บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันวัตถุพยานหลักฐานในที่เกิดเหตุถือเป็นสิ่งที่มีความสำคัญที่สุด ที่ช่วยในการวินิจฉัยคลี่คลายคดีตั้งแต่ชั้นตรวจสถานที่เกิดเหตุจนถึงชั้นศาล ซึ่งในการเกิดอาชญากรรม โดยเฉพาะคดีอาชญากรรมที่มีความรุนแรง เช่น คดีข่มขืน ทำร้ายร่างกาย การฆาตกรรมด้วยอาวุธต่างๆ มักต้องพบหลักฐานบางอย่างทั้งหลักฐานทางกายภาพและทางชีวภาพหลงเหลืออยู่ในสถานที่เกิดเหตุ บนเสื้อผ้าเครื่องนุ่งห่มของผู้เสียหายหรือผู้ต้องสงสัยเสมอ และชีววัตถุพยานที่สำคัญอย่างหนึ่งที่มักพบได้ในคดีอาชญากรรมเหล่านั้น คือ คราบเลือด เมื่ออาศัยข้อมูลต่างๆ เกี่ยวกับคราบเลือดที่พบ เช่น ปริมาณคราบเลือด ลักษณะการกระจายของเลือด รอยป้าย รอยลาก ตำแหน่ง และทิศทาง เป็นต้น ประกอบกับผลการตรวจพิสูจน์ยืนยันทางวิทยาศาสตร์จะสามารถใช้เป็นหลักฐานประกอบในการสืบสวนสอบสวนที่เกี่ยวกับพฤติการณ์ของคดีที่เกิดขึ้น สามารถที่จะเชื่อมโยงกันระหว่างบุคคลที่เกี่ยวข้องในคดีไม่ว่าจะเป็นผู้เสียหาย ผู้ต้องสงสัย พยานบุคคล และสถานที่เกิดเหตุเข้าไว้ในเหตุการณ์เดียวกันได้ ดังนั้นในงานนิติวิทยาศาสตร์ โดยทั่วไปเมื่อพบคราบเลือดต้องสงสัย การตรวจสอบเบื้องต้นที่ต้องทำ คือ ตรวจว่าเป็นคราบเลือดหรือไม่ และเป็นคราบเลือดมนุษย์หรือเลือดสัตว์ก่อน แล้วจึงทำการตรวจลึกลงไปอีกว่าถ้าเป็นคราบเลือดมนุษย์แล้วคราบเลือดนั้นเป็นของใคร ซึ่งในการตรวจเบื้องต้นมักจะใช้การตรวจหาสารชีวเคมีต่างๆ แต่บางครั้งก็มักเกิดปัญหาขึ้นได้ เช่น การตรวจสอบว่าเป็นคราบเลือดหรือไม่ ด้วยวิธี phenolphthalein test หรือที่รู้จักกันในการทดสอบ Kastle-Mayer test ใช้การ oxidation ถ้าพบว่าเป็นเลือดจะให้สีชมพู แต่บางครั้งก็เกิด false positive กับสารบางชนิดได้ เช่น สารที่อยู่ในมันฝรั่ง เป็นต้น สำหรับวิธี luminol test ก็มีข้อจำกัด คือ บริเวณที่ตรวจต้องมืดจึงจะสามารถมองเห็นการเรืองแสงของคราบเลือดที่เกิดปฏิกิริยากับสาร luminol ได้ และในการตรวจยืนยันว่าเป็นคราบเลือดมนุษย์ โดยวิธี precipitin test ถึงแม้ไม่ให้ผลบวกกับเลือดของสัตว์อื่นๆ แต่มีข้อยกเว้นกับสัตว์จำพวกลิง (ศิริพร พันธศรี, 2549) หรือในกรณีของการตรวจหาหมู่เลือดบางครั้งก็ไม่สามารถตรวจหาได้ เนื่องจากถูกทิ้งไว้เป็นเวลานาน เป็นต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปัจจุบันเทคโนโลยีการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ ได้เป็นที่ยอมรับและมีบทบาทมากขึ้น สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ มากมาย โดยเฉพาะบทบาทในฐานะพยานหลักฐานที่สำคัญที่มีส่วนช่วยในการสนับสนุนกระบวนการยุติธรรมในชั้นศาล ไม่ว่าจะเป็นการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล การตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือด หรือการตรวจวัตถุพยานในคดี ทั้งนี้เนื่องจาก สิ่งสำคัญขั้นพื้นฐานของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด คือ ดีเอ็นเอ (Deoxyribonucleic acid : DNA) ซึ่งเป็นสารพันธุกรรมที่ทำหน้าที่ควบคุมลักษณะต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต รวมทั้งเก็บและถ่ายทอดข้อมูลพันธุกรรมไปสู่ลูกหลาน โดยดีเอ็นเอประกอบขึ้นจากการเชื่อมกันของสายพอลินิวคลีโอไทด์ (polynucleotide) 2 สาย ทำให้เกิดเป็นโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นเกลียว (double helix) โดยที่แต่ละหน่วยย่อยนิวคลีโอไทด์นั้นจะประกอบไปด้วยหน่วยน้ำตาล เบส และหมู่ฟอสเฟต ในอัตราส่วน 1:1:1 เบสที่พบโดยทั่วไปมี 4 ชนิด คือ อะดีนีน (Adenine: A), ไธมีน (Thymine: T), กัวนีน (Guanine: G) และ ไซโทซีน (Cytosine: C) ความแตกต่างกันของสายพอลินิวคลีโอไทด์แต่ละสายเกิดจากการมีลำดับการเชื่อมต่อพอลินิวคลีโอไทด์หรือที่เรียกว่า ลำดับเบส (base sequence) ที่ต่างกันนั่นเอง และเมื่อใช้เบสในจำนวนที่แตกต่างกันบนสายดีเอ็นเอ จะทำให้เกิดรหัสข้อมูลที่ต่างกัน ซึ่งเป็นตัวกำหนดคุณสมบัติที่สำคัญของสิ่งมีชีวิต ควบคุมกิจกรรมต่างๆ ของเซลล์ รวมถึงลักษณะของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ดังนั้นลักษณะที่เกิดความแปรปรวน (variation) หรือ เกิดความแตกต่างของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ จึงสามารถที่จะใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตตัวหนึ่ง สายพันธุ์หนึ่ง หรือในระดับต่างสายพันธุ์ได้

ภายในเซลล์ของสัตว์ นอกจากจะพบดีเอ็นเอได้ภายในนิวเคลียสแล้ว ยังสามารถพบได้ภายในออร์แกเนลล์ (organelle) ที่อยู่ในส่วนของไซโทพลาสซึม (cytoplasm) อีก ได้แก่ ดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรีย (mitochondria) ซึ่งเป็นออร์แกเนลล์สำคัญที่เป็นแหล่งพลังงานของเซลล์ โดยเรียกดีเอ็นเอที่อยู่ในไมโตคอนเดรียว่า ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA) ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นดีเอ็นเอเกลียวคู่แบบวงแหวน (double stranded circular DNA) ถูกถ่ายทอดผ่านทางมารดาเท่านั้น ประกอบด้วยยีน 37 ยีน และส่วนที่เรียกว่า บริเวณควบคุม (control region) ซึ่งมีการสะสมของการเกิดการกลายพันธุ์ (mutation) สูง บางทีจึงเรียกบริเวณนี้ว่า บริเวณหลากหลายสูง (hypervariable region) เป็นผลให้สิ่งมีชีวิตมีวิวัฒนาการมากน้อยแตกต่างกัน จนเกิดเป็นกลุ่มของสิ่งมีชีวิตในระดับต่างๆ ขึ้น ทั้งนี้ยีนไซโตโครม บี (cytochrome b gene) เป็นยีนตำแหน่งหนึ่งที่อยู่บนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ สามารถนำมาใช้ตรวจพิสูจน์ เปรียบเทียบลำดับเบสเพื่อแยกกลุ่มสิ่งมีชีวิตในระดับ species ได้ด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา โดยเทคนิคหนึ่งที่นิยมนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบดีเอ็นเอ คือ เทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction : PCR) หรือปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ซึ่งเป็นเทคนิคที่ทำและแปลผลได้ง่าย ใช้เวลาไม่นาน มีประสิทธิภาพสูง และค่าใช้จ่าย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

น้อย สามารถตรวจสอบกับดีเอ็นเอที่มีปริมาณน้อย สภาพไม่สมบูรณ์ หรือมีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอได้ หลักการทั่วไปของเทคนิคนี้เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบครบวงจรในหลอดทดลอง โดยอาศัยเอนไซม์ดีเอ็นเอพอริเมอเรส ที่สามารถทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิสูงๆ เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ในส่วนที่ต้องการให้เป็นล้านๆ เท่า ภายในเวลาเพียง 2-3 ชั่วโมง โดยที่ในปฏิกิริยาแต่ละรอบประกอบด้วยขั้นตอน 3 ขั้นตอน ซึ่งควบคุมโดยอุณหภูมิต่างๆ กัน คือ ขั้นตอน denaturation ให้ความร้อนทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบ (template) ที่เป็นดีเอ็นเอเส้นคู่แยกเป็นดีเอ็นเอเส้นเดี่ยว ขั้นตอน annealing ลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว ให้ไพรเมอร์ (primer) ซึ่งเป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ ขนาด 20-30 เบส ที่มีลำดับคู่สมกับลำดับเบสในดีเอ็นเอต้นแบบเข้ามาจับ และขั้นตอน extension เปลี่ยนอุณหภูมิให้พอเหมาะกับการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส ทำให้เอนไซม์ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเติมเบสที่ปลาย 3′ ของไพรเมอร์ เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาในแต่ละรอบจะได้จำนวนของดีเอ็นเอต้นแบบเข้าสู่ปฏิกิริยารอบต่อไปเพิ่มขึ้น ทำให้ได้ดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน ซึ่งลักษณะการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอจะเป็นการเพิ่มแบบทวีคูณ คือ 2^n เมื่อ n เป็นจำนวนรอบของปฏิกิริยา (วิชัย บุญแสง, 2547)

ดังนั้นจากหลักการและเหตุผลที่กล่าวมาแล้ว จึงเห็นว่าการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอที่มีแหล่งที่มาจากมนุษย์ด้วยตำแหน่งยีนไซโตโครม บี ที่อยู่ในไมโตคอนเดรีย โดยอาศัยเทคนิคพีซีอาร์นั้น เป็นวิธีที่น่าสนใจ สามารถที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์ได้ เกี่ยวกับการตรวจสอบชีววัตถุพยานที่ต้องสงสัยว่ามีแหล่งที่มาจากมนุษย์ และน่าจะสามารถตรวจพิสูจน์ได้ในกรณีของคราบเลือดมนุษย์ที่มีปริมาณคราบเลือดเพียงเล็กน้อย ถูกทิ้งไว้เป็นเวลานานๆ ได้

วัตถุประสงค์ของการค้นคว้า

เพื่อศึกษาความไวและความจำเพาะ ของวิธีการตรวจที่ตำแหน่งยีนไซโตโครม บี จากตัวอย่างคราบเลือดของมนุษย์ โดยอาศัยเทคนิค PCR

สมมติฐานของการค้นคว้า

สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างดีเอ็นเอของมนุษย์ ที่ตำแหน่งยีนไซโตโครม บี ได้ผลชัดเจนถูกต้องทั้งหมด และในการทดสอบแบบเดียวกันไม่พบแถบดีเอ็นเอที่มาจากตัวอย่างดีเอ็นเอของสัตว์ต่างๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขอบเขตการค้นคว้า

ประชากรที่ใช้ในการศึกษา คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของมนุษย์ จำนวน 45 ตัวอย่าง ซึ่งสกัดจากคราบเลือดบนผ้า ขนาดพื้นที่ 5x5 mm. และตัวอย่างดีเอ็นเอของสัตว์ ได้แก่ ไก่ สุนัข หมู และวัว อีกชนิดละ 25 ตัวอย่าง ทำการเพิ่มประมาณดีเอ็นเอเพื่อตรวจพิสูจน์ความไว และความจำเพาะต่อตำแหน่งยีนไซโตโครม บี ในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของมนุษย์ ด้วยเทคนิค PCR ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis บันทึก วิเคราะห์ และสรุปผลเป็นรายงาน

นิยามศัพท์เฉพาะ

ความไว (sensitivity) หมายถึง ความสามารถของการใช้ตำแหน่งยีนไซโตโครม บี ในการตรวจแยกตัวอย่างดีเอ็นเอมนุษย์ ที่สกัดจากคราบเลือดได้ถูกต้อง ด้วยเทคนิค PCR ซึ่งแสดงผลในรูปแบบร้อยละ และปริมาณน้อยที่สุดของตัวอย่างดีเอ็นเอมนุษย์ที่ตรวจได้ผลบวกจากการทดสอบ

ความจำเพาะ (specificity) หมายถึง ความสามารถของการใช้ตำแหน่งยีนไซโตโครม บี ในการตรวจแยกตัวอย่างดีเอ็นเอที่ไม่ใช่ของมนุษย์ (มาจากสัตว์อื่น ได้แก่ ไก่ สุนัข หมู และวัว)ได้ถูกต้อง ด้วยเทคนิค PCR แสดงผลในรูปแบบร้อยละของตัวอย่างดีเอ็นเอจากสัตว์ที่ตรวจได้ถูกต้องจากการทดสอบว่าเป็นผลลบ

ยีนไซโตโครม บี (cytochrome b gene) หมายถึง ยีนที่อยู่บนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ ซึ่งจะมีลำดับเบสที่แตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต (species)

ประโยชน์ที่จะได้รับจากการค้นคว้า

1. ได้ทราบถึงเทคนิค วิธีการที่เชื่อถือได้สำหรับการตรวจพิสูจน์เพื่อยืนยันคราบเลือดมนุษย์โดยใช้ส่วนของยีนไซโตโครม บี ในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ
2. ได้ทราบถึงประสิทธิภาพความไว และความจำเพาะของตำแหน่งยีนไซโตโครม บี ในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ ที่มีต่อการตรวจพิสูจน์คราบเลือดของมนุษย์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved