บทที่ 1

ทบทวนเอกสารและวัตถุประสงค์

การตรวจพิสูจน์สารคัดหลั่งจากร่างกายนั้น มีความเกี่ยวโยงที่อาจแสดงถึงเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นในทางอาชญากรรม ในบางกรณีน้ำลายอาจเป็นน้ำคัดหลั่งที่ผู้กระทำผิดทิ้งไว้ในที่เกิดเหตุหรือบนร่างกายของเหยื่อ ตัวอย่างเช่น ในคดีข่มขืนกระทำชำเรา ผู้ร้ายอาจใช้ปากและลิ้นกับบริเวณต่างๆของร่างกายเหยื่อ ซึ่งการพิสูจน์คราบน้ำลายแต่เดิมนั้น อาศัยการตรวจหาปริมาณเอนไซม์อะไมเลส แต่เอนไซม์อะไมเลส สามารถตรวจพบในสารคัดหลั่งอื่นๆ ของร่างกาย เช่น ปัสสาวะ เลือด น้ำนม หรือแม้แต่เหงื่อ ส่วนในน้ำลายนั้นมีปริมาณเอนไซม์อะไมเลสที่สูงมากทำให้เราสามารถแยกแยะน้ำลายออกจากน้ำคัดหลั่งจากส่วนอื่นๆ ของร่างกายได้ แต่ถ้าหากน้ำลายมีการเสื่อมสลายตามสภาพสิ่งแวดล้อมหรือถูกเจือจางโดยน้ำ ความเข้มข้นของเอนไซม์ก็จะลดลง ทำให้ไม่สามารถที่จะใช้ปริมาณอะไมเลสเป็นตัวบ่งชี้ว่าคราบนั้นคือคราบน้ำลายได้อย่างมั่นใจ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาค้นคว้าหาวิธีการใหม่ที่ช่วยในการตรวจพิสูจน์น้ำลาย เพื่อแยกออกจากสารคัดหลั่งส่วนอื่น

จากการศึกษาสภาวะช่องปากในมนุษย์ พบว่ามีแบคทีเรียเป็นจำนวนมากอาศัยอยู่ โดยน้ำลาย 1 มิลลิลิตร สามารถตรวจพบแบคทีเรียได้ถึง 750 ล้านเซลล์ และชนิดที่พบมากที่สุดชนิดหนึ่งคือ *Streptococcus salivarius* ซึ่งเป็นเชื้อที่พบได้ตั้งแต่ 2 วันแรกนับจากทารกได้คลอดออกมา ดังนั้นการตรวจพบเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวในตัวอย่างคราบหนึ่งใดอาจช่วยบ่งชี้ว่าคราบนั้นเป็นน้ำลาย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แบคทีเรีย

แบคทีเรีย เป็นสัตว์ชั้นต่ำ (prokaryotic cell) ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส ดีเอ็นเอในเซลล์จึงอยู่ร่วมกับออร์กาเนลส์ (organels) อื่นๆในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) โดยดีเอ็นเอมีลักษณะเป็นวงกลม ประกอบด้วยโพลีนิวคลีโอไทด์ (polynucleotide) 2 สายพันเป็นเกลียวต่อเนื่องกันไม่มีปลายเปิด อยู่ในลักษณะเส้นเดี่ยว เรียกว่า haploid (มี chromosome 1 ชุด) (ตรีทิพย์, 2552)

ขนาดและรูปร่างของแบคทีเรีย (Shape and Size)

แบคทีเรียมีขนาดเล็กมาก โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 0.5 – 2.0 ไมครอน (เม็ดเลือดแดงมีขนาด 7.5 ไมครอน) แต่ในความเป็นจริงอาจมีขนาดเล็กหรือใหญ่กว่านี้ ขึ้นอยู่กับลักษณะรูปร่างของเซลล์ของแบคทีเรียแต่ละชนิด โดยการแยกชนิดของแบคทีเรียแบ่งจากรูปร่างจำแนกเป็นพวกใหญ่ๆ ได้ดังนี้

