บทที่ 5
อภิปรายผลการทดลอง

การระบุคราบเลือดที่พบในสถานที่เกิดเหตุว่าเป็นของคนนั้นมีความสำคัญอย่างยิ่งในงานนิติวิทยาศาสตร์ ทั้งนี้เนื่องจากหากระบุได้ว่าเป็นคราบเลือดของคนจริง คราบเลือดดังกล่าวจะเป็นวัตถุพยานสำคัญเพื่อใช้หาผู้ที่เกี่ยวข้องกับการกระทำความผิด และอาจใช้หาตัวผู้กระทำความผิดได้ วิธีการระบุคราบเลือดแต่เดิมจะส่งวัตถุที่มีคราบเลือดติดอยู่ไปให้ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ ซึ่งทำให้เสียเวลา ฉะนั้นหากมีวิธีที่สามารถระบุคราบเลือดคนได้ในสถานที่เกิดเหตุก็น่าจะเป็นประโยชน์ต่องานนิติวิทยาศาสตร์ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาแผ่นทดสอบสำหรับใช้พิสูจน์คราบเลือดคน โดยแผ่นทดสอบจะใช้หลักการจับกันของแอนติเจน (IgG ที่มีในเลือดคน) และแอนติบอดี (Anti-human IgG) สาเหตุที่เลือกใช้ IgG ของคนในการศึกษานี้ เนื่องจากเป็น IgG เป็น Immunoglobulin ชนิดที่มีปริมาณมากที่สุดในซีรัม (สุวิน วองวัจนะ, ม.ป.ป.) และมีความทนทานต่อการทำลายสูงเนื่องจากมีครึ่งชีวิตที่ยาว

การทดลองจะเริ่มจากการทำบริสุทธิ์ IgG จากซีรัมของคน โดยใช้ Protein G Sepharose beads ซึ่งเป็นเม็ดบีดส์ Sepharose ที่มี Protein G ซึ่งเป็นโปรตีนที่แยกได้จากผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Streptococci* ฝังอยู่ภายใน Protein G เป็นโปรตีนที่สามารถจับกับส่วน Fc region ตรงปลาย Heavy chain ของ IgG ได้ ดังนั้นเมื่อนำซีรัมของคนมาบ่มกับ Protein G Sepharose beads ก็จะสามารถแยก IgG ออกจากโปรตีนชนิดอื่นๆ ได้ Wang *et al.* (2009) ประสบความสำเร็จในการทำบริสุทธิ์ IgG จากซีรัมคนด้วย Protein G Sepharose beads โดยไม่มีโปรตีน Albumin มารบกวน

เมื่อได้ human IgG บริสุทธิ์ ขั้นตอนต่อมาจะเป็นการกระตุ้นหนูทดลองให้สร้างแอนติบอดีต่อ Human IgG (Anti-human IgG) โดยนำ Human IgG มาผสมกับ Freud's complete adjuvant จนกระทั่งสารละลายมีลักษณะเป็น Emulsion ก่อนฉีดเข้าหนูทดลอง เพื่อให้ Human IgG คงอยู่ในร่างกายของหนูทดลองได้นาน อีกทั้งใน Freud's complete adjuvant ยังมีเซลล์แบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* ที่ตายแล้ว ซึ่งจะช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในหนูทดลองทำให้สร้างแอนติบอดีในปริมาณมาก จากนั้นอีก 2 สัปดาห์จะกระตุ้นหนูทดลองอีกครั้ง ครั้งนี้จะฉีดหนูทดลองด้วยสารละลาย Emulsion ของ Human IgG และ Freud's incomplete adjuvant (ไม่มีเซลล์แบคทีเรีย) เพื่อกระตุ้นให้หนูสร้าง Anti-human IgG เพิ่มมากขึ้น

การทดสอบว่าหนูทดลองสร้าง Anti-human IgG หรือไม่ และสร้างปริมาณมากเท่าใด ทำได้โดยนำซีรัมของหนู (หลังจากถูกกระตุ้นในแต่ละครั้ง) มาทำเจือจางหลายๆ ความเข้มข้น จากนั้นจึง

นำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA และ Western immunoblotting ซึ่งทั้งสองวิธีจะใช้หลักการเหมือนกัน คือ ใช้ Human-IgG เป็นแอนติเจน หากในซีรัมของหนูมี Anti-human IgG ก็จะจับกับ Human IgG จากนั้นจึงเติม Goat anti-mouse IgG ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ Alkaline phosphatase เพื่อตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ซึ่งสามารถวัดได้จากการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสง (ELISA) หรือเห็นเป็นแถบสี (Western immunoblotting) หลังจากเติมซับสเตรทของเอนไซม์ลงไป จากผลการทดลองพบว่าหนูทดลองสร้าง Anti-human IgG ได้ โดยมีค่าไตเตอร์เท่ากับ 1:10,000 ซึ่งเป็นค่าที่ต่ำ เทียบกับงานวิจัยอื่นที่มีการกระตุ้นสัตว์ทดลองให้สร้าง Anti-human IgG งานของเราได้ค่าไตเตอร์ที่ไม่สูงนัก อาจเนื่องมาจากสัตว์ทดลองใช้กระต่ายในการสร้าง Anti-human IgG ซึ่งอาจจะให้ปริมาณแอนติบอดีที่มากกว่าหนู (Abdolalizadeh, Majidi & Farajnia, 2008)

หลังจากทดสอบแล้วว่าหนูทดลองสร้าง Anti-human IgG ต่อมาก็จะทำบริสุทธิ์ Anti-human IgG จากซีรัมของหนู ทั้งนี้เพื่อจะนำไปติดฉลากกับเอนไซม์ Alkaline phosphatase สำหรับนำไปใช้ในการผลิตแผ่นทดสอบ การติดฉลากจะใช้ Glutaraldehyde เป็นตัวเชื่อมต่อระหว่างแอนติบอดีกับเอนไซม์ เนื่องจากราคาถูก วิธีการติดฉลากไม่ยุ่งยาก และใช้เวลาไม่นาน (Jayakrishnan & Jameela, 1996) อย่างไรก็ตามก่อนจะนำ Anti-human IgG ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ Alkaline phosphatase ไปใช้ ต้องนำมาทดสอบก่อนว่าแอนติบอดีนี้มีความจำเพาะเจาะจงกับเลือดคนหรือไม่ (Specificity) และมีความไวในการตรวจสอบเท่าใด (Sensitivity) จากการทดสอบความจำเพาะเจาะจงด้วยวิธี Dot blotting กับเลือดคน และเลือดสัตว์อื่นๆ 16 ชนิด (ปลาทับทิม, ปลานิล, แพะ, แกะ, วัว, กระต่าย, กบ, หมู, ไก่, เป็ด, หนู, สุนัข, นก, ปลาไหล, ปลาดุก และแมว) พบว่า Anti-human IgG ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์เกิด Cross reaction กับเลือดสัตว์ ที่เป็นเช่นนี้อาจอธิบายได้ว่า Anti-human IgG ที่เตรียมในหนูทดลองเป็นแอนติบอดีชนิด Polyclonal antibody ซึ่งเป็นกลุ่มของแอนติบอดีที่จำเพาะกับ Epitope บน Human IgG คนละชนิด ทำให้แอนติบอดีบางตัวสามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีนที่มี Epitope เหมือนกับ Epitope บน Human IgG จึงเป็นไปได้ว่าโปรตีนที่พบในเลือดสัตว์มี Epitope ที่เหมือนกับ Epitope บน Human IgG ทำให้เลือดสัตว์ดังกล่าวให้ผลบวกกับการทดสอบด้วย Anti-human IgG ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ Alkaline phosphatase ซึ่งเคยมีการรายงานก่อนหน้านี้ถึงการเกิด Cross reaction จากการใช้ Polyclonal antibody กับเลือด หมู กระต่าย สุนัข และแมว (Siwaporn, 2010)

การเกิด Cross reaction ของแอนติบอดีที่ใช้ระบุเลือดคนสามารถกำจัดได้หากใช้ Monoclonal antibody แทน จากการใช้แอนติบอดี (Anti-human IgG) ชนิด Monoclonal antibody ตรวจสอบเลือดคนด้วยเทคนิค Direct ELISA (Tokiwa *et al.*, 1990) และ Competitive ELISA (Hurley *et al.*, 2009) พบว่าสามารถแยกเลือดคนจากเลือดสัตว์ได้โดยไม่เกิด Cross reaction ถึงแม้ว่า

Anti-human IgG ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ Alkaline phosphatase สามารถเกิดปฏิกิริยาได้กับเลือดคนและเลือดสัตว์ทั้ง 16 ชนิด แต่เมื่อวิเคราะห์ความไวของการทดสอบพบว่าปริมาณต่ำสุดของโปรตีนในเลือดคนที่สามารถมองเห็นการเกิดปฏิกิริยาได้ คือ 0.02 μg ในขณะที่เลือดสัตว์ที่เหลือจะมองเห็นปฏิกิริยาได้เมื่อมีปริมาณโปรตีนในเลือด ≥ 0.08 μg ด้วยเหตุนี้จึงมีความเป็นไปได้ในการนำ Anti-human IgG ที่เตรียมได้ในงานวิจัยไปใช้ โดยต้องวิเคราะห์เลือดตัวอย่างที่มีปริมาณโปรตีนระหว่าง 0.08-0.02 μg จึงจะสามารถแยกเลือดคนจากเลือดสัตว์อื่นๆ ได้

หลังจากสามารถระบุเลือดคนได้แล้ว ขั้นตอนต่อไปจะเป็นระบุว่าเป็นเลือดของใคร ซึ่งในงานวิจัยนี้จะใช้วิธีการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) โดยใช้เทคนิค PCR เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณที่มีจำนวนเบสซ้ำที่เรียกว่า STR 10 ตำแหน่ง จากนั้นจะดูขนาดของผลผลิต PCR ทั้ง 10 ตำแหน่งนี้ว่าสามารถใช้ในการระบุเอกลักษณ์บุคคลได้หรือไม่ สาเหตุที่เลือกใช้ STR ในการแยกแยะความแตกต่างระหว่างบุคคล เนื่องจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ดีเอ็นเอบริเวณ STR สามารถใช้ระบุเอกลักษณ์บุคคล เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจาก STR 9 ตำแหน่ง ได้แก่ D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, TH01, VWA, TPOX, LPL พบว่าสามารถใช้จำแนกบุคคลในประชากรภาคเหนือของประเทศไทยได้ (Bhoopat *et al.*, 2006) จากการศึกษาความหลากหลายของลายพิมพ์ดีเอ็นจากประชากรในเมืองลาซา ประเทศทิเบต โดยวิเคราะห์จาก STR จำนวน 15 ตำแหน่ง ได้แก่ D19S433 VWA D18S51 D8S1179 D21S11 D13S317 D16S539 D2S1338 D5S818 D7S820 CSF1PO D3S1358 TH01 FGA และ TPOX พบว่าสามารถระบุเอกลักษณ์บุคคลของประชากรดังกล่าวได้ (Kang *et al.*, 2007) ซึ่ง STR 15 ตำแหน่งได้นำมาใช้ศึกษาความหลากหลายของลายพิมพ์ดีเอ็นเอในประชากรหลายๆ ประเทศ เช่น เกาหลี (Kim *et al.*, 2003) อเมริกา (Erna *et al.*, 2004) กัวเตมาลา (Esther *et al*, 2006) สเปน (Camacho *et al.*, 2007) อาร์เจนตินา (Abovich *et al*, 2009) บราซิล (Lilian *et al*, 2009) มาเลเซีย (Kee *et al*, 2010) และจีน (Deng *et al*, 2011)

สำหรับงานวิจัยครั้งนี้เลือก STR จำนวน 10 ตำแหน่ง การเลือกศึกษาหลายๆ ตำแหน่งเพราะโอกาสที่คน 2 คนจะมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอตรงกันทั้ง 10 ตำแหน่งมีน้อยมาก ในงานวิจัยนี้จึงเลือกศึกษาตำแหน่ง D8S1179, D5S818, D7S820, TPOX, D3S1358, D13S317, vWA, TH01, CSF1PO และ D16S539 เนื่องจากแต่ละตำแหน่งมีอัลลีลที่ต่างกันหลายอัลลีล ซึ่งสามารถนำมาใช้ระบุเอกลักษณ์บุคคลได้ โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างเลือดมาทำ PCR ทีละตำแหน่ง จากนั้นจึงวิเคราะห์ผลผลิต PCR ของแต่ละตำแหน่งบน Polyacrylamide gel เนื่องจากเป็นเจลที่สามารถแยกชิ้นส่วนดีเอ็นที่มีขนาดต่างกันไม่กี่ Base pair (bp) ได้ ในขณะที่ Agarose gel ไม่สามารถแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกันได้น้อยกว่า 200 bp (อุไรวรรณ วิจารณกุลม, 2545) จากผล

การวิเคราะห์ผลผลิต PCR แต่ละตำแหน่งบน Polyacrylamide gel พบว่า STR บางตำแหน่งจะให้ดีเอ็นเอ 2 แถบ ขณะที่บางตำแหน่งให้ดีเอ็นเอแถบเดียว ที่เป็นเช่นนี้เพราะคนเรามีโครโมโซม 2 ชุด แถบดีเอ็นเอของ STR แต่ละแถบจะมาจากโครโมโซมแต่ละชุด หากจำนวนซ้ำของลำดับเบสบน STR ในแต่ละข้างของโครโมโซมเท่ากัน (Homozygous) จะให้ขนาดของผลผลิต PCR ที่เท่ากัน ทำให้เห็นแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวบน Polyacrylamide gel แต่หากจำนวนซ้ำของลำดับเบสบน STR ในแต่ละข้างของโครโมโซมไม่เท่ากัน (Heterozygous) เมื่อนำผลผลิต PCR มาวิเคราะห์บน Acrylamide gel ก็จะเห็นเป็น 2 แถบ

จากผลการวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR บริเวณ STR 10 ตำแหน่ง จากอาสาสมัคร 5 คน พบว่าผลผลิต PCR ที่ได้จากการวิเคราะห์ STR แต่ละตำแหน่ง ของคนๆ เดียวกันจะมีขนาดเท่ากัน ถึงแม้ว่าจะวิเคราะห์จากตัวอย่างที่ต่างกัน (เลือด เส้นผม หรือน้ำลาย) เช่น ผลผลิต PCR ตำแหน่ง D8S1179 ในตัวอย่างเลือด เส้นผม และน้ำลายของคนที่ 1 มีขนาดเท่ากัน แสดงให้เห็นว่าในทุกเซลล์ของร่างกายมีข้อมูลทางพันธุกรรมเหมือนกัน เมื่อพิจารณารูปแบบดีเอ็นเอจากที่ได้จากการวิเคราะห์ STR 10 ตำแหน่ง ของอาสาสมัครแต่ละคน พบว่าอาสาสมัครทั้ง 5 คน มีรูปแบบดีเอ็นเอที่ไม่ซ้ำกันเลย ในอาสาสมัครคนที่ 1 นั้นพบ 2 Allele คือ Allele 1-1 และ 1-2 ซึ่งเป็น Heterozygous เนื่องจากมี Allele ที่ต่างกัน ในอาสาสมัครคนที่ 2 พบ Allele คือ Allele 1-3 และ 1-3 ซึ่งเป็น Homozygous เนื่องจากมี Allele ที่เหมือนกัน ในอาสาสมัครคนที่ 3 พบ Allele คือ Allele 1-4 และ 1-5 ในอาสาสมัครคนที่ 4 พบ Allele คือ Allele 1-6 และ 1-6 ในอาสาสมัครคนที่ 5 พบ Allele คือ Allele 1-7 และ 1-8 และผลผลิตจากการทำพีซีอาร์ของเลือด เส้นผม และน้ำลายในตำแหน่งที่ D5S818, D7S820, TPOX, D3S1358, D13S317, vWA, TH01, CSF1PO และ D16S539 พบว่ารูปแบบ Allele ทั้ง 10 ตำแหน่ง ของแต่ละคนไม่ซ้ำกันเลย แสดงว่า STR 10 ตำแหน่งนี้สามารถแยกแยะความแตกต่างของคนแต่ละคนได้

หลังจากสามารถระบุเอกลักษณ์บุคคลได้จาก STR 10 ตำแหน่งนี้ ขั้นตอนต่อไปจะเป็นการพิสูจน์ว่ารูปแบบของผลผลิต PCR ของ STR 10 ตำแหน่งนี้ สามารถนำไปใช้เปรียบเทียบเพื่อระบุเอกลักษณ์ของบุคคลได้หรือไม่ โดยเลียนแบบสถานการณ์จริง คือ เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของผู้ต้องสงสัย (อาสาสมัคร 5 คน) กับเลือดจากสถานที่เกิดเหตุ (เลือดของอาสาสมัครคนที่ 5) พบว่าเลือด เส้นผม และน้ำลายของอาสาสมัครคนที่ 5 ให้ผลผลิต PCR ของ STR ทั้ง 10 ตำแหน่ง ตรงกับเลือด เส้นผม และน้ำลายจากสถานที่เกิดเหตุ แสดงว่า STR 10 ตำแหน่งนี้สามารถระบุเอกลักษณ์บุคคลได้ ถึงแม้ว่างานวิจัยนี้ยังไม่สามารถระบุว่าผลผลิต PCR ที่ได้ในแต่ละตำแหน่งเป็น Allele ใด เหมือนกับการวิเคราะห์ด้วยเครื่องตรวจดีเอ็นเออัตโนมัติ (Automated DNA analyzer) แต่ก็สามารถแยกแยะความแตกต่างของบุคคล และสามารถใช้เปรียบเทียบรูปแบบเพื่อระบุเอกลักษณ์บุคคลได้