่มีสเปิร์มในปริมาณปกติและมีภาวะที่มีปริมาณสเปิร์มน้อยกว่าปกติ มาทำการละลายที่อัตราส่วนแตกต่างกัน รวมทั้งได้ทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจวัตถุพยาน จากรายงานการตรวจทางห้องปฏิบัติการของ Toronto ใน Canada Hong Kong ใน China และ Toluca และ Texcoco ใน Mexico และผลของการตรวจของทั้ง 3 เทคนิคที่ออกมา ยังสามารถนำไปสู่การตรวจโดยวิธี DNA typing โดยจะนำตัวอย่างที่คัดแล้ว เหลือ 27 ตัวอย่าง จาก 6 ใน 8 กลุ่ม โดยใช้ Y-STR จำนวน 12 loci ผลของการศึกษาในครั้งนี้พบว่า Prostate-specific antigen มีความไวที่สุดเนื่องจากใช้ชุดตรวจที่เป็นผลิตภัณฑ์เชิงพาณิชย์ ส่วนรองลงมาคือ Spermatoscopy และ Acid phosphatase activity มีความไวที่ใกล้เคียงกัน และในการทดสอบประสิทธิภาพของแต่ละห้องปฏิบัติการสามารถจัดกลุ่มผลการตรวจที่ออกมาของทั้ง 3 เทคนิค ได้เป็น 8 กลุ่ม ตั้งแต่ได้ผลออกมาเป็นบวกทั้ง 3 เทคนิค(กลุ่มที่ 1) ไปจนถึงผลเป็นลบทั้ง 3 เทคนิค(กลุ่มที่ 6) ซึ่งพบว่าตัวอย่างส่วนใหญ่มักจะมีผลเป็นบวกหรือลบทั้งหมด และเทคนิคที่มีผลเป็นบวกมากที่สุดคือ Acid phosphatase activity, Spermatoscopy และ Prostate-specific antigen (P30) ตามลำดับ เมื่อนำตัวอย่างดังกล่าวมาทำ DNA typing พบว่าในกลุ่มที่ 1 สามารถจำแนกได้ทั้ง 12 loci และในกลุ่มที่ 6 ไม่สามารถจำแนกได้เลย ส่วนกลุ่มอื่นๆที่เหลือนั้นสามารถจำแนกได้บางส่วนเนื่องจากปริมาณสารพันธุกรรมที่ได้จากการสกัดมีปริมาณมากพอ จากผลการทดลองที่ได้ แสดงให้เห็นถึงความไวของทั้ง 3 เทคนิค และสิ่งที่มีผลต่อความแตกต่างกันของประสิทธิภาพในแต่ละห้องปฏิบัติการ และสามารถนำผลการตรวจวัตถุพยานในคดีข่มขืนกระทำชำเรา มาสนับสนุนการทำ DNA typing ในทางนิติวิทยาศาสตร์ต่อไป

จากข้อสงสัยถึงระยะเวลาหลังจากการหลังที่มีอิทธิพลต่อผลของการตรวจเบื้องต้น Khalidi และคณะ (2004) จึงได้ศึกษาจากตัวอย่าง 227 ตัวอย่าง แบ่งกลุ่มเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มNormospermic กลุ่มAzoospermic และกลุ่มตัวอย่างควบคุม และวิธีการตรวจเบื้องต้นก็จะถูกแบ่งออกเป็นชุดตรวจจาก Diff-Quick<sup>®</sup> และ Phosphatesmo Km Paper<sup>®</sup> สำหรับการตรวจหา Acid phosphatase (AP) และ PSA-check 1<sup>®</sup> สำหรับการตรวจหา Prostate specific activity (PSA) โดยจะแบ่งระยะเวลาหลังจากการหลังเป็น 0, 48 และ 72 ชั่วโมง จากผลการศึกษาพบว่า ความเข้มข้นของอสุจิไม่มีอิทธิพลต่อการตรวจหา AP และ PSA ซึ่งแตกต่างจากการตรวจหาอสุจิจากการส่องกล้องจุลทรรศน์ ในระยะเวลา 72 ชั่วโมง ยังสามารถตรวจด้วยวิธี PSA ได้ และการตรวจโดยวิธี AP สามารถตรวจพบได้ไม่เกิน 72 ชั่วโมง

Notomi และคณะ (2000) ได้มีการพัฒนาวิธีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบใหม่ขึ้นมา เรียกว่า Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ที่มีความจำเพาะสูง มีประสิทธิภาพและความรวดเร็ว โดยใช้เพียงอุณหภูมิเดียว วิธีดังกล่าวใช้เอนไซม์ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม และไพรเมอร์ที่ออกแบบมา 4 แบบ และจำแนกออกเป็น 6 ชุดเบส ที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอต้นแบบ และอินเนอร์ไพรเมอร์จะประกอบไปด้วยส่วนที่เรียกว่า Sense และ anti-sense สำหรับการเริ่มกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ไพรเมอร์ที่ใช้ในลำดับต่อมาเรียกว่า เอาท์เตอร์ไพรเมอร์ เมื่อเอาท์เตอร์ไพรเมอร์ทำงานจะทำให้เกิดการแยกสายดีเอ็นเอที่เริ่มสังเคราะห์จากอินเนอร์ไพรเมอร์ออกจากสายดีเอ็นเอต้นแบบ สายดีเอ็นเอที่เริ่มสังเคราะห์จากอินเนอร์ไพรเมอร์จะเป็นเหมือนกับสายดีเอ็นเอต้นแบบ ซึ่งจะมีโครงสร้างเป็นแบบ stem-loop ต่อจากนั้นอินเนอร์ไพรเมอร์ก็จะสามารถจับส่วนที่เป็น loop ของสายดีเอ็นเอต้นแบบที่สร้างขึ้น และทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเป็นรอบๆ ไป ผลที่ได้จะเกิดโครงสร้างที่ยาวขึ้น โดยมี stem-loop เดิมต่อกับ stem-loop ใหม่ ในการเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องเป็นรอบๆจะทำให้เกิดดีเอ็นเอเป็นจำนวนกว่า  $10^9$  ซ้ำ ภายในเวลาไม่ถึง 1 ชั่วโมง โดยผลสุดท้ายของปฏิกิริยาจะได้ดีเอ็นเอที่มีโครงสร้างเป็น stem-loop ซ้อนกันไปมาเป็นจำนวนมากในสายเดียวกัน ทำให้เกิดโครงสร้างที่เป็น cauliflower-like ด้วยเพราะว่าในกระบวนการใช้ไพรเมอร์ 6 ชุดเบส จาก 4 แบบ ทำให้คาดว่าจะสามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยความสามารถในการแยกแยะสูง

เอนไซม์ DNA polymerase I เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ DNA โดยใช้อุณหภูมิเดียว โดยสังเคราะห์จากแบคทีเรีย *Bacillus stearothermophilus* N3468 การเตรียมเอนไซม์ Bst DNA polymerase I จากสายพันธุ์เด่นที่มีขนาดประมาณ 97 kDa เมื่อนำมาอ่านผลจากการทำ SDS polyacrylamide gels ลำดับของยีน Bst polA ถูกนำมาใช้เป็น Bst polymerase I เมื่อนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูลพบว่า การเกิดการตรวจสอบและซ่อมแซมสายดีเอ็นเอจากปลาย 3' ไป 5' (3' → 5' exonuclease) พบได้ใน *E. coli* DNA polymerase I แต่ไม่พบใน Bst DNA polymerase I ทำให้เกิดข้อสงสัยถึงการมีอยู่ของ 3' → 5' exonuclease ในเอนไซม์ Bst DNA polymerase I Aliotta และคณะ (1996) จึงได้ทำการตรวจทางชีวเคมี 4 แบบ เพื่อจะถูกใช้ในการประเมินว่ามีการซ่อมแซมสายดีเอ็นเอเกิดขึ้นหรือไม่ในเอนไซม์ Bst DNA polymerase I โดยจะทดสอบทั้ง full-length Bst DNA polymerase I และ Bst large fragment พบว่า Bst DNA polymerase I จะมี 5' → 3' exonuclease แต่ไม่มี 3' → 5' exonuclease การขาด 3' → 5' exonuclease ในการซ่อมแซมสายดีเอ็นเอจากหลายๆแบบ อาจมีผลต่อประสิทธิภาพ ซึ่งอาจต้องยอมให้เกิดขึ้นสำหรับการตรวจสอบและซ่อมแซมสายดีเอ็นเอสำหรับเอนไซม์ที่ใช้อุณหภูมิเดียว

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เป็นกระบวนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ใช้เอนไซม์ชนิดเดียว ซึ่งจะมีกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเป็นจำนวนมาก และสารอื่นๆที่ได้จากปฏิกิริยาออกมาด้วย ได้แก่ Pyrophosphate ion จากการใช้ dNTPs ในปฏิกิริยา ซึ่งจะไปจับกับ Magnesium ion ใน DNA polymerase buffer ทำให้เกิดตะกอนสีขาวขึ้น สามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า แสดงว่ามีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเกิดขึ้นจากเทคนิคดังกล่าว และยิ่งมีการสังเคราะห์เพิ่มมากขึ้น ความขุ่นก็จะสังเกตเห็นได้ชัดเจนขึ้น ซึ่งสามารถใช้เครื่องวัดความขุ่นมาใช้ร่วมด้วยได้ (Mori et al, 2001)

หลังจากที่มีการพัฒนาเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ขึ้นมา กว่า 10 ปีที่ผ่านมา ได้มีการนำเทคนิคนี้มาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาสารพันธุกรรม เพราะเป็นเทคนิคที่สะดวก รวดเร็ว มีประสิทธิภาพ และมีความจำเพาะสูง วิธีดังกล่าวใช้เอนไซม์ DNA polymerase และไพรเมอร์ (Primers) ทั้ง 4 แบบ รวมทั้ง 4 แบบแล้วมีชุดดีเอ็นเอทั้งหมด 6 ชุด ซึ่งไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพงและความแม่นยำสูง และมีขั้นตอนในการทำที่น้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบ

กับ วิธีการทำ PCR และ Real time PCR จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถรวบรวมการนำเทคนิค LAMP ไปใช้ ได้แก่ การวินิจฉัยโรคที่เกิดจากเชื้อจุลชีพ โรคทางพันธุกรรม การตรวจเนื้องอก และการระบุเพศของทารกในครรภ์ (Fu et al,2010)

Nogami และคณะ (2008) ได้ศึกษาการระบุเพศโดยใช้ดีเอ็นเอจากโพรงประสาทฟัน โดยวิธี LAMP ซึ่งจะวิเคราะห์จาก Amelogenin locus ไพร์เมอร์ทั้ง 4 แบบที่ใช้เฉพาะกับวิธี LAMP เตรียมจากฐานข้อมูล GenBank® และมีการใช้ loop primers เพื่อใช้ย่นระยะเวลาลงไปกว่าครึ่งของปฏิกิริยาเดิม ตัวอย่างที่เป็นโพรงประสาทฟันทั้ง 32 ตัวอย่าง ที่ถอนออกมาจากฟันแท้ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาตั้งแต่ 1 ปี ถึง 25 ปี หลังจากการสกัด อัลลีล X จะถูกตรวจพบภายในเวลา 32 นาที โดยใช้เครื่องมือวัดความขุ่น Real-time turbidimeter และอัลลีล Y จะถูกตรวจพบภายในเวลา 34 นาที และสามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่าเมื่อเกิดสีขาวขุ่นจากปฏิกิริยา จากผลการทดลองดังกล่าวสามารถกล่าวได้ว่าการระบุเพศโดยใช้วิธี LAMP เป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็ว และเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการตรวจพิสูจน์ศพในกรณีที่มีผู้เสียชีวิตจำนวนมาก

จากงานวิจัยข้างต้นจึงได้นำเทคนิค LAMP มาประยุกต์ใช้ในการระบุเพศ ในตำแหน่ง Amelogenin Y ในการตรวจเบื้องต้นสำหรับวัตถุพยานในคดีความผิดทางเพศ ที่มีผลของการตรวจเบื้องต้นโดยวิธี Acid phosphatase activity และ Sperm cytology แล้ว โดยเฉพาะเมื่อตรวจแล้วได้ผลที่เป็นบวกของ Acid phosphatase activity แต่วิธี Sperm cytology ให้ผลที่เป็นลบ ซึ่งอาจทำให้ไม่สามารถยืนยันได้ว่ามีสารคัดหลั่งจากเพศชายอยู่จริง และในขั้นตอนแปลผลสามารถใช้วิธีการสังเกตสีขาวขุ่นด้วยตาเปล่าแสดงว่าเกิดการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมขึ้น ทำให้สะดวกรวดเร็วมากขึ้น เพื่อที่จะนำผลการวิจัยมาใช้ในการตรวจเบื้องต้นทั้งในห้องปฏิบัติการและในสถานที่เกิดเหตุ กรณีที่มีการเสียชีวิตจำนวนมาก ก่อนที่จะนำตัวอย่างที่มีผลการตรวจ ที่พบว่ามี Amelogenin Y locus มาเปรียบเทียบกับผลการตรวจโดยวิธี Sperm Cytology ที่ตรวจพบและไม่พบตัวสูลิตต่อไป