1. Cocci มีรูปร่างกลม หรืออาจจะมีรูปร่างที่ผิดแปลกไปบ้างเช่น กลมรี หรือคล้ายเม็ดถั่ว ซึ่งพบได้ในแบคทีเรียบางสายพันธ์ นอกจากนั้น cocci ยังแบ่งได้ตามระนาบการแบ่งตัวดังนี้
   - อยู่เดี่ยวๆ เรียกว่า micrococcus
   - ต่อกันเป็นสายยาว เรียกว่า Streptococcus
   - อยู่เป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น Staphylococcus
   - อยู่เรียงตัวเป็นรูปสี่เหลี่ยม เรียกว่า tetrad
2. Bacilli มีรูปร่างเป็นท่อน ซึ่งมีรูปร่างและขนาดแตกต่างกัน เช่นบางชนิดผอมบาง บางชนิดเป็นท่อนสั้น แตกต่างกันไปตามสายพันธ์ของแบคทีเรีย

นอกจากนี้ยังมีรูปร่างอื่นๆ เช่น Spirals มีรูปร่างเป็นเกลียว ความโค้งงอของเซลล์มีหลายระดับ เช่นพวก Vibrio มีรูปร่างโค้งงอคล้ายคอมมา บางครั้งเซลล์จะติดต่อกัน ทำให้มีรูปร่างเหมือนตัว S หลายตัวต่อกัน spirals มีพวกหนึ่งมีลักษณะเป็นเกลียวแข็งคงตัว ซึ่งได้แก่แบคทีเรียในกลุ่ม Spirillum และอีกพวกหนึ่งมีเกลียวยืดหยุ่น ซึ่งแบ่งแยกออกได้หลายสกุลตามลักษณะบางอย่างเช่น ความแน่นของเกลียว การมีปลอกหุ้มรอบนอก แบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นเกลียวยืดหยุ่นเรียกรวมๆ กันว่า Spirochetes

การแยกชนิดแบคทีเรียตามการติดสีแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ แกรมบวก และแกรมลบ

1. <u>แกรมลบ</u> ผนังเซลล์ประกอบด้วย เพปติโดไกลแคน 5-20 % ลิโพโปรตีน ลิโพพอลิแซ็กคาไรด์ และมีกรดไดอะมิโนพิมิลิกแทนที่กรดอะมิโนไลซีน
2. <u>แกรมบวก</u> ผนังเซลล์ประกอบด้วย เพปติโดไกลแคน 90 % มีกรดอะมิโนน้อยชนิดกว่าแกรมลบ แต่มีผนังเซลล์หนากว่าแกรมลบ

องค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบมีความซับซ้อนมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ปริมาณไขมันที่มีมากกว่าในแกรมลบ มีคุณสมบัติเป็น O antigen และ endotoxin เป็นเครื่องป้องกันไม่ให้ถูกย่อยโดยเอนไซม์บางชนิด องค์ประกอบของลิโพพอลิแซ็กคาไรด์ ยังช่วยป้องกันการถูกฟาโกไซโทซิสด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ความแตกต่างที่สำคัญของแบคทีเรียแกรมลบคือ มีเมมเบรนชั้นนอก (outer membrane) ล้อมรอบเพปติโดไกลแคนไว้ เมมเบรนนี้มีไขมันมากถึง 11-22 % ของน้ำหนักแห้งของผนังเซลล์ เมมเบรนชั้นนอกทำหน้าที่เป็นเครื่องกั้นเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการเจริญของผนังเซลล์ ไม่ให้ออกจากช่องว่าง เพอริพลาสมิก (periplasmic space) และยังกั้นสารเคมีและเอนไซม์ภายนอกไม่ให้เข้าไปทำลายเซลล์ ดังนั้นผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกจึงถูกทำลายด้วยเอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozyme) ได้ง่ายกว่าของแบคทีเรียแกรมลบ

การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

แบคทีเรียจะมีรูปร่างแตกต่างกันมากมายแต่การเจริญของแบคทีเรีย (Bacteria Growth) มีลักษณะที่เหมือนกันคือ เจริญเติบโตโดยการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ แต่ใช้การแบ่งเซลล์ (binary fission) จากหนึ่งเซลล์เป็นสองเซลล์

การเจริญเติบโตของแบคทีเรียสามารถแบ่งเป็นระยะได้ 4 ระยะ คือ

1. ระยะเตรียมการ(Lag phase) เป็นช่วงที่แบคทีเรียมีการเปลี่ยนแปลงเพื่อเตรียมความพร้อมสำหรับการแบ่งเซลล์
2. ระยะเพิ่มจำนวน (Log phase) ในระยะนี้แบคทีเรียจะแบ่งเซลล์จาก 1 เซลล์ เป็น 2 เซลล์ จาก 2 เซลล์ เป็น 4 เซลล์ และทวีคูณไปเรื่อย ๆ ทำให้อัตราการเพิ่มจำนวนคงที่
3. ระยะคงที่ (Stationary phase) อัตราการเพิ่มจำนวนกับอัตราการตาย เนื่องมาจากความหนาแน่นของเซลล์และของเสียที่เซลล์ปล่อยออกมา
4. ระยะตาย (Death phase) อัตราการตายสูงกว่าอัตราการเพิ่มจำนวน

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

1. อุณหภูมิ (Temperature) แบคทีเรียส่วนใหญ่เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 25-40 ^{O}C แต่มีบางกลุ่มสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงและมีบางกลุ่มเจริญได้ดี(ถึงแม้จะช้า)ที่อุณหภูมิ 0-15 ^{O}C ดังนั้นโดยทั่วไปเราแบ่งแบคทีเรียออกเป็น 3 กลุ่ม ตามอุณหภูมิที่สามารถเจริญได้ ดังนี้

1.1 Mesophilic bacteria หรือ mesophiles เป็นแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง เจริญเติบโตได้ดีที่ 20-50 ^{O}C

1.2 Thermophilic bacteria หรือ thermophiles เป็นแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูง เจริญเติบโตได้ดีที่ 45-80 ^{O}C

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.3 Psychrophilic bacteria หรือ psychrophiles เป็นแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิต่ำ สามารถเจริญเติบโตได้ที่ –10 - 25 ^{O}C

นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียบางกลุ่มที่เจริญได้ที่อุณหภูมิสูงมาก เช่น กลุ่ม hyperthermophiles สามารถเจริญเติบโตได้ที่ 80-100 ^{O}C และกลุ่ม extremophiles ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 100-120 ^{O}C

2. เวลา (Time) แบคทีเรียใช้เวลาในการเจริญเติบโตแตกต่างกันขึ้นอยู่กับ ชนิดของแบคทีเรีย ชนิดของอาหารที่แบคทีเรียใช้ และปัจจัยอื่น ๆ การอยู่ในสภาวะที่เหมาะสมทำให้แบคทีเรียเจริญได้ดีและมีระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญ(Generation time) น้อยลง

3. อากาศ (Oxygen) แบคทีเรียแต่ละชนิดมีความต้องการอากาศที่แตกต่างกัน เราสามารถแบ่งประเภทของแบคทีเรียตามความต้องการออกซิเจนได้ ดังนี้

3.1 Aerobes เป็นแบคทีเรียที่ต้องการ ออกซิเจนในการเจริญเติบโต สร้างพลังงานโดยกระบวนการ respiration ซึ่งเป็นการสร้างพลังงานโดยใช้ออกซิเจน

3.2 Facultative anaerobes เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน แบคทีเรียกลุ่มนี้สร้างพลังงานได้จากกระบวนการ respiration และยังสามารถสร้างพลังงานจากกระบวนการ fermentation ซึ่งเป็นการสร้างพลังงานโดยไม่ใช้ออกซิเจนโดยกระบวนการ respiration จะให้พลังงานมากกว่ากระบวนการ fermentation และยังทำให้แบคทีเรียเจริญเติบโตได้เร็วกว่าด้วย

3.3 Aerotolerant anaerobes เป็นแบคทีเรียที่ไม่สามารถใช้ออกซิเจนได้เพราะไม่มีสารตั้งต้นกระบวนการ respiration แต่ออกซิเจนก็ไม่ทำให้แบคทีเรียกลุ่มนี้ตายได้

3.4 Strictly anaerobes ออกซิเจนจะเป็นพิษกับแบคทีเรียกลุ่มนี้ ทำให้แบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน

4. ความเป็นกรดด่าง (pH)

ความเป็นกรด-ด่าง ของสภาวะแวดล้อมมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย แบคทีเรียส่วนใหญ่เจริญได้ดีในช่วง pH 6 – 8 อย่างไรก็ดี มีแบคทีเรียบางกลุ่มที่ทนต่อกรด (acid-tolerant bacteria) และบางกลุ่มที่ทนต่อด่าง (alkaline-tolerant bacteria) โดยทั่วไปแบคทีเรียจะเจริญในช่วง pH ที่เป็นด่าง (ค่า pH มากกว่า 7) ได้ดีกว่า ช่วง pH ที่เป็นกรด (ค่า pH น้อยกว่า 7) แต่ก็มีแบคทีเรียบางกลุ่มเช่น Sulfurbacteria ที่เจริญได้โดยใช้กรด sulfuria acid เป็นแหล่งพลังงาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. สารอาหาร

สารอาหารเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับแบคทีเรีย แบคทีเรียเจริญได้ดีที่สุดเมื่อได้รับสารอาหารที่เหมาะสมซึ่งจะแตกต่างกันไป แบคทีเรียบางชนิดต้องการอาหารที่มีทั้ง กรดอะมิโน โปรตีน วิตามินและน้ำตาล แต่อาหารชนิดเดียวกันนี้อาจทำให้แบคทีเรียอีกกลุ่มตายได้

น้ำตาล เป็นสารอาหารที่ช่วยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตแต่ก็ช่วยทำให้แบคทีเรียตายเร็วขึ้นเช่นกันเพราะการใช้น้ำตาลจะสร้างกรดที่จะทำให้เซลล์แบคทีเรียตาย

ในอาหารที่มีเฉพาะ กรดอะมิโนกับวิตามินจะทำให้การเจริญในช่วง Lag phase นานกว่าปกติ และทำให้อัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียช้าลง

6. ความเข้มข้นของเกลือ

แบคทีเรียหลายชนิดสามารถเติบโตได้ในสภาวะที่มีเกลือมากน้อยต่างกัน แบคทีเรียบางชนิดไม่สามารถเจริญได้แม้มีอยู่เพียงเล็กน้อย แบคทีเรียบางชนิดต้องการเกลือปริมาณหนึ่งในการเจริญแต่แบคทีเรียบางกลุ่มอาจเจริญได้แม้อยู่ในสภาวะมีเกลือมาก ๆ เราเรียกแบคทีเรียกลุ่มนั้นว่า halophilic bacteria เช่นเดียวกับน้ำตาลแม้เกลือช่วยให้แบคทีเรียบางกลุ่มเจริญได้ แต่ความเข้มข้นของเกลือที่สูงมาก ๆ จะทำให้เซลล์แบคทีเรียตาย

Streptococcus salivarius

Streptococcus salivarius เป็นแบคทีเรียทรงกลม แกรมบวก มีความยาวประมาณ 2 μm แบคทีเรียทรงกลม จะเกิดในสายคู่ หรือ สายสั้นๆ *Streptococcus salivarius* จะประกอบไปด้วย fimbriae อยู่บนผิวเซลล์ fimbriae เป็นอวัยวะที่มีลักษณะคล้ายขน ที่มีองค์ประกอบเป็นหน่วยย่อยของโปรตีนมีขนาดตั้งแต่ 2-8 นาโนเมตร พบได้ทั่วไปในช่องปากของคนจนถึงระบบทางเดินหายใจส่วนบน เป็นเชื้อประจำถิ่นมักอยู่บริเวณผิวลิ้น เป็นแบคทีเรียในช่วงวัยแรกของชีวิตหลังจากที่ฟันเริ่มขึ้น ในช่วงปีแรก จะมี Streptococcus mutans และ Streptococcus sanguis เพิ่มเข้ามา จากนั้นก็มีสเตรปโตคอกคัสตัวอื่นตามเข้ามา แบคทีเรียในช่องปากนั้นมีประโยชน์ต่อคนคือ ป้องกันไม่ให้แบคทีเรียร้ายแรงชนิดอื่นรุกรานเข้ามา นอกจากนี้ยังมีส่วนในการสังเคราะห์วิตามินช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกาย หลั่งแอนติบอดีมาต่อต้านเชื้อโรคและยังหลั่งสารมาต่อต้านแบคทีเรียแปลกปลอมซึ่งพบว่าแบคทีเรียแปลกปลอมบางชนิดนั้นสามารถทำให้คนเสียชีวิตได้ ตัวอย่างเช่น *Streptococcus suis* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งสามารถพบได้ในสุกร หากรับเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวจะทำให้เกิดอาการ เยื่อหุ้มสมองอักเสบเฉียบพลัน หลอดเลือดอักเสบ อุจจาระร่วง เป็นไข้ ปวดศรีษะ คอแข็ง ผู้ที่รอดชีวิตบางรายยังพบว่ามีความพิการจากการรับเชื้อดังกล่าว เช่น อัมพาตครึ่งซีก หูหนวกทั้ง 2 ข้าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอ (Deoxyribonucleic acid : DNA) เป็นโพลิเมอร์ของนิวคลีโอไทด์ ซึ่งแต่ละหน่วยย่อยประกอบด้วยหน่วยน้ำตาล เบส และหมู่ฟอสเฟตในสัดส่วนเท่าๆ กัน (1:1:1) การเรียงตัวที่ต่างกันของเบสทำให้เกิดความแตกต่างของดีเอ็นเอ (DNA polymorphism) เบสที่พบทั่วไปในดีเอ็นเอถูกจัดเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกเบสไพริมิดีน (pyrimidine) กลุ่มที่สองเบสพิวรีน (purine)

