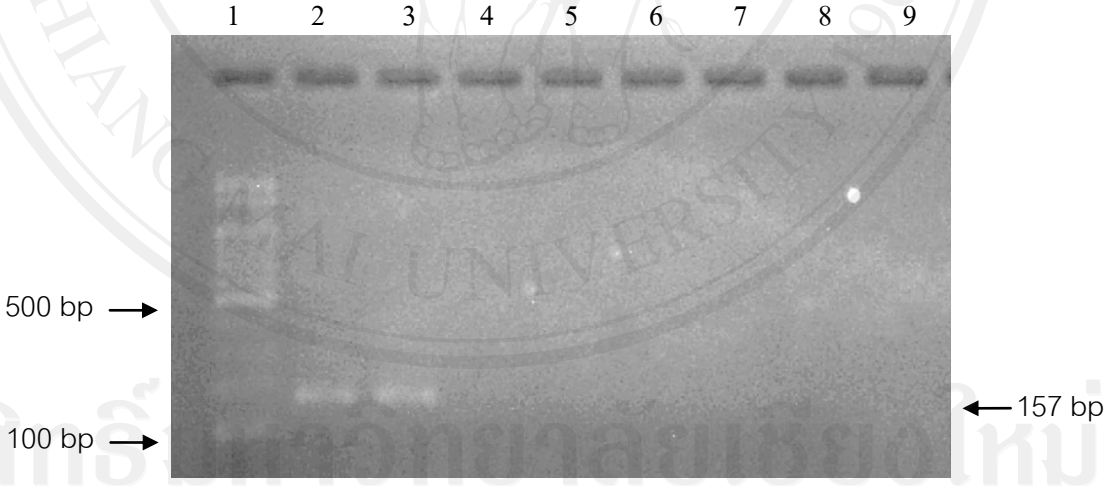
บทที่ 4

ผลการศึกษาและอภิปรายผลการศึกษา

การศึกษาการตรวจสอบความจำเพาะ ผู้ศึกษาได้นำผ้าฝ้ายที่ใช้ในการทดลองไปผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อ (autoclave) ก่อนที่จะนำเลือดมาหยดลงบนผ้า เพื่อเป็นการป้องกันการปนเปื้อนในเบื้องต้น ภายหลังเมื่อได้คราบเลือดบนผ้าแล้ว ผู้ศึกษาได้ทำการตัดผ้าในบริเวณที่ใกล้เคียงคราบเลือดแต่ละคราบ แล้วนำมาทำการตรวจสอบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอ โดยทำการสกัดดีเอ็นเอและทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ แล้วตรวจสอบ PCR product ด้วย 2% agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp ladder) ตัวอย่างดีเอ็นเอจากเลือดมนุษย์ (positive control) ตัวอย่างดีเอ็นเอจากคราบเลือด และน้ำกลั่น (negative control) ผลปรากฏว่าผ้าที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วที่นำมาทดลองครั้งนี้ ไม่มีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอมนุษย์มาก่อน ดังรูปที่ 7



รูปที่ 7 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากผ้าสะอาดบริเวณใกล้เคียงคราบเลือด เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน, positive control, ตัวอย่างดีเอ็นเอจากคราบเลือด และ negative control

ช่องที่ 1 เป็น ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp ladder)

ช่องที่ 2 เป็น positive control ที่ได้จากตัวอย่างเลือดสดของมนุษย์

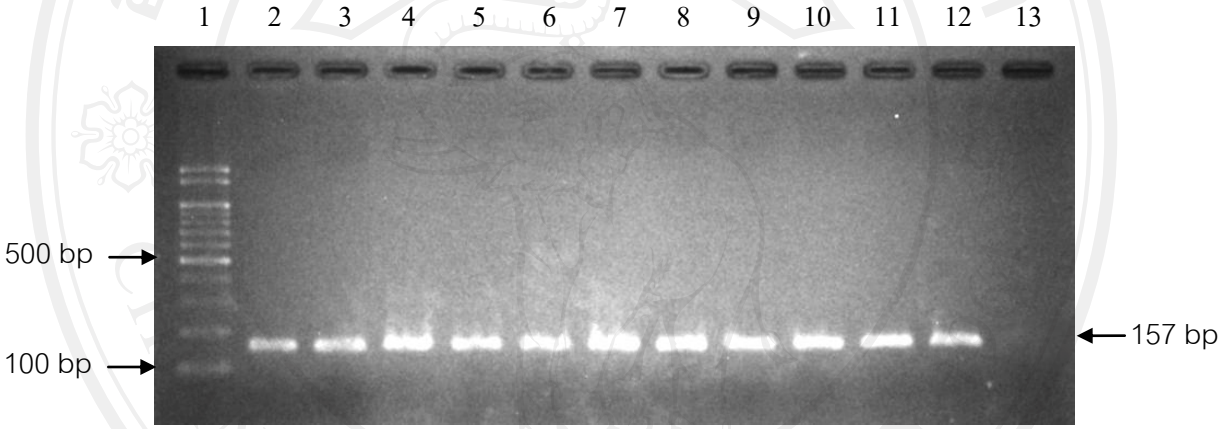
ช่องที่ 3 เป็น ตัวอย่างดีเอ็นเอจากคราบเลือดมนุษย์

ช่องที่ 4-8 เป็น ตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากผ้าบริเวณที่ใกล้เคียงกับคราบเลือด

ช่องที่ 9 เป็น negative control โดยใช้น้ำกลั่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากการนำตัวอย่างดีเอ็นเอจากคราบเลือดมนุษย์ ทั้ง 45 ตัวอย่าง มาดำเนินการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของตำแหน่งยีนไซโตโครม บี ด้วยเทคนิค PCR จนได้ PCR product และตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย 2% agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp ladder) ตัวอย่างดีเอ็นเอจากเลือดมนุษย์ (positive control) และน้ำกลั่น (negative control) ภายหลังการทำการตรวจสอบซ้ำอีก 2 ครั้ง และแปลผลจาก 2 ใน 3 ครั้งแล้ว ปรากฏว่าสามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอ ที่มีขนาดความยาวประมาณ 157 bp ตามที่คาดได้ชัดเจนหมดทั้ง 45 ตัวอย่าง ซึ่งขนาดความยาวนี้มีความใกล้เคียงสอดคล้องกับข้อมูลงานวิจัยของ Matsuda H. (2005) ที่ได้ทำการวิจัยค้นคว้ามาก่อน (ดังรูปที่ 8 และตารางที่ 1)



รูปที่ 8 แถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างคราบเลือดมนุษย์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน, positive control และ negative control

ช่องที่ 1 เป็น ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp ladder)

ช่องที่ 2 เป็น positive control ที่ได้จากตัวอย่างเลือดสดของมนุษย์

ช่องที่ 3-12 เป็นตัวอย่างดีเอ็นเอจากคราบเลือดมนุษย์

ช่องที่ 13 เป็น negative control โดยใช้น้ำกลั่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 1 ผลการตรวจสอบการเพิ่มปริมาณตัวอย่างดีเอ็นเอจากคราบเลือดมนุษย์ ที่ตำแหน่งยีนไซโตโครม บี โดยมีขนาดความยาวของ PCR product ขนาดประมาณ 157 bp

ตัวอย่างลำดับที่	ผลการตรวจสอบ PCR product		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
1	+	+	ND
2	+	+	ND
3	+	+	ND
4	+	+	ND
5	+	+	ND
6	+	+	ND
7	+	+	ND
8	+	+	ND
9	+	+	ND
10	+	+	ND
11	+	+	ND
12	+	+	ND
13	+	+	ND
14	+	+	ND
15	+	+	ND
16	+	+	ND
17	+	+	ND
18	+	+	ND
19	+	+	ND
20	+	+	ND
21	+	+	ND
22	+	+	ND
23	+	+	ND
24	+	+	ND

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่างลำดับที่	ผลการตรวจสอบ PCR product		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
25	+	+	ND
26	+	+	ND
27	+	+	ND
28	+	+	ND
29	+	+	ND
30	+	+	ND
31	+	+	ND
32	+	+	ND
33	–	+	+
34	+	+	ND
35	+	+	ND
36	+	+	ND
37	–	+	+
38	+	+	ND
39	+	+	ND
40	+	+	ND
41	–	+	+
42	+	+	ND
43	+	+	ND
44	+	+	ND
45	+	+	ND

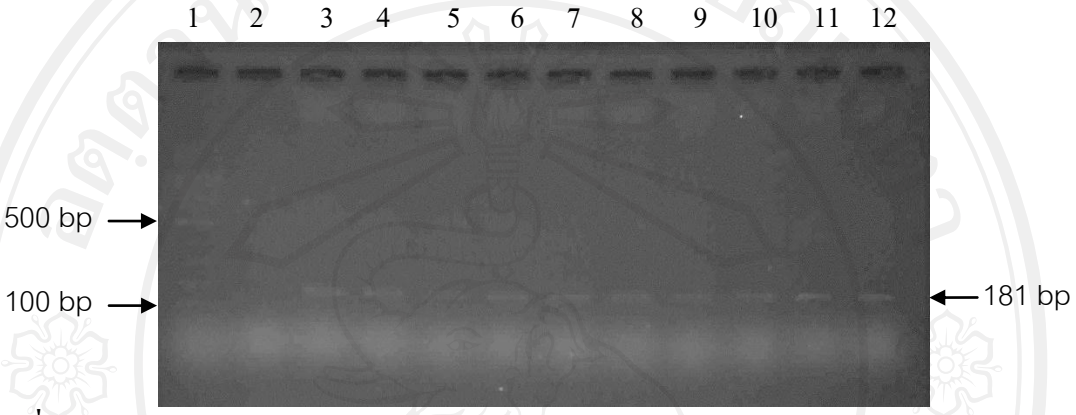
หมายเหตุ + คือ ตรวจพบแถบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 157 bp

– คือ ตรวจไม่พบแถบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 157 bp

ND คือ Not determine

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อนำไพรเมอร์ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีนไซโตโครม บี ของสัตว์ที่นำมาทำการทดสอบเปรียบเทียบในครั้งนี้ มาตรวจสอบกับตัวอย่างดีเอ็นเอของสัตว์แต่ละชนิด เพื่อเป็นการยืนยันการมีอยู่จริงของดีเอ็นเอสัตว์ ผลปรากฏว่าในตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากสัตว์นั้น มีดีเอ็นเออยู่จริง ดังแสดงในรูปที่ 9 ตัวอย่างของดีเอ็นเอจากไก่ และ รูปที่ 10 ตัวอย่างดีเอ็นเอจากหมู

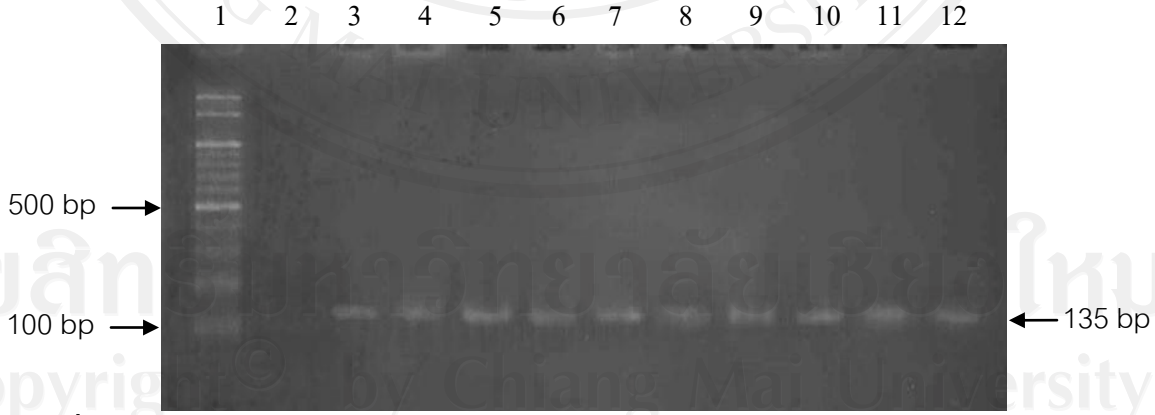


รูปที่ 9 แถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างดีเอ็นเอไก่ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน และ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากเลือดของมนุษย์

ช่องที่ 1 เป็น ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp ladder)

ช่องที่ 2 เป็น ตัวอย่างดีเอ็นเอจากเลือดของมนุษย์

ช่องที่ 3-12 เป็น ตัวอย่างดีเอ็นเอจากไก่



รูปที่ 10 แถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างดีเอ็นเอหมู เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน และ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากเลือดของมนุษย์

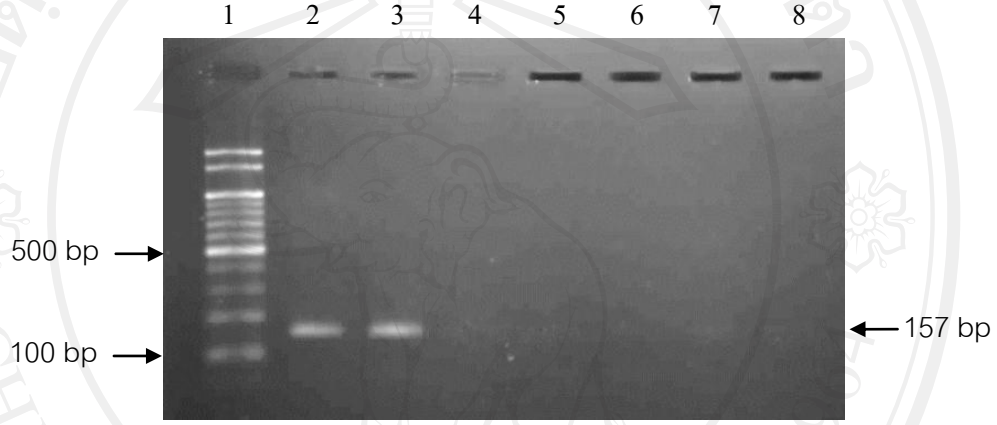
ช่องที่ 1 เป็น ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp ladder)

ช่องที่ 2 เป็น ตัวอย่างดีเอ็นเอจากเลือดของมนุษย์

ช่องที่ 3-12 เป็น ตัวอย่างดีเอ็นเอจากหมู

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อทำการทดสอบในตัวอย่างดีเอ็นเอจากสัตว์อื่น ซึ่งได้แก่ ไก่ สุนัข หมู และวัว ชนิดละ 25 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนไซโตโครม บี ของมนุษย์ และทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR แล้วตรวจสอบ PCR product แบบเดียวกัน เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน positive control ตัวอย่างดีเอ็นเอมนุษย์จากคราบเลือด และ negative control โดยทำการทดสอบซ้ำและแปลผล 2 ใน 3 ครั้งเช่นกัน พบว่ามีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาดประมาณ 157 bp ใน positive control และตัวอย่างดีเอ็นเอจากคราบเลือดมนุษย์เท่านั้น ส่วนในตัวอย่างดีเอ็นเอของสัตว์อื่นทั้งหมด กลับไม่พบแถบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอปรากฏ (ดังรูปที่ 11 และตารางที่ 2)



รูปที่ 11 แถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างคราบเลือดมนุษย์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน, positive control, ตัวอย่างดีเอ็นเอจากสัตว์ และ negative control

ช่องที่ 1 เป็น ดีเอ็นเอมาตรฐาน

ช่องที่ 2 เป็น positive control ที่ได้จากตัวอย่างเลือดสดของมนุษย์

ช่องที่ 3 เป็น ตัวอย่างดีเอ็นเอจากคราบเลือดมนุษย์

ช่องที่ 4-7 เป็น ตัวอย่างดีเอ็นเอของไก่ สุนัข หมู และวัว ตามลำดับ

ช่องที่ 8 เป็น negative control โดยใช้น้ำกลั่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2 ผลการตรวจสอบการเพิ่มปริมาณตัวอย่างดีเอ็นเอจากสัตว์อื่น ได้แก่ ไก่ สุนัข หมู และวัว ชนิดละ 25 ตัวอย่าง ที่ตำแหน่งยีนไซโตโครม บี

ตัวอย่างลำดับที่	ผลการตรวจสอบตัวอย่างดีเอ็นเอจากสัตว์											
	ไก่			สุนัข			หมู			วัว		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
1	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND
2	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND
3	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND
4	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND
5	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND
6	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND
7	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND
8	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND
9	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND
10	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND
11	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND
12	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND
13	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND
14	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND
15	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND
16	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND
17	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND
18	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND
19	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND
20	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND
21	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND
22	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ตัวอย่างลำดับที่	ผลการตรวจสอบตัวอย่างดีเอ็นเอจากสัตว์											
	ไก่			สุนัข			หมู			วัว		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
23	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND
24	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND
25	–	–	ND	–	–	ND	–	+	–	–	–	ND

หมายเหตุ + คือ ตรวจพบแถบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

– คือ ตรวจไม่พบแถบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ND คือ Not determine

จากการทำการตรวจสอบซ้ำ 3 ครั้ง และแปลผลจาก 2 ใน 3 ครั้ง ถือว่าผลการตรวจมีความน่าเชื่อถือเท่ากับ 100% และจากข้อมูลในตารางที่ 1 และตารางที่ 2 จะได้ผลการตรวจสอบเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีผลการตรวจสอบเป็นบวก เป็นกลุ่มที่ตรวจพบแถบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ขนาด 157 bp ได้แก่ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากคราบเลือดมนุษย์ จำนวน 45 ตัวอย่าง และกลุ่มที่มีผลการตรวจสอบเป็นลบ เป็นกลุ่มที่ตรวจไม่พบแถบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ได้แก่ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากสัตว์ 4 ชนิด คือ ไก่ สุนัข หมู และวัว ชนิดละ 25 ตัวอย่าง รวมเป็น 100 ตัวอย่าง และตัวอย่างดีเอ็นเอทั้งหมดในการตรวจสอบรวมเป็น 145 ตัวอย่าง (ดังตารางที่ 3)

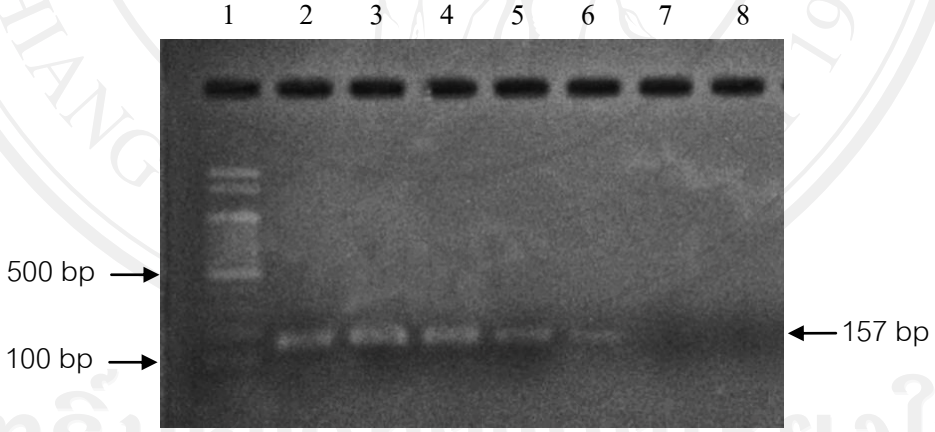
ตารางที่ 3 ผลการตรวจสอบตำแหน่งยีนไซโตโครม บี ในตัวอย่างดีเอ็นเอจากมนุษย์ และสัตว์

ผลการตรวจสอบ	ตัวอย่างดีเอ็นเอ					รวม
	มนุษย์	ไก่	สุนัข	หมู	วัว	
ผลบวก (+)	45	0	0	0	0	45
ผลลบ (–)	0	25	25	25	25	100
รวม	45	25	25	25	25	145

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

จากตารางที่ 3 เมื่อนำมาประเมินผลการตรวจวิเคราะห์ตำแหน่งยีนไซโตโครม บี ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอของมนุษย์ โดยค่าดัชนีที่ใช้ประเมิน ได้แก่ ค่าความไวของการตรวจสอบ และค่าความจำเพาะของการตรวจสอบ คิดเป็นค่าร้อยละได้เท่ากับ 100% เท่ากันทั้งหมด ซึ่งถือได้ว่ามีความถูกต้อง 100%

การศึกษาความไวของการตรวจวิเคราะห์ตำแหน่งยีนไซโตโครม บี ของมนุษย์ ในด้านปริมาณดีเอ็นเอที่มีอย่างน้อยที่สุดที่จะสามารถตรวจได้ โดยการนำดีเอ็นเอแม่แบบ ที่สกัดจากคราบเลือดมนุษย์ ทั้ง 45 ตัวอย่าง มาทำการเจือจางความเข้มข้นในลำดับส่วนดังนี้ 1:10, 1:100, 1:1000 และ 1:10000 แล้วนำสารละลายผสมดีเอ็นเอที่เจือจางในแต่ละลำดับส่วนมาดำเนินการทำปฏิกิริยา PCR แล้วนำ PCR product ที่ได้ไปตรวจดูผลโดยทำการแยกแถบดีเอ็นเอ เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน positive control ตัวอย่างดีเอ็นเอมนุษย์จากคราบเลือด และ negative control โดยทำการทดสอบซ้ำและแปลผล 2 ใน 3 ครั้งเช่นกัน พบว่ามีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาด 157 bp ใน positive control, สารละลายผสมดีเอ็นเอเจือจางในลำดับส่วน 1:10 , 1:100 และ 1:1000 ในขณะที่สารละลายผสมดีเอ็นเอที่เจือจางในลำดับส่วน 1:10000 ไม่พบแถบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอปรากฏ (ดังรูปที่ 12 ตารางที่ 4)



รูปที่ 12 แถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างคราบเลือดมนุษย์ ที่ถูกเจือจางความเข้มข้น เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน, positive control และ negative control

ช่องที่ 1 เป็น ดีเอ็นเอมาตรฐาน

ช่องที่ 2 เป็น positive control ที่ได้จากตัวอย่างเลือดสดของมนุษย์

ช่องที่ 3-7 เป็น ตัวอย่างดีเอ็นเอจากคราบเลือดมนุษย์ ถูกเจือจางความเข้มข้นในลำดับส่วน 1:1 1:10 1:100 1:1000 และ 1:10000 ตามลำดับ

