บทที่ 2
วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 วัตถุพยานทางนิติวิทยาศาสตร์

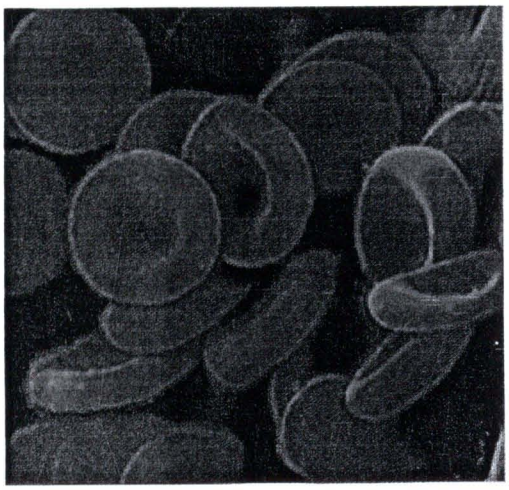
ในการสืบสวนคดีต่างๆ วัตถุพยานเป็นสิ่งสำคัญในการสืบสวน สอบสวน เพื่อหาตัวผู้กระทำความผิด วัตถุพยานสามารถจำแนกได้เป็น (1) วัตถุพยานทางกายภาพ เช่น กลิ่น ภาพถ่าย รอยกระสุนปืน เป็นต้น และ (2) วัตถุพยานทางชีวภาพ เช่น เลือด เส้นผม น้ำลาย น้ำอสุจิ และของเหลวทางสรีระวิทยาอื่นๆ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกันแล้ว วัตถุพยานทางชีวภาพเป็นวัตถุพยานที่สามารถแสดงความสัมพันธ์โดยตรงกับผู้ต้องหาหรือผู้เสียหายได้ เนื่องจากวัตถุพยานเหล่านี้จะได้มาจากผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับอาชญากรรมในทางใดทางหนึ่ง และในบรรดาวัตถุพยานทางชีววิทยาที่กล่าวมาข้างต้น พบว่าวัตถุพยานประเภท เลือด เส้นผม และน้ำลาย จะพบได้ในสถานที่เกิดเหตุมากกว่าวัตถุพยานทางชีวภาพประเภทอื่นๆ

2.1.1 วัตถุพยานทางชีวภาพประเภทเลือด

เลือดเป็นของเหลวที่สำคัญต่อร่างกายสิ่งมีชีวิต โดยเลือดเป็นสิ่งแวดล้อมภายในร่างกายที่สำคัญของเซลล์ (ศักดา ดาดวง, 2552) คนเรามีเลือดประมาณร้อยละ 7-8 ของน้ำหนักตัว เลือดประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นของเหลวเรียกว่าน้ำเลือดหรือพลาสมา (Plasma) ซึ่งมีประมาณร้อยละ 55 ของปริมาณเลือดทั้งหมด ส่วนที่เหลืออีกประมาณร้อยละ 45 เป็นส่วนของเม็ดเลือด ซึ่งประกอบด้วยเซลล์เม็ดเลือดแดง (Erythrocyte) เซลล์เม็ดเลือดขาว (Leucocyte) และเพลตเลต (Platelet) เลือดของคนเรามีความถ่วงจำเพาะประมาณ 1.055-1.065 และมี pH ประมาณ 7.3-7.4 ในคนแต่ละคนมีปริมาณเลือดไม่เท่ากัน ขึ้นอยู่กับเพศ อายุ น้ำหนัก สุขภาพ ในผู้ใหญ่ปกติหนัก 70 กิโลกรัม จะมีเลือดประมาณ 5 ลูกบาศก์เดซิเมตร หรือประมาณ 5 ลิตร โดยเฉลี่ยผู้ชายมีเลือดมากกว่าผู้หญิง ส่วนประกอบของเลือดที่เป็นเซลล์มีอยู่ประมาณร้อยละ 45 ของเลือดทั้งหมด ประกอบด้วย

(1) เซลล์เม็ดเลือดแดง (Red blood cell or erythrocyte)

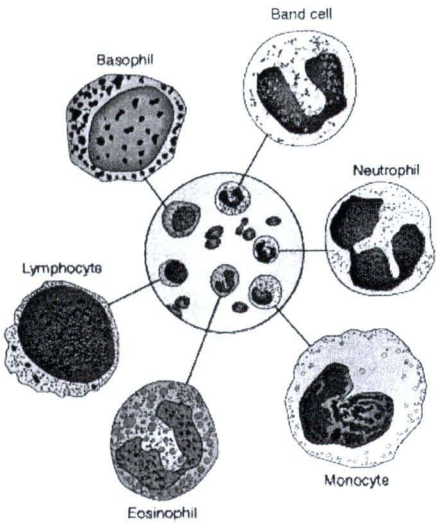
เป็นเซลล์สีแดง มีรูปร่างเป็นทรงกลมแบน คล้ายเหรียญบาทแต่ตรงกลางบุ๋มเข้าไป หรือคล้ายขนมโดนัท (ภาพที่ 2.1) จัดว่าเป็นเซลล์ที่เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของเม็ดเลือด พบว่าในเลือด 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร (1 ไมโครลิตร) มีเม็ดเลือดแดงอยู่ 4 ล้าน ถึง 5 ล้านเซลล์ ภายในเม็ดเลือดแดงมีฮีโมโกบิน (Hemoglobin) ที่สามารถจับและปล่อยออกซิเจนได้ เม็ดเลือดแดงจึงทำหน้าที่ที่สำคัญ คือ การขนส่งออกซิเจนจากปอดไปยังกล้ามเนื้อและอวัยวะต่าง ๆ ในร่างกายของเรา



ภาพที่ 2.1 เซลล์เม็ดเลือดแดง (อุทัยวัน โพธิศิริ, 2552)

(2) เซลล์เม็ดเลือดขาว (White blood cell or leucocyte)

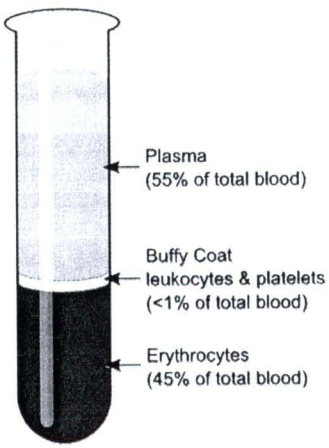
ในเลือด 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร มีเม็ดเลือดขาวอยู่ 4,000-9,000 เซลล์ เซลล์เม็ดเลือดมีหลายชนิด (ภาพที่ 2.2) ในจำนวนนี้กว่าครึ่งหนึ่งเป็นประเภทนิวเคลียสมีหลายพู (Lobe) ที่มีชื่อว่า นิวโทรฟิล (Neutrophil) ทำหน้าที่สำคัญ คือ ช่วยต่อต้านการติดเชื้อ ดังนั้น หากเม็ดเลือดขาวมีจำนวนลดลง ร่างกายเราก็จะติดเชื้อได้ง่าย เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดอื่นก็ได้แก่ อีโอซิโนฟิล (Eosinophill) และ เบโซฟิล (Basophil) ซึ่งมีจำนวนน้อยกว่านิวโทรฟิลมาก เซลล์เหล่านี้มีความสามารถในการกลืนกิน (Phagocytosis) แล้วยังเกี่ยวข้องกับอาการภูมิแพ้ต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นหอบหืด อาการแพ้ละอองเกสร หรือไข้ละอองฟาง เป็นต้น มักพบว่าผู้ป่วยที่มีอาการภูมิแพ้เหล่านี้จะมีจำนวนเซลล์อีโอซิโนฟิลเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังมีเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ (Lymphocyte) ซึ่งมีจำนวน 30% ของเม็ดเลือดขาวทั้งหมด ลิมโฟไซต์เป็นเซลล์รูปร่างกลม มีลักษณะพิเศษ คือ นิวเคลียสขนาดใหญ่มาก กินเนื้อที่ถึงกว่า 50% ของเซลล์ เป็นที่ทราบกันดีว่า ลิมโฟไซต์มีบทบาทสำคัญต่อการทำหน้าที่ของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย



ภาพที่ 2.2 เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ (เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ, ม.ป.ป.)

(3) เกล็ดเลือด (Platelet)

เกล็ดเลือดเป็นชิ้นส่วนของเซลล์เมกะแคริโอไซต์ (Megakaryocyte) ในไขกระดูกมีขนาดเล็กประมาณ 2-4 ไมโครเมตร มีอายุค่อนข้างสั้น เพียง 7-10 วันเท่านั้น เกล็ดเลือดมีหน้าที่สำคัญในการช่วยให้เลือดแข็งตัว (Blood clot) ซึ่งการแข็งตัวของเลือดยังต้องอาศัยอีกองค์ประกอบหนึ่ง คือ พลาสมา (Plasma) หากเติมสารป้องกันป้องกันการแข็งตัวของเลือดลงในเลือด แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงจะสามารถทำให้เม็ดเลือดทั้งสามชนิดแยกตัวออกจากกันได้ (ภาพที่ 2.3) ส่วนบนที่มีสีเหลืองอ่อนใสจะเรียกว่า พลาสมา แต่ถ้าหากไม่เติมสารป้องกันเลือดแข็งตัว แต่ปล่อยให้เลือดแข็งตัวไปเอง จากนั้นนำไปแยกโดยการหมุนเหวี่ยงจะได้ ซีรัม (Serum) ความแตกต่างระหว่างพลาสมากับซีรัมก็คือ พลาสมาจะยังมี ไฟบริโนเจน (Fibrinogen) ซึ่งเป็นส่วนประกอบหนึ่งในการแข็งตัวของเลือดปะปนอยู่ แต่ไม่พบไฟบริโนเจนในซีรัม พบว่าส่วนประกอบของพลาสมาเป็นน้ำ 90% ส่วนที่เหลือคือโปรตีนอัลบูมิน โกลบูลิน โปรตีนอื่นๆ และยังมีน้ำตาล ไขมัน รวมทั้งแร่ธาตุชนิดต่างๆ เป็นส่วนประกอบอีกด้วย



ภาพที่ 2.3 เกล็ดเลือดและพลาสมา (เกล็ดเลือดและพลาสมา, 2552)

2.1.2 วัตถุพยานทางชีวภาพประเภทเส้นผม

เส้นผม เป็นวัตถุพยานที่สำคัญอีกอย่างหนึ่ง เนื่องจากมีลักษณะพิเศษคือ มีความคงทนไม่เน่าเสียง่าย และสารเคมีหรือสารพิษบางอย่างที่เข้าสู่ร่างกายอาจถูกสะสมไว้ในเส้นผมได้ (อรรถพล แช่มสุวรรณวงศ์ และคณะ, 2544) เส้นผมประกอบด้วยส่วนสำคัญ 3 ส่วน ได้แก่

(1) ราก (Root) รูปร่างเป็นกระเปาะหุ้มส่วนโคนของเส้นผม

(2) เส้นผม (Shaft) ประกอบด้วยเซลล์ 3 ชั้น

– ชั้นนอก (Cuticle) ชั้นนอก มีประมาณ 6-10 ชั้น ตรงโคนหนากว่าปลายเส้นผม เซลล์จะเรียงต่อ ทับกัน เหมือนกับ การสร้างหลังคาบ้าน ปลายที่เป็นอิสระจะชี้ไปทางปลายเส้นผม ทำให้เกิดลักษณะลายของเปลือกหุ้ม

– ชั้นกลาง (Cortex) ชั้นกลาง ประกอบด้วยเซลล์อัดแน่นเป็นเนื้อเดียวกัน ทำให้เส้นผมแข็งแรง มีเส้นใยเล็กๆ ทอดยาว ตลอดความยาวเส้น

– ชั้นใน (Medulla) ชั้นใน ประกอบด้วยเซลล์ที่มีโพรงอากาศอยู่ อาจมีอยู่ติดต่อกันทั้งเส้น หรืออยู่เป็นระยะๆ

(3) ส่วนปลาย โดยทั่วไปส่วนปลายจะแหลมนอกจากมีการตัด หรือมีการแปรงผมบ่อยๆ ส่วนปลายอาจแตกได้

2.1.3 วัตถุพยานทางชีวภาพประเภทน้ำลาย

น้ำลาย คือ สสารที่คล้ายน้ำ และมักเป็นฟอง ถูกผลิตขึ้นโดยต่อมน้ำลายและต่อมเมือก และหลั่งออกมาในปากของคนและสัตว์เป็นส่วนใหญ่ (สุรินทร์ เวทย์วิทยานุวัฒน์, ม.ป.ป.) ในน้ำลายมีเอนไซม์ที่สามารถย่อยแป้ง และไขมันที่อยู่ในอาหารในระดับโมเลกุล ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของกระบวนการย่อยอาหาร น้ำลายมีลักษณะเป็นของเหลว มี 2 ชนิด

(1) ชนิดใส (Serous) มีน้ำย่อยอะไมเลส (Amylase) หรือไทยาลิน (Ptyalin) โดยทำหน้าที่ย่อยแป้งให้เป็นเดกซ์ตริน (Dextrin) ซึ่งเป็นแป้งที่มีโมเลกุลเล็กลง

(2) ชนิดเหนียว (Mucous) ช่วยในการคลุกเคล้าอาหารผสมกับน้ำย่อยเกิดได้ดี และสะดวกต่อการกลืนอาหาร

ส่วนประกอบที่พบในน้ำลายมีดังนี้

(1) น้ำ และสารจำพวกอิเล็กโตรไลต์

(2) เมือก (Mucus)

(3) สารยับยั้งแบคทีเรีย เช่น สารประกอบไทโอไซยาไนด์ อิมมูโนโกลบูลิน เอ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

(4) เอนไซม์ มีสามชนิดเป็นหลัก ได้แก่ แอลฟา-อะไมเลส (α-amylase) ไลโซไซม์ (Lysozyme) ซึ่งช่วยทำให้แบคทีเรียสลายตัว และไลเปส (Lingual lipase)

(5) เซลล์ ซึ่งมีทั้งเซลล์ของคนและเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งในน้ำลายมีเซลล์ของคนส่วนใหญ่มาจากเยื่อบุข้างแก้ม

2.2 การตรวจวัตถุพยานทางนิติวิทยาศาสตร์

2.2.1 วัตถุพยานประเภทเลือด

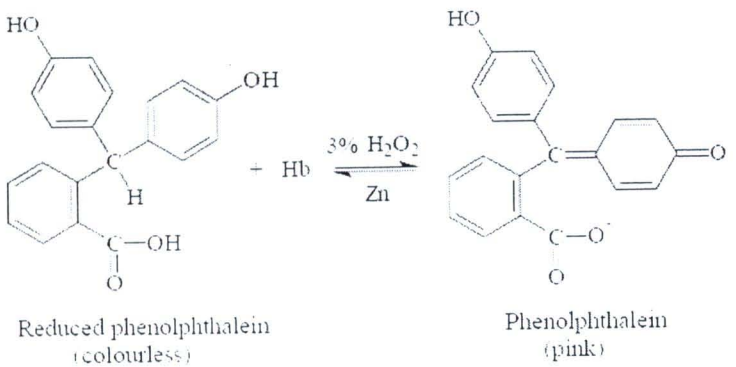
การตรวจเลือดเป็นส่วนสำคัญในการพิสูจน์หลักฐานในหลายๆ กรณีโดยเฉพาะคดีฆาตกรรมที่มีความรุนแรง เลือดจากที่พบในที่เกิดเหตุ อาจมีทั้งแบบสด และแห้ง ในกรณีที่เหตุเพิ่งเกิดอาจเก็บตัวอย่างเลือดได้ใน ลักษณะเป็นของเหลวหรือเป็นก้อนเลือด แต่ส่วนใหญ่แล้วเลือดที่ได้ในที่เกิดเหตุมักเป็นคราบเลือดแห้งที่ติดอยู่ตามอาวุธ เสื้อผ้า หรือวัตถุอื่นๆ การตรวจพิสูจน์เลือดนั้นแบ่งออกได้เป็น 4 ขั้นตอนดังนี้ (อรรถพล แช่มสุวรรณ และคณะ, 2544)

- พิสูจน์ขั้นต้นเพื่อสันนิษฐานว่าวัตถุที่ต้องสงสัยอาจเป็นคราบเลือด
- พิสูจน์ยืนยันว่าวัตถุที่สงสัยเป็นเลือดจริง
- พิสูจน์ยืนยันว่าวัตถุสงสัยเป็นเลือดคน
- พิสูจน์ยืนยันว่าวัตถุสงสัยมีหมู่เลือดหมู่ใด

2.2.1.1 การตรวจพิสูจน์ขั้นต้น

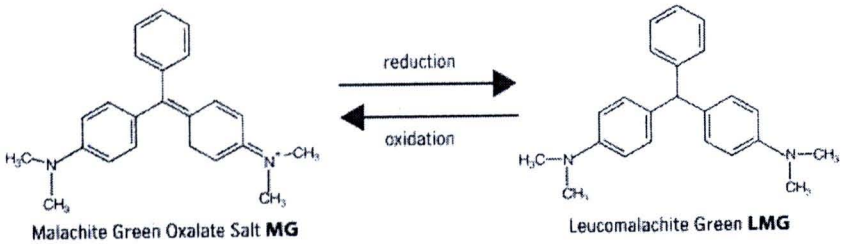
วิธีที่ใช้ในการตรวจพิสูจน์เลือดขั้นต้นนี้ ที่รู้จักกันมากคือ Benzidine test (Pascual and Grifo, 1995) เป็นวิธีง่ายและสะดวก รวดเร็ว มีความไวปานกลาง วิธีนี้เป็นการทดสอบที่อาศัยการสลายตัวของ Hydrogen peroxide โดยอาศัยแอคติวิตีของเอนไซม์ Peroxidase ของหมู่ Heme ที่พบบนฮีโมโกลบิน ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำ และออกซิเจน ซึ่งต่อมาจะไปออกซิไดซ์สารตั้งต้น (Benzidine) ทำให้เปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีน้ำเงิน

Phenolphthalein test อาศัยหลักการเหมือนกับ Benzidine test แต่ใช้ Phenolphthalein เป็นสารตั้งต้น ผลการทดสอบจะให้สีชมพู (ภาพที่ 2.4) วิธีนี้มีความไวมากกว่า Benzidine test แม้คราบเลือดที่เจือจางมากๆ ก็ยังสามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธี



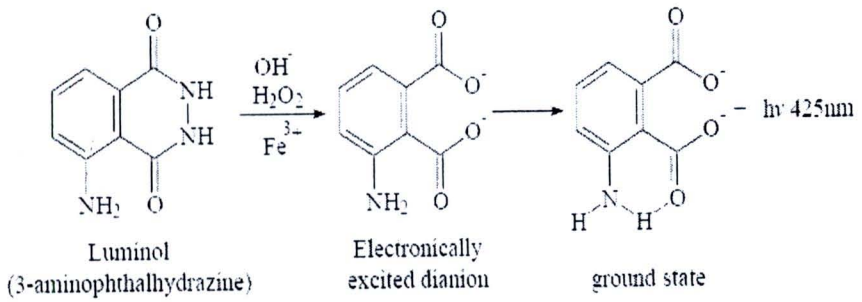
ภาพที่ 2.4 ปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงสีของ Phenolphthalein test (Heather Wansbrough, ม.ป.ป.)

Leucomalachite-green test (รัฐและคณะ, 2551) เป็นการทดสอบโดยใช้ Leucomalachite green (LMG) ซึ่งเป็นสารไม่มีสีเป็นสารตั้งต้น การทดสอบอาศัยหลักการสลายตัวของ H_2O_2 โดยอาศัยแอคติวิตีของเอนไซม์ Peroxidase บนหมู่ Heme จากนั้นออกซิเจนที่ได้จากการสลาย H_2O_2 จะออกซิไดซ์ LMG ให้เป็น Malachite green มีสีเขียว (ภาพที่ 2.5)



ภาพที่ 2.5 ปฏิกิริยารีดอกซ์ของ Leucomalchite green (LMG) (Julie Kowalski, ม.ป.ป.)

Luminol test เป็นการทดสอบที่อาศัยการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ Luminol กับ H_2O_2 โดยมี Fe ที่เป็นองค์ประกอบของฮีโมโกลบินบนเม็ดเลือดแดงเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เกิดประกายเรืองแสงออกมาเรียกว่า Luminescence (ภาพที่ 2.6) ซึ่งสังเกตได้ในห้องที่มืด หรือบนเสื้อผ้าสีมืด เช่น สีดำ น้ำตาลแก่ วิธีนี้สามารถใช้ตรวจ สอบคราบเลือดที่มีปริมาณน้อยมากจนมองไม่เห็น หรือใช้ตรวจสอบคราบเลือดบนเสื้อผ้าที่ผ่านการซักล้างมาแล้ว โดยนำเสื้อผ้าที่สงสัยว่ามีคราบเลือดอยู่มาฉีด Luminol ในห้องมืด สังเกตบริเวณที่ปรากฏประกายวาวเรืองแสงแล้วทำเครื่องหมายไว้ จากนั้นจึงเอาเศษใยผ้าบริเวณนั้นมาตรวจสอบด้วยวิธีอื่นเพื่อการยืนยัน



ภาพที่ 2.6 ปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงของ Luminol test (Heather Wansbrough, ม.ป.ป.)

การทดสอบคราบเลือดวิธีต่างๆ ที่กล่าวมาข้างต้นอาจให้ผลบวกลวงกับการทดสอบที่มีสารปนเปื้อนบางอย่าง เช่น เอนไซม์ Catalase และ Peroxidase ที่พบมากในพืช และสัตว์ หรือ Oxidizing chemical เช่น Fe Cu ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นต้องมีการทดสอบอื่น เพื่อยืนยันว่าคราบที่พบเป็นคราบเลือดจริงๆ

2.2.1.2 การตรวจพิสูจน์ยืนยันว่าเลือดจริง

ขั้นตอนนี้จะใช้การตรวจที่เรียกว่า Crystal test ดูการเกิดผลึกของ Heme กับน้ำยาบางชนิด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่นิยมใช้มากมีสองชนิด ได้แก่ Hematin และ Hemochromogen แต่ข้อเสียของวิธีนี้คือ ความไวต่ำ ใช้ได้เฉพาะกับการตรวจเลือดที่มีปริมาณมาก และบางครั้งสภาพแวดล้อมก็มีส่วนทำให้ไม่เกิดผลึก ซึ่งทำให้ในทางปฏิบัติจะข้ามขั้นตอนนี้ไปตรวจในขั้นที่สามแทน ซึ่งเป็นขั้นตอนที่พิสูจน์ว่าเป็นเลือดคนหรือไม่

2.2.1.3 การตรวจพิสูจน์ยืนยันว่าเป็นเลือดคน

นิยมใช้หลักการจับกันอย่างจำเพาะของแอนติเจน (Antigen) และแอนติบอดี (Antibody) โดยแอนติบอดีที่ใช้ตรวจว่าเป็นเลือดคนจะใช้ Anti-human serum เทคนิคที่นิยมใช้กัน คือ Precipitin test ถ้าปฏิกิริยาที่ได้เป็นบวก จะมีการตกตะกอนเกิดขึ้น แต่ถ้าหากการทดสอบให้ผลลบก็ยังไม่ได้หมายความว่าของเหลวที่สงสัยไม่ใช่เลือดมนุษย์ ทั้งนี้เนื่องจากว่าจำนวนเลือดที่มาตรวจสอบด้วยวิธีนี้อาจมีปริมาณน้อยเกินไปหรือโปรตีนในเลือดถูกทำลายไปแล้ว วิธีการทดสอบ Precipitin test ทำได้โดยนำเอาเลือดที่สกัดได้จากคราบเลือดที่พบบนวัตถุพยาน ใส่ Tube เล็กๆ จากนั้นจึงค่อยๆ เติม Anti–human serum ลงไป แล้วทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยา จากนั้นจึงอ่านผลโดยสังเกต Precipitin line ตรงรอยต่อระหว่างคราบเลือดและ Anti–human serum ซึ่งหากเกิด Precipitin line แสดงว่าเลือดที่นำมาทดสอบนั้นเป็นเลือดคน

2.2.1.4 การตรวจพิสูจน์ยืนยันว่าวัตถุสงสัยมีหมู่เลือดหมู่ใด

ในการตรวจหาหมู่เลือดนั้นแบ่งออกได้สองประเภทตามลักษณะตัวอย่างเลือด (1) การตรวจหมู่เลือดในตัวอย่าเลือดสด จะใช้วิธีการสังเกต Agglutination ของเซลล์เม็ดเลือดแดงเมื่อถูกผสมด้วย Anti-serum A หรือ Anti-serum B และ (2) การตรวจหมู่เลือดในตัวอย่างที่เป็นคราบเลือดหรือเลือดแห้ง ซึ่งถ้าเลือดยังใหม่อยู่และมีปริมาณเพียงพออาจใช้การตรวจ Agglutinin ในเลือดโดยตรงได้ แต่ถ้าเป็นเลือดเก่าหรือมีปริมาณน้อย วิธีการที่ใช้ตรวจ คือ Absorption elution หลักการที่ใช้ในการตรวจ คือ เมื่อเติมแอนติบอดีเข้ากับแอนติเจนชนิดเดียวกันในอุณหภูมิที่เหมาะสมจะเกิด Agglutination แต่เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นการจับกันของแอนติเจนกับแอนติบอดีจะเสียสภาพ แอนติเจนจะถูกปล่อยจากแอนติบอดี เมื่อหยดเม็ดเลือดแดงที่ทราบหมู่เลือดลงไป จะเกิด Agglutination ซึ่งแอนติเจนในเลือดนั้นจะเป็นหมู่เดียวกับหมู่เลือดของเม็ดเลือดแดงที่หยดลงไป การตรวจด้วยวิธี Mixed agglutination ใช้หลักการเดียวกับ Absorption elution แต่ต่างกันตรงไม่ต้องทำให้แอนติบอดีถูกปล่อยออกมา โดยแอนติบอดีด้านหนึ่งจับกับแอนติเจนในคราบเลือด อีกด้านหนึ่งจะจับกับเม็ดเลือดแดงที่หยดลงไปที่ทราบหมู่เลือดแล้ว และวิธีการตรวจอีกวิธีหนึ่ง คือ

Absorption inhibition โดยแอนติเจนกับแอนติบอดีชนิดเดียวกันจะจับกัน และการจับของแอนติเจนจะลดลง เมื่อหยดเม็ดเลือดแดงที่ทราบหมู่แล้วจะทำให้เกิด Agglutination ลดลง

จากการศึกษาการใช้แอนติบอดีในการตรวจพิสูจน์เลือดคน พบว่า Anti-human IgG antibody สามารถจับกับเลือดคนทั้งเลือดสดและแห้ง แม้เลือดที่ตรวจจะผ่านการทำแห้งที่ 80°C และเก็บไว้เป็นเวลา 10 วัน ก็ยังคงให้ผลบวกในการทดลอง แต่อย่างไรก็ตามยังพบการเกิดปฏิกิริยาข้าม (Cross reaction) ของแอนติบอดีดังกล่าวกับเลือดของสัตว์อื่น ได้แก่ สุนัข หมูและกระต่าย (วัชระ ถาวรพงษ์, 2550) ในการพัฒนาชุดทดสอบที่มี Anti-glycophorin A monoclonal antibody เพื่อตรวจตัวอย่างเลือด พบว่าชุดทดสอบสามารถตรวจสอบเลือดมนุษย์ได้อย่างแม่นยำและไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารคัดหลั่งในส่วนต่างๆ ของร่างกาย เช่น น้ำลาย น้ำมูก หรือ อสุจิ เป็นต้น และชุดทดสอบยังสามารถตรวจสอบคราบเลือดที่ผ่านการชำระล้างจากสารทำความสะอาดต่างๆ ได้ (Schweers *et al.*, 2007) ในปี ค.ศ. 2009 Hurley และคณะ ได้พัฒนาการทดสอบที่สามารถตรวจเลือดคนจากตัวอย่างเลือดและคราบเลือดแห้งด้วยเทคนิค ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) แบบ Direct competitive โดยใช้แอนติบอดีชนิด Polyclonal ที่จำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลินชนิดจี (IgG) ของคน พบว่าเทคนิค ELISA มีความจำเพาะต่อ IgG ของคน โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับ IgG ของหมู, แกะ, วัว, แพะ, ม้า และกระต่าย และพบว่าการทดสอบมีความไวสูงสามารถตรวจพบ IgG ได้ที่ปริมาณต่ำสุดที่ความเข้มข้น 0.1 μg/mL เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจเลือดอื่นๆ การทดสอบนี้สามารถตรวจพิสูจน์เลือดคนได้แม้จะผสมกับเลือดของสัตว์อื่นๆ สามารถพิสูจน์เลือดคนจากคราบบนพื้นผิวชนิดต่างๆ และให้ผลบวกกับคราบเลือดที่มีอายุมากกว่า 1 ปี

2.2.2 วัตถุพยานประเภทเส้นผม

การตรวจพิสูจน์เส้นผม เป็นการตรวจเปรียบเทียบลักษณะต่างๆทั้งภายนอกและภายในของเส้นผม (อรรถพล แช่มสุวรรณและคณะ, 2546)

(1) ลักษณะภายนอกที่สามารถตรวจดูได้ด้วยตาเปล่า คือความยาว สี ความโค้ง ความหยิกงอของลำเส้น ความสะอาด สิ่งแปลกปลอมที่ติดอยู่กับเส้นผม เช่น น้ำมัน ความหยาบ ความอ่อนนุ่ม ร่องรอยการบุบสลาย เช่น การถูกตัดหรือการถูกบด

(2) ลักษณะภายในที่ต้องตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ คือ ปลายผมและราก เปลือกนอก ส่วนนอก และแกนในโดยใช้กล้องจุลทรรศน์

การตรวจพิสูจน์ว่าเป็นเส้นผมของผู้ใด หรือยืนยันว่าเป็นผมของผู้ต้องหาหรือไม่จะใช้การตรวจเปรียบเทียบดีเอ็นเอจากรากผม

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

2.2.3 วัตถุพยานประเภทน้ำลาย

น้ำลายและคราบน้ำลายเป็นพยานหลักฐานทางชีวภาพชนิดหนึ่ง การตรวจว่าเป็นคราบน้ำลายจะใช้หลักการตรวจหา Amylase ในน้ำลาย เช่น วิธี Starch-iodine สำหรับการตรวจพิสูจน์น้ำลายว่าเป็นของคนจะใช้วิธี Precipitin test หรือ Gel diffusion ซึ่งอาศัยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนในน้ำลายกับ Anti-human serum ได้ตะกอนสีขาวขุ่นตรงรอยต่อระหว่างสารทั้งสอง ส่วนการตรวจว่าเป็นน้ำลายของผู้ใดนั้นจะใช้การตรวจเปรียบเทียบดีเอ็นเอ โดยจะทำการสกัดดีเอ็นเอจากน้ำลาย ซึ่งดีเอ็นเอที่ได้จะมาจากเซลล์ข้างกระพุ้งแก้มที่มักพบในน้ำลาย

2.3 การตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล

ปัจจุบันวิทยาศาสตร์มีความก้าวหน้าและสามารถนำมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์อย่างกว้างขวาง วิธีการหนึ่งที่ได้พัฒนาเพื่อใช้ตรวจสอบตัวบุคคล คือ การตรวจสอบความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอของมนุษย์ ทุกคนจะมีความแตกต่างกัน เนื่องจากพ่อและแม่จะถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมไปสู่ลูก ผ่านทางโครโมโซม โดยจะมาจากพ่อครึ่งหนึ่ง และจากแม่อีกครึ่งหนึ่งกลายเป็นดีเอ็นเอชุดใหม่ของลูกที่มีเอกลักษณ์เฉพาะตัว ซึ่งสามารถนำมาตรวจพิสูจน์บุคคลได้อย่างชัดเจนและแม่นยำ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552) การตรวจสอบสอบทำได้โดยการเปรียบเทียบลักษณะของดีเอ็นเอระหว่างพ่อ แม่ ลูก ซึ่งได้จากตัวอย่างเลือด คราบอสุจิ น้ำลาย หรือเนื้อเยื่ออื่นๆ การตรวจดีเอ็นเอเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง เป็นที่ยอมรับ และมีความน่าเชื่อถือสูง ให้ผลความถูกต้องแม่นยำ การตรวจดีเอ็นเอในทางนิติวิทยาศาสตร์เช่น การพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลกรณีเกิดอาชญากรรมหรือเกิดภัยพิบัติต่างๆ การตรวจความเป็นพ่อแม่ลูกหรือความสัมพันธ์ระหว่างเครือญาติ การตรวจดีเอ็นเอในพืชและสัตว์เพื่อระบุชนิดหรือสายพันธุ์ที่ถูกต้อง การตรวจสอบการปลอมปนของตัวอย่างในทางการค้า เช่น การตรวจการปลอมปนของเนื้อหมูในอาหารฮาลาล เป็นต้น

การตรวจดีเอ็นเอเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลมีการพัฒนามานาน จากแต่ก่อนที่เป็นการตรวจโดยใช้วิธีไฮบริไดเซชัน และ Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ซึ่งเป็นวิธีที่ยุ่งยาก ใช้เวลานานและข้อจำกัดหลายประการ มาเป็นการตรวจสอบดีเอ็นเอส่วนไมโครแซลเทลไลท์ (Microsatellite) โดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งทำได้ง่ายและรวดเร็วขึ้น รวมทั้งมีประสิทธิภาพในการแยกแยะสูงมีมาตรฐานและเป็นที่ยอมรับ สามารถใช้เป็นหลักฐานในชั้นศาลได้

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 12 ก.ย. 2555
เลขทะเบียน 249520
เลขเรียกหนังสือ

2.3.1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอหรือสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ไม่ว่าจะเป็นคน สัตว์ หรือสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวมีความแตกต่างกัน เมื่อนำมาพิจารณาจะพบว่าเป็นลายพิมพ์เหมือนบาร์โค๊ดหรือลายพิมพ์นิ้วมือที่ใช้จำแนกความแตกต่างเฉพาะตัว เรียกว่า ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (วิชัย บุญแสงและคณะ, 2545) ซึ่งมีความหมายตรงกับคำศัพท์เทคนิคหลายคำ เช่น DNA profile, Genetic profile และ DNA fingerprint จำนวนดีเอ็นเอทั้งหมดบนโครโมโซมนั้นประกอบ ด้วย DNA 2 ส่วน ส่วนหนึ่งนั้น คือ ยีน (Coding DNA) ซึ่งมีจำนวนร้อยละ 5 ของดีเอ็นเอทั้งหมด ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างโปรตีนที่มีความสำคัญต่อกลไกต่างๆ ภายในร่างกาย ส่วนที่ 2 ไม่ใช่ยีน (Non-coding DNA หรือ Junk DNA) มีจำนวนมากถึงร้อยละ 95 เป็นดีเอ็นเอส่วนที่ยังไม่ทราบหน้าที่ชัดเจนแต่อาจจะมีความสำคัญต่อกลไก และการทำงานร่วมกันกับดีเอ็นเอส่วนที่เป็นยีน เพียงแต่ในขณะนี้ยังไม่มีการค้นพบว่ากลไกการทำงานเป็นอย่างไร ดีเอ็นเอส่วนที่เป็น Junk DNA เป็นส่วนที่เป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างระหว่างบุคคลเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลได้

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอสร้างมาจากดีเอ็นเอ (Deoxyribonucleic acid) ซึ่งเป็นสารพันธุกรรมที่ทำหน้าที่ควบคุมลักษณะต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต รวมทั้งเก็บและถ่ายทอดข้อมูลพันธุกรรมไปสู่ลูกหลาน คนแต่ละคนจะมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ไม่เหมือนกัน จึงสามารถใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในการระบุบุคคลได้ เทคโนโลยีลายพิมพ์ดีเอ็นเอในระยะเริ่มต้นประกอบด้วยวิธีการที่ค่อนข้างยุ่งยากเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ เพราะว่าการวิจัยในสมัยนั้นใช้เพียงขั้นตอนพื้นฐาน เช่น การสกัดดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ การตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบ (Probe) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้ตัวอย่างในปริมาณที่มาก (เลือด 5-10 ml) เพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ แต่วิธีนี้มีข้อเสียคือ มีความจำเพาะเจาะจงต่ำ เนื่องจากดีเอ็นเอตรวจสอบที่ใช้สามารถจับกับดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นได้ อีกทั้งขั้นตอนที่ทำต้องอาศัยผู้ที่มีความชำนาญเป็นอย่างดี จึงได้มีการนำเทคนิคพีซีอาร์มาใช้แทน โดยทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงบริเวณที่มีลำดับเบสซ้ำที่เรียกว่า มินิแซทเทลไลท์ และไมโครแซลเทลไลท์ ทำให้การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอทำได้ง่ายขึ้น และทราบผลภายใน 1-2 วัน อีกทั้งการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่าง ไม่จำเป็นต้องใช้เลือดในปริมาณที่มาก ทำให้สามารถวิเคราะห์คราบเลือดได้ ปัจจุบันได้มีการพัฒนาการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นด้วยเครื่องอัตโนมัติทำให้สะดวก รวดเร็วและสามารถตรวจตัวอย่างได้จำนวนมาก

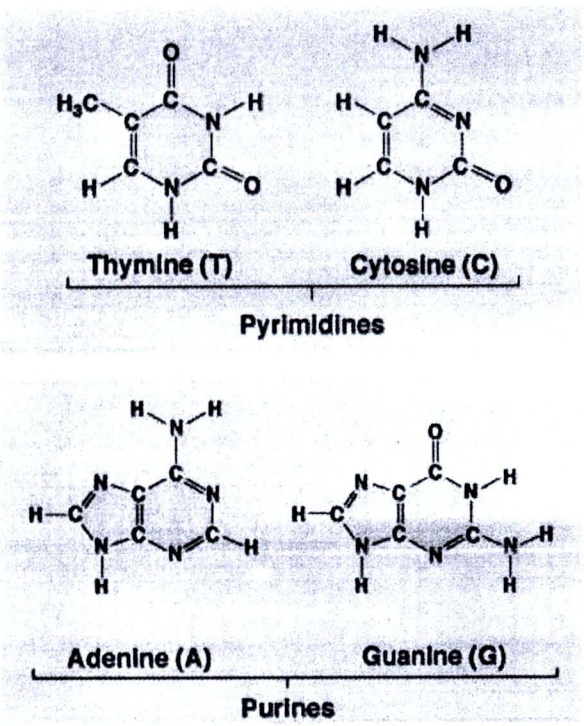
องค์ประกอบและโครงสร้างของดีเอ็นเอ

(1) องค์ประกอบทางเคมี

กรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (Deoxyribonucleic acid) หรือดีเอ็นเอ เป็นพอลิเมอร์ของนิวคลีโอไทด์ที่ต่อกันด้วยพันธะฟอสฟอไดเอสเทอร์ (Phosphodiester bond)

นิวคลีโอไทด์แต่ละหน่วยประกอบด้วย น้ำตาลดีออกซิไรโบส เบส และหมู่ฟอสเฟต เบสที่พบในดีเอ็นเอแบ่งเป็น 2 ประเภท (ภาพที่ 2.7) ได้แก่

- เบสพิวริมิดีน มีโครงสร้างหลักๆ ประกอบด้วยวงแหวน 1 วง เบสในกลุ่มนี้ได้แก่ ไซโทซีน (Cytosine หรือ C) และไทมีน (Thymine หรือ T)
- เบสพิวรีน มีโครงสร้างหลักๆ ที่ประกอบด้วยวงแหวน 2 วง คือวงแหวนพิริมิดีนเชื่อมกับวงแหวนอิมิดาโซล (Imidazole) เบสในกลุ่มนี้ได้แก่ อะดีนีน (Adenine หรือ A) และกัวนีน (Guanine หรือ G)

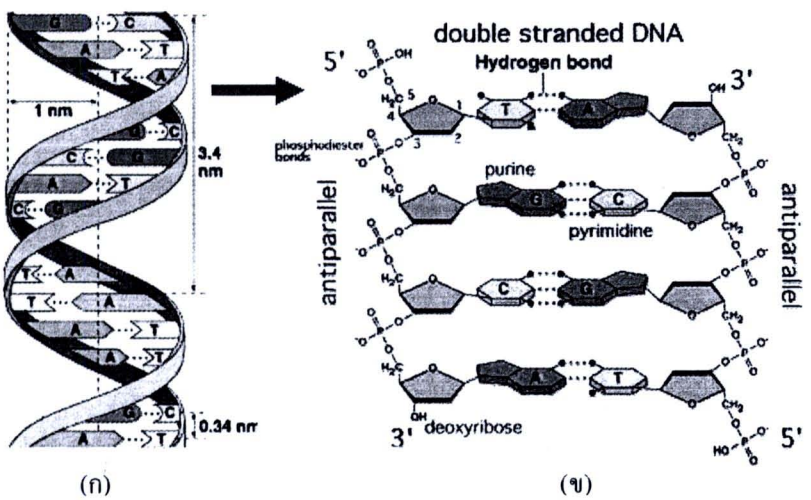


ภาพที่ 2.7 โครงสร้างของเบสที่พบได้ในดีเอ็นเอ (Jay Pitocchelli, ม.ป.ป.)

(2) โครงสร้างของดีเอ็นเอ

ปี พ.ศ. 2496 นักชีววิทยาชาวอเมริกา ชื่อ James Dewey Watson และนักฟิสิกส์ชาวอังกฤษ ชื่อ Francis Harry Compton Crick ได้เสนอโครงสร้างสามมิติของดีเอ็นเอขึ้นมาโดยอาศัยข้อมูลจากภาพเอกซ์เรย์ดิฟแฟรกชั่น (X-ray diffraction pattern) ของผลึกดีเอ็นเอและจากข้อมูลองค์ประกอบทางเคมีของดีเอ็นเอ โดยเสนอว่าดีเอ็นเอมีโครงสร้างเป็นเกลียวคล้ายขดลวดสปริง เรียกว่า ฮีลิกซ์ (Helix) และเกลียวของดีเอ็นเอมีลักษณะเป็นเกลียวคู่เวียนขวา การพันเกลียวของ

ดีเอ็นเอทำให้เกิดเป็นร่องขึ้น 2 ขนาด คือ ร่องขนาดใหญ่ (Major groove) และร่องขนาดเล็ก (Minor groove) เกลียวคู่นี้คือสายพอลินิวคลีโอไทด์สองสายที่มีทิศสวนทางกันโดยมีน้ำตาลและหมู่ฟอสเฟตเป็นแกนของเกลียว และมีเบสอยู่ภายในเกลียว โดยมีระนาบของเบสตั้งฉากกับแกนของเกลียวในลักษณะเหมือนราวบันไดวนกับราวบันได เส้นผ่าศูนย์กลางของเกลียวมีขนาด 20 อังสตรอม แต่ละรอบเกลียวจะประกอบด้วยเบส 10 คู่ ยาว 24 อังสตรอม เกลียวคู่ของดีเอ็นเอถูกยึดด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบสที่อยู่บนสายตรงกันข้าม โดยเบส A จับคู่กับ T ด้วยพันธะไฮโดรเจน 2 พันธะ และ G จับกับ C ด้วยพันธะไฮโดรเจน 3 พันธะ (ภาพที่ 2.8) นอกจากนี้ยังมีแรงไฮโดรโฟบิคช่วยยึดโครงสร้างเกลียวคู่ให้มีความเสถียร



(ก) (ข)

ภาพที่ 2.8 (ก) ลักษณะเกลียวของดีเอ็นเอ (ข) การจับคู่กันของเบสระหว่างดีเอ็นเอ 2 สาย (ลักษณะเกลียวของดีเอ็นเอและการจับคู่กันของเบสระหว่างดีเอ็นเอ 2 สาย, ม.ป.ป.)

การจับคู่กันของเบสบนสายของดีเอ็นเอเป็นกระบวนการที่จำเพาะและจะเกิดได้อย่างสมบูรณ์เมื่อเบสบนสายดีเอ็นเอเป็นเบสคู่สมกัน อย่างไรก็ตามสายดีเอ็นเอต่างชนิดกันแต่มีเบสบางส่วนที่เป็นเบสคู่สมกันอาจเกิดการจับกันเป็นเกลียวในสภาพที่ทำให้มีอุณหภูมิต่ำ และความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสม การจับกันของสายเบสบนสายดีเอ็นเอที่ต่างชนิดกัน เรียกว่า ไฮบริไดเซชั่น (Hybridization) สิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมีลำดับเบสบนดีเอ็นเอที่คล้ายกัน จึงเกิดไฮบริไดเซชั่นได้ดีกว่าสิ่งมีชีวิตที่มีความแตกต่างกัน ดังนั้นความสามารถในการเกิดไฮบริไดเซชั่นของดีเอ็นเอที่มาจากสิ่งมีชีวิตต่างสปีชีส์กันจะช่วยให้เข้าใจถึงความ สัมพันธ์ของวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตได้ดีขึ้น

(3) ขนาดและรูปร่างของดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอที่พบในสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันจะมีขนาดต่างกัน ตั้งแต่ดีเอ็นเอที่มีจำนวนพันเบสในไวรัสและแบคทีเรียไปจนถึงดีเอ็นเอขนาดพันล้านเบสในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง ดีเอ็นเอที่อยู่ในเซลล์ที่มีจำนวนโครโมโซมหนึ่งชุดหรือแฮพลอยด์เซลล์ (Haploid cell, n) เรียกว่า จีโนม (Genome) โดยทั่วไปสิ่งมีชีวิตจำนวนมากจะมีโครโมโซมเรียงตัวกันเป็นคู่หรือดิพลอยด์ (Diploid cell, 2n) ขนาดของจีโนมนิยมบอกค่าเป็นกิโลเบสซึ่งหมายถึง จำนวนเบสบนเกลียวคู่ของดีเอ็นเอคูณด้วย 1,000 (10^3) ดีเอ็นเอของไวรัสและแบคทีเรียส่วนใหญ่มีรูปร่างเป็นวงแหวนเกลียวคู่ ส่วนดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตชั้นสูงหรือยูแคริโอตจะเป็นเส้นยาวเกลียวคู่

ภายในเซลล์ของยูแคริโอต ดีเอ็นเอจะอยู่ภายในนิวเคลียสและกระจายอยู่บนโครงสร้างที่เรียกว่า โครโมโซม (Chromosome) โครโมโซมของยูแคริโอตประกอบด้วยดีเอ็นเอรวมตัวกับโปรตีนอย่างมีแบบแผน โครงสร้างหน่วยพื้นฐานของโครโมโซมเรียกว่า นิวคลีโอโซม (Nucleosome) ประกอบด้วยดีเอ็นเอขนาด 146 เบส จับกับโปรตีนฮีสโตน 4 ชนิด คือ H2A H2B H3 และ H4 อย่างละ 2 โมเลกุลและมีฮิสโตน H1 จับกับดีเอ็นเอขนาด 60 เบสที่เชื่อมระหว่างแต่ละหน่วยนิวคลีโอโซม นิวคลีโอโซมจะมีการพันเกลียวต่อไปอีกทีละ 6 หน่วยย่อยเรียกว่า โซเลนอยด์ (Solenoid) ซึ่งจะม้วนตัวเป็นเกลียวซ้อนตัวขึ้นอีก ทำให้โครโมโซมมีโครงสร้างที่แน่นมากขึ้น การขดตัวหลายชั้นทำให้ดีเอ็นเอสายยาวเข้าไปอยู่ในนิวเคลียสขนาดเล็กได้ จำนวนโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตจะแตกต่างกันไปตามชนิดของสิ่งมีชีวิต ตัวอย่างเช่น ในคนมีโครโมโซม 46 แท่ง หนูมี 42 แท่ง ข้าวโพดมี 20 แท่ง และแบคทีเรียมีเพียง 1 แท่ง เป็นต้น

การศึกษาโครโมโซมโดยการวิเคราะห์ลักษณะ รูปร่าง และจำนวนโครโมโซมทั้ง 2 ชุด (2n) ของเซลล์เรียกว่า การศึกษาแคริโอไทป์ (Karyotype) แคริโอไทป์เป็นของคนประกอบด้วยโครโมโซมทั้งหมด 46 แท่ง (2n=46) ซึ่งนับเป็นคู่ได้ 23 คู่นี้แบ่งออกเป็นออโทโซม (Autosome) ได้แก่ โครโมโซมคู่ที่ 1-22 และโครโมโซมเพศ (Sex chromosome) ได้แก่ โครโมโซมคู่ที่ 23 โครโมโซมที่เป็นคู่กันเรียกว่า โครโมโซมคู่เหมือน (Homologous chromosome) ส่วนโครโมโซมเพศเป็นโครโมโซมคู่ที่ทำหน้าที่กำหนดเพศ ในเพศหญิงในโครโมโซมเพศจะมีรูปร่างเหมือนกันคือ XX ส่วนในเพศชายโครโมโซมเพศจะมีรูปร่างต่างกันคือ XY ออโทโซมเป็นโครโมโซมคู่เหมือนทั้งในเพศชายและเพศหญิง โครโมโซมคู่ที่ 1 มีขนาดใหญ่ที่สุดและเล็กลงไปตามลำดับ โครโมโซมคู่ที่ 1 มีดีเอ็นเอขนาด 250,000 กิโลเบส หรือคิดเป็นความยาวประมาณ 8.5 ซม. ส่วนโครโมโซมที่มีขนาดเล็กที่สุด ได้แก่ โครโมโซมคู่ที่ 21 และโครโมโซม Y จะมีดีเอ็นเอขนาด 50,000 กิโลเบส

(4) หน้าที่ของดีเอ็นเอ

- การจำลองตัวเอง (DNA replication) เมื่อเกิดการแบ่งเซลล์เพื่อสร้างดีเอ็นเอที่เหมือนเดิมทุกประการให้กับเซลล์ใหม่

- การถ่ายทอดข้อมูลผ่านอาร์เอ็นเอเพื่อกำหนดการเรียงตัวของกรดอะมิโนในโปรตีน กระบวนการถ่ายทอดรหัสดีเอ็นเอเพื่อสร้างอาร์เอ็นเอ เรียกว่า Transcription และการกระบวนการแปลรหัสจากอาร์เอ็นเอเป็นโปรตีน เรียกว่า Translation แม้ว่าในร่างกายของแต่ละคนจะมีดีเอ็นเอเหมือนกันทุกเซลล์ แต่เซลล์แต่ละเซลล์อาจจะมีการแสดงออกของยีนในลักษณะที่แตกต่างกันทำให้เซลล์ เนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ มีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน

(5) จีโนมของมนุษย์

จีโนม (Genome) คือ ดีเอ็นเอในแฮพลอยด์เซลล์ จีโนมของคนประกอบด้วยส่วนที่อยู่ในนิวเคลียสและในไมโทคอนเดรีย จีโนมในนิวเคลียสเป็นดีเอ็นเอเส้นยาวเกลียวคู่ มีขนาด 3.1×10^9 คู่เบส กระจายอยู่ในโครโมโซม 23 แท่ง จีโนมในไมโทคอนเดรียเป็นดีเอ็นเอขนาดเล็กเพียง 16,569 คู่เบส ดีเอ็นเอเกือบทั้งหมดในไมโทคอนเดรียทำหน้าที่เป็นยีนซึ่งจะถูกถอดรหัสเพื่อสร้างอาร์เอ็นเอของไรโบโซม (rRNA) ทีอาร์เอ็นเอ (tRNA) หรือแปลรหัสเป็นสายพอลิเปปไทด์ แต่ดีเอ็นเอในนิวเคลียสส่วนใหญ่เป็นลำดับเบสที่ไม่ใช่รหัสซึ่งมียีนอยู่เพียง 30,000-35,000 ยีน คิดเป็น 3% ของจีโนมทั้งหมด ขนาดของยีนแต่ละยีนจะแตกต่างกันมากตั้งแต่ขนาดเล็กเพียง 0.1 กิโลเบส ได้แก่ ยีนของอาร์เอ็นเอขนาดเล็กที่พบในนิวเคลียสไปจนถึงยีนขนาด 2,000 กิโลเบส ที่พบอยู่บนโครโมโซม X โดยเฉลี่ยยีนของมนุษย์จะมีขนาดประมาณ 5-10 กิโลเบส ซึ่งจะสร้างโปรตีนที่มีกรดอะมิโนโดยเฉลี่ยประมาณ 300 ตัว ภายในยีนจะมีลำดับเบสบางส่วนที่ไม่ใช่รหัสและถูกตัดออก เรียกว่า อินทรอน (Intron) และส่วนที่เป็นรหัส เรียกว่า เอ็กซอน (Exon) ส่วนของจีโนมเกือบ 90% ไม่ใช่รหัส และพบอยู่นอกยีน เรียกว่า ส่วนที่ไม่ใช่ยีน (Extragenic) ซึ่งในบริเวณนี้จะพบลำดับเบสซ้ำ (Repetitive sequence) ที่ยังไม่ทราบหน้าที่ชัดเจน

ดีเอ็นเอที่เป็นเบสซ้ำ (Repetitive DNA) ดีเอ็นเอในจีโนมของคนประมาณ 50% ประกอบด้วยส่วนที่มีลำดับเบสซ้ำ พบว่าบางจุดมีจำนวนซ้ำในจีโนมมากกว่า 100,000 ครั้ง ลำดับเบสซ้ำเหล่านี้มีความแตกต่างกันทั้งขนาดและจำนวนซ้ำ สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ เบสซ้ำต่อเนื่อง (Tandem repeats) และเบสซ้ำกระจาย (Interspersed repeats)

(1) เบสซ้ำต่อเนื่อง (Tandem repeats)

เบสซ้ำต่อเนื่อง คือ เบสซ้ำที่มีการเรียงตัวต่อกันเป็นช่วงยาว แบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด ตามจำนวนซ้ำและความยาวของหน่วยซ้ำ ได้แก่

- แซทเทลไลท์ (Satellite) คือ เบสซ้ำสั้นขนาด 1-6 เบสหรือเบสยาวซ้ำขนาดหลายร้อยเบส โดยมีจำนวนซ้ำแต่ละตำแหน่งตั้งแต่ 10^3-10^7 ครั้ง จัดเป็นพวกที่มีการซ้ำของเบสจำนวนมาก แซทเทลไลท์แต่ละแบบจะพบเพียง 1 หรือ 2 ตำแน่งบนโครโมโซม และมักจะพบบริเวณเซนโทรเมียร์

- มินิแซทเทลไลท์ (Minisatellite) คือ เบสซ้ำขนาด 9-100 เบส ที่มีจำนวนซ้ำตั้งแต่ 10 และไม่เกิน 1,000 ครั้ง จัดอยู่ในกลุ่มที่มีการซ้ำของเบสระดับปานกลาง Jeffery และคณะ ค้นพบวิธีการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เบสซ้ำตัวนี้เป็นดีเอ็นเอตรวจสอบ พบว่ามินิแซทเทลไลท์จำนวนมากมีความคล้ายคลึงกันของลำดับเบสหรือมีลำดับเบสแกนเดียวกัน ดีเอ็นเอในบริเวณนี้ความหลากหลายสูง เนื่องจากความแตกต่างในจำนวนซ้ำ บางครั้งจึงมีผู้เรียกว่า Variable number of tandem repeats หรือ VNTRs

- ไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellite) คือ เบสซ้ำขนาด 1-6 เบส มีจำนวนซ้ำแต่ละตำแหน่งไม่เกิน 100 ครั้ง บางครั้งอาจเรียกเบสซ้ำชนิดนี้ว่า Simple sequence repeats (SSR) หรือ Short tandem repeats (STR) เบสซ้ำชนิดนี้พบกระจายอยู่ในบริเวณต่างๆ ของจีโนมประมาณ 10^4-10^5 ตำแหน่งความหลากหลายของจำนวนซ้ำที่พบในบริเวณนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ และเนื่องจากโครโมโซมแซทเทลไลท์จำนวนมากถูกพบกระจายอยู่ทั่วไปในโครโมโซมทำให้มีการนำมาใช้ในการสร้างแผนที่จีโนม

(2) เบสซ้ำกระจาย (Interspersed repeats)

เบสซ้ำกระจาย คือ กลุ่มเบสซ้ำที่พบกระจายอยู่บริเวณต่างๆ ของจีโนมในลักษณะที่ต่างจากกลุ่มเบสซ้ำแบบต่อเนื่องคือจะไม่พบซ้ำกันเป็นช่วงต่อเนื่องแต่จะอยู่ในลักษณะเดี่ยวกระจายทั่วไป แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อยตามความยาวของเบสซ้ำคือ เบสซ้ำกระจายแบบเส้น (Short interspersed elements หรือ SINES) และแบบซ้ำกระจายแบบยาว (Long interspersed elements หรือ LINES)

- เบสซ้ำกระจายแบบเส้น (SINES) มีขนาดประมาณ 130-300 เบส พบอยู่ในจีโนมที่อยู่ในลักษณะเดี่ยวๆ แต่มีอยู่หลายพันชุดในจีโนม SINES ในสปีชีส์เดียวกันจะมีลำดับเบสคล้ายคลึงกันประมาณ 80% แต่ในสิ่งมีชีวิตต่างสปีชีส์กันจะเหมือนกันประมาณ 50% ตัวอย่างของ SINES ที่รู้จักและมีการศึกษากันอย่างกว้างขวางได้แก่ เบสซ้ำในกลุ่มอะลู (*Alu family*) มีหน่วยซ้ำขนาดประมาณ 300 เบส ภายในบริเวณซ้ำจะมีลำดับจำเพาะของเอนไซม์ *AloI* ในแต่ละคนจะมีเบสซ้ำในกลุ่มอะลูที่คล้ายกันแต่ไม่เหมือนกัน โดยเฉลี่ยคนเราจะมีลำดับเบสแกนของเบสซ้ำในกลุ่มต่างกันประมาณ 14% โดยความแตกต่างที่พบมักจะเกิดการแทนที่ของเบสเพียงตัวเดียว

- แบบซ้ำกระจายแบบยาว (LINES) มีขนาดตั้งแต่ 500 เบสขึ้นไป พบประมาณ 1-2% ของจีโนม ตัวอย่างได้แก่ เบสซ้ำในกลุ่มแอลวัน (L1) หรือเบสซ้ำในกลุ่มเคพีเอนวัน (KpnI family) ซึ่งมีขนาด 7 กิโลเบส และพบการกระจายอยู่กว่า 5,000 แห่งในจีโนมของมนุษย์

(6) ความแตกต่างของดีเอ็นเอ (DNA polymorphisms)

ความแตกต่างของลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอที่ตำแหน่งต่างๆ ในจีโนมของมนุษย์ พบได้ทั้งในระหว่างบุคคลหรือแม้แต่ภายในคนเดียวกัน มีการประมาณกันไว้ว่าในแต่ละบุคคลจะพบความแตกต่างในดีเอ็นเอทั้ง 2 ชุด ทุก 500-1,000 เบส สาเหตุที่ทำให้เกิดความแตกต่างของดีเอ็นเอมีหลายประการ คือ

(ก) การเปลี่ยนของเบสตัวเดียว

การเปลี่ยนในลักษณะนี้พบทั้งการแทนที่เบสปกติด้วยเบสตัวอื่นๆ และการเพิ่มหรือการหายไปของเบส 1 ตัว สาเหตุสำคัญของการเกิดการเปลี่ยนของเบสตัวเดียวเกิดจากความผิดพลาดระหว่างการจำลองตัวของดีเอ็นเอหรือเกิดจากจากถูกกระตุ้นให้เปลี่ยนแปลง

(ข) การขาดหายไปหรือการสอดแทรกของดีเอ็นเอ

การขาดหายไปของดีเอ็นเอพบในโรคสำคัญ เช่น โรคธาลัสซีเมียและโรคดูเชนนี มัสคูลาร์ ดิสโทฟีย์ ซึ่งการขาดหายไปของดีเอ็นเอมีสาเหตุต่างกัน สาเหตุหนึ่งเชื่อว่าเกิดจากความผิดปกติเมื่อมีการแลกเปลี่ยนของส่วนดีเอ็นเอในกระบวนการรีคอมบิเนชั่น (Recombination) ส่วนความแตกต่างของดีเอ็นเอที่เกิดจากการสอดแทรกดีเอ็นเอจะพบน้อยกว่าแต่เชื่อว่ามักจะเกี่ยวกับเบสซ้ำการกระจาย

(ค) การขาดหายไปหรือการขยายจำนวนของดีเอ็นเอในกระบวนการรีคอมบิเนชั่น

ความผิดปกติของดีเอ็นเอแบบนี้มักจะพบในส่วนของจีโนมที่มีลำดับเบสของดีเอ็นเอคล้ายหรือเหมือนกัน เช่น ในยีนที่เป็นกลุ่มของยีนเดียวกันหรือในส่วนของดีเอ็นเอที่ไม่ใช่รหัส ได้แก่ เบสซ้ำชนิดต่างๆ ซึ่งเมื่อเกิดการแลกเปลี่ยนของส่วนดีเอ็นเอระหว่างการครอสซิ่งโอเวอร์ของโครโมโซมคู่เหมือนอาจมีการเรียงตัวผิดของลำดับเบสที่เหมือนหรือคล้ายกัน ทำให้มีการไขว้เปลี่ยนของซิสเตอร์โครมาทิดที่ไม่เท่ากัน (Unequal crossing over) เป็นผลให้เกิดการขาดหายไปหรือการขยายจำนวนของดีเอ็นเอ และเชื่อกันว่าการไขว้เปลี่ยนของโครมาทิดที่ไม่เท่ากันเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้มินิแซทเทลไลท์มีความแตกต่างของจำนวนซ้ำในแต่ละบุคคล จึงมีการนำมินิแซทเทลไลท์ไปใช้เป็นดีเอ็นเอตรวจสอบในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอซึ่งสามารถบอกความแตกต่างระหว่างบุคคลได้

(ง) การขยายจำนวนของดีเอ็นเอที่เกิดจากการเลื่อนของเบส

บริเวณเบสซ้ำที่มีเบสแกนขนาดเล็กมาเรียงตัวอยู่ด้วยกันหลายๆ หน่วยซ้ำอาจมีการเลื่อนของเบสที่ทำให้เกิดมิวเตชั่น (Mutation) ของดีเอ็นเอได้ การเลื่อนทำให้เกิดการซ้อนกันของเบสและเกิดปลายยื่นเหลื่อมออกมา จึงมีการเติมเบสโดยเอนไซม์พอลีเมอเรส ทำให้เกิดการขยายจำนวนเบสซ้ำในบริเวณนี้ทำให้เกิดความแตกต่างของดีเอ็นเอขึ้น ซึ่งเบสซ้ำชนิดไมโครแซทเทลไลท์มีความแตกต่างต่างของจำนวนซ้ำเนื่องมาจากการเลื่อนของเบสในกลไกนี้

2.3.2 เทคนิคพีซีอาร์กับการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ถูกค้นพบครั้งแรกในปี พ.ศ.2528 โดยนักวิทยาศาสตร์อังกฤษชื่อ Alec John Jeffreys และคณะ ซึ่งพบว่าลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอส่วนหนึ่งจะประกอบไปด้วยลำดับเบสขนาดสั้นๆ ที่มีการเรียงตัวซ้ำ ๆ เรียกว่า STR (Short tandem repeat) กระจายอยู่บนสายดีเอ็นเอซึ่งมีลักษณะเฉพาะในแต่ละบุคคล จำนวนซ้ำที่พบมีตั้งแต่ 2 ครั้งไปจนถึง 1,000 ครั้ง ซึ่งจำนวนซ้ำจะแตกต่างกันไปในแต่ละคน แต่เนื่องจากการดูลายพิมพ์ดีเอ็นเอหรือ STR ต้องใช้ดีเอ็นเอในปริมาณมาก จึงเป็นข้อจำกัดในการใช้งานทางนิติเวชศาสตร์ซึ่งตัวอย่างที่ส่งตรวจมักมีปริมาณดีเอ็นเอน้อย หรือมีแบคทีเรียปนเปื้อน ด้วยเหตุนี้เทคนิคพีซีอาร์จึงถูกนำมาใช้เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ทำให้สามารถใช้ในงานทางนิติเวชศาสตร์ได้ ส่วนของดีเอ็นเอที่นิยมใช้ในการพิสูจน์บุคคล ได้แก่ Minisatellite ที่มีการเรียงตัวซ้ำกันของเบสจำนวนตั้งแต่ 14-70 เบส และ Microsatellite ที่มีการเรียงตัวซ้ำกันของเบสจำนวนตั้งแต่ 2-6 เบส ผลิตผลที่ได้จากการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอจะมีขนาดตั้งแต่ 100-1,000 เบส จากการศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับ miniSTR จำนวน 9 ตำแหน่งที่ได้จากตัวอย่าง DNA ที่มีการสลายตัวค่อนข้างสูงจากคนเกาหลี 300 คนที่ไม่มีความเกี่ยวข้องกันโดยใช้ PCR 3 ระบบ (Multiplex I: D10S1248, D14S1434 และ D22S1045; Multiplex II: D1S1677, D2S441 และ D4S2364; and Multiplex III: D3S3053, D6S474 และ D20S482) พบว่าข้อมูลของ D10S1248, D2S441, D22S1045, D14S1434, และ D6S474 มีค่าเทียบเท่ากับข้อมูลจาก CODIS STRs ดังนั้น miniSTR สามารถนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์สำหรับการวิเคราะห์ DNA ที่เกิดการสลายตัวในงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ได้ (Chung *et al.*, 2007) จากการศึกษาการนำ STR 9 ตำแหน่ง ได้แก่ D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, TH01, VWA, TPOX, LPL มาใช้ในการจำแนกบุคคลของประชากรในภาคเหนือของประเทศไทย พบว่าตำแหน่งของ STR ดังกล่าวสามารถใช้จำแนกบุคคลได้ (Bhoopat *et al.*, 2006) เมื่อทำการศึกษาเกี่ยวกับ STR loci Penta D และ Penta E ในกลุ่มตัวอย่างจากภาคเหนือของประเทศไทย ซึ่งได้ออกแบบ primers ใหม่ที่สามารถใช้สำหรับแยกตำแหน่งของ Penta D และ Penta E บน native polyacrylamide gels พบว่า

จากทั้งหมดของ allele ใน allele ที่ 9 และ 18 จะสร้าง Penta D และ Penta E ที่มีผลต่อการจำแนกบุคคล (Bhoopat and Steger, 2004)

2.3.2.1 หลักการทั่วไปของเทคนิคพีซีอาร์ (สุรินทร์ ปียะโชคณากุล, 2552)

เทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction) เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยไม่จำเป็นต้องทำให้ชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวบริสุทธิ์ก่อน วิธีนี้สามารถแยกส่วนของดีเอ็นเอที่สนใจได้โดยไม่ต้องนำไปเพิ่มปริมาณด้วยวิธีการโคลน ขั้นตอนการทำพีซีอาร์จะอาศัยเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลีเมอเรส (DNA polymerase) สังเคราะห์ดีเอ็นเอซ้ำกันหลายๆ รอบ เพื่อให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นหรือทวีคูณ โดยมีไพร์เมอร์ (Primer) ซึ่งเป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ที่มีเบสคู่สมกับปลาย 5' และ 3' ของดีเอ็นเอแม่แบบ เป็นจุดเริ่มต้นของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ดังนั้นข้อจำกัดในการทำพีซีอาร์ คือ ต้องการทราบลำดับเบสของบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ ซึ่งอาจทราบลำดับเบสทั้งหมด หรือทราบเฉพาะส่วนปลายก็ได้ บริเวณหรือชิ้นของดีเอ็นเอที่เกิดจากการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณขึ้น จะมีขนาดความยาวเท่ากับชิ้นดีเอ็นเอจากปลาย 5' ของไพร์เมอร์หนึ่งถึงปลาย 5' ของไพร์เมอร์อีกชนิดหนึ่งนั่นเอง

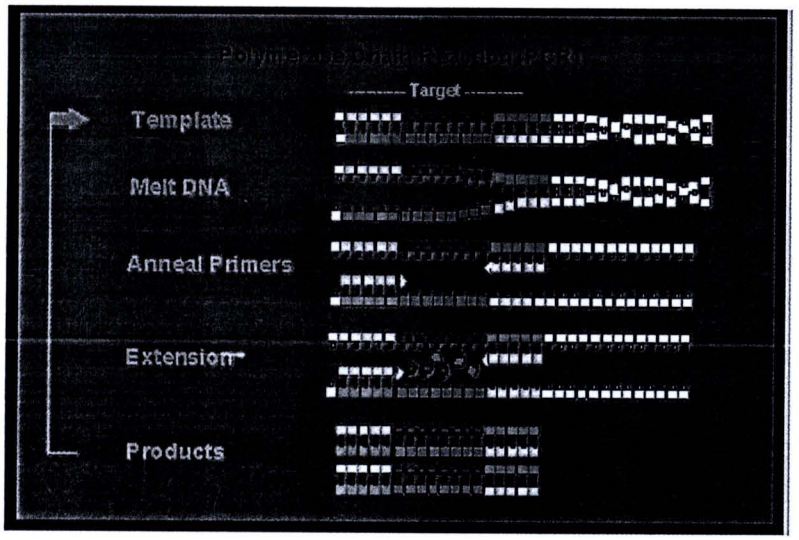
ไพร์เมอร์ที่ใช้เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ จะมีความยาวประมาณ 20-35 เบส วิธีทำพีซีอาร์ คือ สกัดดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ที่มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการออกมาจากเซลล์ แล้วนำมาใส่ในหลอดทดลองที่มีไพร์เมอร์ พีซีอาร์บัฟเฟอร์ ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟต (dNTP) ทั้ง 4 ชนิด และเอนไซม์พอลีเมอเรส ซึ่งที่ใช้กันส่วนใหญ่คือ Taq DNA polymerase เพราะสามารถทนอุณหภูมิสูงๆ ได้ จากนั้นจึงนำหลอดทดลองที่มีสารละลายผสมมาใส่ในเครื่อง Thermocycler เพื่อเริ่มปฏิกิริยาพีซีอาร์ ที่ประกอบด้วยขั้นตอนใหญ่ๆ 3 ขั้นตอน (ภาพที่ 2.9) ได้แก่

(1) Denaturation เป็นขั้นตอนที่ทำให้ดีเอ็นเอแม่แบบเสียสภาพ โดยใช้ความร้อนอุณหภูมิประมาณ 94°C ทำลายพันธะไฮโดรเจนที่เกิดจากการจับกันของเบสทั้งสองสาย ทำให้ดีเอ็นเอแม่แบบแยกออกจากกัน

(2) Annealing เป็นขั้นตอนที่ไพร์เมอร์จับกับดีเอ็นเอแม่แบบ โดยจะลดอุณหภูมิลงให้พอเหมาะกับการจับของไพร์เมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบทั้งสองสาย ซึ่งอุณหภูมิในขั้นนี้จะขึ้นกับขนาดและองค์ประกอบของเบสในไพร์เมอร์ที่ใช้ ทั้งนี้เพราะขนาดและองค์ประกอบของเบส มีผลต่อการเข้าคู่กันของเบสระหว่างไพร์เมอร์และดีเอ็นเอแม่แบบ

(3) Extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่อุณหภูมิประมาณ 72°C โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลีเมอเรสทำหน้าที่เติมดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ที่มีเบสคู่สมกับดีเอ็นเอแม่แบบต่อจากไพร์เมอร์

เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปครบทั้ง 3 ขั้นตอน โมเลกุลดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า เช่น จากเดิม 1 โมเลกุลจะเพิ่มเป็น 2 โมเลกุล ดังนั้นถ้าดำเนินปฏิกิริยาซ้ำกันหลายๆ รอบ ปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายจเพิ่มขึ้นจาก 1 เป็น 2, 4, 8,...เท่าไปเรื่อยๆ จนถึง 2^n เท่าเมื่อปฏิกิริยาผ่านไป n รอบ ซึ่งหากใช้รอบพีซีอาร์ 30-40 รอบ จะสามารถเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอ็นเอได้ถึงพันล้านเท่า การตรวจสอบผลการทำพีซีอาร์นิยมใช้การทำอิเล็กโทรโฟรีซีสในตัวกลางที่เป็นเจล



ภาพที่ 2.9 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Chris Lee, 2009)

แม้ว่าเทคนิคพีซีอาร์จะมีประสิทธิ์ภาพสูงแต่ก็มีข้อจำกัดบางอย่าง เช่น

(1) ข้อผิดพลาดอาจเกิดได้จากการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลีเมอเรสในการนำเบสที่ไม่ใช่คู่สมมาต่อกับดีเอ็นเอ เมื่อทำพีซีอาร์ไป 30 รอบ โอกาสผิดพลาดจะพบ 1 ใน 3,000 bp ของผลผลิตที่ได้

(2) ความยาวของขนาดพีซีอาร์ ถึงแม้ว่าพีซีอาร์จะสามารถทำให้ได้ผลผลิตที่มีขนาดยาว 10 kb ได้ แต่ส่วนใหญ่จะให้ผลที่ดีที่สุด เมื่อขนาดของพีซีอาร์ไม่มากไปกว่า 2 kb ทั้งนี้เพราะหากผลผลิตพีซีอาร์มีขนาดยาวมากกว่านี้ ความผิดพลาดจะมากขึ้น เนื่องจากเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลีเมอเรสทำงานได้ไม่สมบูรณ์ ทำให้การต่อกันของ dNTPs จากไพร์เมอร์ผิดพลาด

2.3.2.2 การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส

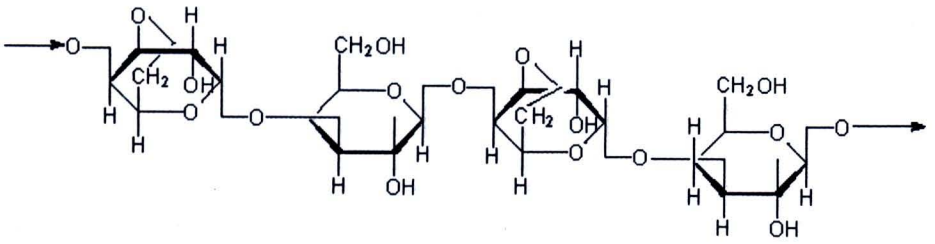
อิเล็กโทรโฟรีซีส (Electrophoresis) เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโมเลกุลของสารที่มีประจุออกจากกันโดยใช้กระแสไฟฟ้า โดยให้สารที่มีประจุนั้นเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางชนิดหนึ่งในสารละลาย สารที่มีประจุต่างกันจะเคลื่อนที่ไปในทิศทางตรงกันข้ามกัน นอกจากประจุแล้วอัตรา

การเคลื่อนที่ยังขึ้นอยู่กับขนาด, รูปร่างของโมเลกุล, แรงเคลื่อนไฟฟ้า และตัวอย่างที่ใช้ด้วย อิเล็กโทรโฟรีซีสบนตัวกลางที่เป็นอะกาโรสเจล (Agarose gel) หรือ พอลีอะครีลาไมด์เจล (Polyacrylamide gel) เป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้แยก ระบุชนิด และทำบริสุทธิ์ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ เทคนิคนี้ง่าย รวดเร็ว และสามารถจำแนกชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ด้วยวิธีการอื่นๆ เช่น ไม่สามารถแยกได้ด้วยวิธีเดนซิตีเกรเดียนต์เซนตริฟิวเกชัน (Density gradient centifugation) นอกจากนี้ยังสามารถระบุตำแหน่งดีเอ็นเอภายในเจลได้โดยการย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) ซึ่งเป็นสีย้อมฟลูออเรสเซนต์ที่แทรกเข้าไปในดีเอ็นเอตรงชั้นของเบส (Stacking base) ทำให้สามารถตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ (DNA band) ที่มีปริมาณพียง 1-10 นาโนกรัม ได้ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต

การเลือกใช้เจลตัวกลางที่ใช้แยกดีเอ็นเอจะขึ้นอยู่กับขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ทำการแยก โดยเจลพอลีอะครีลาไมด์สามารถแยกชิ้นดีเอ็นเอขนาด 5-500 bp ได้มีประสิทธิภาพที่สุด พอลีอะครีลาไมด์มีอำนาจในการจำแนกสูงมาก สามารถแยกชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันเพียง 1 bp ได้ ถึงแม้พอลีอะครีลาไมด์เจลจะทำให้ชิ้นดีเอ็นเอเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วและสามารถรับเอาดีเอ็นเอในปริมาณค่อนข้างมากได้ แต่ก็มีข้อเสียของการเตรียมที่ยุ่งยาก และการจับค่อนข้างลำบากกว่าอะกาโรสเจล อะกาโรสเจลมีอำนาจในการจำแนกต่ำกว่าพอลีอะครีลาไมด์เจลแต่มีช่วงการจำแนกที่สูงกว่า ดีเอ็นเอที่มีขนาดความยาวจาก 200 bp ถึงประมาณ 50 kb สามารถแยกออกจากกันได้บนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้นต่างๆ

(1) อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส (Agarose gel electrophoresis)

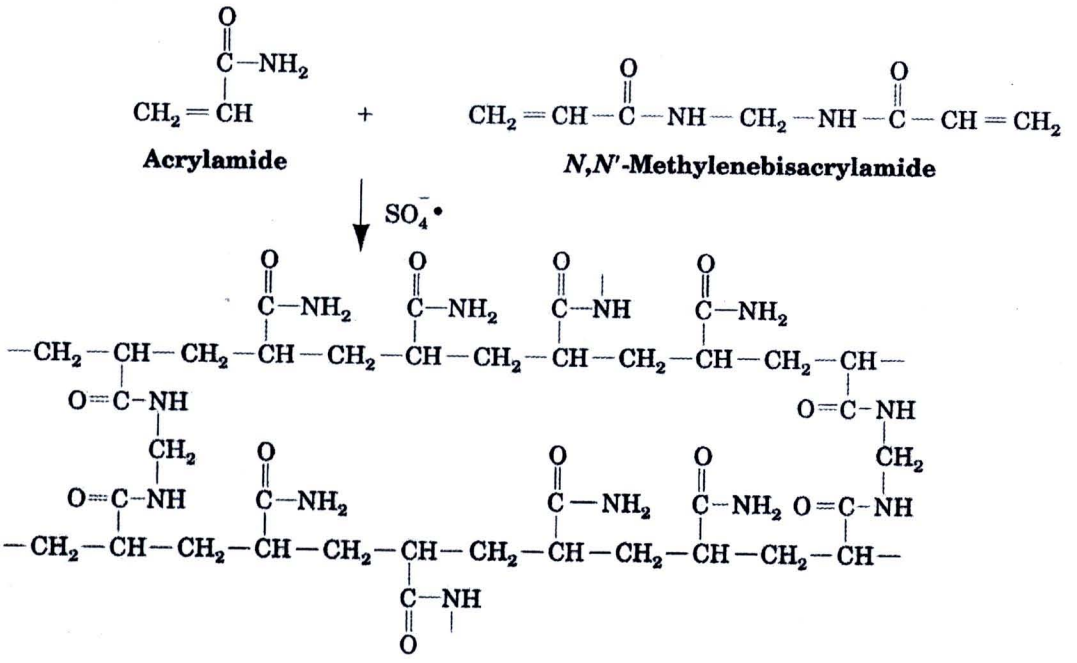
อะกาโรสเจลเป็นพอลิเมอร์ของ D-galactose สลับกับ 3,6-anhydrogalactose (ภาพที่ 2.10) ซึ่งแยกได้จากสาหร่ายทะเล เช่นเดียวกับวุ้น (Agar) องค์ประกอบหรือหน่วยย่อยโดยรวมจะเหมือนกัน แต่จะมีความแตกต่างกันบ้างที่หมู่ R ซึ่งต่ออยู่กับหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 6 ของน้ำตาลกาแล็กโทส อะกาโรสเป็นชื่อเรียกโดยรวม จึงประกอบด้วยพอลิแซ็กคาร์ไรด์หลายชนิด และอาจมีสารประกอบอื่นเจือปน เช่น ซัลเฟต โปรตีน สารที่เจือปนนี้ถ้าเป็นสารที่มีประจุจะทำให้เกิดเหตุการณ์ที่เรียกว่า Electroendosmosis (EEO) ซึ่งจะไปขัดขวางการเคลื่อนของสารที่กำลังแยก ดังนั้นอะกาโรสเจลที่ดี ควรมีค่า EEO ต่ำ ซึ่งจะสังเกตได้จากฉลากข้างขวด นอกจากนี้การแยกดีเอ็นให้บริสุทธิ์ด้วยอะกาโรสบางวิธี สารพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีหมู่ซัลเฟตเหล่านี้จะติดปนมาพร้อมกับดีเอ็นเอ และเป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์หลายชนิด เช่น พอลีเมอเรส ไลเกส เอนไซม์ตัดจำเพาะ การเลือกอะกาโรสจึงต้องใช้ชนิดที่มีความบริสุทธิ์สูงสำหรับใช้ในงานระดับโมเลกุล



ภาพที่ 2.10 โครงสร้างทางเคมีของอะกาโรส แสดงโมเลกุลของ 3, 6-anhydrogalactose สลับกับ D-galactose (Letzte Änderung, 2003)

(2) พอลิอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีส (Polyacrylamide gel electrophoresis)

พอลิอะครีลาไมด์เจลเกิดจากการรวมตัวกันของ อะครีลาไมด์ (Acrylamide) และบิสอะครีลาไมด์ (N, N'-methylene bisacrylamide หรือเรียกสั้นๆ โดยทั่วไปว่า Bisacrylamide) เกิดเป็นพอลิเมอร์ที่มีลักษณะเป็นร่างแห (ภาพที่ 2.11) การเกิดพอลิเมอร์ดังกล่าวเป็นการสังเคราะห์ขึ้นทางเคมี จึงมีความสม่ำเสมอและควบคุมได้ พอลิเมอร์ที่ได้นี้ไม่ทำปฏิกิริยากับสารเคมีใด มีความใส มีความคงตัวของ pH อุณหภูมิ และมี Ionic strength กว้าง สามารถปรับขนาดของช่องในพอลิเมอร์ได้ จึงเหมาะสำหรับแยกโมเลกุลของโปรตีนและดีเอ็นเอ อะครีลาไมด์เป็นโมเลกุลพื้นฐานในเจล โดยมีบิสอะครีลาไมด์เป็นตัวเชื่อมต่อโมเลกุลทั้งให้ประสานกันเป็นร่างแห ดังนั้นขนาดของช่องจึงขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของอะครีลาไมด์ และเปอร์เซ็นต์ของบิสอะครีลาไมด์ที่มีในเจลทั้งหมด การจับตัวเป็นพอลิเมอร์ของอะครีลาไมด์และบิสอะครีลาไมด์ อาศัยอนุมูลอิสระ (Free radical) จากแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (Ammonium persulfate) (ภาพที่ 2.11)โดยมี TEMED (N, N, N, N'-tetramethylenethylenediamine) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระ ดังนั้นถ้าเพิ่มปริมาณ TEMED หรือแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตจะเร่งปฏิกิริยาให้การจับตัวเป็นพอลิอะครีลาไมด์ได้เร็วขึ้น ปฏิกิริยาการจับตัวกันเป็นพอลิเมอร์จะเกิดได้ช้าหรือไม่เกิดเลยถ้าค่า pH ต่ำ และปฏิกิริยายังถูกยับยั้งได้ด้วยออกซิเจนด้วย



ภาพที่ 2.11 การเกิดพอลิอะครีลาไมด์เจลจากสารตั้งต้นอะครีลาไมด์ และบิสอะครีลาไมด์ โดยอาศัยอนุมูลอิสระเปอร์ซัลเฟต (การเกิดพอลิอะครีลาไมด์เจลจากสารตั้งต้นอะคริลาไมด์ และบิสอะครีลาไมด์ โดยอาศัยอนุมูลอิสระเปอร์ซัลเฟต, 2548)

อะครีลาไมด์และบิสอะครีลาไมด์โมเลกุลเดี่ยว เป็นสารที่มีพิษและสามารถดูดซึมผ่านทางผิวหนัง จึงควรสวมถุงมือขณะปฏิบัติงาน พอลิอะครีลาไมด์เจลใช้ได้ทั้งในแบบ Native gel เพื่อใช้แยกโมเลกุลของดีเอ็นเอที่เป็นเกลียวคู่ตามธรรมชาติ และใช้ในแบบ Denaturing gel เพื่อแยกโมเลกุลดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ผ่านการทำให้เสียสภาพแล้ว โดยเติมยูเรียลงไปในเจล ให้มีความเข้มข้น 7-8 โมลาร์