คุณสมบัติทั่วไปของดีเอ็นเอ

<u>คุณสมบัติทางกายภาพ</u>

1. ถูกย่อยสลายเป็นหน่วยย่อยเล็กๆอย่างสมบูรณ์ได้ด้วยกรดแก่
2. ทนต่อการย่อยด้วยด่าง
3. เสียสภาพธรรมชาติเมื่อถูกความร้อน (denaturation) และกลับมาจับกันใหม่ได้ (renaturation) ถ้าอุณหภูมิเย็นลง

<u>คุณสมบัติทางชีวภาพ</u>

1. เก็บรักษาข้อมูลทางพันธุกรรม ถ่ายทอดไปได้ในแต่ละรุ่น
2. จำลอง (DNA replication) และซ่อมแซม (DNA repair) ตัวเองได้ การจำลองตัวเองของ ดีเอ็นเอ ในสัตว์ชั้นต่ำ (ศึกษาใน *Escherichia coli*) เป็นแบบ semiconservative replication คือ เมื่อมีการจำลองตัวเองจะมีการแยกโพลีนิวคลีโอไทด์ ทั้ง 2 สายออกจากกัน จากนั้นสร้างสายใหม่เข้าคู่กับสายเก่าเสมอ
3. ถ่ายทอดหรือแสดงออกข้อมูลอย่างเป็นลำดับขั้น โดยผ่านอาร์เอ็นเอ

เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นหลักการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่ (DNA Replication) จากดีเอ็นเอต้นแบบในหลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้นและได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่า ค้นพบครั้งแรกโดย Kary Mullis และคณะ โดยใช้หลักการเลียนแบบธรรมชาติที่อาศัยดีเอ็นเอต้นแบบเป็นจุดเริ่มต้นและมีเอนไซม์พวก DNA polymerase ช่วยทำให้สายดีเอ็นเอยาวออกไปโดยเลือกจับเอานิวคลีโอไทด์ตัวใดตัวหนึ่งใน 4 ชนิดคือ dATP, dGTP, dCTP, dTTP เข้ามาต่อเป็นเบสคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบ (template) ส่วนประกอบต่างๆในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมีดังนี้คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ(template DNA), thermostable DNA polymerase, deoxynucleotides, triphosphate (dNTPs) ทั้ง 4 ชนิด, Oligonucleotide primer อย่างน้อย 1 คู่ และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ปริมาณดีเอ็นเอจะเพิ่มมากขึ้นได้ต้องอาศัยปฏิกิริยาที่ต่อเนื่องหลายๆรอบ ซึ่งแต่ละรอบจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ

1. ขั้นตอน denaturation เป็นการแยกสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยว โดยอาศัยความร้อนที่อุณหภูมิสูง 90-95 องศาเซลเซียส
2. ขั้นตอน primer annealing เป็นขั้นตอนที่มีการลดอุณหภูมิลงมาที่ประมาณ 45-60 องศาเซลเซียส เพื่อให้ primer สามารถเกาะติดกับดีเอ็นเอต้นแบบตรงบริเวณเบสคู่สม
3. ขั้นตอน primer extension เป็นขั้นตอนการขยายสายดีเอ็นเอ โดยการต่อลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3’ ของ primer แล้วมีการขยายดีเอ็นเอสายใหม่จากทิศทาง 5’ ไป 3’ โดยอาศัยการทำงานของเอ็นไซม์ thermostable DNA polymerase เช่น Taq polymerase ซึ่งปกติใช้อุณหภูมิในช่วง 70-75 องศาเซลเซียส

สารเคมีที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยา PCR

1. Deoxynucleotides (dNTP) เป็นนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นหน่วยย่อยสำหรับนำไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่
2. DNA polymerase เป็นเอนไซม์สำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอให้ช่วยเร่งปฏิกิริยาเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์ใหม่เข้ากับไพรเมอร์
3. Primer เป็นดีเอ็นเอเริ่มต้นสายสั้นๆ ทีมีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบของการสังเคราะห์ ในการทำ PCR จึงต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการจะเพิ่มจำนวน เพื่อใช้ในการสร้าง primer จำเพาะ
4. Template คือดีเอ็นเอต้นแบบหรือยีนส่วนที่ต้องการเพิ่มปริมาณ หรือเป็นตัวอย่างดีเอ็นเอ ที่ต้องการนำมาตรวจหาดีเอ็นเอจำเพาะ
5. PCR buffer เป็นสารละลายที่ควบคุมสภาวะของการทำปฏิกิริยาให้เหมาะสม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เอนไซม์ (Enzyme)