ช่องที่ 8 เป็น negative control โดยใช้น้ำกลั่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4 ผลการตรวจสอบการเพิ่มปริมาณตัวอย่างดีเอ็นเอจากคราบเลือดมนุษย์ ที่ถูกเจือจางความเข้มข้นในลำดับส่วน 1:10 , 1:100 , 1:1000 และ 1:10000 ตามลำดับ

ตัวอย่างลำดับที่	ผลการตรวจสอบ PCR product											
	1:10			1:100			1:1000			1:10000		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
1	+	+	ND	+	+	ND	+	+	ND	+	–	–
2	+	+	ND	+	+	ND	+	+	ND	–	–	ND
3	+	+	ND	+	+	ND	+	+	ND	–	–	ND
4	+	+	ND	+	+	ND	+	+	ND	–	–	ND
5	+	+	ND	+	+	ND	+	+	ND	–	–	ND
6	+	+	ND	+	+	ND	–	+	+	–	–	ND
7	+	+	ND	+	+	ND	+	+	ND	–	–	ND
8	+	+	ND	+	+	ND	+	+	ND	–	–	ND
9	+	+	ND	+	+	ND	+	–	+	–	–	ND
10	+	+	ND	+	+	ND	+	+	ND	–	–	ND
11	+	+	ND	+	+	ND	+	+	ND	–	–	ND
12	+	+	ND	+	+	ND	+	+	ND	–	–	ND
13	+	+	ND	+	+	ND	+	+	ND	–	–	ND
14	+	+	ND	+	+	ND	+	+	ND	–	–	ND
15	+	+	ND	+	+	ND	+	+	ND	–	–	ND
16	+	+	ND	+	+	ND	+	+	ND	–	–	ND
17	+	+	ND	+	+	ND	+	+	ND	–	–	ND
18	+	+	ND	+	+	ND	+	+	ND	–	–	ND
19	+	+	ND	+	+	ND	+	–	+	–	–	ND
20	+	+	ND	+	+	ND	+	+	ND	–	–	ND
21	+	+	ND	+	+	ND	+	+	ND	–	–	ND
22	+	+	ND	+	+	ND	+	+	ND	–	–	ND
23	+	+	ND	+	+	ND	+	+	ND	–	–	ND

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ตัวอย่างลำดับที่	ผลการตรวจสอบ PCR product											
	1:10			1:100			1:1000			1:10000		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
24	+	+	ND	+	+	ND	+	+	ND	–	–	ND
25	+	+	ND	+	+	ND	+	+	ND	–	–	ND
26	+	+	ND	+	+	ND	+	+	ND	–	–	ND
27	+	+	ND	+	+	ND	–	+	+	–	–	ND
28	+	+	ND	+	+	ND	+	+	ND	–	–	ND
29	+	+	ND	+	+	ND	+	+	ND	–	–	ND
30	+	+	ND	+	+	ND	+	+	ND	–	–	ND
31	+	+	ND	+	+	ND	+	+	ND	–	–	ND
32	+	+	ND	+	+	ND	+	+	ND	–	–	ND
33	+	+	ND	+	+	ND	–	–	–	–	–	ND
34	+	+	ND	+	+	ND	–	+	+	–	–	ND
35	+	+	ND	+	+	ND	+	+	ND	–	–	ND
36	+	+	ND	+	+	ND	+	+	ND	–	–	ND
37	+	+	ND	+	+	ND	+	+	ND	–	–	ND
38	+	+	ND	+	+	ND	+	+	ND	–	–	ND
39	+	+	ND	+	+	ND	+	+	ND	–	–	ND
40	+	+	ND	+	+	ND	+	+	ND	–	–	ND
41	+	+	ND	+	+	ND	+	+	ND	–	–	ND
42	+	+	ND	+	+	ND	+	+	ND	–	–	ND
43	+	+	ND	+	+	ND	+	+	ND	–	–	ND
44	+	+	ND	+	+	ND	+	+	ND	–	–	ND
45	+	+	ND	+	+	ND	+	+	ND	–	–	ND

หมายเหตุ + คือ ตรวจพบแถบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 157 bp

– คือ ตรวจไม่พบแถบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 157 bp

ND คือ Not determine

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากผลการศึกษาพบว่าสามารถที่จะตรวจวิเคราะห์เพื่อระบุดีเอ็นเอของมนุษย์ด้วยตำแหน่งยีนไซโตโครม บี ในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอได้ในระดับที่ปริมาณดีเอ็นเอถูกเจือจางลงไป 10 เท่า (1:10) และ 100 เท่า (1:1000) ได้ทั้งหมด ส่วนในสารละลายผสมดีเอ็นเอที่เจือจางลงไป 1000 เท่า (1:1000) พบแถบดีเอ็นเอปรากฏ 44 ตัวอย่าง จากจำนวนทั้งหมด 45 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 97.78 (ดังตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 สรุปผลการการตรวจสอบการเพิ่มปริมาณตัวอย่างดีเอ็นเอจากคราบเลือดมนุษย์ที่ถูกเจือจาง ความเข้มข้นในลำดับส่วน 1:10 , 1:100 , 1:1000 และ 1:10000 ตามลำดับ

ผลการตรวจสอบ	ความเข้มข้นสารละลายผสมดีเอ็นเอ			
	1:10	1:100	1:1000	1:10000
ผลบวก (+)	45	45	44	0
ผลลบ (–)	0	0	1	0
รวม	45	45	45	0

เนื่องจากการทดลองนี้เมื่อนำน้ำสกัดดีเอ็นเอไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาว 260 nm เพื่อคำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นก่อนทำการเจือจางในแต่ละลำดับส่วน ผลปรากฏว่าปริมาณดีเอ็นเอที่วัดได้ไม่มีความบริสุทธิ์ กล่าวคือมีปริมาณโปรตีนและ RNA เจือปนจำนวนมาก ปริมาณที่วัดได้จึงไม่ใช่ปริมาณของดีเอ็นเอที่แท้จริง ผู้ศึกษาจึงได้ใช้การเทียบค่าปริมาณ hemoglobin พบว่าสารละลายผสมดีเอ็นเอเจือจาง 1000 เท่า มีปริมาณ hemoglobin น้อยสุดอยู่ที่ประมาณ 3 ng/ml (ดังตารางที่ 6 ในภาคผนวก ข) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับค่า sensitivity ของชุดตรวจเลือด (HemDirect Hemoglobin Assay) ที่ระบุไว้เป็น 40 ng/ml นั้น ถือได้ว่าการตรวจระบุคราบเลือดมนุษย์ด้วยตำแหน่งยีนไซโตโครม บี มี sensitivity ที่สูงกว่า

จากผลการศึกษาที่ได้กล่าวมาทั้งหมด ในการศึกษาตำแหน่งยีนไซโตโครม บี ที่มีความจำเพาะและความไวต่อการตรวจระบุดีเอ็นเอที่มีแหล่งที่มาจากมนุษย์ ด้วยวิธีการ PCR และ electrophoresis สามารถกระทำได้อย่างรวดเร็วทำให้สามารถระบุผลภายในเวลา 3-4 ชั่วโมง รวมทั้งเป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการตรวจสอบดีเอ็นเอในด้านอื่นๆ ด้วย เป็นต้น เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำ PCR และ electrophoresis นั้นง่ายต่อการใช้งาน องค์ประกอบหนึ่งที่มีส่วนสำคัญในการศึกษาการตรวจวิเคราะห์โดยวิธีการนี้ คือ สภาวะของสารเคมี สารละลายผสม และการผสมสารเคมีแต่ละชนิด รวมทั้งไพรเมอร์ที่ใช้นั้นจะต้องมีความเหมาะสม สามารถทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในระดับที่มีความไวสูงสุดและในขณะเดียวกันต้องมีความจำเพาะต่อตำแหน่งยีน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไซโตโครม บี ของมนุษย์ด้วย ซึ่งจะเป็นส่วนช่วยกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่จะเกิดขึ้นในปฏิกิริยา PCR และให้ผลการตรวจที่แม่นยำ อย่างไรก็ตามในการตรวจสอบกับตัวอย่างดีเอ็นเอจากคราบเลือดมนุษย์และจากสัตว์ ยังพบมีผลลบปลอม (False negative) และผลบวกปลอม (False positive) อยู่บ้าง อาจเนื่องมาจากทักษะและการปนเปื้อนของตัวผู้ปฏิบัติการเอง เช่น การสกัดแยกดีเอ็นเอ สิ่งปนเปื้อนจากห้องปฏิบัติการ ผม ผิวหนังของผู้ทดลองที่อาจตกหล่นขณะเปิด-ปิดฝาหลอดทดลอง เป็นต้น ซึ่งจะต้องมีความระมัดระวังอย่างมากและต้องทำการตรวจสอบซ้ำอีกแล้วนับผลจาก 2 ใน 3 ครั้ง

นอกจากนี้ในการวัด sensitivity ของการตรวจนั้น เนื่องมาจากวิธีการสกัดเป็นการสกัดแบบโดยรวม นอกจากดีเอ็นเอที่ได้แล้ว ยังมีสารชีวโมเลกุลอื่นๆ ในเซลล์ ถูกสกัดออกมาด้วย ดังนั้นการวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาว 260 nm. เพื่อคำนวณปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นของตัวอย่างดีเอ็นเอจากคราบเลือด ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จึงมีความเข้มข้นลดลงและมีการเจือปนของโปรตีนและ RNA อยู่ด้วย ซึ่งอาจมีผลไปรบกวนการดำเนินของปฏิกิริยา PCR ได้อีกทางหนึ่ง แต่อย่างไรก็ตาม sensitivity ในปริมาณที่ถูกเจือจางลงไป 1000 เท่า ก็เพียงพอที่จะสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอในระดับความเข้มข้นที่ต่ำได้ผลดี แต่ทั้งนี้ควรมีการพัฒนาปรับปรุงในด้านวิธีการสกัดดีเอ็นเอให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น และอาจต้องใช้การตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย polyacrylamide gel electrophoresis เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการแยกของแถบดีเอ็นเอให้มีความละเอียดชัดเจนยิ่งขึ้น อีกทั้งควรหากเป็นตัวอย่างที่มาจากเลือดควรมีการทำการทดสอบเปรียบเทียบจริงกับชุดตรวจฮีโมโกลบินในเลือด หรือทำการวิเคราะห์ทั้งด้านคุณภาพและปริมาณด้วยเทคนิค Quantitative Realtime PCR ปริมาณที่แน่นอนที่ทำการวิเคราะห์ได้จะช่วยเพิ่มระดับความเชื่อมั่นของวิธีการตรวจ

การใช้ตำแหน่งยีนไซโตโครม บี ในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ เพื่อระบุว่าเป็นดีเอ็นเอที่มีแหล่งที่มาจากมนุษย์หรือสัตว์ สามารถที่จะนำไปใช้ทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ ในหลายคดี เช่นกรณีการเฉี่ยวชนคน การฆาตรกรรม การทำร้ายร่างกาย เป็นต้น ซึ่งอาจมีการกล่าวอ้างการกระทำผิดว่าคราบต้องสงสัยที่พบเป็นคราบเลือดที่มาจากสัตว์ไม่ใช่มนุษย์ และได้ถูกทิ้งไว้นาน หรือมีการทำความสะอาดไปแล้ว ไม่สามารถตรวจเบื้องต้นทางเคมีได้ หรือปริมาณดีเอ็นเอในนิวเคลียสมีน้อยเสื่อมสลายไป เนื่องจากสภาวะแวดล้อม อุณหภูมิ ความชื้น รวมถึงสารเคมี เป็นต้น ทำไม่สามารถตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอในนิวเคลียสได้ จึงอาจใช้ตรวจพิสูจน์ยีนไซโตโครม บี ในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอแทนได้ หรือบางครั้งชีววัตถุพยานอื่นๆ ที่ได้มาอาจไม่ได้อยู่ในสภาพที่บอกได้ทันทีถึงแหล่งที่มาด้วยลักษณะทางกายภาพ เช่น เศษชิ้นเนื้อ หรือส่วนของกระดูกต้องสงสัย เมื่อนำไปตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอจากนิวเคลียสไม่ประสบผลสำเร็จเนื่องจากดีเอ็นเอในนิวเคลียสเสื่อมสลายไปแล้ว แต่ยังพอมีดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรียเหลืออยู่ การตรวจพิสูจน์ด้วยดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรียที่ตำแหน่ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ยีนไซโตโครม บี อาจเป็นวิธีการหนึ่งที่ช่วยเพิ่มหรือยืนยันผลการระบุแหล่งที่มาของเศษชิ้นเนื้อหรือส่วนของกระดูกต้องสงสัยนั้นได้อีกทางหนึ่ง รวมไปถึงชีววัตถุพยานที่ต้องสงสัยอื่นๆ อย่างเช่น เส้นผมเส้นขน ซึ่งผลที่ได้เบื้องต้นหากพบว่าเป็นวัตถุพยานที่มาจากส่วนหนึ่งส่วนใดของมนุษย์แล้ว อาจนำไปสู่การสืบสวนสอบสวนในขอบเขตที่แคบลงได้ ถือเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการตรวจระบุชีววัตถุพยานต้องสงสัย และการให้ความสำคัญกับวัตถุพยานนั้นๆ ในคดี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved