การตรวจหาดีเอ็นเอเพศชายจากตัวอย่างน้ำซับช่องคลอด โดยเทคนิคลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน

น.ส.สุนิตา ชุณห์กุล

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2564

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Detection of male DNA from vaginal swabs by loop-mediated isothermal amplification

Miss Sunita Chunkul

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Genetics
Department of Botany
FACULTY OF SCIENCE
Chulalongkorn University
Academic Year 2021
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจหาดีเอ็นเอเพศชายจากตัวอย่างน้ำซับช่องคลอดโดยเทคนิคลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน
โดย	น.ส.สุนิตา ชุณห์กุล
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนีกร ธรรมโชติ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ นายแพทย์กรเกียรติ วงศ์ไพศาลสิน

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนีกร ธรรมโชติ)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์กรเกียรติ วงศ์ไพศาลสิน)

.... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต)

.... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.บุษบา ฤกษ์อำนวยโชค)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สุนิตา ชุณห์กุล : การตรวจหาดีเอ็นเอเพศชายจากตัวอย่างน้ำซับช่องคลอด โดยเทคนิคลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน. (Detection of male DNA from vaginal swabs by loop-mediated isothermal amplification) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. ดร.รัชนีกร ธรรมโชติ, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ. นพ.กรเกียรติ วงศ์ไพศาลสิน

คดีข่มขืนกระทำชำเราเป็นคดีอาญาที่เกิดขึ้นเป็นอันดับต้น ๆ ในประเทศไทย การตรวจสอบหลักฐานในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจคดีข่มขืนกระทำชำเราทางนิติวิทยาศาสตร์ต้องผ่านการตรวจสอบทางห้องปฏิบัติการ โดยในปัจจุบันใช้วิธีการตรวจคัดกรอง (screening test) ด้วยเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเตสและการตรวจสอบยืนยัน (confirmatory test) ด้วยการส่องกล้องจุลทรรศน์หาอสุจิ ซึ่งทั้ง 2 วิธีมีความจำเพาะและความไวสูง แต่มีข้อจำกัดและโอกาสในการเกิดผลบวกหรือผลลบเทียมได้ เพื่อเพิ่มความสามารถและลดข้อผิดพลาดจากการตรวจ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาดีเอ็นเอเพศชายจากตัวอย่างน้ำซับช่อคลอดโดยเทคนิคลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน (LAMP) ที่มีความไวสูงและสามารถทำซ้ำแล้วให้ผลตรงกัน โดยออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนอเมโลจีนินวายเพื่อใช้ในการตรวจหาดีเอ็นเอเพศชายจากตัวอย่างน้ำซับช่องคลอดด้วยเทคนิค LAMP ผลการศึกษาพบว่าเทคนิค LAMP มีความไวสูงในการตรวจหาดีเอ็นเอเพศชายปริมาณตั้งแต่ 0.1 นาโนกรัมขึ้นไป ความจำเพาะในการตรวจสอบต่อดีเอ็นเอเป้าหมายสูงโดยแสดงผลบวกในกรณีที่ตรวจพบดีเอ็นเอมนุษย์เพศชายเท่านั้น ซึ่งไม่มีการแสดงผลในดีเอ็นเอมนุษย์เพศหญิง และดีเอ็นเอสัตว์ (หนูเม้าส์ หนูแรท และหมู) นอกจากนั้น ผลจากการตรวจสอตัวอย่างในคดีข่มขืนที่เกิดขึ้นจริงในประเทศไทยจำนวน 92 ตัวอย่าง แสดงให้เห็นว่าเทคนิค LAMP มีความแม่นยำในการตรวจสอบสูงถึงร้อยละ 96.7 ซึ่งแม่นยำกว่าการตรวจสอบด้วยชุดน้ำยาแอซิดฟอสฟาเตสและการตรวจหาอสุจิด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มีความถูกต้องในการตรวจสอบร้อยละ 57.6 และ 79.3 ตามลำดับ และสามารถใช้สารสีฟีนอลเรดในการตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาของเทคนิค LAMP จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเทคนิค LAMP สามารถใช้เป็นวิธีทางเลือกในการตรวจสอบเบื้องต้นสำหรับคดีข่มขืนได้

สาขาวิชา	พันธุศาสตร์	ลายมือชื่อนิสิต ....
ปีการศึกษา	2564	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก ....
		ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม ....

6270111423 : MAJOR GENETICS
KEYWORD: Sexual assault, LAMP technique, amelogenin-Y gene

Sunita Chunkul : Detection of male DNA from vaginal swabs by loop-mediated isothermal amplification. Advisor: Assoc. Prof. Rachaneekorn Tammachote, Ph.D. Co-advisor: Assoc. Prof. Kornkiat Vongpaisarnsin, M.D.

Sexual assault is one of the top crimes in Thailand. The examination of rape case specimens take place in laboratory. Currently, the examination begins with acid phosphatase test as a screening test and then confirmed by microscopic examination as a confirmatory test. Both methods were high sensitivity and specificity but the limitations were the likelihood of generating false positive or false negative results. Therefore, to improve the examination of rape case specimens, the objective of this study is to detect male DNA from vaginal fluid samples by Loop-mediated isothermal amplification, which is highly sensitive and reproducible. The primers were designed to be specific to the amelogenin-Y gene and used for detecting male DNA by the LAMP technique. The results showed that the LAMP technique was highly sensitive in detecting male DNA above 0.1 ng with a high specificity to target DNA, it showed positive results only in human male DNA sample but not in human female DNA or animal DNA (mouse, rat, and pig). In addition, when used in rape case samples in Thailand, the results showed that the LAMP technique had a high assay accuracy of 96.7%, which was higher than the acid phosphatase test and microscopic test that had accuracy of 57.6% and 79.3%, respectively and phenol red dye can be used to detect LAMP reaction with naked eyes. The results from this study indicated that the LAMP technique can be used as an alternative method for presumptive test in rape cases.

Field of Study: Genetics — Student's Signature ....

Academic Year: 2021 — Advisor's Signature ....

Co-advisor's Signature ....

CHULALONGKORN UNIVERSITY

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนีกร ธรรมโชติ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และรองศาสตราจารย์ นพ.กรเกียรติ วงศ์ไพศาลสิน อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ได้ให้คำปรึกษาและช่วยเหลือให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข ที่กรุณาให้เกียรติเป็นประธาน

รองศาสตราจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต และรองศาสตราจารย์ ดร.บุษบา ฤกษ์อำนวยโชค ที่กรุณาให้เกียรติเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ตรวจทาน และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ประภาษ กาวิชา คณะทรัพยากรธรรมชาติและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสกลนคร ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ และสอนเทคนิคต่าง ๆ ในระหว่างดำเนินงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ และพี่ ๆ นักวิจัยห้องปฏิบัติการนิติเซโรวิทยาทุกท่าน พี่วรรณ พี่อัจฉรา พี่พูล พี่นัท พี่วิน พี่ปอม พี่แพท พี่พลอย และพี่นี ที่ช่วยให้ข้อมูล คำแนะนำ และแก้ไขปัญหาต่าง ๆ มากมายตลอดระยะเวลาในการทำงานวิจัย

ขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ และภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ ที่คอยให้กำลังใจ และการช่วยเหลือต่าง ๆ

ขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดชทรงพระชนมายุครบ 72 พรรษา (สำหรับนิสิตโครงการทุนการศึกษาสมเด็จพระบรมโอรสาธิราชฯ สยามมกุฎราชกุมาร) และทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิต

สุดท้ายนี้ของกราบขอบพระคุณบิดา-มารดา และครอบครัว ผู้ให้การสนับสนุน และเป็นกำลังใจเสมอมา

สุนิตา ชุณห์กุล

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย .... ค

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .... ง

กิตติกรรมประกาศ .... จ

สารบัญ .... ฉ

สารบัญตาราง .... ฌ

สารบัญรูป .... ฎ

บทที่ 1 1

บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 3

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 3

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4

บทที่ 2 5

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5

2.1 การตรวจสอบการข่มขืน 5

2.2 ยีนอเมโลจีนิน 7

2.3 เทคนิคลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน (Loop-Mediated Isothermal Amplification: LAMP) 8

2.4 การวิเคราะห์ Y-STR 14

2.5 การศึกษาการประยุกต์ใช้เทคนิค LAMP ในทางนิติวิทยาศาสตร์ 15

บทที่ 3 18

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

วิธีดำเนินการวิจัย 18

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย 18

3.2 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย 18

3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย 19

3.4 วิธีดำเนินการวิจัย 19

บทที่ 4 24

ผลการทดลอง 24

4.1 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับเทคนิคลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน 24

4.2 การตรวจสอบการปรากฏของสารพันธุกรรมในตำแหน่งอเมโลจีนินวายจากตัวอย่าง เยื่อบุกระพุ้งแก้มจากอาสาสมัครเพศชายและเพศหญิงด้วยเทคนิคลูปมีดิเอเตด ไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน 25

4.3 การทดสอบความไวของเทคนิคลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน 26

4.4 การทดสอบความจำเพาะของเทคนิคลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน 27

4.5 การทดสอบแบบอำพราง (blind test) 27

4.6 การทดสอบการปรากฏของสารพันธุกรรมในตำแหน่งอเมโลจีนินวายจากตัวอย่าง น้ำซับช่องคลอดด้วยเทคนิคลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน และการวิเคราะห์ Y-STR (เพื่อยืนยันความถูกต้องของเทคนิค LAMP) 28

4.7 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ 29

บทที่ 5 33

อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ 33

5.1 อภิปรายผลการวิจัย 33

5.1.1 ความไวของเทคนิค LAMP 33

5.1.2 ความจำเพาะของเทคนิค LAMP 33

5.1.3 การทดสอบแบบอำพราง 34

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

5.1.4 เปรียบเทียบผลของเทคนิค LAMP กับการวิเคราะห์ Y-STR 34
5.1.5 สารสีฟีนอลเรด 35
5.1.6 กรณีศึกษา 35
5.2 สรุปผลการวิจัย 37
5.3 ข้อเสนอแนะ 37
บรรณานุกรม 40
ภาคผนวก 43
ประวัติผู้เขียน 54

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 สารสำคัญต่าง ๆ ที่สามารถตรวจพบได้ในสารคัดหลั่งเพศชาย (Jequier, 2011).............5

ตารางที่ 2 Tm ที่เหมาะสมของแต่ละไพรเมอร์ในเทคนิค LAMP 10

ตารางที่ 3 ตัวอย่างน้ำซับช่องคลอดจากวัตถุพยานที่ได้รับการตรวจสอบผลโดยวิธีแอซิดฟอสฟาเตส และการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ จำนวน 92 ตัวอย่าง (+ = ตรวจพบ, - = ตรวจไม่พบ).............20

ตารางที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ทั้ง 6 ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงต่อยีนอเมโลจีนินวาย....24

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความไวของเทคนิคลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชันและชุด ไพรเมอร์จากการออกแบบข้างต้น (สีเหลือง = ตรวจพบ สีส้ม = สี Transition และสีชมพู = ตรวจไม่พบ) 26

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบแบบอำพราง (blind test) (สีเหลือง = ตรวจพบ สีชมพู = ตรวจไม่พบ และเครื่องหมาย ✓ คือผลการวิเคราะห์ถูกต้อง)..28

ตารางที่ 7 จำนวนตัวอย่างของผลการตรวจสอบด้วยวิธีแอซิดฟอสฟาเตส (AP) การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ (ME) เทคนิคลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน (LAMP) และการวิเคราะห์ Y-STR 29

ตารางที่ 8 ประสิทธิภาพในการตรวจหาสารคัดหลั่งเพศชายด้วยวิธีแอซิดฟอสฟาเตส....................29

ตารางที่ 9 ประสิทธิภาพในการตรวจหาอสุจิด้วยการส่องกล้องจุลทรรศน์..................................30

ตารางที่ 10 ประสิทธิภาพในการตรวจหาดีเอ็นเอเพศชายด้วยเทคนิค LAMP..............................30

ตารางที่ 11 ผลการวิเคราะห์ไคสแควร์ระหว่างการตรวจหาสารคัดหลั่งเพศชายด้วยวิธีแอซิด ฟอสฟาเตส (AP) กับการวิเคราะห์ Y-STR...31

ตารางที่ 12 ผลการวิเคราะห์ไคสแควร์ระหว่างการตรวจหาอสุจิด้วยการส่องกล้องจุลทรรศน์ (ME) กับการวิเคราะห์ Y-STR 31

ตารางที่ 13 ผลการวิเคราะห์ไคสแควร์ระหว่างการตรวจหาดีเอ็นเอเพศชายด้วยเทคนิค LAMP กับการวิเคราะห์ Y-STR...32

ตารางที่ 14 ผลการตรวจสอบด้วยเทคนิค LAMP ที่มีความแตกต่างจากการวิเคราะห์ Y-STR 35

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 15 ผลการตรวจหาดีเอ็นเอเพศชายจากผู้เสียหาย 36

ตารางที่ 16 ปริมาตรของสารในการทำปฏิกิริยา LAMP... 43

ตารางที่ 17 การเตรียมความเข้มข้น (10X) ของไพรเมอร์สำหรับทำปฏิกิริยา LAMP.................... 43

ตารางที่ 18 ตารางการจรแบบ 2x2 ที่ใช้ในการคำนวณประสิทธิภาพของวิธีการทดลองที่ใช้ในการตรวจหาสิ่งที่เกี่ยวข้องกับเพศชาย... 43

ตารางที่ 19 ความเข้มข้นดีเอ็นเอจากตัวอย่างเยื่อบุกระพุ้งแก้มของอาสาสมัครทั้งเพศชาย และเพศหญิง 44

ตารางที่ 20 ผลความเข้มข้นดีเอ็นเอ ผลแอดซิดฟอสฟาเตส (AP) ผลการส่องกล้องจุลทรรศน์ (ME) ผลเทคนิค LAMP และการวิเคราะห์ Y-STR ทั้ง 92 ตัวอย่าง 44

ตารางที่ 21 ความเข้นข้นดีเอ็นเอที่ใช้ในเทคนิค LAMP เทียบกับการวิเคราะห์ Y-STR 48

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 ปฏิกิริยาการทดสอบเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเตส (Yang et al., 2008) 6

รูปที่ 2 ตำแหน่งของยีนอเมโลจีนินเอ็กซ์บนโครโมโซม Xp22.1 - Xp22.3 (ภาพซ้าย) และ ยีนอเมโลจีนินวายบนโครโมโซม Yp11.2 (ภาพขวา) (Butler andLi, 2014) 8

รูปที่ 3 ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีนอเมโลจีนินวายเทียบกับยีนอเมโลจีนินเอ็กซ์ .. 8

รูปที่ 4 ไพรเมอร์ในเทคนิค LAMP (Montrasio, 2015) 9

รูปที่ 5 ระยะห่างที่เหมาะสมระหว่างไพรเมอร์ของเทคนิค LAMP (Montrasio, 2015) 11

รูปที่ 6 โครงสร้างดีเอ็นเอในขั้นตอน initial ที่มีลักษณะเหมือนดัมเบล (dumbbell-like structure) (New England BioLabs, 2015 : online) 12

รูปที่ 7 ผลจากการเกิดปฏิกิริยาของเทคนิค LAMP พบว่ามีดีเอ็นเอหลากหลายขนาด (New England BioLabs, 2015 : online) 13

รูปที่ 8 ผลการเกิดปฏิกิริยาของเทคนิค LAMP สามารถสังเกตตะกอนสีขาวขุ่นได้ด้วยตาเปล่า (หลอดที่ 1 แสดงตัวอย่างควบคุมลบ และหลอดที่ 2 แสดงตัวอย่างควบคุมบวก) 13

รูปที่ 9 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์จับกับยีนอเมโลจีนินวายเทียบกับยีนอเมโลจีนินเอ็กซ์ (ไพรเมอร์ F3: สีน้ำเงิน ไพรเมอร์ FIP: สีเขียว ไพรเมอร์ LF: สีแดง ไพรเมอร์ BIP: สีม่วง ไพรเมอร์ LB: สีแดงเข้ม และไพรเมอร์ B3: สีส้ม) 24

รูปที่ 10 ผลของสารสีฟีนอลเรดหลังจากการทำปฏิกิริยา LAMP ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (NTC: ตัวควบคุมผลลบ FBC1-5: ตัวอย่างเยื่อบุกระพุ้งแก้มของอาสาสมัครเพศหญิง และ MBC1-5: ตัวอย่างเยื่อบุกระพุ้งแก้มของอาสาสมัครเพศชาย) 25

รูปที่ 11 ผลของการรันเจลโดยเครื่อง QIAxcel หลังจากการทำปฏิกิริยา LAMP ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (NTC: ตัวควบคุมผลลบ FBC1-5: ตัวอย่างเยื่อบุกระพุ้งแก้มของอาสาสมัครเพศหญิง และ MBC1-5: ตัวอย่างเยื่อบุกระพุ้งแก้มของอาสาสมัครเพศชาย) 25

รูปที่ 12 ผลการทดสอบความจำเพาะของเทคนิคลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชันและชุดไพรเมอร์ในหนูเม้าส์ (Mus musculus) หนูแรท (Rattus norvegicus) หมู (Sus scrofa

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

domesticus) และมนุษย์เพศหญิง (female) เทียบกับมนุษย์เพศชาย (male) และชุดควบคุมลบ (NTC) 27

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

คดีข่มขืนกระทำชำเรา เป็นคดีอาชญากรรมทางเพศที่เกิดขึ้นในทุกสังคมตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน สำหรับประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2552-2553 พบว่าเด็กหญิงช่วงอายุต่ำกว่า 15 ปีถูกข่มขืนมากที่สุดเมื่อเทียบกับช่วงอายุอื่นในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (เลียงชัย จตุรัส et al., 2554) ใน พ.ศ. 2560 พบว่าเด็กและเยาวชนหญิงช่วงอายุ 5-20 ปีถูกข่มขืนมากที่สุดเมื่อเทียบกับช่วงอายุอื่นในประเทศไทย (สำนักงานกองทุนการสร้างเสริมสุขภาพ, 2561) และใน พ.ศ. 2563 คดีข่มขืนกระทำชำเราถูกจัดอยู่ในอันดับที่ 3 ของคดีอาญา ประเภทฐานความผิดเกี่ยวกับชีวิต ร่างกาย และเพศ (สำนักงานตำรวจแห่งชาติ, 2564)

ในทางนิติวิทยาศาสตร์ การตรวจดีเอ็นเอเป็นเครื่องมือสำคัญในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล และมีบทบาทในกระบวนการยุติธรรมเพื่อใช้ยืนยันตัวบุคคลผู้กระทำผิดและผู้เสียหาย ซึ่งได้รับการยอมรับทั้งในระดับชาติและระดับสากล (ฤกษ์อำนวยโชค, 2561) โดยแหล่งที่มาของดีเอ็นเอ ได้แก่ เลือด น้ำอสุจิ เยื่อบุช่องคลอด เส้นผม น้ำลาย และกระดูก เป็นต้น (National Institute of Justice, 2012 : online) การตรวจสอบตัวอย่างทางนิติวิทยาศาสตร์ต้องผ่านกระบวนการตรวจสอบเบื้องต้น (presumptive test) ซึ่งส่วนใหญ่อาศัยการทำปฏิกิริยาทางเคมีกับสารคัดหลั่งทำให้เกิดการเปลี่ยนสี ทำให้สามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า และการตรวจสอบยืนยัน (confirmatory test) จากนั้นหากต้องการระบุตัวบุคคลเจ้าของตัวอย่างจะใช้เทคนิคการตรวจดีเอ็นเอชนิด short tandem repeat (STR analysis) (Kayser, 2017)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สำหรับการตรวจสอบเบื้องต้นเกี่ยวกับการมีอยู่ของสารคัดหลั่งเพศชาย หรือน้ำอสุจิ (semen) ในคดีข่มขืนกระทำชำเราในปัจจุบัน คือ วิธีการทดสอบแอซิดฟอสฟาเตส (acid phosphatase test) เป็นการตรวจหาเอนไซม์แอดซิดฟอสฟาเตสในตัวอย่างส่งตรวจ โดยอาศัยการสังเกตการเปลี่ยนสีจากการทำปฏิกิริยาทางเคมีกับน้ำอสุจิ ซึ่งมีปริมาณเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเตสสูง การทดสอบแอซิดฟอสฟาเตสนั้นมี

ความไว (sensitivity) ร้อยละ 65.5 ความจำเพาะ (specificity) ร้อยละ 96.4 (Peonim et al., 2013) และสามารถอ่านผลด้วยตาเปล่า แต่มีข้อจำกัด คือ ต้องตรวจสอบภายใน 72 ชั่วโมงหลังการข่มขืน และเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเตสสามารถพบได้จากช่องคลอดของเพศหญิงในความเข้มข้นต่ำ รวมถึงเวลาในการปรากฏผลทดสอบบวกเป็นเวลาที่ยังไม่เหมาะสม (Ryan, 2014 : online) ส่วนการตรวจสอบยืนยัน ในปัจจุบันใช้วิธีการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ เป็นการตรวจหาอสุจิโดยอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการตรวจสอบ (Jackson et al., 2020) ซึ่งผู้ตรวจสอบต้องใช้สายตาในการสังเกต อาจทำให้มีโอกาสในการเกิดผลลบเทียมได้ รวมทั้งในกรณีที่ผู้กระทำผิดเป็นหมัน ไม่มีการสร้างอสุจิ (azoospermia) หรือสร้างอสุจิน้อย (oligospermia) หรือเป็นหมันโดยการผ่าตัดท่อนำอสุจิ (vasectomy) อาจไม่พบอสุจิในน้ำอสุจิเลย (Martinez et al., 2015) สำหรับการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Y-STR ในการระบุตัวบุคคล ซึ่งเป็นวิธีที่มีความแม่นยำสูงและนับเป็นมาตรฐานในการบ่งชี้ว่าตัวอย่างที่ตรวจสอบมีองค์ประกอบของสารพันธุกรรมและเซลล์ของเพศชาย อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์ Y-STR มีข้อเสียคือ ขั้นตอนทางห้องปฏิบัติการมีความซับซ้อน และใช้เวลาในการตรวจสอบเป็นระยะเวลานาน

ยีนอเมโลจีนินเป็นยีนที่สามารถพบทั้งโครโมโซมเอ็กซ์ที่บริเวณ Xp22.1-Xp22.3 เรียกว่า ยีนอเมโลจีนินเอ็กซ์ และโครโมโซมวายที่บริเวณ Yp11.2 เรียกว่ายีนอเมโลจีนินวาย โดยยีนที่อยู่ในแต่ละโครโมโซมจะมีขนาด และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันเล็กน้อย (Frances et al., 2007) สำหรับดีเอ็นเอเพศชายจะสามารถพบทั้งยีนอเมโลจีนินเอ็กซ์ และวาย ส่วนดีเอ็นเอเพศหญิงจะสามารถพบเฉพาะยีนอเมโลจีนินเอ็กซ์เท่านั้น ดังนั้นการตรวจหาการมีอยู่ของดีเอ็นเอเพศชายจึงตรวจหายีนอเมโลจีนินวายเท่านั้น

เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เป็นวิธีการเพิ่มกรดนิวคลีอิก ซึ่งมีความจำเพาะ และประสิทธิภาพสูง ภายในสภาพอุณหภูมิคงที่ (Notomi et al., 2000) การทำปฏิกิริยาของเทคนิค LAMP จะใช้ไพรเมอร์จำนวน 4-6 ไพรเมอร์ ประกอบด้วย inner primer (FIP และ BIP) และ outer primers (F3 และ B3) นอกจากนี้ยังสามารถเติมลูปไพรเมอร์ (LF และ LB) เพื่อเร่งการเกิดปฏิกิริยาได้ (Nagamine et al., 2002) และสามารถสังเกตผลจากการทำปฏิกิริยาได้ด้วยตาเปล่าโดยดูจากความขุ่นของสารละลายในหลอดที่ใช้ทดสอบ เนื่องจากการเกิดแมกนีเซียมไพโรฟอสเฟต หรือตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส นอกจากนี้ยังสามารถใช้สารสีในการเกิดปฏิกิริยาได้ เช่น hydroxynaphthol blue (HNB) (Jackson et al., 2020)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จากการศึกษาก่อนหน้า โดย Nogami และคณะ มีการใช้เทคนิค LAMP ในการกำหนดเพศจากตัวอย่างเนื้อเยื่อในโพรงประสาทฟันที่สกัดดีเอ็นเอแล้วเก็บไว้ 1-25 ปี ที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้ไพรเมอร์ 4 ชุด ได้แก่ ชุดไพรเมอร์อเมโลจีนินเอ็กซ์ ชุดไพรเมอร์อเมโลจีนินวาย ชุดไพรเมอร์อเมโลจีนินเอ็กซ์รวมกับลูปไพรเมอร์ และชุดไพรเมอร์อเมโลจีนินวายรวมกับลูปไพรเมอร์ ซึ่งผลการศึกษาพบว่าสามารถแยกเพศจากตัวอย่างเนื้อเยื่อในโพรงประสาทฟันได้ และชุดไพรเมอร์ที่มีลูปไพรเมอร์จะใช้เวลาในการตรวจสอบน้อยที่สุด (Nogami et al., 2008) ต่อมาได้มีการนำไพรเมอร์ของ Nogami และคณะ มาใช้ในการศึกษาการตรวจหาอเมโลจีนินวายโลคัสในน้ำซับช่องคลอดในคดีความผิดทางเพศโดยใช้เทคนิค LAMP ซึ่งผลการศึกษาพบว่าในการตรวจตำแหน่งอเมโลจีนินวายโลคัส โดยเทคนิค LAMP แตกต่างจากการตรวจหาอสุจิอย่างมีนัยสำคัญ (ธีระชัย วชิราวิโรจน์ et al., 2556) ต่อมามีการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการใช้ชุดไพรเมอร์ที่มีการเติมลูปไพรเมอร์ 1 ไพรเมอร์ (LF) จากการศึกษาของ Nogami และคณะเทียบกับการใช้ชุดไพรเมอร์ที่มีการเติมลูปไพรเมอร์ 2 ไพรเมอร์ (LF และ LB) ผลการศึกษาพบว่าการใช้ลูปไพรเมอร์ 2 ไพรเมอร์ ทำให้การเกิดปฏิกิริยาของเทคนิค LAMP เร็วกว่าการใช้ลูปไพรเมอร์เพียง 1 ไพรเมอร์ (Scott et al., 2019)

ในการศึกษานี้ ผู้วิจัยได้พัฒนาการตรวจสอบการปรากฏของดีเอ็นเอเพศชายจากตัวอย่างน้ำซับช่องคลอดในคดีข่มขืนกระทำชำเรา โดยใช้เทคนิค LAMP ตรวจสอบที่เครื่องหมายพันธุกรรมตำแหน่งอเมโลจีนินวาย เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีความไว และความจำเพาะสูง และข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถใช้เป็นวิธีทางเลือกในการตรวจตัวอย่างในคดีข่มขืนกระทำชำเราให้สะดวกและมีความจำเพาะมากยิ่งขึ้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อพัฒนาการตรวจหาดีเอ็นเอเพศชายจากตัวอย่างน้ำซับช่องคลอดโดยเทคนิคลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

พัฒนาเทคนิคลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชันและออกแบบไพรเมอร์บริเวณยีนอเมโลจีนินวายให้เหมาะสมสำหรับการตรวจดีเอ็นเอเพศชาย รวมทั้งหาความไวและความจำเพาะของไพรเมอร์ จากนั้นทดลองใช้เทคนิคลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชันตรวจตัวอย่างในคดีข่มขืนกระทำชำเราที่เกิดขึ้นจริงในประเทศไทย

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถใช้เทคนิคลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชันเป็นวิธีทางเลือกในการตรวจตัวอย่างในคดีข่มขืนกระทำชำเราให้สะดวกและมีความจำเพาะมากยิ่งขึ้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การตรวจสอบการข่มขืน

สารคัดหลั่งเพศชาย (semen) คือของเหลวที่สร้างจากอวัยวะสืบพันธุ์เพศชาย มีสีขาวน้ำนม และค่อนข้างขุ่น โดยสีขาวน้ำนมของสารคัดหลั่งเพศชายเกิดจากโปรตีนปริมาณมากภายในสารคัดหลั่ง และความขุ่นมัวของสารคัดหลั่งเกิดจากอสุจิจำนวนมากภายในสารคัดหลั่ง

องค์ประกอบของสารคัดหลั่งเพศชาย

ส่วนประกอบต่าง ๆ ของสารคัดหลั่งเพศชายมีแหล่งกำเนิดที่แตกต่างกัน ซึ่งส่วนประกอบต่าง ๆ จะผสมกันบริเวณท่อปัสสาวะและหลั่งออกสู่ภายนอก โดยแหล่งกำเนิดของสารคัดหลั่งเพศชายประกอบด้วย อัณฑะ ท่ออสุจิ ถุงน้ำเชื้อ ต่อมลูกหมาก ต่อมบัลโบยูรีทรัล และท่อปัสสาวะ สารสำคัญต่าง ๆ ภายในสารคัดหลั่งเพศชาย (Jequier, 2011) ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สารสำคัญต่าง ๆ ที่สามารถตรวจพบได้ในสารคัดหลั่งเพศชาย (Jequier, 2011)

แหล่งที่มา	สารเคมี
อัณฑะ (testis) และท่ออสุจิ (excurrent ducts)	Testosterone
	Inhibin B
	Transferrin
	Ceruloplasmin
	L-carnitine
	Glycerophosphorylcholine
	Inositol
	Lactic dehydrogenase C_4
	Sperm cell
ถุงน้ำอสุจิ (seminal vesicles)	Fructose
	Prostaglandins (PGE_2)
	Seminogelin I and II
	Nitric oxide synthase
ต่อมลูกหมาก (prostate gland)	Prostatic acid phosphatase
	Prostate-specific antigen

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

	Vesiculase
	Spermine
	Citric acid and citratrs
	Zinc, calcium, and megnesium

ค่า pH ของสารคัดหลั่งเพศชาย

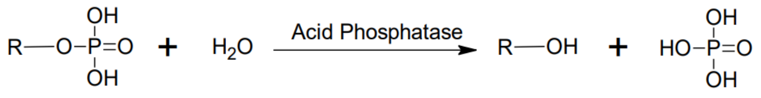
สารคัดหลั่งเพศชายมีค่า pH ระหว่าง 7.2-8.4 ซึ่งเป็นค่า pH ปกติของร่างกาย ถ้าค่า pH ต่ำกว่า 7.2 อาจเกิดจากความเข้มข้นของอสุจิน้อยหรือท่อสืบพันธุ์ผิดปกติ และถ้าค่า pH เกิน 8.4 อาจเกิดจากการติดเชื้อภายในท่อปัสสาวะ (Jequier, 2011)

ปัจจุบันการตรวจสอบคดีข่มขืนทางนิติวิทยาศาสตร์ ประกอบด้วยการตรวจสอบเบื้องต้นจะใช้การทดสอบเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเตส และการตรวจสอบยืนยันจะใช้การตรวจหาอสุจิด้วยกล้องจุลทรรศน์

1. การทดสอบเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเตส (acid phosphatase test)

การทดสอบเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเตส เป็นการตรวจสอบเบื้องต้นเพื่อระบุการมีอยู่ของสารคัดหลั่งเพศชายบนวัตถุพยานในทางนิติวิทยาศาสตร์ โดยเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเตสสามารถพบได้มากในน้ำอสุจิ ซึ่งผลิตจากต่อมลูกหมากของอวัยวะเพศชาย หลักการของการทดสอบแอซิดฟอสฟาเตสจะใช้การเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาเคมีในชุดน้ำยา กล่าวคือ เมื่อนำชุดน้ำยาไปทดสอบกับน้ำอสุจิ เอนไซม์แอซิดฟอสฟาเตสจะเร่งการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของแอลฟาเนปทิลฟอสเฟต (α-naphthyl phosphate) เกิดเป็นสารพวกฟีนอล (naphthol) ซึ่งจะทำปฏิกิริยาต่อกับสารเบนทามีนฟาสบลู (Brentamine Fast Blue) ที่อยู่ในชุดน้ำยา ทำให้เกิดเป็นสีม่วงขึ้นภายในเวลา 60 วินาที (Lewis et al., 2013) ดังรูปที่ 1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูปที่ 1 ปฏิกิริยาการทดสอบเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเตส (Yang et al., 2008)

ข้อดีของการทดสอบด้วยชุดทดสอบเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเตส คือทดสอบง่าย รวดเร็ว และสามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า แต่อย่างไรก็ตามการทดสอบนี้มีข้อเสีย คือสามารถเกิดผลบวกลวงได้เนื่องจากเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเตสสามารถพบได้ในส่วนอื่น ๆ ของร่างกายของทั้งเพศชาย

และเพศหญิง ซึ่งจากผลการศึกษาของ Lewis และคณะ พบว่าชุดน้ำยาสามารถให้ผลบวกในตัวอย่างน้ำซับช่องคลอด และน้ำลายได้ (Lewis et al., 2013)

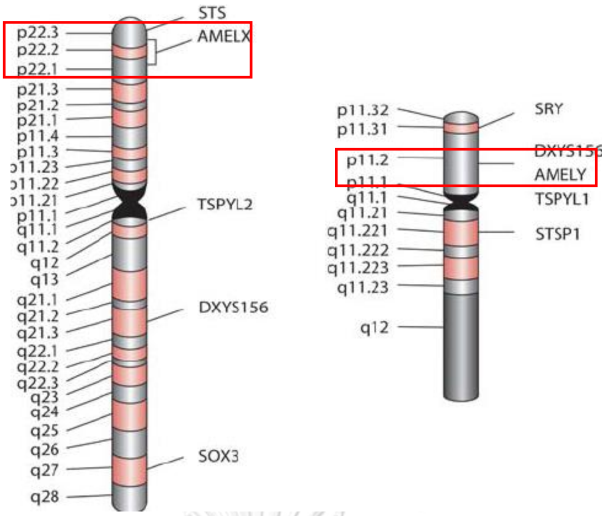
2. การตรวจหาอสุจิด้วยกล้องจุลทรรศน์

การตรวจหาอสุจิด้วยกล้องจุลทรรศน์ เป็นขั้นตอนการตรวจสอบยืนยันการมีอยู่ของอสุจิในพยานหลักฐานซึ่งใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน โดยหลักฐานที่ได้คือหลักฐานจากน้ำซับช่องคลอดของผู้เสียหายหรือวัตถุพยานบริเวณที่เกิดเหตุ นำมาป้ายบนแผ่นสไลด์จากนั้นนำสไลด์มาย้อมสีฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน (H&E) แล้วจึงส่องหาอสุจิด้วยกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งบริเวณหัวของอสุจิจะมีนิวเคลียสจะติดสีน้ำเงิน ส่วนบริเวณไซโทพลาซึมจะติดสีชมพู

แม้ว่ากระบวนการทำงานในการตรวจหาตัวอสุจิด้วยวิธีนี้ไม่มีความซับซ้อน แต่อย่างไรก็ตามการตรวจสอบด้วยวิธีนี้ยังคงเป็นปัญหาเนื่องจากในการตรวจสอบต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญที่มีประสบการณ์ในการดำเนินการเนื่องจากการสังเกตตัวอสุจิทำได้ยาก ในกรณีที่มีปริมาณอสุจิน้อยหรือไม่มีอสุจิผู้ตรวจสอบอาจใช้เวลานานหลายชั่วโมงในการส่องกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งเป็นการสิ้นเปลืองเวลาและทรัพยากรบุคคลเป็นอย่างมาก นอกจากนั้นในบางกรณีผู้ตรวจสอบอาจมีการสังเกตตกหล่นทำให้ผลที่ออกมาผิดพลาด (Riman et al., 2015)

2.2 ยีนอเมโลจีนิน

ยีนอเมโลจีนินสามารถพบได้ทั้งโครโมโซมเอ็กซ์ และโครโมโซมวาย บริเวณตำแหน่ง Xp22.1 - Xp22.3 บนโครโมโซมเอ็กซ์ และ Yp11.2 บนโครโมโซมวาย ดังรูปที่ 2 โดยยีนอเมโลจีนินเอ็กซ์และยีนอเมโลจีนินวายมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายคลึงกัน 89 เปอร์เซ็นต์ (Nakahori et al., 1991) ซึ่งยีนทั้งสองมีบางบริเวณที่ลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกัน และมีการขาดหาย (deletion) หรือเพิ่มขึ้นมาของนิวคลีโอไทด์ (insertion) ดังรูปที่ 3 เป็นการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนอเมอโลจีนินวาย และยีนอเมโลจีนินเอ็กซ์ ซึ่งบริเวณที่ยีนทั้งสองมีนิวคลีโอไทด์เหมือนกันจะมีเครื่องหมาย “ * ” ดังนั้นความแตกต่างระหว่างยีนอเมโลจีนินเอ็กซ์ และยีนอเมโลจีนินวาย สามารถนำมาใช้เป็นเครื่องหมายในการระบุเพศในทางนิติวิยาศาสตร์ได้ (Butler andLi, 2014) เนื่องจากยีนอเมโลจีนินเอ็กซ์ สามารถพบได้ทั้งเพศหญิงและเพศชาย แต่ยีนอเมโลจีนินวายสามารถพบได้เฉพาะเพศชายเท่านั้น



รูปที่ 2 ตำแหน่งของยีนอเมโลจีนินเอ็กซ์บนโครโมโซม Xp22.1 - Xp22.3 (ภาพซ้าย) และ ยีนอเมโลจีนินวายบนโครโมโซม Yp11.2 (ภาพขวา) (Butler andLi, 2014)

```
AMELY      TGATTTGCTCAGTGGCTTAAGGTATGGTTATTAGTTGACGTTATGGTGAAGTTTTTCTGG      1216
AMELX      GAATGCTATTTGTGCCATAATCGATTTGAACCAGCCCCGCTATTGGTAGACATTTTGTTT      1276
             **    *  *** * ***   **    *  **      *  ****  *  **** *

AMELY      GGACTGTGATACCAGGTAGGTTAATGCCCCCAGTAGCAGTGGTACATCAAGCATCCCTGT      1276
AMELX      TAAATGTTACTTCATA-----------GGCCAGGCGCAGTGGCTCATGC-----CTGTAA      1320
             * *** *   **               ****  *******  ***       *  *

AMELY      TCATAGCCATCAATGCAGCTTAAACAGGCACCAATGTTACTGGGTCCTGGAAAGTCAATT      1336
AMELX      TCCCAGCACTTTGGGAGGCCGAGGCAGGCA-----GATCATGAGGTCAGGAGATGGAGAC      1375
           **  ***  *    *  **  *  ******     * *  ** *  * *** *   *

AMELY      CTTGGACCACTGGACGGCTTGTTTAGACACTGGTAGTGAGAGCAATGATCTGGGTGGCTA      1396
AMELX      CATC-----CTGGACAACATGGTGAAACCCCGTCTCTACTAAAAATATAAAAATAAGCTG      1430
           * *      ******  * ** * * ** * *    *   *  ***          ***

AMELY      GGTGGATTCTCAGGTCCCCGTCCAGCTGGTATGATATATGTTATAGCAGTACCAGTGGTG      1456
AMELX      GGCATGGTGGCATGTGCCTGTAATCC----------------------------------      1456
           **     *  ** ** ** **    *
```

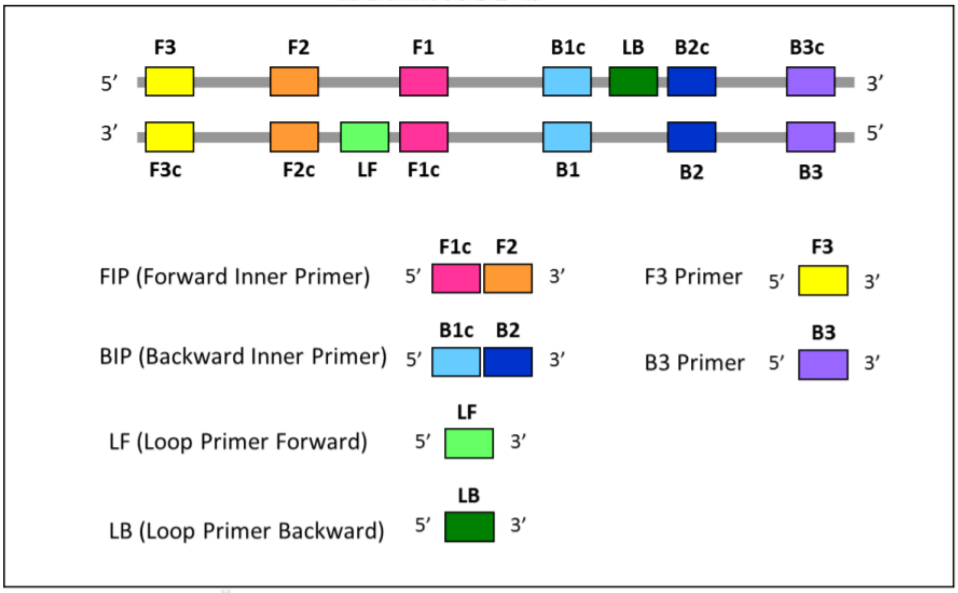
รูปที่ 3 ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีนอเมโลจีนินวายเทียบกับยีนอเมโลจีนินเอ็กซ์

2.3 **เทคนิคลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน** (Loop-Mediated Isothermal Amplification: LAMP)

เทคนิค LAMP ถูกคิดค้นโดย Tsugunori Notomi และคณะใน ค.ศ. 2000 ซึ่งมีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างรวดเร็ว โดยมีความจำเพาะ และมีประสิทธิภาพสูง ภายใต้อุณหภูมิคงที่ตลอดการทำปฏิกิริยาในช่วงอุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส ดังนั้นในการใช้เทคนิค LAMP เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจึงไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (thermal cycler) ในการปรับอุณหภูมิ โดยการทำปฏิกิริยาของเทคนิค LAMP ใช้ไพรเมอร์ 4-6 ไพรเมอร์ จับบริเวณดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งผลจากการ

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค LAMP จะได้สายดีเอ็นที่มีลักษณะโครงสร้างแบบดัมเบล (dumbbell structure) (Notomi et al., 2000)

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาในเทคนิค LAMP มีทั้งหมด 6 ตัว ซึ่งถูกออกแบบให้จำเพาะกับยีนเป้าหมาย ประกอบด้วย F3 (forward primer), B3 (backward primer), FIP (forward inner primer), BIP (backward inner primer), FL (loop primer forward) และ BL (loop primer backward) ดังรูปที่ 4 โดยไพรเมอร์ FL และ BL ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาของเทคนิค LAMP ให้เกิดได้ไวขึ้น ซึ่งจะมีหรือไม่มีในการทำปฏิกิริยาก็ได้



รูปที่ 4 ไพรเมอร์ในเทคนิค LAMP (Montrasio, 2015)

CHULALONGKORN UNIVERSITY

ปัจจัยหลักในการออกแบบไพรเมอร์ในเทคนิค LAMP มีดังนี้ (Eiken Chemical : online)

1. Melting temperature (Tm)

ค่า Tm คือ อุณหภูมิที่ทำให้ครึ่งหนึ่งของดีเอ็นเอแยกตัวออกจากกันกลายเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว ซึ่งค่า Tm ของไพรเมอร์จะส่งผลต่อความสเถียรของการเข้าคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ และยังมีผลต่อความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยค่า Tm ที่เหมาะสมแก่ไพรเมอร์แต่ละตำแหน่ง ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 Tm ที่เหมาะสมของแต่ละไพรเมอร์ในเทคนิค LAMP

ไพรเมอร์	**Tm (°C)**
F1c, B1c	64 - 66
F2, B2	59 - 61
F3, B3	59 - 61
FIP, BIP	64 - 66
LF, LB	61 - 63

2. ความยาวของไพรเมอร์

ความยาวที่เหมาะสมสำหรับไพรเมอร์ที่ใช้โดยทั่วไปคือ 18 – 22 คู่เบส ซึ่งเป็นความยาวที่พอเหมาะสำหรับการจับของไพรเมอร์บริเวณดีเอ็นเอแม่แบบ

ความยาวของไพรเมอร์ส่งผลโดยตรงต่อค่า Tm ของไพรเมอร์ ขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของคู่เบส โดยความยาวของไพรเมอร์สามารถยาวมากขึ้นได้ในบริเวณที่คู่เบส AT สูง หรือสามารถสั้นลงได้ในบริเวณที่มีคู่เบส GC สูง เพื่อให้ได้ค่า Tm ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา LAMP

3. สัดส่วน GC (GC content)

สัดส่วนเบส GC ที่เหมาะสมสำหรับไพรเมอร์ควรมีค่าระหว่าง 40% - 65% โดยสัดส่วนเบส GC ส่งผลให้ได้ไพรเมอร์ที่ดีมีค่าระหว่าง 50% - 60%

4. โครงสร้างรองของไพรเมอร์ (primer secondary structures)

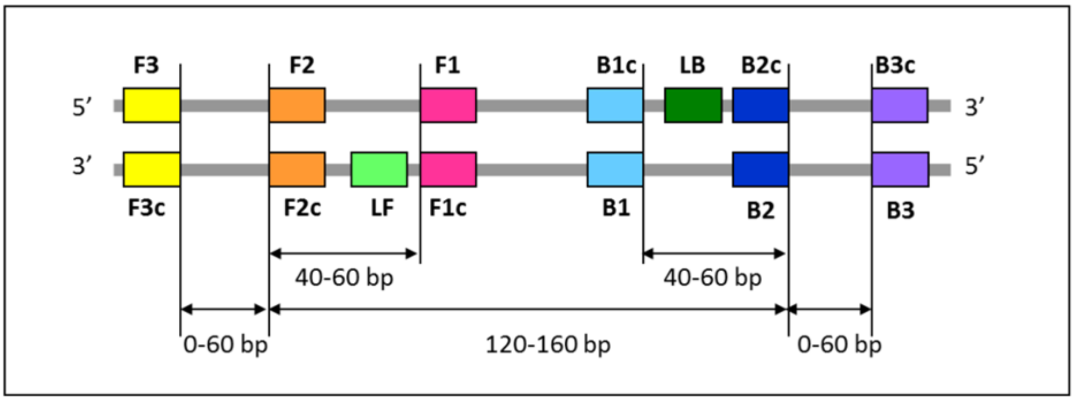
สำหรับ LAMP ไพรเมอร์ โดยเฉพาะบริเวณ FIB และ BIP ควรได้รับการออกแบบให้หลีกเลี่ยงการก่อตัวของโครงสร้างรอง (secondary structures) ซึ่งการเกิดโครงสร้างรองของไพรเมอร์ส่งผลโดยตรงต่อการทำปฏิกิริยาของไพรเมอร์

โครงสร้างรองของไพรเมอร์เกิดจากปฏิสัมพันธ์ภายในโมเลกุลของไพรเมอร์ โดยความเสถียรของโครงสร้างรองของไพรเมอร์แทนด้วยค่า ΔG ซึ่งเป็นค่าของพลังงานที่ต้องการสำหรับทำลายโครงสร้างรองของไพรเมอร์ โดยค่า ΔG ที่มีค่าติดลบมากแสดงให้เห็นถึงความเสถียรของไพรเมอร์

5. ระยะห่างระหว่างไพรเมอร์

ในการออกแบบไพรเมอร์ต้องคำนึงถึงระยะห่างระหว่างไพรเมอร์ เพื่อให้สัมพันธ์กับขนาดผลจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอซึ่งอยู่ในรูปแบบดัมเบล โดยระยะห่างระหว่างที่เหมาะสมประกอบด้วย

ระยะห่างระหว่างปลาย 5’ ของ F2/B2 และ F1c/B1c เท่ากับ 40-60 นิวคลีโอไทด์ ระยะห่างระหว่างปลาย 3’ ของ F3/B3 และปลาย 5’ ของ F2/B2 เท่ากับ 0-60 นิวคลีโอไทด์ และระยะห่างระหว่างปลาย 5’ ของ F2 และ B2 เท่ากับ 120-160 นิวคลีโอไทด์ ดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 ระยะห่างที่เหมาะสมระหว่างไพรเมอร์ของเทคนิค LAMP (Montrasio, 2015)

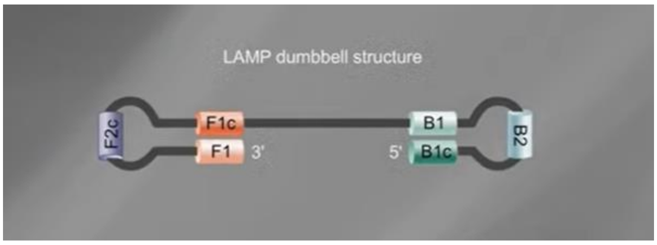
การเกิดปฏิกิริยาของเทคนิค LAMP ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ 1.) starting material initial step 2.) cycling amplification step และ 3.) elongation and recycling step (Notomi et al., 2000)

1. Starting material initial step

การเกิดปฏิกิริยาของเทคนิค LAMP เริ่มจากการเติมเอนไซม์ ซึ่งทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 60 – 65 °C เพื่อใช้ในการแยกสายดีเอ็นเอสายคู่เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว จากนั้นไพรเมอร์ BIP ด้าน B2 เข้าจับกับบริเวณ B2c บนสายดีเอ็นเอเป้าหมายและทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากด้าน 3’ ไปยัง 5’ จากนั้นไพรเมอร์ B3 จะมาจับบริเวณ B3c แล้วทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากด้าน 3’ ไปยัง 5’ แทนที่สายดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์จากไพรเมอร์ BIP โดยสายดีเอ็นเอที่สังเคราะห์โดยไพรเมอร์ BIP บริเวณด้าน 5’ จะทำการจับกันเป็น loop ระหว่างบริเวณ B1 กับ B1c

จากนั้นไพรเมอร์ FIP ด้าน F2 จะเข้าจับบริเวณ F2c บนสายดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ BIP และทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากด้าน 3’ ไปยัง 5’ จากนั้นไพรเมอร์ F3 จะมาจับบริเวณ F3c แล้วทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากด้าน 3’ ไปยัง 5’ แทนที่สายดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์จากไพรเมอร์ FIP โดยสายดีเอ็นเอที่สังเคราะห์โดยไพรเมอร์ FIP บริเวณด้าน 5’ จะทำการจับกันเป็น

loop ระหว่างบริเวณ F1 กับ F1c เกิดเป็นสายดีเอ็นเอที่มีโครงสร้างเหมือนดัมเบล (Dumbbell-like structure) ดังรูปที่ 6



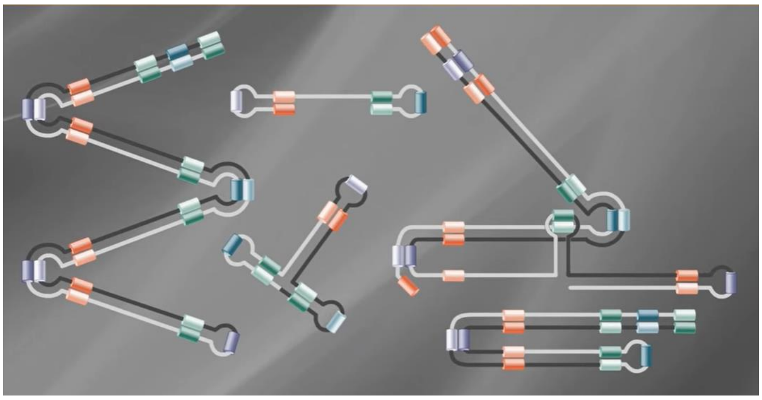
รูปที่ 6 โครงสร้างดีเอ็นเอในขั้นตอน initial ที่มีลักษณะเหมือนดัมเบล (dumbbell-like structure) (New England BioLabs, 2015 : online)

2. Cycling amplification step

เมื่อได้ดีเอ็นเอที่มีโครงสร้างเหมือนดัมเบลจากการสังเคราะห์ในช่วงแรก ไพรเมอร์ด้าน B1 จะทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากด้าน 3’ ไปยังด้าน 5’ ทำให้สายดีเอ็นเอด้าน 5’ ที่ขดตัวเป็น loop จากนั้นไพรเมอร์ BIP และ FIP จะเข้ามาจับบริเวณ B2 และ F2 ตามลำดับและทำการสังเคราะห์ DNA เป็นวัฏจักรอย่างต่อเนื่อง ทำให้ได้สายดีเอ็นเอที่มีลักษณะเหมือนดัมเบลเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง

3. Elongation and recycling step

ขั้นตอนนี้เป็นการเกิดปฏิกิริยาซ้ำอย่างต่อเนื่องจากการสังเคราะห์สายดีเอของไพรเมอร์ BIP และ FIP เกิดเป็นสายดีเอ็นที่มีโครงสร้างดัมเบลที่ต่อกันหลายข้อ และสามารถเกิดการสังเคราะห์ต่อไปอย่างต่อเนื่อง ทำให้ได้ผลผลิตจากการเกิดปฏิกิริยาของเทคนิค LAMP ปริมาณมากในเวลารวดเร็ว และมีหลากหลายขนาดขึ้นอยู่กับจำนวนข้อที่ต่อกัน ดังรูปที่ 7

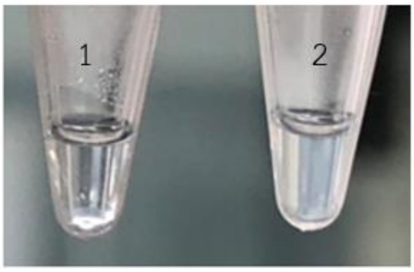


รูปที่ 7 ผลจากการเกิดปฏิกิริยาของเทคนิค LAMP พบว่ามีดีเอ็นเอหลากหลายขนาด (New England BioLabs, 2015 : online)

การเกิดปฏิกิริยาของเทคนิค LAMP เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปจะทำให้เกิดตะกอนสีขาวขุ่นจากการเกิดแมกนีเซียมไพโรฟอสเฟต ($Mg_2P_2O_7$) ซึ่งสามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า ดังรูปที่ 8 และสมการต่อไปนี้ (Jackson et al., 2020)

1.) $(DNA)_n + dNTPs + Me^{2+} \rightarrow (DNA)_{n+1} + Me_2P_2O_7$

2.) $2Mg^{2+} + (p_2O_7)^{4-} \rightarrow Mg_2P_2O_7 \downarrow$



รูปที่ 8 ผลการเกิดปฏิกิริยาของเทคนิค LAMP สามารถสังเกตตะกอนสีขาวขุ่นได้ด้วยตาเปล่า (หลอดที่ 1 แสดงตัวอย่างควบคุมลบ และหลอดที่ 2 แสดงตัวอย่างควบคุมบวก)

การตรวจสอบผลการเกิดปฏิกิริยาของเทคนิค LAMP ด้วยสารสี

1. Hydroxynaphthol blue (HNB): สารสี HNB ถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบปฏิกิริยาของเทคนิค LAMP จากการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแมกนีเซียมไอออน โดยสีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีม่วงไปเป็นสีฟ้าเมื่อความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออนลดลงจากการรวมตัวกับไพโรฟอสเฟตเกิดเป็นแมกนีเซียมไพโรฟอสเฟต (Goto et al., 2009)

2. Calcein: ในสภาวะปกติสารสี calcein จะจับกับแมงกานีสไอออน ในช่วงนี้สารละลายยังคงมีสีเหลือง เมื่อเติม dNTPs เพื่อเริ่มการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค LAMP พร้อมกับทำการกระตุ้นด้วยแสง UV ทำให้แมงกานีสไอออนหลุดออกและแมกนีเซียมไอออนจะเข้ามาจับกับ calcein แทน ทำให้สีของสารละลายเปลี่ยนจากสีส้มเหลืองเป็นสีเขียว (Tomita et al., 2008)

3. Phenol red: สารสี phenol red เป็นสารสีที่มีการเปลี่ยนสีตาม pH ของสารละลาย ในช่วงก่อนเกิดการทำปฏิกิริยาแมกนีเซียมไอออนในสารละลายส่งผลให้สารละลายมีสภาวะเป็นเบสส่งผลให้ฟีนอลเรดมีสีชมพู หลังจากการเกิดปฏิกิริยาของเทคนิค LAMP แมกนีเซียมไอออนจะจับกับไพโรฟอสเฟตเกิดเป็นแมกนีเซียมไพโรฟอสเฟตซึ่งเป็นกลางส่งผลให้ค่า pH ของสารละลายลดลง สีของฟีนอลเรดจึงเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีเหลือง (Scott et al., 2019)

2.4 การวิเคราะห์ Y-STR

เอสทีอาร์ (short tandem repeat, STR) หรือ ไมโครแซตเทลไลต์ (microsatellite) คือส่วนของดีเอ็นเอบริเวณที่มีการเรียงตัวของลำดับเบสซ้ำมีความยาวประมาณ 1-6 คู่เบส โดยแต่ละบุคคลจะมีจำนวนการซ้ำของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน ซึ่งจำนวนที่แตกต่างกันดังกล่าวถูกนำมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการตรวจสอบทางนิติวิทยาศาสตร์ในการระบุตัวผู้ต้องสงสัยจากหลักฐานพยานทางชีวภาพ (Roewer, 2019) ในปัจจุบันเอสทีอาร์สามารถตรวจได้ทั้งออโตโซม (autosomal STR) โครโมโซมเอ็กซ์ (X-STR) และโครโมโซมวาย (Y-STR)

การตรวจ STR บนโครโมโซมวาย (Y-STR) ในชุดน้ำยาสำเร็จรูปของแต่ละบริษัท อาจจะมีจำนวนและตำแหน่งที่แตกต่างกันไป เช่นชุดน้ำยา Yfiler™ Plus PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, USA) มี 25 ตำแหน่ง และชุดน้ำยา PowerPlex® Y23 System (Promega, USA) มี 22 ตำแหน่ง เป็นต้น ซึ่งประโยชน์ของการตรวจ Y-STR มีดังนี้ (ฤกษ์อำนวยโชค, 2561)

1. ใช้ตรวจความสัมพันธ์ญาติร่วมสายบิดาเดียวกัน
2. ใช้ตรวจทดสอบเพิ่มเติมกรณีการตรวจดีเอ็นเอบนออโตโซมมีข้อจำกัดบางประการ เช่น มีการกลาย (mutation)
3. ใช้ในคดีล่วงละเมิดทางเพศที่ตัวอย่างส่งตรวจมีการปะปนกันระหว่างดีเอ็นเอของเหยื่อผู้หญิงและผู้ต้องสงสัยผู้ชาย หรือมีดีเอ็นเอของผู้ชายน้อยเนื่องจากมีความจำเพาะกับดีเอ็นเอเพศชาย
4. ใช้ในคดีล่วงละเมิดทางเพศกรณีที่มีผู้ต้องสงสัยหลายคนร่วมกันในการก่อคดี (multiple rape case)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

5. สามารถตรวจในพยานวัตถุที่สกัดดีเอ็นเอได้ในปริมาณน้อย เช่น เศษผิวหนังในซอกเล็บ คราบน้ำลายบนผิวหนัง คราบน้ำอสุจิ

สำหรับความไว (sensitivity) ของการวิเคราะห์ Y-STR ด้วยชุดน้ำยา Yfiler™ Plus PCR Amplification Kit พบว่า ความเข้มข้นดีเอ็นเอตั้งต้นมากกว่าหรือเท่ากับ 0.25 นาโนกรัม จะสามารถวิเคราะห์ Y-STR ได้ทุกตำแหน่ง (full profile) และความเข้มข้นดีเอ็นเอตั้งต้นมากกว่า 0.031 นาโนกรัม จะสามารถวิเคราะห์ Y-STR ได้บางตำแหน่ง (partial profile) (Watahiki et al., 2017) และชุดน้ำยา PowerPlex® Y23 System พบว่า ความเข้มข้นดีเอ็นเอตั้งต้นมากกว่าหรือเท่ากับ 0.125 นาโนกรัม จะสามารถวิเคราะห์ Y-STR ได้ทุกตำแหน่ง (full profile) และความเข้มข้นดีเอ็นเอตั้งต้นมากกว่า 0.0312 นาโนกรัม จะสามารถวิเคราะห์ Y-STR ได้บางตำแหน่ง (partial profile) (Thompson et al., 2013)

2.5 การศึกษาการประยุกต์ใช้เทคนิค LAMP ในทางนิติวิทยาศาสตร์

1. การระบุเพศจากตัวอย่างเนื้อเยื่อในโพรงประสาทฟันโดยเทคนิคลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน (Nogami et al., 2008)

งานวิจัยฉบับนี้ Nogami และคณะทำการศึกษาการนำเทคนิค LAMP มาประยุกต์ใช้ในการระบุเพศจากตัวอย่างเนื้อเยื่อในโพรงประสาทฟัน (dental pulp) จำนวน 32 ตัวอย่างที่สกัดดีเอ็นเอแล้วเก็บไว้ 1-25 ปี ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งการศึกษานี้ได้ทำการออกแบบไพรเมอร์โดยมีบริเวณเป้าหมายบริเวณยีนอเมโลจีนินเอ็กซ์ และยีนอเมโลจีนินวาย จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยา LAMP ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ผลการศึกษาพบว่าการระบุเพศของตัวอย่างเนื้อเยื่อในโพรงประสาทฟัน จำนวน 32 ตัวอย่างถูกต้องทั้งหมด และเวลาเฉลี่ยที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาของชุดไพรเมอร์ Amel-X ชุดไพรเมอร์ Amel-X + loop ชุดไพรเมอร์ Amel-Y และชุดไพรเมอร์ Amel-Y + loop เท่ากับ 50.5 31.7 52.1 และ 33.5 นาทีตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการเติม Loop primer ช่วยเร่งการเกิดปฏิกิริยาได้เร็วขึ้น

2. การคัดกรองดีเอ็นเอเพศชายจากการเปลี่ยนสีด้วยเทคนิคลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน (Scott et al., 2019)

งานวิจัยฉบับนี้ Scott และคณะทำการนำชุดไพรเมอร์ Amel-Y + loop จากการศึกษาของ Nogami และคณะ เปรียบเทียบกับไพรเมอร์ที่ได้ทำการออกแบบใหม่โดยใช้ตำแหน่งใกล้เคียงกันบนยีนอเมโลจีนินวาย โดยตั้งชื่อชุดไพรเมอร์ว่า ID50-82 ซึ่งไพรเมอร์ทั้งสองชุดมีความแตกต่างกันคือ

ชุดไพรเมอร์ของ Nogami และคณะมีการเติม loop forward primer เท่านั้น แต่ชุดไพรเมอร์ ID50-82 มีการเติมทั้ง loop forward primer และ loop backward primer

ผลการศึกษาพบว่าชุดไพรเมอร์ ID50-82 มีความไวสูงกว่าชุดไพรเมอร์ของ Nogami และคณะ โดยสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 400 พิโคกรัม ภายในเวลา 30 นาที ซึ่งชุดไพรเมอร์ของ Nogami และคณะใช้เวลาถึง 45 นาที ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าการเติม loop primer ทั้ง loop forward primer (LF) และ loop backward primer (LB) มีผลต่อการเร่งให้ปฏิกิริยาเกิดได้ไวขึ้น

3. การระบุของเหลวจากร่างกายมนุษย์ด้วยเทคนิคลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน (Jackson et al., 2020)

งานวิจัยฉบับนี้ Jackson และคณะนำเทคนิค RT-LAMP มาใช้ในการตรวจสอบเบื้องต้นในการจำแนกประเภทของตัวอย่างทางชีวภาพ ได้แก่ เลือด น้ำลาย อสุจิ และน้ำซับช่องคลอด โดยใช้เอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ที่สกัดจากตัวอย่างเพื่อหลีกเลี่ยงการใช้ดีเอ็นเอ ซึ่งทำให้ดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างทั้งหมดสามารถใช้ในการตรวจสอบยืนยันในขั้นตอนถัดไปได้ โดยงานวิจัยนี้ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะของแต่ละของเหลว กล่าวคือ ออกแบบไพรเมอร์สำหรับตัวอย่างเลือดบริเวณยีน *Human B-globin* (*HBB*) ตัวอย่างน้ำลายบริเวณยีน *histatin-3 precursor* (*HTN3*) ตัวอย่างอสุจิบริเวณยีน *human semenogelin-1-precursor* (*SEMG1*) และตัวอย่างน้ำซับช่องคลอดบริเวณยีน *human beta-defensins* (*HBD-1*) จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยา RT-LAMP ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มข้นของตัวอย่างแต่ละชนิดแตกต่างกัน เป็นเวลา 15, 30 และ 45 นาที

ผลจากการศึกษาพบว่าตัวอย่างเลือดมีความไวในการตรวจสอบมากที่สุดโดยสามารถตรวจสอบได้ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 312.5 pg/μl ภายในเวลา 30 นาที ตัวอย่างอสุจิสามารถตรวจสอบได้ที่ความเข้มข้น 1.25 ng/μl ภายในเวลา 45 นาที ตัวอย่างน้ำลายสามารถตรวจสอบได้ที่ความเข้มข้น 1.25 ng/μl ภายในเวลา 45 นาที และตัวอย่างน้ำซับช่องคลอดสามารถตรวจสอบได้ที่ความเข้มข้น 6.25 ng/μl ภายในเวลา 45 นาที ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเทคนิค RT-LAMP มีความไวในการตรวจสอบสูง สามารถใช้ตรวจสอบในกรณีที่ตัวอย่างมีความเข้มข้นของเอ็มอาร์เอ็นเอต่ำได้

ดังที่กล่าวมาข้างต้น จะเห็นว่าเทคนิคลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชันมีความไวและความจำเพาะในการเกิดปฏิกิริยาสูง โดยใช้อุณหภูมิคงที่ตลอดการทำปฏิกิริยา จึงไม่ต้องการเครื่องมือที่ซับซ้อนในการทำงาน และสามารถใช้สารสีในการติดตามการเกิดปฏิกิริยาด้วยตาเปล่าได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาการนำเทคนิคลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชันมาใช้ในกาตรวจสอบเบื้องต้นเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอเพศชายจากวัตถุพยานในคดีข่มขืนกระทำชำเรา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

1. เครื่องเขย่าสาร (Vortex-Genie 2) (Scientific Industries, USA)
2. เครื่องนึ่งสำหรับฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (Autoclave)
3. เครื่องปั่นเหวี่ยงสาร (Microcentrifuge) (Eppendorf, Germany)
4. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermal cyclers) (Applied Biosystems, USA)
5. เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม Quantus™ Fluorometer (Promega, USA)
6. เครื่อง QIAxcel Advanced (Qiagen, Germany)
7. เครื่อง ThermoMixer (Eppendorf, Germany)
8. เครื่อง 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA)
9. ตู้ปลอดเชื้อ
10. ไมโครปิเปต (Eppendorf, Germany)

3.2 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. DynaMag™-2 Magnet (Invitrogen, USA)
2. Microcentrifuge tube 1.5 ml
3. PCR-COOLER TUBE RACK (Eppendorf, Germany)
4. PCR® Tube Racks
5. PCR tubes/ strip/ plate 0.2 ml
6. Pipette tip; 10 ul, 200 ul, 1000 ul
7. ถุงมือยางพารา
8. ใบมีดผ่าตัด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. สารเคมีสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ และวัดความเข้มข้นดีเอ็นเอ
    - ชุดสกัดสำเร็จรูป PrepFiler® Forensic DNA Extraction Kit (Applied Biosystems, USA)
    - ชุดน้ำยา QuantiFluor® ONE dsDNA System (Promega, USA)
2. สารเคมีสำหรับการทดสอบความจำเพาะ
    - ดีเอ็นเอดีเอ็นเอหนูเม้าส์ (*Mus musculus* สายพันธุ์ ICR Swiss mice) (Merck, Germany)
    - ดีเอ็นเอหนูแรท (*Rattus norvegicus*) (Eurofins GeneScan, Germany)
    - ดีเอ็นเอหมู (*Sus scrofa domestica*) (Eurofins GeneScan, Germany)
3. สารเคมีสำหรับเทคนิคลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน
    - ชุดน้ำยา WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix with UDG (New England Biolabs, USA)
    - ไพรเมอร์ (Forward Primer, Backward Primer, Forward Inner Primer, Backward Inner Primer, Loop-forward Primer และ Loop-backward Primer)
4. สารเคมีสำหรับ QIAxcel
    - ชุดน้ำยา QIAxcel DNA High Resolution Kit (Qiagen, Germany)
5. สารเคมีสำหรับเทคนิค STR
    - ชุดน้ำยา Yfiler™ Plus PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, USA)
    - ชุดน้ำยา PowerPlex® Y23 System (Promega, USA)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.4 วิธีดำเนินการวิจัย

1. ค้นคว้าเอกสารและข้อมูลที่เกี่ยวข้อง

2. ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษาคือตัวอย่างเยื่อบุกระพุ้งแก้มจากอาสาสมัครเพศชาย จำนวน 5 คน และเพศหญิง จำนวน 5 คน และตัวอย่างน้ำซับช่องคลอดจากวัตถุพยานในการกระทำความผิดทางเพศ

จำนวน 92 ตัวอย่าง ประกอบด้วยตัวอย่างที่ได้รับการตรวจสอบโดยวิธีแอซิดฟอสฟาเตส และการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ได้ผลบวกทั้งสองวิธี จำนวน 12 ตัวอย่าง การตรวจสอบโดยวิธีแอซิดฟอสฟาเตสได้ผลบวก ในขณะที่การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ได้ผลลบ จำนวน 48 ตัวอย่าง การตรวจสอบโดยวิธีแอซิดฟอสฟาเตสได้ผลลบ ในขณะที่การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ได้ผลบวก จำนวน 4 ตัวอย่าง และการตรวจสอบโดยวิธีแอซิดฟอสฟาเตส และการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ได้ผลลบทั้งสองวิธี จำนวน 28 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 3 โดยตัวอย่างทั้งหมดได้รับจากห้องปฏิบัติการหน่วยเซโรวิทยาและดีเอ็นเอ ภาควิชานิติเวชศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ระหว่างเดือนธันวาคม พ.ศ. 2563 ถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2564 ซึ่งตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาได้รับอนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (IRB No. 115/64)

ตารางที่ 3 ตัวอย่างน้ำซับช่องคลอดจากวัตถุพยานที่ได้รับการตรวจสอบผลโดยวิธีแอซิดฟอสฟาเตสและการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ จำนวน 92 ตัวอย่าง (+ = ตรวจพบ, - = ตรวจไม่พบ)

การทดสอบแอซิดฟอสฟาเตส	การส่องกล้องจุลทรรศน์	ทั้งหมด (92 ตัวอย่าง)
+	+	12
	-	48
-	+	4
	-	28

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3. การออกแบบไพรเมอร์สำหรับเทคนิคลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน

ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอเมโลจีนินวาย (NG_008011.1) โดยใช้โปรแกรม LAMP Designer 1.16 (http://www.optigene.co.uk/lamp-designer/) ซึ่งกำหนดพารามิเตอร์ดังนี้ ความยาว : 18-22 นิวคลีโอไทด์ ค่า Tm ของไพรเมอร์ F1c และ B1c : 65 ± 2 องศาเซลเซียส ค่า Tm ของไพรเมอร์ F3 F2 B3 และ B2 : 60 ± 2 องศาเซลเซียส ค่า Tm ของไพรเมอร์ LF และ LB : 62 ± 2 องศาเซลเซียส ระยะห่างระหว่างปลาย 5’ ของ F2 และ B2 : 120-180 นิวคลีโอไทด์ ระยะห่างระหว่างปลาย 5’ ของ F2/B2 และ F1c/B1c : 40-60 นิวคลีโอไทด์ ระยะห่างระหว่างปลาย 3’ ของ F3/B3 และปลาย 5’ของ F2/B2 : 0-60 นิวคลีโอไทด์ และ %GC : 40-65

4. การสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างเยื่อบุกระพุ้งแก้มของอาสาสมัครทั้งเพศชายและเพศหญิง รวมถึงตัวอย่างน้ำซับช่องคลอดจากวัตถุพยานมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป PrepFiler Forensic DNA Extraction (Applied Biosystems, USA) จากนั้นนำดีเอ็นเอปริมาตร 2 ไมโครลิตร มาวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยา QuantiFluor® ONE dsDNA System (Promega, USA) และเก็บหลอดทดลองที่บรรจุดีเอ็นเอไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

5. การตรวจสอบการปรากฏของสารพันธุกรรมในตำแหน่งอเมโลจีนินวายด้วยเทคนิคลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน

ตรวจสอบตำแหน่งเครื่องหมายพันธุกรรมอเมโลจีนินวายด้วยเทคนิคลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชันกับดีเอ็นเอจากเยื่อบุกระพุ้งแก้มด้วยชุดน้ำยา WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix with UDG (New England Biolabs, USA) ซึ่งจะทำการปรับสภาวะของการทำปฏิกิริยาจนได้สภาวะและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา ผลจากการตรวจสอบด้วยสารสีฟีนอลเรดพบว่าดีเอ็นเอจากเพศชายจะเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีเหลือง ส่วนดีเอ็นเอเพศหญิงจะไม่มีการเปลี่ยนสี (สีชมพู) และผลจากเครื่อง QIAxcel จะพบแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างเพศชาย และไม่พบแถบดังกล่าวในตัวอย่างจากเพศหญิง

6. การทดสอบความไวของเทคนิคลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน

6.1 เตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอของเพศชายจากเยื่อบุกระพุ้งแก้ม ที่ปริมาณดีเอ็นเอ 1, 0.1, 0.01 และ 0.001 นาโนกรัม

6.2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่งเครื่องหมายพันธุกรรมอเมโลจีนินวายด้วยเทคนิคลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน โดยใช้ชุดน้ำยา WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix with UDG (New England Biolabs, USA) จากตัวอย่างในข้อ 6.1 อย่างละ 3 ซ้ำ เป็นเวลา 30 และ 45 นาที ตามลำดับ

6.3 ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยสารสีฟีนอลเรด และเครื่อง QIAxcel (Qiagen, 2017)

7. การทดสอบความจำเพาะของเทคนิคลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน

7.1 เตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอหนูเม้าส์ (*Mus musculus* สายพันธุ์ ICR Swiss mice) ดีเอ็นเอหนูแรด (*Rattus norvegicus*) ดีเอ็นเอหมู (*Sus scrofa domestica*) ดีเอ็นเอมนุษย์เพศชาย และดีเอ็นเอมนุษย์เพศหญิง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

7.2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่งเครื่องหมายพันธุกรรมอเมโลจีนินวายด้วยเทคนิคลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน โดยใช้ชุดน้ำยา WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix with UDG (New England Biolabs, USA) จากตัวอย่างในข้อ 7.1 อย่างละ 3 ซ้ำ

7.3 ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยสารสีฟีนอลเรด และเครื่อง QIAxcel

8. การทดสอบแบบอำพราง (blind test)

8.1 เตรียมตัวอย่างของเหลว ได้แก่ เลือดและน้ำลายจากเพศชายและหญิง และน้ำอสุจิจากเพศชาย ด้วยอัตราส่วนต่าง ๆ

8.2 เตรียมหลอดทดลอง 10 หลอด โดยให้นักวิจัยอีกท่านทำการหยดของเหลวในร่างกายจากข้อ 8.1 ลงในหลอดทดลอง โดยที่ผู้วิจัยไม่ทราบส่วนประกอบของของเหลวในแต่ละหลอด

8.3 ผู้วิจัยนำหลอดทดลองทั้ง 10 หลอดมาทำการสกัดและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน โดยใช้ชุดน้ำยา WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix with UDG (New England Biolabs, USA) แล้วนำมาตรวจสอบผลด้วยสารสีฟีนอลเรด และเครื่อง QIAxcel จากนั้นจึงทายผลว่าในแต่ละหลอดมีดีเอ็นเอเพศชายหรือไม่

9. การทดสอบการปรากฏของสารพันธุกรรมในตำแหน่งอเมโลจีนินวายจากตัวอย่างน้ำซับช่องคลอดด้วยเทคนิคลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน

9.1 เตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอน้ำซับช่องคลอดจากวัตถุพยาน จำนวน 92 ตัวอย่าง

9.2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่งเครื่องหมายพันธุกรรมอเมโลจีนินวายด้วยเทคนิคลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชันโดยใช้ชุดน้ำยา WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix with UDG (New England Biolabs, USA) เป็นเวลา 30 ถึง 45 นาที กล่าวคือถ้าที่เวลา 30 นาทีหลังทำปฏิกิริยา พบตัวอย่างที่มีการเปลี่ยนสีจากสีชมพูไปเป็นสีส้ม (transition color) จะให้ปฏิกิริยาดำเนินต่อไปจนถึง 45 นาทีแล้วอ่านผล

9.3 ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยใช้สารสีฟีนอลเรด และเครื่อง QIAxcel

10. การทดสอบการปรากฏของสารพันธุกรรมในตำแหน่งอเมโลจีนินวายจากตัวอย่างน้ำซับช่องคลอดด้วยการวิเคราะห์ Y-STR (เพื่อยืนยันความถูกต้องของเทคนิค LAMP)

10.1 นำตัวอย่างดีเอ็นเอจากข้อ 9.1 มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค STR โดยใช้ชุดน้ำยา Yfiler™ Plus PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, USA) หรือ PowerPlex® Y23 System (Promega, USA)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

10.2 ตรวจสอบผล โดยใช้โปรแกรม GeneMapper™ ID-X (Applied Biosystems, USA)

11. วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

11.1 ตรวจสอบประสิทธิภาพการตรวจหาดีเอ็นเอเพศชายโดยชุดน้ำยาแอซิดฟอสฟาเตส การส่องกล้องจุลทรรศน์ และเทคนิค LAMP ตามลำดับ โดยคำนวณค่าดัชนี 5 ดัชนี คือ sensitivity specificity PPV NPV และ accuracy ซึ่งใช้ผลจากการวิเคราะห์ Y-STR ในการอ้างอิง

11.2 เปรียบเทียบความสัมธ์ระหว่างการตรวจหาดีเอ็นเอเพศชายโดยชุดน้ำยาแอซิดฟอสฟาเตส การส่องกล้องจุลทรรศน์ และเทคนิค LAMP เทียบกับผลการวิเคราะห์ STR โดยการทดสอบไคสแควร์ (Chi square test) ในตารางการจรแบบ 2×2 (2x2 Tables) เพื่อทดสอบความสอดคล้องระหว่างข้อมูล 2 กลุ่ม

12. สรุปผลและเขียนรายงาน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับเทคนิคลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน

ผลการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอเมโลจีนินวาย โดยใช้โปรแกรม LAMP Designer 1.16 แสดงดังตารางที่ 4 ไพรเมอร์ดังกล่าวจะจับเข้ากับยีนอเมโลจีนินวาย ดังรูปที่ 9 ซึ่งมีบางนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกับยีนอเมโลจีนินเอ็กซ์ และบางบริเวณยีนอเมโลจีนินเอ็กซ์เกิดการขาดหาย (deletion) แสดงให้เห็นว่าชุดไพรเมอร์มีความจำเพาะกับดีเอ็นเอมนุษย์เพศชาย

ตารางที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ทั้ง 6 ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงต่อยีนอเมโลจีนินวาย

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5’→ 3’)
Forward primer (F3)	CAGTGGCTTAAGGTATGGTTAT
Backward primer (B3)	GGACCTGAGAATCCACCT
Forward inner primer (FIP)	TGATGGCTATGAACAGGGATGCGATACCAGGTAGGTTAATGCC
Backward inner primer (BIP)	ACAGGCACCAATGTTACTGGGGCTCTCACTACCAGTGTCTA
Loop-forward primer (LF)	TTGATGTACCACTGCTACTGG
Loop-backward primer (LB)	ATTCTTGGACCACTGGACG

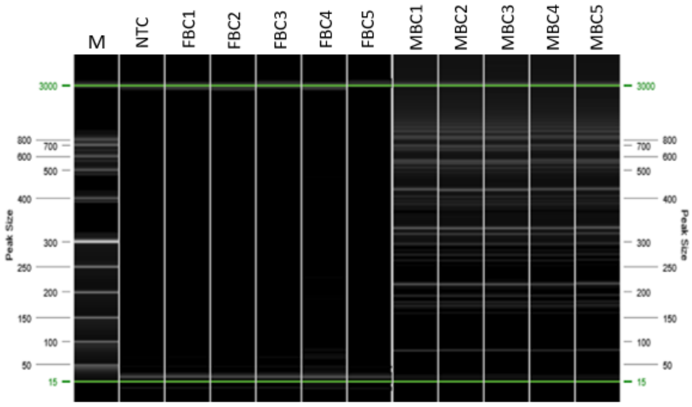
```
AMELY      TGATTTGCTCAGTGGCTTAAGGTATGGTTATTAGTTGACGTTATGGTGAAGTTTTTCTGG    1216
AMELX      GAATGCTATTTGTGCCATAATCGATTTGAACCAGCCCCGCTATTGGTAGACATTTTGTTT    1276
             **    *  *** * ***   **    *  **      *  ****  *  **** *

AMELY      GGACTGTGATACCAGGTAGGTTAATGCCCCCAGTAGCAGTGGTACATCAAGCATCCCTGT    1276
AMELX      TAAATGTTACTTCATA-----------GGCCAGGCGCAGTGGCTCATGC-----CTGTAA    1320
             * *** *   **               ****  *******  ***       *  *

AMELY      TCATAGCCATCAATGCAGCTTAAACAGGCACCAATGTTACTGGGTCCTGGAAAGTCAATT    1336
AMELX      TCCCAGCACTTTGGGAGGCCGAGGCAGGCA-----GATCATGAGGTCAGGAGATGGAGAC    1375
           **  ***  *    *  **  *  ******     * *  ** *  * *** *   *

AMELY      CTTGGACCACTGGACGGCTTGTTTAGACACTGGTAGTGAGAGCAATGATCTGGGTGGCTA    1396
AMELX      CATC-----CTGGACAACATGGTGAAACCCCGTCTCTACTAAAAATATAAAAATAAGCTG    1430
           * *      ******  * ** * * ** * *    *   *  ***          ***

AMELY      GGTGGATTCTCAGGTCCCCGTCCAGCTGGTATGATATATGTTATAGCAGTACCAGTGGTG    1456
AMELX      GGCATGGTGGCATGTGCCTGTAATCC----------------------------------    1456
           **     *  ** ** ** **    *
```

รูปที่ 9 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์จับกับยีนอเมโลจีนินวายเทียบกับยีนอเมโลจีนินเอ็กซ์ (ไพรเมอร์ F3: สีน้ำเงิน ไพรเมอร์ FIP: สีเขียว ไพรเมอร์ LF: สีแดง ไพรเมอร์ BIP: สีม่วง ไพรเมอร์ LB: สีแดงเข้ม และไพรเมอร์ B3: สีส้ม)

4.2 การตรวจสอบการปรากฏของสารพันธุกรรมในตำแหน่งอเมโลจีนินวายจากตัวอย่างเยื่อบุกระพุ้งแก้มจากอาสาสมัครเพศชายและเพศหญิงด้วยเทคนิคลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน

จากการนำตัวอย่างเยื่อบุกระพุ้งแก้มของอาสาสมัครทั้งเพศชาย และเพศหญิงมาสกัดดีเอ็นเอ และวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอ จากนั้นนำไปตรวจสอบการปรากฏของสารพันธุกรรมในตำแหน่งอเมโลจีนินวายด้วยเทคนิคลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชันที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่าสามารถสังเกตเห็นการเปลี่ยนสีจากสีชมพูเป็นสีเหลืองในตัวอย่างดีเอ็นเอจากเพศชาย และไม่มีการเปลี่ยนสีจากสีเหลืองในตัวอย่างดีเอ็นเอจากเพศหญิง ดังรูปที่ 10 นอกจากนี้ผลจากเครื่อง QIAxcel จะพบแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างเพศชาย และไม่พบแถบดังกล่าวในตัวอย่างจากเพศหญิง ซึ่งผลจากเครื่อง QIAxcel จะแสดงถึงความถูกต้องของสารสีฟีนอลเรดที่สามารถสังเกตผลได้ด้วยตาเปล่า ดังรูปที่ 11

รูปที่ 10 ผลของสารสีฟีนอลเรดหลังจากการทำปฏิกิริยา LAMP ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (NTC: ตัวควบคุมผลลบ FBC1-5: ตัวอย่างเยื่อบุกระพุ้งแก้มของอาสาสมัครเพศหญิง และ MBC1-5: ตัวอย่างเยื่อบุกระพุ้งแก้มของอาสาสมัครเพศชาย)



รูปที่ 11 ผลของการรันเจลโดยเครื่อง QIAxcel หลังจากการทำปฏิกิริยา LAMP ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (NTC: ตัวควบคุมผลลบ FBC1-5: ตัวอย่างเยื่อบุกระพุ้งแก้มของอาสาสมัครเพศหญิง และ MBC1-5: ตัวอย่างเยื่อบุกระพุ้งแก้มของอาสาสมัครเพศชาย)

4.3 การทดสอบความไวของเทคนิคลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน

จากการนำตัวอย่างดีเอ็นเอของเพศชายจากเยื่อบุกระพุ้งแก้มมาเจือจางให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอ 1, 0.1, 0.01 และ 0.001 นาโนกรัม อย่างละ 3 ซ้ำ (#1-3) และนำไปตรวจสอบการปรากฏของสารพันธุกรรมในตำแหน่งอเมโลจีนินวายด้วยเทคนิคลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชันที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 และ 45 นาที พบว่าความไวของชุดไพรเมอร์จากการศึกษาข้างต้นเท่ากับ 0.1 นาโนกรัม ที่เวลา 30 นาที ซึ่งแสดงผลบวกทั้ง 3 ซ้ำ สำหรับการดูผลด้วยตาเปล่าจากการเปลี่ยนสีของสารสีฟีนอลเรดแสดงดังตารางที่ 5 และสำหรับผลเจลจากเครื่อง QIAxcel ให้ผลตรงกับการเปลี่ยนสีของสารสีฟีนอลเรด

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความไวของเทคนิคลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชันและชุดไพรเมอร์จากการออกแบบข้างต้น (สีเหลือง = ตรวจพบ สีส้ม = สี Transition และสีชมพู = ตรวจไม่พบ)

ความเข้มข้นดีเอ็นเอ	เวลาในการทำปฏิกิริยา (นาที)	
	30	45
1 นาโนกรัม	#1	#1
	#2	#2
	#3	#3
0.1 นาโนกรัม	#1	#1
	#2	#2
	#3	#3
0.01 นาโนกรัม	#1	#1
	#2	#2
	#3	#3
0.001 นาโนกรัม	#1	#1
	#2	#2
	#3	#3
ตัวควบคุมผลลบ	#1	#1
	#2	#2
	#3	#3

4.4 การทดสอบความจำเพาะของเทคนิคลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน

จากการนำตัวอย่างดีเอ็นเอหนูเม้าส์ (*Mus musculus* สายพันธุ์ ICR Swiss mice) ดีเอ็นเอหนูแรท (*Rattus norvegicus*) ดีเอ็นเอหมู (*Sus scrofa domestica*) ดีเอ็นเอมนุษย์เพศชาย และดีเอ็นเอมนุษย์เพศหญิง ที่มีความเข้มข้น 5 นาโนกรัม จำนวนอย่างละ 3 ซ้ำ และนำไปตรวจสอบการปรากฏของสารพันธุกรรมในตำแหน่งอเมโลจีนินวายด้วยเทคนิคลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชันที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที พบว่าชุดไพรเมอร์จากการศึกษาข้างต้นมีความจำเพาะสูง เนื่องจากผลการศึกษาพบผลบวกเฉพาะตัวอย่างดีเอ็นเอจากมนุษย์เพศชายเท่านั้น โดยตัวอย่างอื่นให้ผลลบทั้งหมด แสดงผลการเปลี่ยนสีของสารสีฟีนอลเรดดังรูปที่ 12 และสำหรับผลเจลจากเครื่อง QIAxcel ให้ผลตรงกับการเปลี่ยนสีของสารสีฟีนอลเรด

รูปที่ 12 ผลการทดสอบความจำเพาะของเทคนิคลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชันและชุดไพรเมอร์ในหนูเม้าส์ (Mus musculus) หนูแรท (Rattus norvegicus) หมู (Sus scrofa domesticus) และมนุษย์เพศหญิง (female) เทียบกับมนุษย์เพศชาย (male) และชุดควบคุมลบ (NTC)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

4.5 การทดสอบแบบอำพราง (blind test)

จากการนำตัวอย่างของเหลว ได้แก่ เลือด และน้ำลายจากเพศชายและหญิง และน้ำอสุจิจากเพศชาย และให้นักวิจัยท่านอื่นทำการผสมของเหลวลงในหลอดทดลอง โดยที่ผู้วิจัยไม่ทราบส่วนประกอบของของเหลวในแต่ละหลอดทั้งหมด 10 หลอด จากนั้นผู้วิจัยทำการทดสอบและวิเคราะห์ผลว่าในแต่ละหลอดมีดีเอ็นเอเพศชายหรือไม่ พบว่าผู้วิจัยสามารถระบุหลอดที่มีส่วนผสมของดีเอ็นเอเพศชายได้ถูกต้องทั้งหมด ดังตารางที่ 6 ซึ่งผลจากการเปลี่ยนสีของฟีนอลเรดและผลเจลจากเครื่อง QIAxcel ให้ผลตรงกัน

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบแบบอำพราง (blind test) (สีเหลือง = ตรวจพบ สีชมพู = ตรวจไม่พบ และเครื่องหมาย ✓ คือผลการวิเคราะห์ถูกต้อง)

ตัวอย่าง	เพศชาย (ไมโครลิตร)			เพศหญิง (ไมโครลิตร)		อัตราส่วน (เพศชาย : เพศหญิง)	ผล LAMP
	เลือด	น้ำอสุจิ	น้ำลาย	เลือด	น้ำลาย		
1			10		20	1 : 2	✓
2		10		20		1 : 2	✓
3				10		0 : 1	✓
4		30			20	3 : 2	✓
5	10			40		1 : 4	✓
6		10			10	1 : 1	✓
7	10				10	1 : 1	✓
8			20		10	2 : 1	✓
9					10	0 :1	✓
10		10		20		1 : 2	✓

4.6 การทดสอบการปรากฏของสารพันธุกรรมในตำแหน่งอเมโลจีนินวายจากตัวอย่างน้ำซับช่องคลอดด้วยเทคนิคลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน และการวิเคราะห์ Y-STR (เพื่อยืนยันความถูกต้องของเทคนิค LAMP)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จากการนำตัวอย่างดีเอ็นเอจากน้ำซับช่องคลอดจากวัตถุพยานในคดีข่มขืนกระทำชำเรา จำนวน 92 ตัวอย่าง ที่ผ่านการทดสอบเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเตส และการส่องกล้องจุลทรรศน์ มาตรวจหาดีเอ็นเอเพศชายด้วยเทคนิค LAMP เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ Y-STR ดังตารางที่ 7 พบว่าการตรวจสอบเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเตสให้ผลบวกเทียมจำนวน 32 ตัวอย่าง และผลลบเทียมจำนวน 7 ตัวอย่าง การตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ให้ผลลบเทียมจำนวน 19 ตัวอย่าง และการตรวจสอบด้วยเทคนิค LAMP มีความผิดพลาดในการตรวจสอบน้อยที่สุดโดยมีเพียงผลลบเทียมจำนวน 2 ตัวอย่าง

ตารางที่ 7 จำนวนตัวอย่างของผลการตรวจสอบด้วยวิธีแอซิดฟอสฟาเตส (AP) การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ (ME) เทคนิคลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน (LAMP) และการวิเคราะห์ Y-STR

	ทั้งหมด (92 ตัวอย่าง)	**การวิเคราะห์ Y-STR**	
		ตรวจพบ	**ตรวจไม่พบ**
AP+, ME+, LAMP+	12	12	0
AP+, ME-, LAMP+	14	14	0
AP+, ME-, LAMP-	34	2	32
AP-, ME+, LAMP+	4	4	0
AP-, ME-, LAMP+	2	2	0
AP-, ME-, LAMP-	26	1	25

4.7 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

4.7.1 ประสิทธิภาพในการตรวจหาสิ่งที่เกี่ยวข้องกับเพศชายโดยชุดน้ำยาแอซิดฟอสฟาเตส การส่องกล้องจุลทรรศน์ และเทคนิคลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน

จากการคำนวณค่าดัชนีเพื่อวัดประสิทธิภาพในการตรวจหาสิ่งที่เกี่ยวข้องกับเพศชาย 5 ดัชนี ได้แก่ sensitivity specificity positive predictive value (PPV) negative predictive value (NPV) และ accuracy ของการตรวจด้วยเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเตส ดังตารางที่ 8 การส่องกล้องจุลทรรศน์ ดังตารางที่ 9 และเทคนิค LAMP ดังตารางที่ 10

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 8 ประสิทธิภาพในการตรวจหาสารคัดหลั่งเพศชายด้วยวิธีแอซิดฟอสฟาเตส

	Y-STR (+)	**Y-STR (-)**	**ทั้งหมด**	**ประสิทธิภาพ**
การทดสอบแอซิดฟอสฟาเตส (+)	28	32	60	Sensitivity 80% PPV 46.7% Specificity 43.9% NPV 78.1% Accuracy 57.6%
การทดสอบแอซิดฟอสฟาเตส (-)	7	25	32	
ทั้งหมด	35	57	92	

ตารางที่ 9 ประสิทธิภาพในการตรวจหาอสุจิด้วยการส่องกล้องจุลทรรศน์

	Y-STR (+)	Y-STR (-)	ทั้งหมด	ประสิทธิภาพ
การส่องกล้องจุลทรรศน์ (+)	16	0	16	Sensitivity 45.7% PPV 100% Specificity 100% NPV 75% Accuracy 79.3%
การส่องกล้องจุลทรรศน์ (-)	19	57	76	
ทั้งหมด	35	57	92	

ตารางที่ 10 ประสิทธิภาพในการตรวจหาดีเอ็นเอเพศชายด้วยเทคนิค LAMP

	Y-STR (+)	Y-STR (-)	ทั้งหมด	ประสิทธิภาพ
เทคนิค LAMP (+)	32	0	32	Sensitivity 91.4% PPV 100% Specificity 100% NPV 95% Accuracy 96.7%
เทคนิค LAMP (-)	3	57	60	
ทั้งหมด	35	57	92	

4.7.2 การทดสอบไคสแควร์

การทดสอบไคสแควร์เพื่อหาความสัมพันธ์กันของผลการตรวจหาสิ่งที่เกี่ยวข้องกับเพศชายด้วยวิธีแอซิดฟอสฟาเตส ดังตารางที่ 11 การส่องกล้องจุลทรรศน์ ดังตารางที่ 12 และเทคนิค LAMP ดังตารางที่ 13 โดยนำผลการเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ Y-STR

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สมมติฐานในการทดสอบไคสแควร์

H_0: ข้อมูลทั้ง 2 ชุด ไม่มีความสัมพันธ์กัน

H_1: ข้อมูลทั้ง 2 ชุด มีความสัมพันธ์กัน

ตารางที่ 11 ผลการวิเคราะห์ไคสแควร์ระหว่างการตรวจหาสารคัดหลั่งเพศชายด้วยวิธีแอซิดฟอสฟาเตส (AP) กับการวิเคราะห์ Y-STR

ผลการตรวจสอบ	Observed frequency (O)	Expected frequency (E)	$(O-E)^2/E$
AP+, STR+	28	22.83	1.17
AP+, STR-	32	37.17	0.72
AP-, STR+	7	12.17	2.20
AP-, STR-	25	19.83	1.35
ทั้งหมด			**X^2 = 5.44**

จากการทดสอบนัยสำคัญ โดยมีระดับความอิสระ (Degree of freedom: df) ที่ df = (2-1)(2-1) = 1 ซึ่งค่าวิกฤตจากตารางไคสแควร์ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 และ df = 1 มีค่าเท่ากับ 6.635 ซึ่งมีค่ามากกว่าค่าที่คำนวณได้ (5.44) จึงยอมรับ H_0 และปฏิเสธ H_1 คือ การตรวจสอบด้วยวิธีแอซิดฟอสฟาเตสไม่มีความสัมพันธ์กับการวิเคราะห์ Y-STR

ตารางที่ 12 ผลการวิเคราะห์ไคสแควร์ระหว่างการตรวจหาอสุจิด้วยการส่องกล้องจุลทรรศน์ (ME) กับการวิเคราะห์ Y-STR

ผลการตรวจสอบ	Observed frequency (O)	Expected frequency (E)	$(O-E)^2/E$
ME+, STR+	16	6.01	16.14
ME+, STR-	0	9.91	9.91
ME-, STR+	19	28.91	3.40
ME-, STR-	57	47.09	2.09
ทั้งหมด			**X^2 = 31.54**

จากการทดสอบนัยสำคัญ โดยมีระดับความอิสระ (Degree of freedom: df) ที่ df = (2-1)(2-1) = 1 ซึ่งค่าวิกฤตจากตารางไคสแควร์ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 และ df = 1 มีค่าเท่ากับ 6.635

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ซึ่งมีค่าน้อยกว่าค่าที่คำนวณได้ (31.54) จึงปฏิเสธ H_0 และยอมรับ H_1 คือ การตรวจสอบด้วยการส่องกล้องจุลทรรศน์มีความสัมพันธ์กับการวิเคราะห์ Y-STR

ตารางที่ 13 ผลการวิเคราะห์ไคสแควร์ระหว่างการตรวจหาดีเอ็นเอเพศชายด้วยเทคนิค LAMP กับการวิเคราะห์ Y-STR

ผลการตรวจสอบ	Observed frequency (O)	Expected frequency (E)	$(O-E)^2/E$
LAMP+, STR +	32	12.17	32.29
LAMP+, STR -	0	19.83	19.83
LAMP-, STR +	3	22.83	17.22
LAMP-, STR -	57	37.17	10.57
ทั้งหมด			**X^2 = 79.91**

จากการทดสอบนัยสำคัญ โดยมีระดับความอิสระ (Degree of freedom: df) ที่ df = (2-1)(2-1) = 1 ซึ่งค่าวิกฤตจากตารางไคสแควร์ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 และ df = 1 มีค่าเท่ากับ 6.635 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าค่าที่คำนวณได้ (79.91) จึงปฏิเสธ H_0 และยอมรับ H_1 คือ การตรวจสอบด้วยเทคนิค LAMP ความสัมพันธ์กับการวิเคราะห์ Y-STR

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ผลจากการทดสอบไคแสควร์จากตารางที่ 11-13 พบว่าการตรวจสอบสิ่งที่เกี่ยวข้องกับเพศชายด้วยวิธีแอซิดฟอสฟาเตสไม่มีความสัมพันธ์กับการวิเคราะห์ Y-STR แสดงให้เห็นว่าการตรวจสอบด้วยวิธีแอซิดฟอสฟาเตสมีโอกาสให้ผลที่ผิดพลาดสูงกว่าการส่องกล้องจุลทรรศน์และเทคนิค LAMP

บทที่ 5
อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผลการวิจัย

5.1.1 ความไวของเทคนิค LAMP

การทดสอบความไวในการเกิดปฏิกิริยาของเทคนิค LAMP ได้นำตัวอย่างดีเอ็นเอเพศชายจากเยื่อบุกระพุ้งแก้มมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 1, 0.1, 0.01 และ 0.001 นาโนกรัม ผลจากการตรวจหาดีเอ็นเอเพศชายที่ความเข้มข้นดังกล่าวด้วยเทคนิค LAMP จากผลการทดลองสามารถตรวจหาดีเอ็นเอเพศชายที่ความเข้มข้น 0.1 นาโนกรัม ได้ทั้งสามซ้ำ เมื่อตรวจหาดีเอ็นเอเพศชายที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 0.01 นาโนกรัม พบว่าที่เวลา 30 นาที สามารถตรวจพบดีเอ็นเอเพศชายได้ 2 จาก 3 ตัวอย่าง แต่ที่เวลา 45 นาที สามารถตรวจพบดีเอ็นเอเพศชายได้ 1 จาก 3 ตัวอย่าง โดยสาเหตุที่ผลการตรวจดีเอ็นเอเพศชายที่เวลา 30 นาที และ 45 นาที แตกต่างกันเนื่องจากความเข้มข้นของดีเอ็นเอในการตรวจสอบน้อยมากส่งผลให้ในการดูดดีเอ็นเอมาใช้ในบางตัวอย่างอาจไม่มีดีเอ็นเอเพศชายถูกดูดขึ้นมาทำให้ไม่สามารถตรวจพบดีเอ็นเอเพศชายได้ แสดงให้เห็นว่าความไวในการตรวจสอบด้วยเทคนิค LAMP สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอที่ช่วงความเข้มข้น 0.01-0.1 นาโนกรัม โดยจากการศึกษาของ Scott และคณะ (Scott et al., 2019) ได้ผลความไวของเทคนิค LAMP ที่ 0.4 นาโนกรัม แสดงให้เห็นว่าชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบเพื่อใช้ในงานวิจัยนี้มีความไวมากกว่าชุดไพรเมอร์ของ Scott และคณะ แต่อย่างไรก็ตามความแตกต่างของความไวที่เกิดขึ้นนี้อาจเป็นผลมาจากอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองหรือสารเคมีที่ใช้ซึ่งมีแหล่งที่มาต่างกันทำให้ประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยาไม่เท่ากัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

5.1.2 ความจำเพาะของเทคนิค LAMP

การทดสอบความจำเพาะในการตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค LAMP จากการนำตัวอย่างดีเอ็นเอหนูเม้าส์ (*Mus musculus* สายพันธุ์ ICR Swiss mice) ดีเอ็นเอหนูแรท (*Rattus norvegicus*) ดีเอ็นเอหมู (*Sus scrofa domestica*) ดีเอ็นเอมนุษย์เพศชาย และดีเอ็นเอมนุษย์เพศหญิง ผลจากการทดลองแสดงให้เห็นว่าเทคนิค LAMP มีความจำเพาะสูงต่อดีเอ็นเป้าหมายให้ผลบวกในกรณีที่ตรวจสอบกับดีเอ็นเอของมนุษย์เพศชายเท่านั้น โดยในดีเอ็นเอมนุษย์เพศหญิงและดีเอ็นเอสัตว์ให้ผลลบทั้งหมด ซึ่งจากการศึกษาการใช้ชุดน้ำยาตรวจสอบเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเตสพบว่าการตรวจสอบด้วยวิธีนี้มีความจำเพาะต่ำ โดยสามารถให้ผลบวกได้ในกรณีที่ตรวจสอบน้ำลายหรือน้ำซับช่องคลอดเพศหญิง (Gonçalves et al., 2017) ซึ่งสามารถให้ผลบวกเทียมได้

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการตรวจสอบด้วยเทคนิค LAMP และการใช้ชุดน้ำยาแอซิดฟอสฟาเตสแสดงให้เห็นว่าเทคนิค LAMP มีโอกาสให้ผลที่ถูกต้องมากกว่า แต่อย่างไรก็ตามยีนอเมโลจีนินวายยังสามารถพบได้ในลิงซึ่งเป็นสัตว์ที่มีดีเอ็นเอใกล้เคียงกับมนุษย์ ซึ่งดีเอ็นเอของลิงมีข้อจำกัดในการนำมาทดลองทำให้ยังไม่ได้มีการศึกษาความจำเพาะของชุดไพรเมอร์กับตัวอย่างดีเอ็นเอของลิง ดังนั้นผู้วิจัยจึงนำชุดไพรเมอร์ไปตรวจสอบความคล้ายคลึงของดีเอ็นเอบริเวณยีนอเมโลจีนินวายของลิง พบว่ามีไพรเมอร์บางตัวสามารถจับกับดีเอ็นเอของลิงได้

5.1.3 การทดสอบแบบอำพราง

เพื่อยืนยันความถูกต้องในการนำเทคนิค LAMP ไปใช้ในการตรวจสอบตัวอย่างจริงและอาจมีดีเอ็นเอของมนุษย์เพศชายและหญิงผสมรวมกันในตัวอย่าง จึงได้ทำการทดสอบแบบอำพราง โดยทำการผสมตัวอย่างของเหลวจากร่างกายมนุษย์ซึ่งเก็บมาจากอาสาสมัครเพศชาย 2 คน และเพศหญิง 1 คน จากนั้นนำตัวอย่างของเหลวมาผสมกันในอัตราส่วนโดยปริมาตรของเหลวซึ่งไม่ทราบความเข้มข้นของดีเอ็นเอในแต่ละตัวอย่าง ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่านักวิจัยสามารถตรวจสอบการมีอยู่ของดีเอ็นเอเพศชายได้อย่างถูกต้องทั้ง 10 ตัวอย่าง โดยจากการศึกษาของ Jackson และคณะ (Jackson et al., 2020) ได้มีการทำการทดสอบแบบอำพราง ในการระบุว่าในแต่ละตัวอย่างมีของเหลวจากร่างกายชนิดใดผสมกัน โดยของเหลวจากร่างกายที่ใช้ในการทดสอบประกอบด้วย เลือด น้ำลาย น้ำอสุจิ และน้ำซับช่องคลอด ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าผู้วิจัยสามารถระบุส่วนผสมของของเหลวจากร่างกายที่ผสมกันถูกต้องทุกตัวอย่าง ซึ่งผลการทดสอบนี้สอดคล้องกับผลการวิจัยของการทดลองนี้ แสดงให้เห็นถึงความแม่นยำของเทคนิค LAMP ในการตรวจสอบ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

5.1.4 เปรียบเทียบผลของเทคนิค LAMP กับการวิเคราะห์ Y-STR

การทดสอบการปรากฏของสารพันธุกรรมในตำแหน่งอเมโลจีนินวายจากตัวอย่างน้ำซับช่องคลอดด้วยเทคนิค LAMP โดยใช้เทคนิค Y-STR ในการตรวจสอบความถูกต้อง ผลจากการทดลองแสดงให้เห็นว่าเทคนิค LAMP ให้ผลผลตรงกับการตรวจสอบด้วยเทคนิค Y-STR จำนวน 89 ตัวอย่างจากทั้งหมด 92 ตัวอย่าง ซึ่ง 3 ตัวอย่างที่ผลการตรวจสอบด้วยเทคนิค LAMP มีความแตกต่างจากการตรวจสอบด้วยการวิเคราะห์ Y-STR แสดงผลการตรวจสอบดังตารางที่ 14 สำหรับตัวอย่าง DR076 พบ 25 ตำแหน่งของ Y-STR (full profile) แต่ผลจากเทคนิค LAMP รวมทั้งวิธีแอซิดฟอสฟาเตส และการส่องกล้องจุลทรรศน์ให้ผลลบทั้งหมด อาจเกิดจากการวิเคราะห์ Y-STR มีความไวที่สูง

กว่าเทคนิคอื่น ซึ่งสามารถตรวจพบดีเอ็นเอได้ตั้งแต่ 0.031 นาโนกรัมขึ้นไป (Watahiki et al., 2018) แต่จากการวัดความเข้มข้นดีเอ็นเอในตัวอย่างเป็นภาพรวมของปริมาณดีเอ็นเอของทั้งเพศหญิงและชายเท่ากับ 0.17 นาโนกรัม จึงอาจเป็นไปได้ว่าตัวอย่างนี้มีสัดส่วนดีเอ็นเอเพศชายน้อยกว่า 0.1 นาโนกรัม ซึ่งต่ำกว่าขีดความไวของเทคนิค LAMP ที่สามารถตรวจพบ สำหรับตัวอย่าง DR102 และ DR103 การทดสอบด้วยชุดน้ำยาแอซิดฟอสฟาเตสให้ผลบวก แต่การส่องกล้องจุลทรรศน์ และเทคนิค LAMP ให้ผลลบ อาจเกิดจากตัวอย่างมีเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเตสสูง และหลังจากการสกัดดีเอ็นเอตัวอย่างที่ได้มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอเพศชายในปริมาณน้อย หรือตัวอย่างอาจเริ่มเสื่อมสภาพ (degrade) โดยเทียบได้จากการวิเคราะห์ Y-STR รายงานได้เป็นบางตำแหน่ง (partial profile) ซึ่งเทคนิค LAMP ไม่มีความไวพอในการตรวจพบ

ตารางที่ 14 ผลการตรวจสอบด้วยเทคนิค LAMP ที่มีความแตกต่างจากการวิเคราะห์ Y-STR

รหัสตัวอย่าง	ความเข้มข้นดีเอ็นเอ (ng/ul)	การทดสอบแอซิดฟอสฟาเตส	การส่องกล้องจุลทรรศน์	ผล LAMP	จำนวนตำแหน่งที่พบ Y-STR
DR076	0.17	-	-	-	25/25
DR102	0.3	+	-	-	8/25
DR103	0.3	+	-	-	2/25

5.1.5 สารสีฟีนอลเรด

จากการทดลองใช้สารสีฟีนอลเรดในการติดตามการเกิดปฏิกิริยาของเทคนิค LAMP พบว่าผลในการติดตามการเกิดปฏิกิริยาสอดคล้องกับการนำตัวอย่างมาตรวจสอบโดยเครื่อง QIAxcel ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความถูกต้องของการใช้สารสีในการติดตามผลด้วยตาเปล่า ดังนั้นในการติดตามผลของเทคนิค LAMP ในการนำไปใช้ในการปฏิบัติงานจริงสามารถตรวจสอบผลด้วยสารสีฟีนอลเรดได้ด้วยตาเปล่าโดยไม่ต้องยืนยันผลด้วยเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส นอกจากนี้ผลจากสารสีฟีนอลเรดสามารถเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้เป็นเวลานานมากกว่า 2 เดือน โดยผลไม่มีการเปลี่ยนแปลงระหว่างเก็บรักษา

5.1.6 กรณีศึกษา

ผู้เสียหายรายหนึ่ง อายุ 14 ปี ถูกข่มขืนกระทำชำเราวันที่ 6 พ.ย. 2564 เวลา 24.00 น. มาพบแพทย์เก็บตัวอย่างวันที่ 7 พ.ย. 2564 เวลา 18.00 น. จากนั้นเจ้าที่ได้ทำการตรวจเอนไซม์แอซิด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ฟอสฟาเตสและการส่องกล้องจุลทรรศน์ในวันที่ 15 พ.ย. 2564 ซึ่งในกรณีนี้แพทย์ได้ทำการเก็บตัวอย่างมากกว่า 1 บริเวณ และผลจากการตรวจสอบด้วยวิธีแอดซิดฟอสฟาเตส การส่องกล้องจุลทรรศน์ เทคนิค LAMP และการวิเคราะห์ Y-STR ดังตารางที่ 15 พบว่าผลการวิเคราะห์ Y-STR แสดงผลชัดเจนในตัวอย่างจากบริเวณทวารหนักในตัวอย่างที่ 7 และ 8 โดยผลการตรวจสอบด้วยวิธีแอซิดฟอสฟาเตสและการส่องกล้องจุลทรรศน์ให้ผลเป็นลบ ในขณะที่การตรวจสอบด้วยเทคนิค LAMP ให้ผลบวกสอดคล้องกับการวิเคราะห์ Y-STR แสดงให้เห็นว่าเทคนิค LAMP สามารถใช้ในการตรวจสอบในตัวอย่างนี้ได้

ในกรณีที่เทคนิค LAMP ให้ผลลบในตัวอย่างรอบทวารหนัก ปากมดลูก และภายในช่องคลอด ในตัวอย่างที่ 1, 2, 4 และ 6 จะเห็นว่าผลจากการวิเคราะห์ Y-STR มีตำแหน่งที่ตรวจพบน้อย เกิดจากการที่ปริมาณดีเอ็นเอมนุษย์เพศชายที่ได้จากการเก็บตัวอย่างในบริเวณเหล่านั้นมีปริมาณน้อย โดยจากการวัดความเข้มข้นดีเอ็นเอในตัวอย่างเป็นภาพรวมของปริมาณดีเอ็นเอของทั้งเพศหญิงและชาย ซึ่งได้ความเข้มข้นน้อยกว่า 1 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ส่งผลให้การตรวจสอบด้วยเทคนิค LAMP ไม่สามารถตรวจพบได้ ซึ่งในทางปฏิบัติสำหรับการวิเคราะห์ Y-STR การที่มีตำแหน่งปรากฏขึ้นในจำนวนน้อยส่งผลให้ไม่สามารถใช้ผลในการระบุตัวบุคคลได้

ตารางที่ 15 ผลการตรวจหาดีเอ็นเอเพศชายจากผู้เสียหาย

ตัวอย่าง	บริเวณ	ความเข้มข้นดีเอ็นเอ (ng/ul)	การทดสอบแอซิดฟอสฟาเตส	การส่องกล้องจุลทรรศน์	ผล LAMP	การวิเคราะห์ Y-STR		
						ผล	ตำแหน่ง	ตำแหน่ง (%)
1	รอบทวารหนัก 1	0.62	-	-	-	+	4/25	16
2	รอบทวารหนัก 2	0.64	-	-	-	+	7/25	28
3	ปากมดลูก 1	1.17	+	-	+	+	4/25	16
4	ปากมดลูก 2	0.96	+	-	-	+	3/25	12

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

5	ภายใน ช่องคลอด 1	2.22	-	-	+	+	8/25	32
6	ภายใน ช่องคลอด 2	0.54	-	-	-	+	1/25	4
7	ทวารหนัก 1	1.05	-	-	+	+	25/25	100
8	ทวารหนัก 2	1.55	-	-	+	+	16/25	64

5.2 สรุปผลการวิจัย

จากผลการทดลองพบว่าเทคนิค LAMP มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบเบื้องต้นสำหรับการตรวจหาดีเอ็นเอเพศชายจากตัวอย่างน้ำซับช่องคลอดสูง โดยสามารถตรวจพบดีเอ็นเพศชายได้ที่ความเข้มข้น 0.1 นาโนกรัมขึ้นไป รวมทั้งมีความจำเพาะต่อตัวอย่างดีเอ็นเอมนุษย์เพศชายซึ่งเป็นเป้าหมายในการตรวจสอบสูง จากการทดลองนำเทคนิค LAMP ใช้ในการตรวจหาดีเอ็นเพศชายจากตัวอย่างน้ำซับช่องคลอดจากผู้เสียหายในคดีข่มขืนกระทำชำเราแสดงให้เห็นว่าเทคนิค LAMP มีความแม่นยำสูง โดยให้ผลที่ถูกต้อง 96.7% ซึ่งมีความแม่นยำกว่าการตรวจสอบด้วยชุดน้ำยาแอซิดฟอสฟาเตสในปัจจุบัน อีกทั้งยังสามารถใช้สารสีในการติดตามผลการเกิดปฏิกิริยาได้ ดังนั้นเทคนิค LAMP จึงสามารถใช้เป็นทางเลือกในการตรวจสอบเบื้องต้นในการตรวจหาดีเอ็นเอเพศชายในคดีข่มขืนกระทำชำเราได้

5.3 ข้อเสนอแนะ

- การตรวจสอบด้วยเทคนิค LAMP ใช้เวลาประมาณ 30-60 นาที แต่ต้องผ่านขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง จึงควรหาวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ใช้เวลาน้อยกว่านี้ แต่อย่างไรก็ตามทั้งขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ และเทคนิค LAMP สามารถทำหลายตัวอย่างพร้อมกันได้

- การติดตามการเกิดปฏิกิริยาของเทคนิค LAMP ในงานวิจัยนี้ใช้สารสีฟีนอลเรดในการดูผลด้วยตาเปล่า แต่ยังมีสารสีอื่นๆ เช่นสารสี Hydroxynaphthol blue (HNB) ที่นิยมใช้ในต่างประเทศ แต่ยังไม่มีการนำมาใช้ในงานวิจัยนี้
- ทดสอบความจำเพาะกับดีเอ็นเอของลิง เนื่องจากมีบางไพรเมอร์สามารถจับกับดีเอ็นเอบริเวณยีนอเมโลจีนินวายของลิงได้
- เทคนิค LAMP สามารถเกิดการปนเปื้อนได้ง่าย จึงควรผสมสารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาในตู้ที่เฉพาะ และใช้อุปกรณ์สำหรับทำปฏิกิริยา LAMP เท่านั้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บรรณานุกรม

Butler, E., andLi, R. (2014). Genetic Markers for Sex Identification in Forensic DNA Analysis. *Journal of Forensic Investigation 2*, 1-10.

Frances, F., Portoles, O., Gonzalez, J. I., Coltell, O., Verdu, F., Castello, A., andCorella, D. (2007). Amelogenin test: From forensics to quality control in clinical and biochemical genomics. *Clin Chim Acta, 386*(1-2), 53-56.

Gonçalves, A. B. R., de Oliveira, C. F., Carvalho, E. F., andSilva, D. A. (2017). Comparison of the sensitivity and specificity of colorimetric and immunochromatographic presumptive methods for forensic semen detection. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 6*, e481-e483. doi:10.1016/j.fsigss.2017.09.189

Goto, M., Honda, E., Ogura, A., Nomoto, A., andHanaki, K. (2009). Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *Biotechniques, 46*(3), 167-172.

Jackson, K. R., Layne, T., Dent, D. A., Tsuei, A., Li, J., Haverstick, D. M., andLanders, J. P. (2020). A novel loop-mediated isothermal amplification method for identification of four body fluids with smartphone detection. *Forensic Science International: Genetics, 45*, 102195.

Kayser, M. (2017). Forensic use of Y-chromosome DNA: a general overview. *Hum Genet, 136*(5), 621-635. doi:10.1007/s00439-017-1776-9

Lewis, J., Baird, A., McAlister, C., Siemieniuk, A., Blackmore, L., McCabe, B., O'Rourke, P., Parekh, R., Watson, E., Wheelhouse, M., et al. (2013). Improved detection of semen by use of direct acid phosphatase testing. *Science and Justice 53*(4), 385-394.

Martinez, P., Santiago, B., Alcala, B., andAtienza, I. (2015). Semen searching when sperm is absent. *Science and Justice 55*(2), 118-123.

Nagamine, K., Hase, T., andNotomi, T. (2002). Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes, 16*(3), 223-229.

Nakahori, Y., Takenaka, O., andNakagome, Y. (1991). A human X-Y homologous region

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

encodes "Amelogenin". *Genomics, 9*, 264-269.

Nogami, H., Tsutsumi, H., Komuro, T., andMukoyama, R. (2008). Rapid and simple sex determination method from dental pulp by loop-mediated isothermal amplification. *Forensic Science International: Genetics, 2*(4), 349-353.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., andHase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research 28*, 1-7.

Peonim, V., Worasuwannarak, W., Sujirachato, K., Teerakamchai, S., Srisont, S., Udnoon, J., andChudoung, U. (2013). Comparison between prostate specific antigen and acid phosphatase for detection of semen in vaginal swabs from raped women. *Journal of Forensic and Legal Medicine 20*(6), 578-581.

Riman, S., Shek, C. H., Beaudoin, V. C., Peck, M., Benjamin, J., Ayoub, C., Prugh, L., andPodini, D. (2015). Confirmatory detection of sperm and semen Via proximity ligation real-time PCR. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 5*, e109-e111. doi:10.1016/j.fsigss.2015.09.044

Roewer, L. (2019). Y‐chromosome short tandem repeats in forensics—Sexing, profiling, and matching male DNA. *WIREs Forensic Science, 1*(4).

Scott, A., Jackson, K., Carter, M., Comeau, R., Layne, T., andLanders, J. (2019). Rapid sperm lysis and novel screening approach for human male DNA via colorimetric loop-mediated isothermal amplification. *Forensic Science International: Genetics, 43*, 102139.

Thompson, J. M., Ewing, M. M., Frank, W. E., Pogemiller, J. J., Nolde, C. A., Koehler, D. J., Shaffer, A. M., Rabbach, D. R., Fulmer, P. M., Sprecher, C. J., et al. (2013). Developmental validation of the PowerPlex(R) Y23 System: a single multiplex Y-STR analysis system for casework and database samples. *Forensic Science International: Genetics, 7*(2), 240-250.

Tomita, N., Mori, Y., Kanda, H., andNotomi, T. (2008). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat Protoc, 3*(5), 877-882.

Watahiki, H., Fujii, K., Fukagawa, T., Mita, Y., Kitayama, T., Nakahara, H., Mizuno, N., andSekiguchi, K. (2018). Validation of the Yfiler Plus PCR Amplification Kit for forensic purposes. *Japanese Journal of Forensic Science and Technology, 23*(1), 13-34. doi:10.3408/jafst.730

Yang, D., li, Z., Diwu, Y. A., Fu, H., Liao, J., Wei, C., andDiwu, Z. (2008). A novel fluorogenic coumarin substrate for monitoring acid phosphatase activity at low pH environment. *Current Chemical Genomics 2*, 48-50.

เลียงชัย จตุรัส, วิรุจน์ คุณกิตติ, andแจ่มสุวรรณ, อ. (2554, 4-6 ตุลาคม 2554). คดีข่มขืนในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. Paper presented at the การประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 27.

ธีระชัย วชิราวิโรจน์, ธานินทร์ ภู่พัฒน์, andภู่พัฒน์, เ. (2556). การตรวจหาอเมโลจีนินวายโลคัสในตัวอย่างน้ำซับช่องคลอดในคดีความผิดทางเพศโดยวิธีลูปมีดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน. วารสารนิติเวชศาสตร์ *5*.

ฤกษ์อำนวยโชค, บ. (2561). วิทยาการก้าวหน้าด้านนิติพันธุศาสตร์. กรุงเทพมหานคร : คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี.

สำนักงานกองทุนการสร้างเสริมสุขภาพ. (2561). สถิติ 'ความรุนแรงทางเพศ' ของไทยยังน่าห่วง. Retrieved 6 พฤศจิกายน 2563

สำนักงานตำรวจแห่งชาติ. (2564). สถิติฐานความผิดคดีอาญา (คดี *4* กลุ่ม) หน่วยงาน ทั่วประเทศ. กรุงเทพมหานคร : ระบบสารสนเทศสถานีตำรวจ สำนักงานตำรวจแห่งชาติ.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก

ตารางที่ 16 ปริมาตรของสารในการทำปฏิกิริยา LAMP

ชนิดของสาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
WarmStart Colorimetric LAMP 2X Master Mix	12.5
LAMP Primer Mix (10X)	2.5
Target DNA	1
dH_2O	9
ปริมาตรรวม	25

ตารางที่ 17 การเตรียมความเข้มข้น (10X) ของไพรเมอร์สำหรับทำปฏิกิริยา LAMP

ไพรเมอร์	ความเข้มข้น (10X)
FIP	16 μM
BIP	16 μM
F3	2 μM
B3	2 μM
Loop F	4 μM
Loop B	4 μM

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 18 ตารางการจรแบบ 2x2 ที่ใช้ในการคำนวณประสิทธิภาพของวิธีการทดลองที่ใช้ในการตรวจหาสิ่งที่เกี่ยวข้องกับเพศชาย

		การตรวจด้วยมาตรฐานสูงสุด		
		ผลบวก	ผลลบ	ผลรวม
ผลการตรวจด้วยวิธีที่สนใจ	ผลบวก	TP	FP	TP+FP
	ผลลบ	FN	TN	FN+TN
	ผลรวม	TP+FN	FP+TN	N

เมื่อ TP คือ ผลบวกจริง (true positive)

FP คือ ผลบวกลวง (false positive)

FN คือ ผลลบลวง (false negative)

TN คือ ผลลบจริง (true negative)

N คือ ผลรวมทั้งหมด

โดยการคำนวณค่าดัชนีต่างๆเป็นดังนี้

Sensitivity = TP/(TP+FN) x 100

Positive predictive value (PPV) = TP/(TP+FP) x 100

Specificity = TN/(FP+TN) x 100

Negative predictive value (NPV) = TN/(FN+TN) x 100

Accuracy = (TP+TN)/N x 100

ตารางที่ 19 ความเข้มข้นดีเอ็นเอจากตัวอย่างเยื่อบุกระพุ้งแก้มของอาสาสมัครทั้งเพศชาย และเพศหญิง

อาสาสมัครเพศชาย	ความเข้มข้นดีเอ็นเอ (ng/uL)	อาสาสมัครเพศหญิง	ความเข้มข้นดีเอ็นเอ (ng/uL)
MBC1	1.85	FBC1	0.83
MBC2	1.08	FBC2	1.30
MCB3	0.74	FBC3	0.38
MBC4	5.40	FBC4	0.38
MBC5	0.72	FBC5	0.25

ตารางที่ 20 ผลความเข้มข้นดีเอ็นเอ ผลแอดซิดฟอสฟาเตส (AP) ผลการส่องกล้องจุลทรรศน์ (ME) ผลเทคนิค LAMP และการวิเคราะห์ Y-STR ทั้ง 92 ตัวอย่าง

รหัสตัวอย่าง	เลขประจำตัว	ความเข้มข้นดีเอ็นเอ (ng/uL)	ผล AP	ผล ME	ผล LAMP	การวิเคราะห์ Y-STR		
						ผล	ตำแหน่ง	ตำแหน่ง (%)
R239-63	DR001	18	+	-	+	+	11/22	50
	DR002	1.35	+	-	+	+	25/25	100
	DR003	0.487	-	-	+	+	25/25	100

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

	DR004	17	+	-	+	+	19/25	76
R002-64	DR005	6	+	-	+	+	25/25	100
	DR006	0.6	-	-	+	+	16/25	64
R003-64	DR007	11	+	-	-	-		
	DR008	3.18	-	-	-	-		
R005-64	DR011	7.6	+	+	+	+	25/25	100
	DR012	23	+	+	+	+	22/22	100
	DR013	10	+	+	+	+	22/22	100
R006-64	DR014	31	+	-	-	-		
R007-64	DR015	32	+	-	-	-		
R008-64	DR016	42	+	-	-	-		
R025-64	DR017	1.45	+	-	-	-		
	DR018	0.2	+	-	-	-		
R029-64	DR019	3.05	+	-	-	-		
	DR020	1.48	+	-	-	-		
R030-64	DR021	0.5	+	-	-	-		
R031-64	DR022	3.15	+	-	-	-		
	DR023	10	+	-	-	-		
R035-64	DR024	65	+	-	-	-		
R044-64	DR025	65	+	-	+	+	25/25	100
R051-64	DR026	1.07	-	-	-	-		
	DR027	34	+	-	-	-		
	DR028	24	+	-	-	-		
R052-64	DR029	0.455	+	-	-	-		
	DR030	0.175	+	-	-	-		
R059-64	DR031	0.8	+	-	+	+	24/25	96
R061-64	DR033	7.8	+	+	+	+	5/22	22.73
R067-64	DR039	9.1	+	-	-	-		
	DR040	33	-	-	-	-		
	DR041	0.131	-	-	-	-		

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

R070-64	DR042	0.1	+	-	-	-		
	DR043	0.1	+	-	-	-		
R076-64	DR045	0.312	+	-	-	-		
R087-64	DR052	0.55	+	-	-	-		
R088-64	DR053	36	+	+	+	+	22/22	100
	DR054	2.75	+	-	+	+	22/22	100
R090-64	DR055	0.75	-	-	-	-		
R091-64	DR058	9.7	-	-	-	-		
	DR059	1.6	-	-	-	-		
	DR060	0.8	-	-	-	-		
	DR061	1.35	-	-	-	-		
R093-64	DR062	0.43	-	-	-	-		
R094-64	DR064	0.543	+	-	+	+	10/25	40
R097-64	DR065	0.224	+	+	+	+	22/22	100
R108-64	DR067	10	-	-	-	-		
R109-64	DR068	38	-	+	+	+	2/22	9.09
	DR069	7.6	+	+	+	+	22/22	100
R117-64	DR070	62	-	-	-	-		
	DR071	7	-	-	-	-		
R121-64	DR072	9.2	+	-	-	-		
	DR073	4.45	+	-	-	-		
R122-64	DR074	13	-	-	-	-		
	DR075	0.845	+	-	-	-		
R125-64	DR076	0.17	-	-	-	+	25/25	100
	DR077	1.45	+	-	+	+	24/25	96
R127-64	DR078	41	-	-	-	-		
R128-64	DR079	3.5	+	-	+	+	25/25	100
R129-64	DR080	12	+	-	-	-		
R130-64	DR081	0.24	+	-	-	-		
	DR082	2.7	-	-	-	-		

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

	DR083	1.28	+	-	-	-		
R132-64	DR084	0.64	-	-	-	-		
R136-64	DR085	20	-	-	-	-		
R139-64	DR086	1.55	+	-	+	+	25/25	100
	DR087	2.08	+	-	+	+	3/22	13.64
	DR088	5.2	+	-	+	+	2/22	9.09
	DR089	4.52	+	+	+	+	6/22	27.27
R140-64	DR090	2.33	-	-	-	-		
R145-64	DR091	12	-	-	-	-		
R148-64	DR092	2.52	+	+	+	+	Mix profile	100
R150-64	DR093	52	-	-	-	-		
	DR094	51	-	-	-	-		
R153-64	DR095	5.5	-	-	-	-		
R144-64	DR096	1.38	-	-	-	-		
R156-64	DR097	29	-	-	-	-		
R157-64	DR098	1.4	+	-	-	-		
	DR099	0.53	+	-	+	+	25/25	100
R170-64	DR100	1.39	+	+	+	+	25/25	100
	DR101	3	+	+	+	+	25/25	100
R177-64	DR102	0.3	+	-	-	+	8/25	32
R179-64	DR103	0.3	+	-	-	+	2/25	8
R181-64	DR105	38	-	+	+	+	25/25	100
R182-64	DR107	0.51	+	+	+	+	25/25	100
R184-64	DR108	0.15	+	-	-	-		
R202-64	DR113	1.4	+	-	-	-		
	DR114	0.87	+	-	-	-		
R203-64	DR115	1.15	+	-	-	-		
R207-64	DR116	0.13	-	+	+	+	22/25	88
	DR117	0.093	-	+	+	+	24/25	96

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 21 ความเข้มข้นดีเอ็นเอที่ใช้ในเทคนิค LAMP เทียบกับการวิเคราะห์ Y-STR

	เลขประจำตัว	ความเข้มข้น ดีเอ็นเอ (ng/ul)	ความเข้มข้นดีเอ็นเอใน เทคนิค LAMP			ความเข้มข้นดีเอ็นเอใน การวิเคราะห์ Y-STR	
			ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
1.	DR001	18	1 ul			1 ng	
2.	DR002	1.35	1 ul			2 ng	
3.	DR003	0.487	1 ul			0.97 ng	1.95 ng
4.	DR004	17	1 ul			2 ng	
5.	DR005	6	1 ul	5 ul		2 ng	
6.	DR006	0.6	1 ul	5 ul	10 ul	2.4 ng	
7.	DR007	11	1 ul			1 ng	
8.	DR008	3.18	1 ul			1 ng	
9.	DR011	7.6	1 ul			2 ng	
10.	DR012	23	1 ul			1 ng	
11.	DR013	10	1 ul			1 ng	
12.	DR014	31	1 ul			2 ng	
13.	DR015	32	1 ul			1 ng	
14.	DR016	42	1 ul			2 ng	
15.	DR017	1.45	1 ul			2 ng	
16.	DR018	0.2	1 ul			1 ng	
17.	DR019	3.05	1 ul			2 ng	
18.	DR020	1.48	1 ul			2 ng	
19.	DR021	0.5	1 ul			2 ng	
20.	DR022	3.15	1 ul			2 ng	
21.	DR023	10	1 ul			2 ng	
22.	DR024	65	1 ul			2 ng	
23.	DR025	65	1 ul			1 ng	65 ng
24.	DR026	1.07	1 ul			2 ng	
25.	DR027	34	1 ul			2 ng	
26.	DR028	24	1 ul			2 ng	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

27.	DR029	0.455	2 ul			1.82 ng	
28.	DR030	0.175	2 ul			0.88 ng	
29.	DR031	0.8	2 ul	5 ul		1.6 ng	
30.	DR033	7.8	1 ul			1 ng	15.6 ng
31.	DR039	9.1	1 ul			2 ng	
32.	DR040	33	1 ul			1 ng	
33.	DR041	0.131	1 ul			0.66 ng	
34.	DR042	0.1	2 ul			0.5 ng	
35.	DR043	0.1	2 ul			0.5 ng	
36.	DR045	0.312	1 ul			1.56 ng	
37.	DR052	0.55	1 ul			2.2 ng	
38.	DR053	36	1 ul			1 ng	
39.	DR054	2.75	1 ul			1 ng	
40.	DR055	0.75	1 ul			2.25 ng	
41.	DR058	9.7	1 ul			1 ng	
42.	DR059	1.6	1 ul			2 ng	
43.	DR060	0.8	1 ul			1.6 ng	
44.	DR061	1.35	1 ul			2 ng	
45.	DR062	0.43	1 ul			1.72 ng	
46.	DR064	0.543	1 ul	5 ul	10 ul	2.17 ng	
47.	DR065	0.224	1 ul			1.12 ng	
48.	DR067	10	1 ul			2 ng	
49.	DR068	38	1 ul			1 ng	76 ng
50.	DR069	7.6	1 ul			1 ng	
51.	DR070	62	1 ul			2 ng	
52.	DR071	7	1 ul			2 ng	
53.	DR072	9.2	1 ul			2 ng	
54.	DR073	4.45	1 ul			2 ng	
55.	DR074	13	1 ul			2 ng	
56.	DR075	0.845	1 ul			1.69 ng	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

57.	DR076	0.17	1 ul	5 ul	10 ul	0.85 ng	
58.	DR077	1.45	1 ul			2 ng	
59.	DR078	41	1 ul			2 ng	
60.	DR079	3.5	1 ul			2 ng	
61.	DR080	12	1 ul			2 ng	
62.	DR081	0.24	1 ul			1.2 ng	
63.	DR082	2.7	1 ul			1 ng	
64.	DR083	1.28	1 ul			2.56 ng	
65.	DR084	0.64	1 ul			2.56 ng	
66.	DR085	20	1 ul			2 ng	
67.	DR086	1.55	1 ul			2 ng	
68.	DR087	2.08	1 ul			1 ng	4.16 ng
69.	DR088	5.2	1 ul			1 ng	10.4 ng
70.	DR089	4.52	1 ul			1 ng	9.04 ng
71.	DR090	2.33	1 ul			2 ng	
72.	DR091	12	1 ul			2 ng	
73.	DR092	2.52	1 ul			2 ng	
74.	DR093	52	1 ul			2 ng	
75.	DR094	51	1 ul			2 ng	
76.	DR095	5.5	1 ul			2 ng	
77.	DR096	1.38	1 ul			2 ng	
78.	DR097	29	1 ul			2 ng	
79.	DR098	1.4	1 ul			2 ng	
80.	DR099	0.53	1 ul			2.12 ng	
81.	DR100	1.39	1 ul			2 ng	
82.	DR101	3	1 ul			2 ng	
83.	DR102	0.3	2 ul	5 ul	10 ul	1.5 ng	
84.	DR103	0.3	2 ul	5 ul	10 ul	1.5 ng	
85.	DR105	38	1 ul	5 ul		2 ng	190 ng
86.	DR107	0.51	1 ul			2.04 ng	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

87.	DR108	0.15	2 ul			0.75 ng	
88.	DR113	1.4	1 ul			2 ng	
89.	DR114	0.87	1 ul			1.74 ng	
90.	DR115	1.15	1 ul			2.3 ng	
91.	DR116	0.13	5 ul			0.65 ng	
92.	DR117	0.093	5 ul			0.47 ng	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	สุนิตา ชุณห์กุล
วัน เดือน ปี เกิด	5 กรกฎาคม 2540
สถานที่เกิด	จังหวัดฉะเชิงเทรา
วุฒิการศึกษา	วท.บ. สาขาวิชาพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ที่อยู่ปัจจุบัน	660/133 ไอดีโอ คิว จุฬา-สามย่าน ถ.พระรามที่ 4 แขวงมหาพฤฒาราม เขตบางรัก กรุงเทพมหานคร 10500
ผลงานตีพิมพ์	ตีพิมพ์ในเอกสารรายงานสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับชาตินนทีอีสาน ครั้งที่ 9 (ออนไลน์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสกลนคร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University