เอนไซม์เป็นโมเลกุลของโปรตีนที่ใช้ในการสร้างพลังงาน เอนไซม์มีอยู่ในร่างกายคน พืช และสัตว์ เฉพาะในคนพบประมาณ 2,800 ชนิดและประมาณการว่ามีเอนไซม์ในร่างกายทั้งหมด 3000 ชนิด เอนไซม์จำเป็นต่อปฏิกิริยาเคมีทุกอย่างในร่างกาย ไม่ว่าจะเป็นอวัยวะเนื้อเยื่อและเซลล์ทุกเซลล์ของเรา ถ้าไม่มีเอนไซม์ร่างกายก็ไม่สามารถใช้สารอาหารในอาหารที่เราบริโภคเข้าไปได้เต็มที่ เอนไซม์เป็นตัวย่อยสารอาหารให้มีขนาดเล็กลงเพื่อที่จะให้เกิดการดูดซึมผ่านกระแสโลหิตไปเลี้ยงเซลล์ต่างๆ ของร่างกายสร้างกล้ามเนื้อ กระดูก เส้นประสาท เม็ดเลือด ต่อมต่างๆ ปอดและ

อวัยวะทุกส่วน แม้แต่วิตามินแร่ธาตุและฮอร์โมนก็ไม่อาจทำงานได้ถ้าไม่มีเอนไซม์ เอนไซม์มีทั้งที่ร่างกายสร้างขึ้นโดยธรรมชาติ และเอนไซม์ที่มีอยู่ในอาหารสดที่กินเข้าไปในน้ำลายก็มีเอนไซม์ เอนไซม์คือ ตัวเร่งที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาที่เกิดในสิ่งมีชีวิต ทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มสูงขึ้นได้ถึง 10^{8} – 10^{14} เท่าของปฏิกิริยาเดิมที่ไม่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง ในปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งนั้น สารที่เข้าทำปฏิกิริยากัน มีชื่อเรียกว่าสับสเตรต (substrate) โดยส่วนใหญ่แล้วเอนไซม์ชนิดหนึ่งๆ จะสามารถเร่งปฏิกิริยาที่มีสับสเตรตชนิดใดชนิดหนึ่งโดยเฉพาะเท่านั้น นั่นคือเอนไซม์เป็นตัวเร่งที่มีความจำเพาะต่อสับสเตรต

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของ เอนไซม์

- อุณหภูมิ ที่เหมาะสม
- ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ส่วนใหญ่ทำงานได้ดีในช่วง pH 6.7-7
- ความเข้มข้นของ เอนไซม์ และสารอาหาร

เอนไซม์ แบ่งเป็น 3 ชนิด

1. เอนไซม์จากอาหาร (food enzyme) พบในอาหารดิบทุกชนิด ถ้ามากจากพืช เรียกว่า เอนไซม์จากพืช (plant enzyme)
2. เอนไซม์ย่อยอาหาร (digestive enzyme) เป็นเอนไซม์ที่ผลิตโดยร่างกายส่วนใหญ่ผลิตจากตับอ่อน เพื่อใช้ย่อยและดูดซึมอาหารที่กินเข้าไปทำให้ร่างกายได้รับสารอาหาร (nutrient) ที่มีคุณค่า
3. เอนไซม์ในการเผาผลาญพลังงาน (metabolic enzyme) เม ตาบอลิค เอนไซม์ เป็นเอนไซม์ที่ผลิตในเซลล์และเนื้อเยื่อต่าง ๆ ในร่างกาย ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาชีวเคมี เพื่อการเผาผลาญสารอาหาร และสร้างพลังงาน สร้างภูมิต้านทาน สร้างความเจริญเติบโตตลอดจนซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอของอวัยวะต่าง ๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

น้ำลาย

น้ำลายจะถูกสร้างจากต่อมน้ำลายซึ่งเป็นต่อมมีท่อ ประมาณ 1-1.5 ลิตร มีฤทธิ์เป็นกรดอ่อน (pH 6.0-7.0) มีลักษณะเป็นของเหลว 2 ชนิด ได้แก่ ชนิดใส และ ชนิดเหนียว ทำหน้าที่ละลายอาหารป้องกันไม่ให้ปากแห้ง และช่วยในการเคลื่อนไหวของของลิ้นในขณะพูดโดยมีอยู่ 3 คู่คือ

1. ต่อมข้างกกหู (Parotid gland) อยู่บริเวณกกหูทั้ง 2 ข้างจะผลิตน้ำลายประมาณ 25% ของน้ำลายทั้งหมด
2. ต่อมใต้ขากรรไกร (Submaxillary gland) สร้างน้ำลายทั้งชนิดใสและชนิดเหนียว แต่มีน้ำลายชนิดใสมากกว่า ต่อมชนิดนี้ผลิตน้ำลายประมาณ 70% ของน้ำลายทั้งหมด
3. ต่อมใต้ลิ้น (Sublingual gland) สร้างน้ำลายทั้งชนิดใสและชนิดเหนียว แต่มีน้ำลายชนิดเหนียวมากกว่า ต่อมชนิดนี้ผลิตน้ำลายประมาณ 5% ของน้ำลายทั้งหมด

น้ำลาย มีส่วนประกอบ ดังนี้

1. เอนไซม์อะไมเลส (Amylase) ช่วยย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต
2. น้ำ (Water) มีประมาณ 99.5% เป็นตัวทำละลายสารอาหาร
3. น้ำเมือก (Mucin) เป็นสารคาร์โบไฮเดรต ผสมโปรตีน ช่วยให้อาหารรวมตัวกันเป็นก้อน ลื่น และกลืนสะดวก

เอนไซม์อะไมเลส มี molecular weight ประมาณ 50000 เป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยอาหารจำพวกแป้ง ให้ได้เป็นไดแซคคาไรด์ (disaccharide) ได้แก่น้ำตาลมอลโตส และเดกซ์ทริน จากนั้นน้ำตาลมอลโตส จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์มอลเตส ให้ได้เป็นน้ำตาลกลูโคส ส่วนเดกซ์ทรินนั้นจะถูกย่อยโดยเอนไซม์อะไมเลสและกลูโคอะไมเลสต่อไป เอนไซม์อะไมเลสจะสลายพันธะที่จำเพาะคือ ตรงตำแหน่งที่เรียกว่า 1,4 alpha-glucosidic linkage ในอาหารจำพวกแป้ง เอนไซม์จำพวกนี้ถูกสร้างขึ้นที่ต่อมน้ำลาย ตับอ่อน และจุลชีพบางชนิดก็สามารถสร้างได้ด้วยเช่นกัน พบว่าในเด็กวัยรุ่นจะมีเอนไซม์ในน้ำลายมากกว่าคนอายุ 60-90 ปี ถึง 30 เท่า เอนไซม์อะไมเลสส่วนใหญ่พบได้ที่ต่อมน้ำลาย ประมาณ 55-60% และตับอ่อน 40-45% ส่วนอื่นๆ ได้แก่ ท่อนำไข่ ถุงน้ำรังไข่ อัณฑะ ปอด ต่อมไทรอยด์ ต่อมทอลซิล น้ำนม เหงื่อ น้ำตา หรือแม้แต่อวัยวะที่เป็นเนื้อร้ายหรือมะเร็ง โดยเอนไซม์อะไมเลสแบ่งได้ 2 ชนิดคือ α –amylase พบได้ที่ต่อมน้ำลาย และ ß–amylase พบได้ที่ตับอ่อน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากความรู้ดังกล่าว จึงเป็นที่มาของงานวิจัยนี้ ที่ต้องการศึกษาเชื้อ *Streptococcus salivarius* เปรียบเทียบกับวิธีการตรวจโดยหาเอนไซม์อะไมเลสด้วยเครื่องอัตโนมัติ ในน้ำลายที่ผ่านการเจือจาง เพื่อทราบประสิทธิภาพของการตรวจสอบว่า ชนิดใดดีกว่ากันและอาจนำมาประยุกต์ใช้ในกรณีจริงต่อไปโดยในต่างประเทศได้มีการศึกษาและประยุกต์ใช้เพื่อเป็นประโยชน์ยกตัวอย่างเช่น

Chen Y M et al., 1998 ได้ทำต้นแบบ (primer) จำเพาะกับเชื้อ *Streptococcus salivarius*

Hoshino T et al., 2004 แสดงให้เห็นว่าเป็นครั้งแรกของงานวิจัยที่วิธี PCR (polymerase chain reaction) มีประโยชน์ต่อการวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม mitis และ salivarius ในน้ำลาย

Nakanishi H et al., 2009 ได้ทำการตรวจหาเชื้อ *Streptococcus salivarius* พบว่าเชื้อ *Streptococcus salivarius* นั้นมีโอกาสพบได้ถึง 100 % แสดงให้เห็นว่า *Streptococcus salivarius*นั้นมีความจำเพาะมากกว่า และสามารถตรวจพบได้ในงานนิติวิทยาศาสตร์รูปแบบจำลองโดยการทดสอบตรวจจากบุหรี่ ผ้าฝ้าย และน้ำลายที่เก็บไว้เป็นเวลา 6 ปี ผลคือสามารถตรวจพบได้ถึง 80 % และได้ทำการทดลองเพื่อหาในสัตว์จำพวก สุนัข แมว สุกร แพะ ผลคือไม่ปรากฏเชื้อดังกล่าวแต่อาจสามารถพบได้ในบางกรณีซึ่งมีโอกาสน้อยมาก

Takai N et al., 2004 ได้ทำการศึกษาถึงผลกระทบต่อระดับเอนไซม์อะไมเลส ของผู้ที่ถูกทดสอบโดยการให้ดูวิดีโอที่มีเนื้อหาตึงเครียด สลับกับวิดีโอภาพวิวทิวทัศน์สวยงาม พบว่าภาวะความเครียดมีผลต่อระดับเอนไซม์อะไมเลส

Yamaguchi M et al., 2006 ได้ทำการวัดระดับเอนไซม์อะไมเลสจากกลุ่มอาสาสมัคร 15 คน โดยให้ขับรถยนต์ในแบบระมัดระวัง เปรียบเทียบกับขับแบบรวดเร็ว พบว่าระดับเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดของกลุ่มทดลองอยู่ในช่วง 14 ถึง 216 kU/l และมีความสัมพันธ์กับความเครียด

จากการทบทวนเอกสารจะเห็นได้ว่าปริมาณเอนไซม์อะไมเลสในน้ำลาย มีการแปรปรวนไปตามบุคคล และสภาพอารมณ์ กล่าวคือ แต่ละคนจะมีระดับเอนไซม์อะไมเลสในน้ำลายไม่เท่ากัน และเมื่ออารมณ์แปรปรวนยังทำให้ระดับเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไปตามสภาวะความเครียด ดังนั้นการใช้ปริมาณเอนไซม์เป็นตัวบ่งชี้ว่าเป็นคราบน้ำลาย อาจจะไม่มีความเที่ยงตรงเพราะเหตุจากการแปรปรวนของระดับเอนไซม์ดังได้กล่าวมาแล้วข้างต้น จำเป็นต้องค้นหาวิธีการตรวจพิสูจน์แบบใหม่ที่อาจจะได้ผลชัดเจน และนำมาใช้ประโยชน์ได้ดีขึ้น

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อตรวจน้ำลายที่เจือจางแล้ว โดยเปรียบเทียบโอกาสตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อ *Streptococcus salivarius* กับการตรวจปริมาณเอนไซม์อะไมเลส ซึ่งใช้ค่าการคัดออกที่ 500 U/l ด้วยเครื่องอัตโนมัติ

สมมติฐานการศึกษา

การตรวจพิสูจน์น้ำลาย เจือจาง โดยตรวจหาเชื้อ *Streptococcus salivarius* มีความไว (Sensitivity) สูงกว่าการตรวจวัดปริมาณเอนไซม์อะไมเลส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขอบเขตการวิจัย

ขอบเขตประชากร

ประชากรไทย จำนวน 70 คน

ขอบเขตการทดลอง

ศึกษาความไว (Sensitivity) ของการตรวจดีเอ็นเอจากเชื้อ *Streptococcus salivarius* เปรียบเทียบการตรวจปริมาณเอนไซม์อะไมเลส โดยเก็บตัวอย่างน้ำลายจากอาสาสมัครเจือจาง 100 เท่า เพื่อตรวจดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) และวัดปริมาณเอนไซม์อะไมเลสโดยวิธี enzymatic photometry

ประโยชน์ที่จะได้รับจากการศึกษา

อาจจะได้เทคนิคในการตรวจพิสูจน์ทราบว่าเป็นน้ำลายที่มีความไว (Sensitivity) กว่าการตรวจในแบบเดิม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved