บทที่ 1

บทนำ วัตถุประสงค์ และทบทวนเอกสาร

บทนำ หลักการ ทฤษฎี เหตุผล และสมมติฐาน

ปัจจุบันเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ได้เข้ามามีบทบาทในการทำประโยชน์กับงานหลายๆ ด้าน อาทิเช่น ด้านการแพทย์เพื่อการวินิจฉัยโรค อุตสาหกรรม และสิ่งแวดล้อมเพื่อการผลิตเกษตรกรรมเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ รวมไปถึงการตรวจดีเอ็นเอทางนิติวิทยาศาสตร์ เรามักจะคุ้นเคยกับคำว่า ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ซึ่งเป็นสิ่งที่ใช้บ่งบอกลักษณะจำเพาะของแต่ละบุคคล พัฒนาขึ้นใช้ครั้งแรกโดย ศาสตราจารย์ Alec Jeffreys ในปี ค.ศ. 1985 และพบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอจะเป็นเอกลักษณ์ของแต่ละบุคคล โอกาสที่คนสองคนจะมีดีเอ็นเอเหมือนกันมีค่าเท่ากับ 1 ใน 9,340 ล้าน ซึ่งมีค่าสูงกว่าจำนวนประชากรในโลกนี้ (สุรินทร์, 2548) งานนิติวิทยาศาสตร์นำลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาใช้ประโยชน์ในการตรวจหาความสัมพันธ์ของบุคคลว่าเป็นพ่อ แม่ ลูกกันจริงหรือไม่ อีกทั้งยังช่วยในการหาตัวผู้กระทำความผิดจากวัตถุพยานทางชีวภาพที่คนร้ายได้ทิ้งเอาไว้ในที่เกิดเหตุ และเรามักจะพบว่าวัตถุพยานชีวภาพที่คนร้ายได้ทิ้งไว้ในที่เกิดเหตุนั้นมีปริมาณที่น้อยมากซึ่งอาจทำให้ยากต่อการตรวจพิสูจน์ ด้วยเหตุนี้ จึงมีการนำเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์เข้ามาช่วยเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจำเพาะส่วนก่อนโดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) พัฒนาขึ้นในปี ค.ศ. 1986 โดย Kary Mullis สามารถเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอเฉพาะส่วนที่ต้องการ เป็นจำนวนมาก ภายในระยะเวลาอันสั้นในหลอดแก้ว (in vitro) (หัทยา, 2549) ทำให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจำนวนมากเพื่อง่ายต่อการตรวจสอบ ในปี ค.ศ. 2000 Notomi *et al.* ได้พัฒนาเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบใหม่ ชื่อว่า Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP)

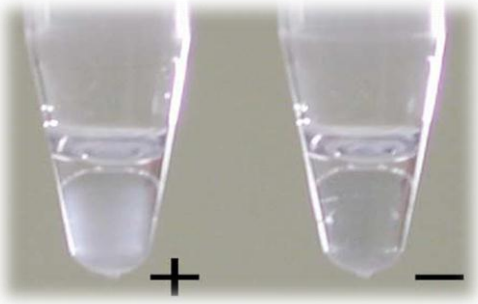
เทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) ได้ถูกทำการวิจัยแล้วว่าเป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ดีกว่าเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ทั้งในด้านของความมีประสิทธิภาพสูง (efficiency) ความไว (sensitivity) ความแม่นยำ (precision) ความจำเพาะ (specificity) และความประหยัด (cheapness) (Eiken GENOME SITE, 2005) ด้วยคุณสมบัติต่างๆ ดังที่ได้กล่าวมาของเทคนิคนี้ทำให้ผู้วิจัยเกิดความสนใจที่จะนำเทคนิคนี้มาพัฒนาต่อยอดในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์

ในปัจจุบันเทคนิคแลมป์ (LAMP)ได้ถูกนำไปใช้อย่างกว้างขวางในงานทางด้านการแพทย์ เพื่อช่วยในการวินิจฉัยโรคที่เกิดจาก แบคทีเรีย ไวรัส และปรสิต โดยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อที่สงสัยเพื่อตรวจวินิจฉัย และหาแนวทางรักษาได้ทันท่วงที แต่การนำมาใช้ทางนิติวิทยาศาสตร์ และการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของมนุษย์ด้วยเทคนิคแลมป์นั้นยังมีน้อยมาก ดังนั้นจึงเป็นการสมควรอย่างยิ่งที่จะต้องทำการวิจัยเพื่อที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ ซึ่งจะส่งผลดีให้กับหน่วยงานด้านความยุติธรรม ในเรื่องของความรวดเร็ว และลดความยุ่งยากในการตรวจพิสูจน์ รวมไปถึงการประหยัดงบประมาณของรัฐได้อย่างมหาศาล

Visual Detection (EIKEN, 2005)
ภาพ 1 การเรืองแสงที่เกิดจากการใช้สารฟลูออเรสเซนต์

ความแตกต่างของเทคนิคแลมป์กับเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) มีอยู่หลายอย่างด้วยกันเทคนิคแลมป์ใช้อุณหภูมิเดียวตลอดทั้งปฏิกิริยา (isothermal) ส่วนพีซีอาร์นั้นต้องใช้อุณหภูมิหลากหลายในหนึ่งรอบของปฏิกิริยา (thermal cycler) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เทคนิคแลมป์มีความยุ่งยากน้อยกว่า เพราะเพียงแค่ใช้เครื่องแช่อบ (incubator) ก็สามารถทำได้แล้ว ในขณะที่เทคนิคพีซีอาร์ต้องใช้เครื่องมือสำหรับพีซีอาร์ที่มีราคาแพงกว่า และมีขั้นตอนการตั้งค่าเครื่องมือที่ยุ่งยากมากกว่า นอกจากนี้การที่เทคนิคแลมป์ใช้ไพรเมอร์ (primer) ถึงสี่ตัวที่จำเพาะกับตำแหน่งจดจำบนยีนที่สนใจทำให้เทคนิคแลมป์มีความจำเพาะมากกว่าเทคนิคพีซีอาร์ที่ใช้ไพรเมอร์เพียงแค่สองตัว (Moradi *et al*., 2008) ในส่วนของเอนไซม์พอลิเมอเรสเทคนิคแลมป์ใช้ *Bst*. DNA polymerase ซึ่งมีคุณสมบัติแยกดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยวได้ (strand displacement) ซึ่ง *Tag* polymerase ที่ใช้ในเทคนิคพีซีอาร์นั้นไม่มีคุณสมบัตินี้ ในด้านของกลไกการสังเคราะห์เทคนิคแลมป์จะใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่มีลักษณะคล้ายดัมเบล (dumbbell-shaped DNA structures) เป็นดีเอ็นเอตั้งต้นในการสังเคราะห์ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นการทำงานร่วมกันระหว่างเอนไซม์ *Bst*. polymerase และไพรเมอร์ที่มีลักษณะเฉพาะตัว นอกจากนี้ผลผลิตของเทคนิคแลมป์ที่นำไปทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) จะพบเป็นแถบขั้นบันได (ladder)

เนื่องจากว่าผลิตภัณฑ์ของเทคนิคแลมป์มีหลากหลายขนาดแตกต่างกัน (จิตรลัดดา และคณะ, 2554) สำหรับระยะเวลาในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ในหนึ่งรอบของปฏิกิริยา เทคนิคแลมป์สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ 10^9 ซ้ำ (copies) โดยใช้เวลาน้อยกว่าหนึ่งชั่วโมง ซึ่งเทคนิคพีซีอาร์ใช้ระยะเวลาในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่มากกว่านั้น (Notomi *et al*., 2000) ข้อดีของเทคนิคแลมป์อีกประการหนึ่งคือ สามารถดูผลของการตรวจวัดได้ด้วยตาเปล่า (visual detection) ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาของแมกนีเซียม ไพโรฟอสเฟต (magnesium pyrophosphate) ที่เกิดจากการรวมกันของฟอสเฟตไอออน (pyrophosphate ion) จาก dNTPs กับแมกนีเซียมไอออน (magnesium ion) จากบัฟเฟอร์ของเอนไซม์ *Bst*. DNA polymerase (Buates, 2009) ลักษณะของความขุ่นที่เกิดขึ้นแสดงได้ดังภาพ 2 นอกจากการดูความขุ่นด้วยตาเปล่าแล้วเทคนิคแลมป์ยังสามารถดูผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้สารฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence) ทำให้เกิดการเรืองแสงในหลอดทดลองที่มีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อีกด้วย การเรืองแสงแสดงไว้ดังภาพ 1



(Hirayama *et al*., 2004)

ภาพ 2 ลักษณะความขุ่นที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

จากหลักการดังกล่าวจึงเป็นที่มาของการทำงานวิจัยนี้ เพื่อพัฒนาต่อยอดเทคนิคใหม่สำหรับใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์ เป็นประโยชน์ในการประหยัดเวลา และงบประมาณ รวมถึงทราบประสิทธิภาพ และความไวของเทคนิคที่สามารถใช้กับสิ่งส่งตรวจที่มาจากมนุษย์ ในที่นี้ก็คือเลือด โดยมุ่งเน้นความสนใจไปที่ยีน Amelogenin ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาเคลือบฟัน (enamel) มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม X และ Y ที่ตำแหน่ง p22 ซึ่งเป็นโครโมโซมเพศ (Sasaki *et al*., 1995) และนี่จึงเป็นเหตุผลที่เลือกใช้ยีน Amelogenin เพื่อการศึกษาเกี่ยวกับการระบุเพศของมนุษย์ ด้วยการใช้เทคนิคแลมป์ตรวจวัดหายีน Amelogenin Y ซึ่งมีในเพศชาย จึงเป็นวิธีการที่จะสามารถแยกแยะสารพันธุกรรมว่าเป็นของเพศชายหรือไม่

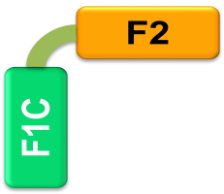
กลไกการทำงานของเทคนิคแลมป์

ปฏิกิริยาของเทคนิคแลมป์จะเกิดขึ้นได้ต้องมีส่วนประกอบที่สำคัญต่างๆ อันได้แก่ น้ำ (H_2O), 10X buffer, betaine, dNTPs, primer mix, *Bst*. DNA polymerase และดีเอ็นเอแม่แบบ (template) ซึ่งในบรรดาส่วนประกอบเหล่านี้สารที่มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดกลไกการทำปฏิกิริยาของเทคนิคแลมป์ก็คือ primer mix และ *Bst*. DNA polymerase

Bst. DNA polymerase เป็นดีเอ็นเอพอลิเมอเรสชนิดหนึ่งซึ่งได้มาจากแบคทีเรียที่ชื่อว่า *Bacillus stearothermophilus* ซึ่งหน้าที่การทำงานก็คล้ายๆ กับ *Taq* DNA polymerase แต่ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสทั้งสองชนิดนี้มีความแตกต่างกันที่คุณสมบัติจำเพาะตัวของมัน กล่าวคือ *Taq* DNA polymerase สามารถทำงานได้ในช่วงอุณหภูมิที่สูงจึงเหมาะกับปฏิกิริยาของเทคนิคพีซีอาร์ที่เป็นแบบวัฏจักร (thermal cycler) แต่ *Bst*. DNA polymerase เหมาะที่จะทำงานในช่วงอุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียสจึงเหมาะกับปฏิกิริยาของเทคนิคแลมป์ที่ใช้อุณหภูมิเดียว (isothermal) อีกทั้งยังมีคุณสมบัติที่เรียกว่า stand displacement ซึ่งเป็นคุณสมบัติของการแยกดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวโดยไม่ต้องอาศัยขั้นตอนการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อแยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturation)หน้าที่ของ *Bst*. DNA polymerase ในปฏิกิริยาแลมป์ก็คือเป็นตัวขับเคลื่อนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่

ในส่วนของไพรเมอร์นั้น เทคนิคแลมป์มีไพรเมอร์อยู่หนึ่งชุดซึ่งประกอบไปด้วย ไพรเมอร์ทั้งหมดสี่ตัว อันได้แก่ FIP, F3, BIP และ B3 ซึ่งทั้งสี่ตัวนี้แยกย่อยออกเป็นสองกลุ่มใหญ่คือ

1. Forward Primer แบ่งเป็น Forward Inner Primer (FIP) และ Forward Outer Primer (F3) ซึ่งไพรเมอร์ทั้งสองตัว จะเป็นไพรเมอร์ที่เข้าทำปฏิกิริยาก่อนไพรเมอร์อีกกลุ่มหนึ่ง ลักษณะของ FIP Primer จะประกอบไปด้วย 2 ตำแหน่งจดจำคือ F1c กับ F2 ดังแสดงไว้ในภาพ 3

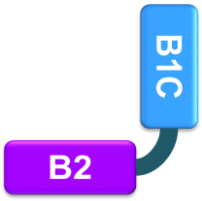


ภาพ 3 Forward Inner Primer (FIP)

ลักษณะของ F3 Primer ประกอบไปด้วย 1 ตำแหน่งจดจำคือ F3 ดังแสดงไว้ในภาพ 4

ภาพ 4 Forward Outer Primer (F3)

2. Backward Primer แบ่งเป็น Backward Inner Primer (BIP) และ Backward Outer Primer (B3) ซึ่ง ไพรเมอร์ทั้งสองตัว จะเป็นไพรเมอร์ที่เข้าทำปฏิกิริยาทีหลังไพรเมอร์อีกกลุ่มหนึ่ง ลักษณะของ BIP Primer จะประกอบไปด้วย 2 ตำแหน่งจดจำคือ B1c กับ B2 ดังแสดงไว้ในภาพ 5

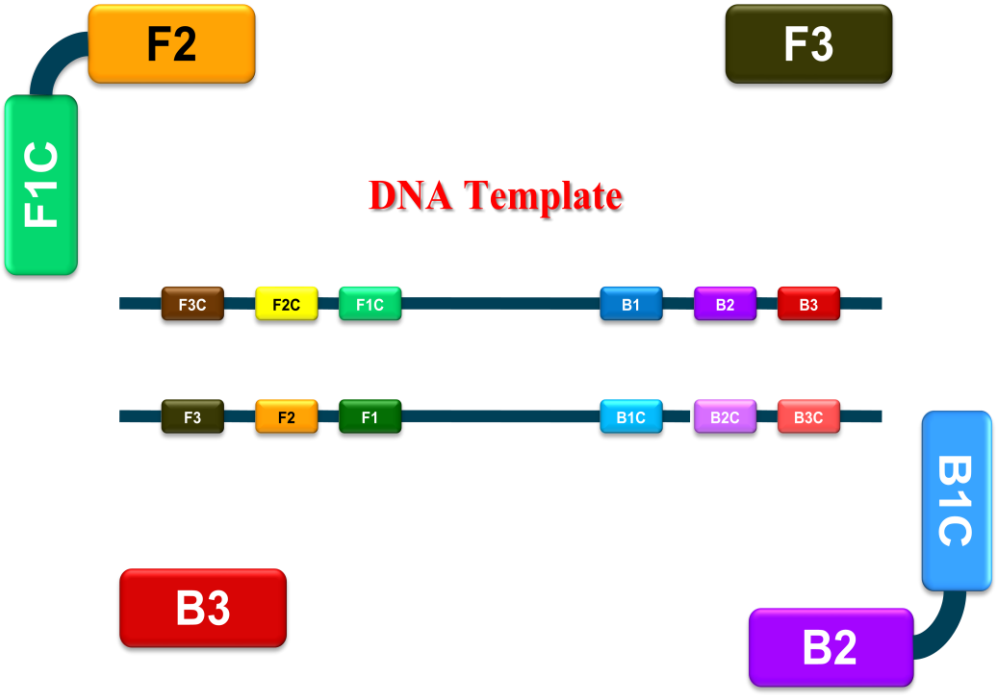


ภาพ 5 Backward Inner Primer (BIP)

ลักษณะของ B3 Primer ประกอบไปด้วย 1 ตำแหน่งจดจำคือ B3 ดังแสดงไว้ในภาพ 6

ภาพ 6 Backward Outer Primer (B3)

ตำแหน่งเข้าจับของแต่ละตำแหน่งจดจำของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบมีดังต่อไปนี้ F1c กับ F1, F2 กับ F2c, F3 กับ F3c, B1c กับ B1, B2 กับ B2c, B3 กับ B3c ซึ่งแสดงไว้ดังภาพ 7

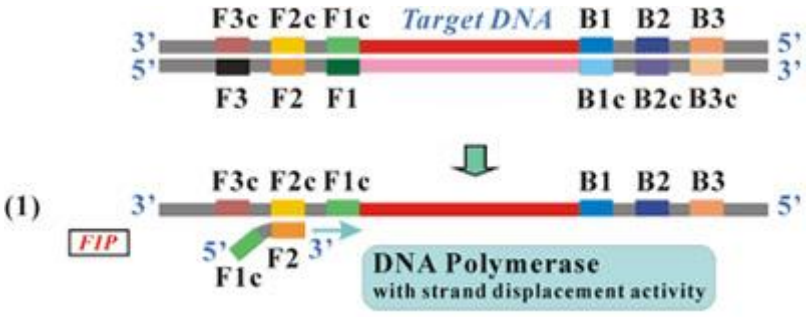


ภาพ 7 ตำแหน่งจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบ

การทำงานของไพรเมอร์ และเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสจะเป็นไปตามขั้นตอนดังนี้
(ขอขอบคุณรูปภาพกลไกการทำงาน ที่นำมาประกอบคำอธิบายของผู้เขียนจาก Eiken Website)

ขั้นตอนที่ 1

Bst. แสดงคุณสมบัติ stand displacement แล้ว FIP Primer เข้าจับกับดีเอ็นเอแม่แบบ

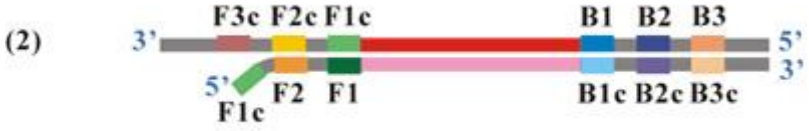


ภาพ 8 กลไกปฏิกิริยาแลมป์ ขั้นตอนที่ 1 (EIKEN, 2005)

FIP Primer นำตำแหน่ง F2 เข้าจับกับตำแหน่ง F2c ของดีเอ็นเอแม่แบบ

ขั้นตอนที่ 2

ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสสังเคราะห์สายใหม่ที่เกิดจากการตั้งต้นของ FIP Primer

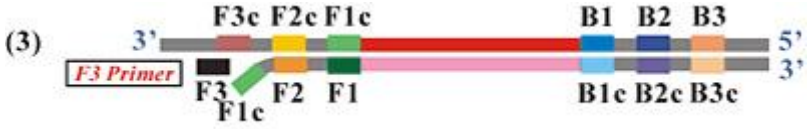


ภาพ 9 กลไกปฏิกิริยาแลมป์ ขั้นตอนที่ 2 (EIKEN, 2005)

ตำแหน่ง F1c ถูกห้อยไว้ ไม่เข้าคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ

ขั้นตอนที่ 3

F3 Primer เข้าจับที่ตำแหน่ง F3c ของดีเอ็นเอแม่แบบสังเคราะห์สายใหม่แทนที่สายเดิม



ภาพ 10 กลไกปฏิกิริยาแลมป์ ขั้นตอนที่ 3 (EIKEN, 2005)

ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ที่เกิดจากการตั้งต้นของ F3 Primer

ขั้นตอนที่ 4

ได้ดีเอ็นเอสายใหม่ที่เป็นคู่สมกับดีเอ็นเอแม่แบบซึ่งเกิดจากการตั้งต้นของ F3 Primer

ภาพ 11 กลไกปฏิกิริยาแลมป์ ขั้นตอนที่ 4 (EIKEN, 2005)

สายดีเอ็นเอที่ถูกเลาะออกมาจะถูกนำไปเป็นสายตั้งต้นจำลองโครงสร้างดัมเบล

ขั้นตอนที่ 5

สายที่ถูกเลาะออกมาทางด้านซ้ายมือจะมีตำแหน่งที่สามารถจับคู่กันได้ คือ F1c กับ F1

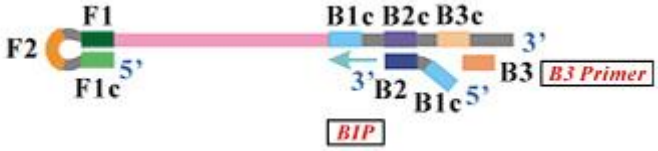
ภาพ 12 กลไกปฏิกิริยาแลมป์ ขั้นตอนที่ 5 (EIKEN, 2005)

การจับกันของตำแหน่งจดจำทางด้านซ้ายจะทำให้เกิดลูกดัมเบลทางด้านซ้าย

ขั้นตอนที่ 6

จากนั้น BIP และB3 จะเข้ามาทำหน้าที่ตั้งต้นสังเคราะห์สายคล้ายกับ FIP กับ F3

(6)



ภาพ 13 กลไกปฏิกิริยาแลมป์ ขั้นตอนที่ 6 (EIKEN, 2005)

โดยเริ่มจาก BIP ใช้ B2 เข้ามาจับกับตำแหน่ง B2c แล้วทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอไปจนสุดสาย

ขั้นตอนที่ 7

แล้ว B3 เข้ามาจับที่ตำแหน่ง B3c ของดีเอ็นเอแม่แบบแล้งสังเคราะห์ดีเอ็นเอไปจนสุดสาย

(7)

ภาพ 14 กลไกปฏิกิริยาแลมป์ ขั้นตอนที่ 7 (EIKEN, 2005)

แล้วสายที่ BIP ตั้งต้นก็ถูกเลาะออกมา

ขั้นตอนที่ 8

สายที่ BIP ตั้งต้นหลุดออกมา จำลองเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า Dumbbell Shape Structure

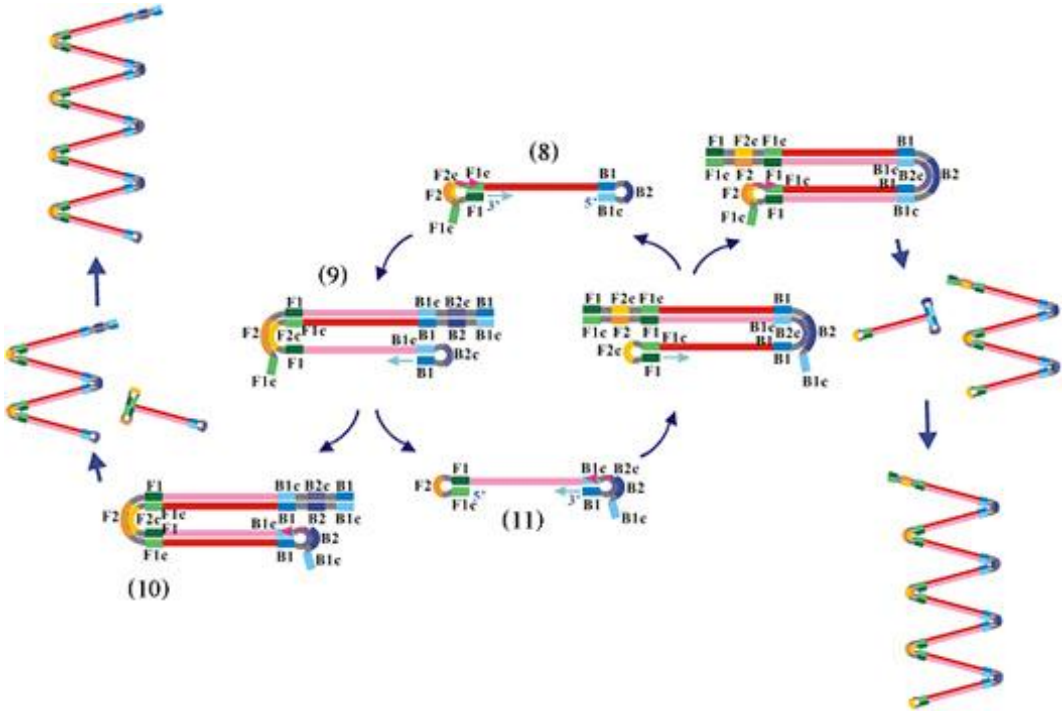
(8)

ภาพ 15 กลไกปฏิกิริยาแลมป์ ขั้นตอนที่ 8 (EIKEN, 2005)

ดัมเบลจะตั้งต้นในการจำลองสารพันธุกรรมให้เป็นโครงสร้าง Cauliflower like Structure

ขั้นตอนที่ 9 - 11

Dumbbell Shape Structure ถูกนำมาใช้ตั้งต้นในการสังเคราะห์ Cauliflower like Structure



ภาพ 16 กลไกปฏิกิริยาแลมป์ ขั้นตอนที่ 9-11 (EIKEN, 2005)

Cauliflower like Structure คือ โครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายดอกกะหล่ำซึ่งมีหลากหลายขนาด ซึ่งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในส่วนนี้จะเป็นหน้าที่การทำงานของ FIP และ BIP Primer

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพ และความไวของเทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) ในการตรวจระบุเพศจากตัวอย่างเลือดของมนุษย์

ประโยชน์ที่จะได้รับจากการศึกษาเชิงทฤษฎีและ/หรือเชิงประยุกต์

4.1 ทราบว่าสิ่งส่งตรวจที่เป็นเลือดของมนุษย์ปริมาณน้อยที่สุดเท่าไรที่จะสามารถตรวจพิสูจน์เพศชายได้ด้วยเทคนิคแลมป์ (LAMP)

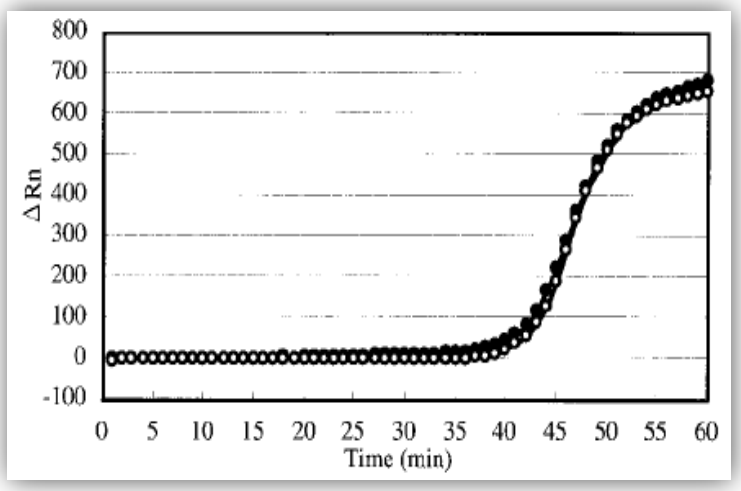
4.2 ทราบถึงประสิทธิภาพของการใช้เทคนิคแลมป์ (LAMP) สำหรับการตรวจระบุเพศชายในสิ่งส่งตรวจที่เป็นเลือดของมนุษย์

4.3 นำไปใช้เป็นการตรวจเบื้องต้นทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ในการระบุเพศของมนุษย์

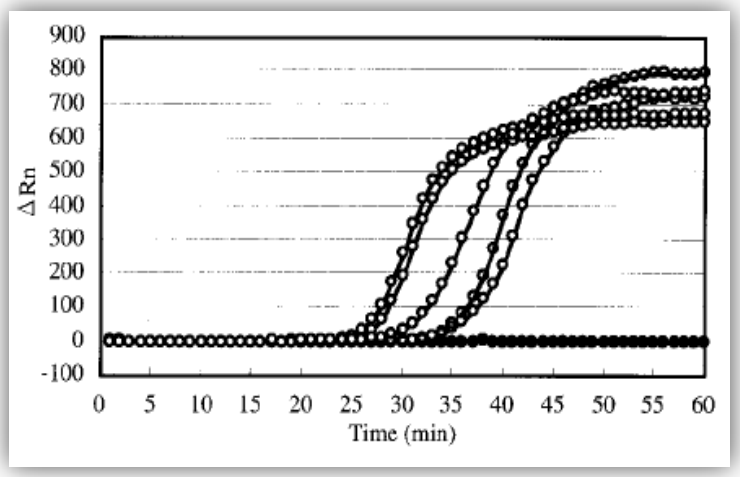
4.4 ช่วยในเรื่องของการประหยัดเวลา และประหยัดงบประมาณในการตรวจพิสูจน์ทางด้านนิติวิทยาศาสตร์

ทบทวนเอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปี ค.ศ. 1985 ได้มีการพัฒนาเทคนิคในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง โดยไม่ต้องนำไปขยาย หรือเพิ่มปริมาณภายในเซลล์ของแบคทีเรีย เทคนิคดังกล่าวนี้เรียกว่า Polymerase Chain Reaction (PCR) (ประดิษฐ์, 2550) นับว่าเป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมอย่างสูง ด้วยความก้าวหน้าของวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีทำให้เกิดการพัฒนาเทคนิคใหม่ขึ้นมาเพื่อแก้ปัญหาของเทคนิคเก่าๆ ในปี ค.ศ. 2000 Notomi *et al.* ได้พัฒนาเทคนิคที่มีชื่อว่า Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) ซึ่งได้ทำการทดลองใน hepatitis virus B (HBV) DNA โดยใช้ไพรเมอร์สี่ชุด คือ FIP, BIP, F3 และ B3 เขาทำการศึกษาถึงกลไกการทำงานของเทคนิคแลมป์ และได้มีการตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (confirm structure) ด้วยวิธี southern blot hybridization นอกจากนี้ยังได้ทำการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมต่อเทคนิคแลมป์รวมไปถึงการหาความไวของเทคนิคแลมป์ที่ใช้ในการทดลองกับ hepatitis virus B (HBV) DNA ซึ่งเขาได้พบว่า เทคนิคแลมป์มีประสิทธิภาพ และความไวที่ดีกว่าเทคนิคพีซีอาร์ที่ใช้กันมาแต่เดิม



(ก) ไม่ผ่านกระบวนการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อแยกสายดีเอ็นเอ

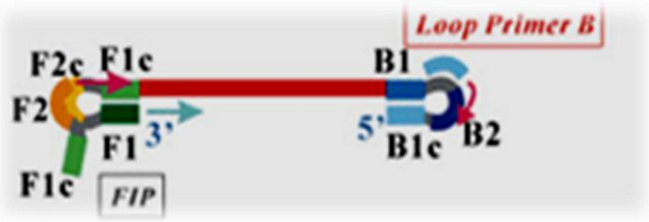


(ข) ผ่านกระบวนการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อแยกสายดีเอ็นเอ
(Nagamine *et al*., 2001)

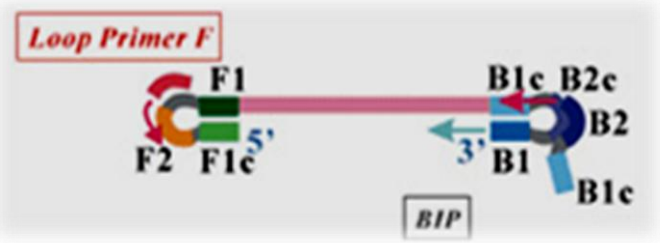
ภาพ 17 เปรียบเทียบระยะเวลาในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในกรณีที่ทำการเพิ่ม และไม่เพิ่มอุณหภูมิในการแยกสายดีเอ็นเอ

ในปี 2001 Mori *et al*. ได้อธิบายกลไกเกิดการขุ่นของเทคนิคแลมป์ว่าเกิดจากปฏิกิริยาของแมกนีเซียม ไพโรฟอสเฟตที่เกิดจากการรวมกันของไพโรฟอสเฟตไอออนจาก dNTPs กับแมกนีเซียมไอออนจากบัฟเฟอร์ของ *Bst*. DNA polymerase และเมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปทำการปั่นแยกจะทำให้เห็นตะกอนความขุ่นชัดเจนขึ้นในบริเวณก้นหลอดทดลอง และในปีเดียวกัน Nagamine *et al*. ก็ได้รายงานว่าเทคนิคแลมป์สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้โดยไม่ต้องอาศัยกระบวนการแยกสายดีเอ็นเอแม่แบบก่อน (denature template) ซึ่งเขาได้อธิบายว่าเอนไซม์ *Bst*. DNA polymerase ที่ใช้มีคุณสมบัติแยกดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยวได้(strand displacement) อย่างไรก็ตามพบว่าการแยกสายดีเอ็นเอแม่แบบก่อนจะช่วยย่นระยะเวลาของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ ลักษณะกราฟเปรียบเทียบระยะเวลาของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเมื่อมีการแยกสายดีเอ็นเอแม่แบบก่อน กับไม่ผ่านขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอแม่แบบแสดงไว้ดังภาพ 17 (ก) และ(ข) โดยที่แกน X เป็นระยะเวลาของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม และแกน Y เป็นปริมาณดีเอ็นเอที่ตรวจวัดได้ ต่อมาในปี ค.ศ. 2002 Nagamine *et al*. ก็ได้ทำการพัฒนาต่อยอดเทคนิคแลมป์โดยการประยุกต์ใช้ loop primer ในการทดลองกับ hepatitis virus B (HBV) DNA เขาพบว่าการใช้ loop primer มีผลต่อระยะเวลาในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคแลมป์ซึ่งจะสามารถย่นระยะเวลาในการตรวจพบการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ถึงสองเท่าตัว ซึ่งตำแหน่งเข้าจับของ loop Primer แสดงไว้ดังภาพที่ 18 (ก) และ (ข) โดยที่ loop F

เป็นลำดับเบสคู่สมกับลำดับเบสที่อยู่ระหว่างตำแหน่ง F1 กับ F2 และ loop B เป็นลำดับเบสคู่สมกับลำดับเบสที่อยู่ระหว่างตำแหน่ง B1 กับ B2



(ก) ตำแหน่งเข้าจับของ loop primer B



(ข) ตำแหน่งเข้าจับของ loop primer F

ภาพ 18 ตำแหน่งการเข้าจับของ loop Primer

หลังจากที่เทคนิคแลมป์ได้ถือกำเนิดขึ้นมาก็มีนักวิจัยหลายท่านนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ เช่นทางการแพทย์ ในปี 2007 Oriel *et al*. ได้ทำการศึกษาพัฒนาเทคนิคแลมป์เพื่อการวินิจฉัยโรคไข้ง่วงหลับที่เกิดจากเชื้อโปรโตซัว *Trypanosoma* ทั้งในมนุษย์ และสัตว์ เขาได้ทำการศึกษาถึงความจำเพาะของไพรเมอร์ที่มีต่อสปีชีส์ (species) ต่างๆ ของเชื้อโปรโตซัว *Trypanosoma* ร่วมกับการศึกษาถึงความไว และพบว่าชุดไพรเมอร์ของสปีชีส์ *T. brucei, T. gambiense, T.congolense, T. cruzi* และ *T. evansi* มีความจำเพาะสูงที่สุด และดีเอ็นเอของเชื้อ *Trypanosoma* สามารถตรวจวัดได้ด้วยเทคนิคแลมป์ แม้จะมีปริมาณน้อยกว่าหนึ่งฟิโคกรัม

ต่อมาในปี 2008 Uemura *et al*. ได้นำเทคนิคแลมป์ไปประยุกต์ใช้กับการวินิจฉัยโรคปอดอักเสบที่เกิดจากเชื้อรา *Pneumocystis pneumonia* ซึ่งเขาพบว่าสามารถใช้เทคนิคแลมป์ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเชื้อรา *Pneumocystis pneumonia* เพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคได้ และยังสามารถทำได้เร็ว และง่ายด้วย เพียงแค่ใช้ heat block และ black light เท่านั้น และในปีเดียวกัน Deguo *et al*. ได้ทำการศึกษาถึงข้อเสียของเทคนิคแลมป์ โดยเขาทำการทดสอบในเชื้อ *Salmonella* ในน้ำนมดิบ ซึ่งทำให้เกิดโรคทางเดินอาหาร ในการวิจัยเขาได้ใช้ไพรเมอร์หกตัว คือ inner primer สองตัว outer primer สองตัว และ loop primer สองตัว ที่อุณหภูมิ 61 องศา

เซลเซียส เขาพบว่า เทคนิคแลมป์จะมีประสิทธิภาพสูงก็ต่อเมื่อใช้กับดีเอ็นเอแม่แบบที่มีความบริสุทธิ์สูงด้วยเช่นกัน และยังพบว่าข้อจำกัดของเทคนิคแลมป์คือ ตัวยับยั้งที่มีอยู่ในน้ำนมดิบมีผลต่อปฏิกิริยาของเทคนิคแลมป์ซึ่งเป็นผลการทดลองที่แตกต่างจากรายงานของนักวิจัยอื่นๆ และเขายังพบอีกว่าความไวของเทคนิคแลมป์นั้นน้อยกว่าเทคนิคพีซีอาร์

เทคนิคแลมป์ถูกนำไปใช้เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ เชื้อรา ไวรัส และ ปรสิต เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ และอุตสาหกรรมอย่างแพร่หลาย แต่ถึงอย่างไรก็ตาม ก็ได้มีการนำเทคนิคแลมป์มาใช้กับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของมนุษย์ โดยในปี 2008 นักวิจัยชาวญี่ปุ่น Nogami *et al*. ได้ประยุกต์ใช้เทคนิคแลมป์ในการระบุเพศของมนุษย์ จากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟัน ซึ่งเขาได้ทำการทดสอบเปรียบเทียบระหว่างการใช้ loop primer และการไม่ใช้ loop primer เพื่อดูถึงข้อแตกต่าง เขาพบว่าการใช้ loop primer สามารถย่นระยะเวลาของการตรวจพบการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจาก 70-80 นาที ให้เหลือเพียง 30-37 นาที และเขายังพบอีกว่าสามารถใช้เทคนิคแลมป์ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเพื่อการตรวจระบุเพศของมนุษย์จากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันได้ ถึงแม้ว่าเนื้อเยื่อจากฟันนั้นจะถูกเก็บไว้ในห้องที่ทำการควบคุมอุณหภูมิมาแล้วถึง 25 ปี

สำหรับประเทศไทยนั้นก็ได้มีการนำเทคนิคแลมป์มาประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยโรคทางด้านการแพทย์เช่นกัน โดยในปี 2009 Buates จากภาควิชาไมโครไบโอโลยี (Microbiology) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้ใช้เทคนิคแลมป์เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียเพื่อการวินิจฉัยโรค ซึ่งพบว่าการใช้เทคนิคแลมป์นั้น ทำได้ง่าย และรวดเร็วกว่า conventional diagnosis technique ที่ใช้กันมาแต่เดิม และยังประหยัดกว่าการใช้เทคนิค alternative diagnosis ซึ่งได้แก่พวก nested PCR และ real-time quantitative PCR approaches เป็นอย่างมาก นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้เทคนิคแลมป์กับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของมนุษย์ โดย Chu *et al*. จากหลักสูตรนิติวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของมนุษย์เพื่อการระบุความเป็นมนุษย์แยกจากสัตว์อื่น โดยทำใน ยีนไซโตโครมบี (cytochrom b) ซึ่งเป็นยีนในไมโตคอนเดรียเขาใช้ตัวอย่างจาก คน และสัตว์อื่น คือ กุ้ง สุนัข หมู ลิง เม่น และนก โดยใช้เนื้อเยื่อจากเซลล์เยื่อบุข้างแก้ม (buccal cell) หรือ เนื้อเยื่อส่วนอื่นๆ สำหรับ กุ้ง และหมู พบว่าสัตว์อื่นไม่พบการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคแลมป์ในขณะที่มนุษย์สามารถระบุความเป็นมนุษย์จากการตรวจวัดยีนไซโตโครมบีได้อย่างมีประสิทธิภาพแม้จะมีปริมาณสารพันธุกรรมตั้งต้นเพียงแค่ 10 ซ้ำเท่านั้น