บทที่ 4

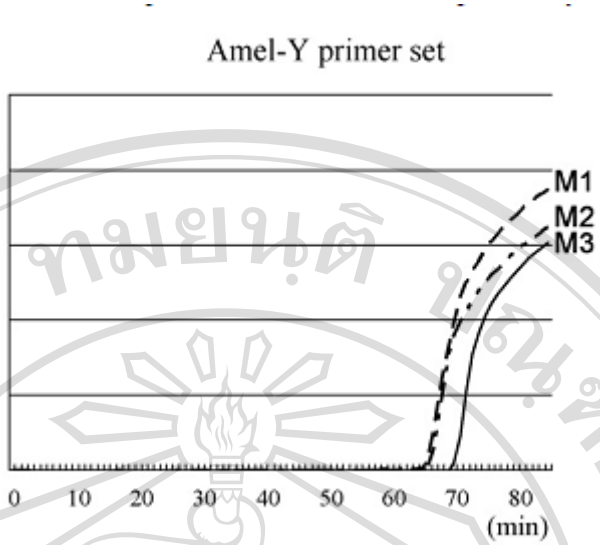
อภิปรายผลการวิจัย

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อการศึกษาประสิทธิภาพ ของเทคนิค Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) มาทำการทดสอบตรวจหายีน Amelogenin Y จากตัวอย่างรากฟัน จำนวน 20 ตัวอย่าง แบ่งเป็นสองกลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วย ฟันเพศชาย 5 ตัวอย่าง และเพศหญิง 5 ตัวอย่าง โดยกลุ่มแรกถูกเผาด้วยเตาถ่านเป็นระยะเวลา 30 นาที ส่วนกลุ่มที่สองถูกเผาด้วยเตาแก๊สเป็นระยะเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำตัวอย่างฟันไปสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Phenol chloroform extraction จากนั้นเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ตำแหน่ง Amelogenin Y ด้วยเทคนิค LAMP และดูผลการทดสอบด้วยอะคริลามายด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

ฟันที่เผาด้วยเตาถ่านไม้คาดว่าจะอยู่ในช่วงอุณหภูมิ < 400 องศาเซลเซียส (กรมควบคุมมลพิษ, 2552) ส่วนฟันที่เผาด้วยเตาแก๊สจะได้รับความร้อนที่สูงมากกว่าถ่านไม้อยู่ที่ประมาณ 400 องศาเซลเซียส ขึ้นไปจนถึงระดับ 1500 องศาเซลเซียส (กรมธุรกิจพลังงาน, 2551)

จากการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ตำแหน่ง Amelogenin Y คือ แช่อบที่ 63 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยา (Inactivate) ที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เนื่องจากเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ตำแหน่ง Amelogenin Y จากตัวอย่างฟันนั้นสามารถเพิ่มได้ดีที่เวลา 65-75 นาที (Nogami et al., 2008) จึงใช้เวลา 90 นาที เพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมให้มากพอที่สามารถตรวจสอบได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 12 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในส่วนของยีน Amelogenin Y ของเทคนิคแลมป์จากตัวอย่างฟัน (Nogami *et al*., 2008)

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิคแลมป์ พบว่าตัวอย่างน้ำสกัดดีเอ็นเอเพศชาย 10 ตัวอย่าง เมื่อทดสอบแล้วได้ผลบวก (Positive) 8 ตัวอย่าง โดยให้ผลแบบ smear ซึ่งผู้ศึกษาได้ตั้งสมมติฐานว่า อาจเกิดจากการที่มีปริมาณของดีเอ็นเอน้อยเกินไป และจากการศึกษาพบว่าตัวอย่างที่เป็นผลบวก ก็สามารถให้ผลที่เป็น smear ได้เช่นกัน เนื่องจากข้อสมมติฐานดังกล่าวตรงกับงานวิจัยของ Zhang *et al.* โดยเมื่อทำการศึกษาแล้วพบว่า การที่ผลิตผลของเทคนิคแลมป์ไม่เพียงพออาจทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะ หรือการให้ผลแบบ smear ขึ้นมาได้ (Zhang *et al.*, 2009) ซึ่งวิธีแก้ไขนั้นสามารถทำได้โดยการใช้ loop primer ซึ่งจากการทดลองศึกษาของ Nagamine *et al.* พบว่า การใช้ loop primer สามารถช่วยลดอัตราการเกิดแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะ หรือการเกิดผลแบบ smear ได้ (Nagamine *et al*., 2002)

สำหรับตัวอย่างดีเอ็นเอเพศชายที่ให้ผลลบมีโอกาสเกิดได้จากสามกรณีด้วยกัน คือ กรณีแรกสามารถเกิดได้จาก ปริมาณดีเอ็นเอที่อยู่ในฟันที่นำมาใช้เป็นตัวอย่างมีน้อยอยู่แล้วซึ่งโครงสร้างและปริมาณสารเคมี รวมไปถึงปริมาณดีเอ็นเอที่อยู่ในฟันของมนุษย์แต่ละคนมีมากน้อยไม่เท่ากัน (Alvares *et al*., 1996) กรณีที่สอง อาจเกิดจากปริมาณสารดีเอ็นเอนั้นถูกทำลายไปมากเกินกว่าที่จะสามารถทำการตรวจวัด หรือถูกทำลายไปจนหมดจากความร้อนสูง โดยพบว่า ตัวอย่างที่เผาด้วยเตาถ่านสามารถตรวจปริมาณสารพันธุกรรมที่ตำแหน่ง Amelogenin Y ได้ทั้งห้าตัวอย่าง แต่ตัวอย่างฟันที่ถูกเผาโดยเตาแก๊สสามารถตรวจพบได้สามตัวอย่าง และการที่ตัวอย่างฟันนั้นถูกเผาที่อุณหภูมิสูงเกินไปนั้น ทำให้ดีเอ็นเอถูกทำลายไปมากจนไม่สามารถตรวจพบได้ (Williams *et al*., 2004) และกรณีที่สามเกิดได้จากความสามารถในการสกัดสารดีเอ็นเอจากตัวอย่าง รวมไปถึงความ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บริสุทธิ์ของตัวอย่างฟันที่ถูกเผา โดยงานวิจัยของ Deguo *et al.* ได้กล่าวว่า วิธีการสกัดมีผลต่อการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเทคนิคแลมป์ เนื่องจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคแลมป์จะมีประสิทธิภาพก็ต่อเมื่อใช้ดีเอ็นเอแม่แบบที่มีความบริสุทธิ์สูง และ Deguo ได้อธิบายว่าตัวรบกวนซึ่งอาจจะเป็น สารอินทรีย์(Organic) หรือ สารอนินทรีย์(Inorganic substance) เช่น สารลดแรงตึงผิว(Detergents), ยาปฏิชีวนะ(Antibiotics), สารประกอบฟีนอล(Phenolic compounds), เอนไซม์(Enzymes), กลุ่มแป้งหรือเซลลูโลส(Polysaccharides), ไขมัน(Fats), โปรตีน(Proteins) และ เกลือ(Salts) ซึ่งอาจไปยับยั้งปฏิกิริยาของเทคนิคแลมป์ได้ รวมถึงไปมีผลโดยอ้อมต่อการทำงานของไพรเมอร์ (Deguo *et al.*, 2008)

โดยในการทดลองนั้นเริ่มแรกได้ทำการตรวจดูในเจล Agarose แต่ปรากฏว่าแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างไม่ชัดเจน บางตัวอย่างไม่สามารถมองเห็นได้ในเจล Agarose ดังนั้นจึงทำการตรวจผลโดยใช้เจล Acrylamide ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวมากกว่าเจล Agarose

เมื่อเปรียบเทียบงานวิจัยชิ้นนี้ที่ใช้เทคนิคแลมป์เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจากฟันที่ถูกเผากับการทดลองของ Williams *et al*. ซึ่งใช้เทคนิค PCR ในการตรวจสอบระบุเพศจากฟันที่ถูกเผา พบว่าเมื่อใช้ Primer Amel จะไม่สามารถตรวจระบุเพศได้ แต่ถ้าใช้ Primer SUL I/II พบว่าสามารถตรวจสอบเพศได้ถูกต้องเมื่อฟันถูกเผาที่อุณหภูมิไม่เกิน 200 องศาเซลเซียสเท่านั้น โดยตัวอย่างฟันเพศชายที่ถูกเผาที่อุณหภูมิต่ำว่า 400 องศาเซลเซียส สามารถตรวจระบุเพศได้ 15 ตัวอย่าง จาก 38 ตัวอย่างหรือคิดเป็น 39.5% ซึ่งได้ผลต่างจากงานวิจัยชิ้นนี้ที่สามารถตรวจระบุเพศชายจากฟันที่ถูกเผาด้วยเตาถ่าน (อุณหภูมิ < 400 องศาเซลเซียส)ได้ถูกต้อง 100% อีกทั้งยังสามารถตรวจสอบระบุเพศชายจากตัวอย่างฟันที่ถูกเผาด้วยเตาแก๊ส(อุณหภูมิระหว่าง 400-1,500 องศาเซลเซียส) ได้ 3 ตัวอย่างจาก 5 ตัวอย่างหรือคิดเป็น 60% ซึ่งการทดลองของ Williams *et al*. ไม่สามารถตรวจสอบระบุเพศชายได้

จากการคำนวณค่า Performance Characteristics ของการทดสอบเทคนิคพบว่า Sensitivity ของการทดสอบเท่ากับ 80 % แสดงให้เห็นว่าเทคนิคแลมป์นั้นมีความไวค่อนข้างสูง, Specificity ของการทดสอบเท่ากับ 100% โดย Specificity จะมากหรือน้อยนั้น ขึ้นกับประสิทธิภาพของไพรเมอร์ขึ้นอยู่กับว่ามีการออกแบบไพรเมอร์ได้จำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายได้มากน้อยเพียงใด, False negative rate ของการทดสอบเท่ากับ 20% เป็นค่าที่แสดงถึงโอกาสที่จะเกิดกรณีที่ตัวอย่างผลบวก (Positive) จะให้ผลเป็นผลลบ (Negative) นั้นมีค่าที่ค่อนข้างน้อย ซึ่งค่าที่ได้นั้นขึ้นกับปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่าง และวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างดังกล่าวมาแล้ว False positive rate ของการทดสอบเท่ากับ 0% ซึ่งเห็นได้ว่า ไม่มีโอกาสที่จะพบกรณีที่ตัวอย่างผลลบ (Negative) จะให้ผลเป็นผลบวก (Positive) เลยนั่นเอง, Predictive value positive ของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดสอบเท่ากับ 100% แสดงให้เห็นว่า โอกาสที่การตรวจที่เป็นผลบวก (Positive) จะเป็นตัวอย่างที่เป็นผลบวก (Positive) จริง อยู่ถึง 100% แสดงให้เห็นถึงความถูกต้องในการตรวจหา Amelogenin Y ได้เป็นอย่างดี และ Predictive value negative ของการทดสอบเท่ากับ 83% แสดงให้เห็นว่า โอกาสที่การตรวจที่เป็นผลลบ (Negative) จะเป็นตัวอย่างที่เป็นผลลบ (Negative) จริง อยู่ที่ 83 ราย จาก 100 ราย นอกจากนี้เมื่อทำการทดสอบสมมติฐานด้วยไคสแควร์แล้วพบว่า ค่าไคสแควร์ที่คำนวณได้เท่ากับ 13.34 ซึ่งมากกว่าค่าไคสแควร์ที่เปิดได้จากตาราง แสดงว่าเทคนิคแลมป์สามารถตรวจปริมาณสารพันธุกรรมที่ตำแหน่ง Amelogenin Y ในเพศชาย และเพศหญิงได้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นว่า เทคนิคแลมป์มีประสิทธิภาพในการตรวจระบุแยกเพศชายออกจากเพศหญิง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved