บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การตรวจหาวัตถุพยานทางชีวภาพ เช่น เส้นผม เส้นขน คราบเลือด คราบอสุจิ ในสถานที่เกิดเหตุมีความสำคัญในการพิสูจน์หาผู้กระทำความผิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่ไม่มีพยานผู้เห็นเหตุการณ์ สำหรับการตรวจหาวัตถุพยานประเภทคราบเลือดในที่เกิดเหตุ ปัญหาสำคัญที่พบคือ (1) การระบุแหล่งที่มาของคราบเลือดว่าเป็นคราบเลือดของคน หรือ สัตว์ และ (2) หากพิสูจน์ว่าเป็นเลือดคนได้แล้ว คราบเลือดที่พบนั้นเป็นของใคร ซึ่งการตรวจสอบโดยปกติสามารถทำได้โดยเก็บตัวอย่างไปตรวจในห้อง ปฏิบัติการแต่กว่าจะได้ผลต้องใช้เวลานาน ด้วยเหตุนี้หากพัฒนาเทคนิคที่สามารถนำไปใช้ตรวจสอบคราบเลือดในสถานที่เกิดเหตุ เพื่อยืนยันผลได้ทันทีว่าเป็นเลือดคนไม่ใช่เลือดของสัตว์ ก็น่าจะเป็นประโยชน์ต่อการพิสูจน์หลักฐาน

การตรวจพิสูจน์ว่าเป็นคราบเลือดในสถานที่เกิดเหตุมักใช้วิธีทางเคมี (Chemical method) เนื่องจากเป็นวิธีการที่ให้ผลเร็ว นิยมใช้การทดสอบหาการทำงานของเอนไซม์ Peroxidase ทั้งนี้เพราะหมู่ Heme ที่พบบน Hemoglobin มีแอคติวิตีของเอนไซม์ Peroxidase ซึ่งสามารถเร่งการสลาย Hydrogen peroxide (H_2O_2) ได้เป็น Oxidizing species ที่สามารถทำปฏิกิริยากับสับสเตรทบางชนิดเกิดเป็นสารที่มีสี สับสเตรทที่นิยมใช้ เช่น Benzidine, Ortho-tolidine, Leucomalachite green, Leucocrystal violet และ Phenolphthalein (Kastle-Meyer test) ผลบวกของปฏิกิริยาขึ้นกับชนิดของสับสเตรทที่ใช้ หากใช้ Benzidine จะให้สีน้ำเงินแกมเขียว ส่วน Phenolphthalein จะให้สีชมพูในบางคดีผู้กระทำผิดอาจทำลายหลักฐานประเภทคราบเลือดโดยการเช็ด ล้าง หรือนำผ้าไปซัก ทำให้ไม่สามารถตรวจหาคราบเลือดได้ด้วยตาเปล่า จึงมีการพัฒนาเทคนิคการตรวจหาคราบเลือดโดยใช้ Luminol ซึ่งเป็นสารเคมีที่เมื่อเกิดปฏิกิริยา Peroxidase แล้วจะให้สารเรืองแสงสีฟ้า (รัฐ รัตนปริคณน์ และคณะ, 2551) ทำให้สามารถตรวจหาตำแหน่งของคราบเลือดได้ อย่างไรก็ตามการตรวจคราบเลือดด้วยวิธีทางเคมีไม่สามารถยืนยันผลว่าเป็นคราบเลือดได้ร้อยเปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์บางชนิด เช่น Catalase และ Peroxidase ที่พบในพืช และสัตว์ รวมทั้ง Oxidizing chemical เช่น Cu และ Fe สามารถให้ผลบวกกับการทดสอบดังกล่าว ด้วยเหตุนี้ตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับการทดสอบทางเคมี จำเป็นต้องนำไปทดสอบเพื่อยืนยันผลอีกครั้งว่าเป็นเลือดคน ซึ่งวิธีการทดสอบว่าเป็นเลือดคนหรือไม่นั้นนิยมใช้วิธีทดสอบทางชีวภาพ (Biological test)

วิธีทดสอบทางชีวภาพที่ใช้พิสูจน์ว่าเป็นเลือดคนนิยมใช้วิธีที่อาศัยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี เช่น Precipitin test ซึ่งเป็นการทดสอบที่ใช้แอนติบอดี คือ Anti-human serum ในการตรวจหาแอนติเจน คือ Human serum ในตัวกลางที่เป็นวุ้น หากเป็นเลือดคนจะเกิดปฏิกิริยาตกตะกอน (Precipitation) มองเห็นเป็นเส้นตะกอนสีขาว อย่างไรก็ตามข้อจำกัดของการทดสอบแบบนี้ คือ จำนวนเลือดที่นำมาทำการทดสอบต้องมีปริมาณมากพอ และโปรตีนที่อยู่ในเลือดต้องไม่ถูกทำลายถึงจะให้ผลบวก (วิน เชยชมศรี, ม.ป.ป.)

หลังจากพิสูจน์ได้แล้วว่าเป็นคราบเลือดของคนปัญหาที่สำคัญต่อมาคือการพิสูจน์ว่าคราบเลือดที่พบเป็นเลือดของใคร ซึ่งปัจจุบันนิยมใช้การตรวจดีเอ็นเอ เพราะเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่มีความน่าเชื่อถือสูง สำหรับการตรวจพิสูจน์บุคคลโดยใช้นิวเคลียร์ดีเอ็นเอ (Nuclear DNA) จะทำการวิเคราะห์บริเวณตำแหน่งที่เรียกว่า STR (Short tandem repeats) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการเรียงตัวของเบส 2-6 คู่เบส ซ้ำๆ กัน ประมาณ 7-15 ซ้ำ (วิชัย บุญแสง และคณะ, 2545) โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ (PCR, Polymerase chain reaction) ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงตำแหน่งดังกล่าวแล้วจึงตรวจสอบผลบนแผ่นอะกาโรสเจลด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis เพื่อดูขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ ขนาดของดีเอ็นเอขึ้นอยู่กับจำนวนซ้ำที่พบบน STR ซึ่งจะมีความหลากหลายในแต่ละบุคคล การตรวจพิสูจน์บุคคลมักวิเคราะห์ตำแหน่ง STR มากกว่า 1 ตำแหน่ง เนื่องจากหากวิเคราะห์ STR เพียงตำแหน่งเดียว ความเป็นไปได้ที่คนสองคนจะมีรูปแบบดีเอ็นเอเหมือนกันจะสูงกว่าการวิเคราะห์ STR หลายๆ ตำแหน่ง ปัจจุบันสถาบันนิติเวชตรวจพิสูจน์บุคคลโดยการวิเคราะห์ STR 16 ตำแหน่ง เช่น D3S1358, D21S11, D18S51 และ FGA เป็นต้น

แหล่งของดีเอ็นเอที่นำมาใช้ในการตรวจพิสูจน์บุคคลนอกจากคราบเลือดแล้ว ยังมีวัตถุพยานอื่นๆ อีก เช่น น้ำลายที่อาจพบตามก้นบุหรี่ ซองจดหมาย หรือปากถ้วยกาแฟ เส้นผม และเส้นขน ดังนั้นหากเราสามารถใช้เทคนิคที่ใช้ตรวจพิสูจน์บุคคลจากวัตถุพยานเหล่านี้ ภายในเวลาอันรวดเร็วก็น่าจะมีประโยชน์ต่อการจับตัวผู้กระทำความผิด งานวิจัยนี้จึงมุ่งหมายที่จะพัฒนาแผ่นทดสอบเพื่อใช้ในการตรวจพิสูจน์คราบเลือดคน โดยใช้แอนติบอดีที่ผลิตขึ้นเอง พร้อมทั้งใช้เทคนิคพีซีอาร์ที่สามารถพิสูจน์บุคคล จากตัวอย่างเลือด เส้นผม และน้ำลายได้อย่างรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพ

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อพัฒนาแผ่นทดสอบสำหรับใช้ตรวจพิสูจน์คราบเลือดของคน

1.2.2 เพื่อใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการพิสูจน์บุคคลจากสิ่งส่งตรวจประเภท เลือด เส้นผม และน้ำลาย

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาแผ่นทดสอบสำหรับจำแนกเลือดคนจากเลือดของสัตว์ โดยใช้ IgG ที่พบในซีรัมของคนเป็นเป้าหมายของการจำแนกความแตกต่าง ในการทดลองจะเตรียมแอนติบอดีต่อ IgG ของคน (Anti-human IgG) ในหนูทดลอง จากนั้นจะนำมาทดสอบหาความไวและความจำเพาะเจาะจงของ Anti-human IgG กับเลือดคน แล้วนำ Anti-human IgG มาติดฉลากด้วยเอนไซม์ Alkaline phosphatase และทดสอบแอนติบอดีที่ทำการติดสลากกับเอนไซม์กับเลือดสัตว์ชนิดต่างๆ ได้แก่ ปลาทับทิม ปลานิล ปลาไหล ปลาดุก แพะ แกะ วัว หมูกระต่าย กบ หนู สุนัข แมว ไก่ เป็ด และนก ด้วยวิธี Dot blotting เพื่อนำไปพัฒนาแผ่นทดสอบสำหรับตรวจพิสูจน์เลือดคนต่อไป

สำหรับการพิสูจน์บุคคลด้วยเทคนิคพีซีอาร์จะทำการเลือกไพร์เมอร์ตรงบริเวณที่มีลำดับเบสซ้ำที่สามารถแยกความแตกต่างของบุคคลได้ โดยไพร์เมอร์ที่เลือก 10 คู่ เพื่อให้ค่าความสามารถในการระบุบุคคลสูง ตัวอย่างดีเอ็นเอที่จะนำมาวิเคราะห์จะเตรียมจาก เลือด น้ำลาย และเส้นผม

1.4 สถานที่ทำการวิจัย

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ได้แอนติบอดีที่มีความสามารถในการแยกเลือดคนออกจากเลือดสัตว์ชนิดต่างๆ เช่น ปลาทับทิม ปลานิล ปลาไหล ปลาดุก แพะ แกะ วัว หมูกระต่าย กบ หนู สุนัข แมว ไก่ เป็ด และนก

1.5.2 สามารถนำผลการทดลองที่ได้ไปพัฒนาเพื่อผลิตแผ่นทดสอบสำหรับใช้ในการตรวจพิสูจน์เลือดคนได้อย่างถูกต้อง รวดเร็ว และราคาถูก

1.5.3 สามารถระบุบุคคลจากตัวอย่างเลือด น้ำลาย และเส้นผม ด้วยเทคนิคพีซีอาร์และสามารถนำไปใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์ได้