บทที่ 4

อภิปรายผลการวิจัย

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อการศึกษาประสิทธิภาพ และความไวของเทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification โดยทดสอบการระบุเพศในตัวอย่างเลือดมนุษย์โดยทำการตรวจวัดหายีน Amelogenin Y ซึ่งงานวิจัยนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็นสองส่วนคือ ส่วนแรกเป็นการทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิคแลมป์ด้วยการนำตัวอย่างเลือดมนุษย์จำนวน 30 ตัวอย่างมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Chelex และทำการทดสอบด้วยเทคนิคแลมป์ ดูผลการทดสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ส่วนที่สองเป็นการตรวจวัดหาความไวของเทคนิคแลมป์โดยการนำตัวอย่างเลือดมนุษย์มาสกัดด้วยวิธีฟีนอลคลอโรฟอร์ม (Phenol-Chloroform) แล้วทำการวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nano Drop นำดีเอ็นเอที่ได้มาเจือจางเป็น 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 เท่า แล้วทำการทดสอบด้วยเทคนิคแลมป์ เพื่อหาปริมาณต่ำสุดของดีเอ็นเอที่สามารถตรวจพบการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ด้วยเทคนิคแลมป์ และมองเห็นได้ในอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

การทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิคแลมป์ พบว่าตัวอย่างน้ำสกัดดีเอ็นเอเพศชาย 15 ตัวอย่าง เมื่อทดสอบแล้วได้ผลบวก (positive) 15 ตัวอย่าง ส่วนตัวอย่างดีเอ็นเอของเพศหญิง 15 ตัวอย่างทดสอบได้ผลลบ (negative) 14 ตัวอย่าง และให้ผล smear เป็น false positive หนึ่งตัวอย่าง เมื่อทำซ้ำทั้งหมดสามครั้งผลของการทดสอบยังให้ผลเป็น smear เช่นเดิม คาดว่าความผิดพลาดที่เกิดขึ้นนี้อาจเกิดจากสองปัจจัยด้วยกันคือ

1. อาจมีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอผู้ชายในตัวอย่าง
2. เกิดจากความไม่คงที่ของอุณหภูมิในขณะทำการทดสอบ

เนื่องจากเทคนิคแลมป์มีความไวสูง การที่มีละอองของตัวอย่างผลบวก (positive) เพียงน้อยนิดปนเปื้อนลงไปในตัวอย่างผลลบ (negative) ก็อาจทำให้เกิดผลที่มีการปนเปื้อนได้ และจากการศึกษาพบว่าตัวอย่างที่เป็นผลบวก ก็ให้ผลที่เป็น smear ได้เช่นกัน และการที่ตัวอย่าง

ผลบวกให้ผลเป็น smear นั้น ผู้ศึกษาตั้งสมมติฐานว่าอาจเกิดจากการที่มีปริมาณของดีเอ็นเอน้อยเกินไป ซึ่งผู้ศึกษาก็ได้ทำการทดสอบสมมติฐานนี้ด้วยการนำน้ำสกัดดีเอ็นเอเพศชายที่สกัดด้วยวิธี Chelex มาทำการเจือจาง แล้วทำการทดสอบด้วยเทคนิคแลมป์ จากการทดสอบพบว่าน้ำสกัดดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี Chelex ซึ่งถูกเจือจางในปริมาณมากนั้นมีอัตราการเกิดผล smear สูง แต่ตัวอย่างที่สกัดด้วยวิธีฟีนอลคลอโรฟอร์ม แม้ว่าจะถูกเจือจางในปริมาณมาก ก็ไม่ปรากฏผล smear ดังนั้นจากการทดสอบเบื้องต้นนี้ผู้ศึกษาคาดว่า ตัวอย่างที่สกัดด้วยวิธี Chelex นั้นได้ดีเอ็นเอที่ไม่มีความบริสุทธิ์เพียงพอ และวิธีสกัดแบบ Chelex ก็เป็นวิธีอย่างหยาบที่ไม่สามารถให้ปริมาณดีเอ็นเอที่คงที่ได้ในแต่ละครั้งของการปิเปตดีเอ็นเอจึงทำให้เกิดปัญหาการ smear ขึ้น ซึ่งปัญหาการ smear นี้ ไม่พบในตัวอย่างที่สกัดด้วยวิธีฟีนอลคลอโรฟอร์ม ซึ่งข้อสมมติฐานดังกล่าวตรงกับงานวิจัยของ Zhang *et al.* ที่บอกว่าการที่ผลิตผลของเทคนิคแลมป์ไม่เพียงพออาจทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะขึ้นมาได้ (Zhang *et al.*, 2009) ซึ่งวิธีแก้ไข Nagamine *et al.* บอกว่า loop primer จะช่วยลดอัตราการเกิดแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะได้ (Nagamine *et al.*, 2002)

สำหรับการปนเปื้อนในตัวอย่างเพศหญิงนี้ก็แบ่งออกได้เป็นสามกรณีด้วยกันคือ มีการปนเปื้อนในขณะเตรียม master mix, มีการปนเปื้อนในขณะปิเปตดีเอ็นเอแม่แบบ และมีการปนเปื้อนลงไปในหลอดของดีเอ็นเอแม่แบบโดยตรง ซึ่งกรณีที่ผู้ศึกษาคาดว่าเป็นไปได้มากที่สุดก็คือกรณีที่สาม มีการปนเปื้อนลงไปในหลอดของดีเอ็นเอแม่แบบโดยตรง เนื่องจากว่าในกรณีแรกหากปนเปื้อนลงไปใน master mix จะต้องมีแถบ smear ปรากฏอยู่ในหลอดควบคุมผลลบ (negative control) ของการทดลองด้วย แต่สำหรับการทดลองชุดนี้ไม่เกิดการปนเปื้อนในตัวอย่างหลอดควบคุมผลลบ (negative control) หากเป็นการปนเปื้อนในรูปแบบที่สอง คือ มีการปนเปื้อนในขณะปิเปตดีเอ็นเอแม่แบบก็เป็นกรณีที่เป็นไปได้น้อยมากเนื่องจากว่าการทดสอบซ้ำในครั้งที่สอง และครั้งที่สาม ผู้ศึกษาได้ทำการป้องกันด้วยการใช้ทิป (tip) ที่ใส่ตัวกรองด้วยสำลีฆ่าเชื้อแล้ว ซึ่งมีโอกาสน้อยมากที่จะเกิดการปนเปื้อนจากการปิเปตดีเอ็นเอแม่แบบตัวอย่างเดียวกันถึงสามครั้ง

สำหรับปัจจัยที่สองเกิดจากความไม่คงที่ของอุณหภูมิในการทดสอบ จากการศึกษาผู้ศึกษาพบว่าความคงที่ของอุณหภูมิสำหรับทำปฏิกิริยาในเทคนิคแลมป์นั้นมีผลต่อคุณภาพของผลการทดสอบด้วยเทคนิคแลมป์กล่าวคือ ผู้ศึกษาได้ทำการทดสอบการใช้เครื่องแช่อบ (incubator) ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาสำหรับเทคนิคแลมป์เป็นสามลักษณะด้วยกัน คือ

1. ให้ความร้อนกับหลอดทดลองผ่านเครื่องแช่อบโดยตรง และใช้ค่าอุณหภูมิที่ได้จากเครื่องแช่อบเป็นเกณฑ์วัด

2. ให้ความร้อนกับหลอดทดลองผ่านเครื่องแช่อบโดยตรง และใช้ค่าอุณหภูมิที่ได้จากเทอร์โมมิเตอร์ (thermometer) เป็นเกณฑ์วัด
3. ให้ความร้อนกับหลอดทดลองโดยผ่านทางน้ำที่ให้ความร้อนด้วยเครื่องแช่อบ และใช้ค่าอุณหภูมิที่ได้จากเทอร์โมมิเตอร์เป็นเกณฑ์วัด

จากผลการทดสอบด้วยวิธีทั้งสามพบว่า วิธีที่สามมีอัตราความผิดพลาดของผลการทดลองน้อยที่สุด รองลงมาก็เป็นวิธีที่สอง และวิธีที่หนึ่งให้ผลการทดลองที่มีอัตราความผิดพลาด มากที่สุด

ซึ่งการเกิดผล smear ในตัวอย่างผลลบดังกล่าวนั้นไม่น่าจะเกิดจากความไม่คงที่ของอุณหภูมิ เนื่องจากหากเป็นเพราะความไม่คงที่ของอุณหภูมิจะต้องเกิดผลผิดพลาดในทุกหลอดทดลองของชุดการทดลองนั้น

นอกจากปัจจัยของอุณหภูมิ และการปนเปื้อนที่ทำให้เกิดผล smear ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ก็ยังมีปัจจัยอื่นๆ อีกที่สามารถทำให้เกิดผล smear เช่นกัน ได้แก่ ระยะเวลาของการทำปฏิกิริยา และการเขย่าวนสารเคมีที่ใช้ ซึ่งหากระยะเวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยาไม่มีความเหมาะสม กล่าวคือ มากเกินไปหรือน้อยเกินไปก็อาจทำให้เกิดผล smear ได้ ในส่วนของการเขย่าวนสารก็เช่นกัน ต้องเขย่าวนสารที่จะใช้ในการทำปฏิกิริยาให้เข้ากันอย่างสมบูรณ์ทั่วถึง จึงจะทำให้ไม่เกิดผลผิดพลาดสำหรับการทำปฏิกิริยาของเทคนิคแลมป์

ในส่วนของการหา condition และ protocol ที่เหมาะสมของเทคนิคแลมป์พบว่า ความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละตัวในการทำปฏิกิริยาของเทคนิคแลมป์เป็นดังตาราง 7 ดังนี้

ตาราง 7 ความเข้มข้นสุดท้ายของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาของเทคนิค LAMP

Chemical	**Final Concentrate**
H_20	-
10X Buffer	1X
Betaine	0.8 M
dNTPs	0.4 mM each
Primer Mix	FIP&BIP 1.6 µM each
	F3&B3 0.2 µM each
Bst.	0.32 U/µl
Template	-
Total	-

จากตาราง 7 พบว่า ความเข้มข้นของ 10X buffer ใช้ความเข้มข้นปฏิกิริยา 1X เหมือนกับทุกงานวิจัยแต่มีความเข้มข้นของสารที่ผสมอยู่ใน 10X buffer นั้นแตกต่างกัน ตัวที่แตกต่างจากงานวิจัยอื่นคือ ตัว $MgSO_4$ สำหรับการทดลองในครั้งนี้ใช้ $MgSO_4$ ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 2 mM ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยของ Notomi *et al.* ที่ใช้ความเข้มข้นสุดท้ายของ $MgSO_4$เป็น 4 mM (Notomi *et al.,* 2000) และแตกต่างจาก Tomita *et al.* ที่ใช้ความเข้มข้นของ $MgSO_4$ เป็น 8 mM (Tomita *et al.,* 2008) จากการศึกษาพบว่า $MgSO_4$ ช่วยทำให้ปฏิกิริยาของเทคนิคเกิดขึ้นได้ดี แต่ถ้าใส่ในปริมาณที่ไม่เหมาะสมก็จะทำให้เกิดผลผิดพลาดได้ เช่น ถ้าใส่น้อยเกินไป ก็จะทำให้ไม่เกิดการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม แต่ถ้าใส่ในปริมาณมากเกินไปก็จะทำให้ปฏิกิริยาดีเกินไป เกิดเป็นแถบ smear หนาเข้มในทุกหลอดการทดลองในชุดนั้น สำหรับการทำงานของ $MgSO_4$ ที่มีผลต่อปฏิกิริยาของเทคนิคแลมป์นั้น งานวิจัยของ Hung *et al.* รายงานว่า Mg^{++} จาก $MgSO_4$ มีผลต่อการเข้าจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบ และมีผลต่อการทำงานของดีเอ็นเอพอลิเมอเรสด้วย (Hung *et al.*, 2005)

ในส่วนของ betaine ผู้ศึกษาพบว่า betaine มีความสำคัญต่อการทำปฏิกิริยาของเทคนิคแลมป์มาก เนื่องจากว่าหากไม่ใส่ betaine จะทำให้ไม่เกิดการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมซึ่งความเข้มข้นของ betaine ในการทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.8 M ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hung *et al.* ที่ทำการทดสอบปริมาณสารเคมีที่ใช้สำหรับปฏิกิริยาของเทคนิคแลมป์ในความเข้มข้นต่างๆ เพื่อดูความเข้มข้นที่เหมาะสม ซึ่ง Hung บอกว่า ความเข้มข้นสุดท้ายของ betaine ที่ 0.8 M มีความเหมาะสมมากที่สุด Hung ได้อธิบายว่า betaine มีกลไกที่เป็นไปได้ 2 แบบ ที่ทำให้มีผลต่อปฏิกิริยาของเทคนิคแลมป์ คือ กลไกที่หนึ่ง betaine มีผลทำให้ดีเอ็นเอแม่แบบพร้อมสำหรับการทำงานของดีเอ็นเอพอลิเมอเรส และกลไกที่สอง คือ betaine ช่วยทำให้ GC-rich sequence เกิดความไม่มั่นคงขึ้น ซึ่งเป็นข้อดีที่จะช่วยทำให้สายดีเอ็นเอแม่แบบแยกออกจากกันง่ายขึ้น (Hung *et al,* 2005) และจากการศึกษาผู้ศึกษาพบว่าเมื่อทดลองลดความเข้มข้นสุดท้ายของ betaine ให้เหลือ 0.4 M ก็สามารถทำได้เช่นกัน ซึ่งสอดกับงานวิจัยของ Chu *et al.* ที่ใช้ betaine ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.4 M (Chu *et al.,* 2010) แต่ต่างจาก Nagamine *et al.* ที่ใช้ความเข้มข้นสุดท้ายของ betaine เท่ากับ 1 M ซึ่งผู้ศึกษาคิดว่า การที่จะใช้ปริมาณความเข้มข้นของ betaine เท่าใดนั้น ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของความเข้มข้นสารนั้นกับตัวอย่าง และดีเอ็นเอเป้าหมายที่จะทำการทดสอบด้วย

สำหรับ dNTPs นั้น ผู้ศึกษาได้ใช้ความเข้มข้นของ dNTPs สุดท้ายเป็น 0.4 mM each ซึ่งต่างจากงานวิจัยของ Hung *et al.* ที่บอกว่าความเข้มข้นสุดท้ายของ dNTPs เท่ากับ 1.0 mM each

ดีที่สุด (Hung *et al*, 2005) แต่ปริมาณที่ผู้ศึกษาใช้นั้นสอดคล้องกับงานวิจัยของ Notomi *et al.* ที่ใช้ความเข้มข้นสุดท้ายของ dNTPs เท่ากับ 0.4 mM each เช่นกัน (Notomi *et al.*, 2000)

ในส่วนของ primer mix และ *Bst* DNA polymerase นั้น ผู้ศึกษาได้ใช้ความเข้มข้นสุดท้ายเหมือนกับที่ทุกงานวิจัยได้ใช้กัน กล่าวคือ primer mix มีอัตราส่วน Outer Primer: Inner Primer เป็น 1/8 ซึ่งอยู่ในอัตราส่วนที่เหมาะสมคือ ควรอยู่ในช่วงระหว่าง 1/4 ถึง 1/10 และ *Bst* DNA polymerase ก็ใช้ความเข้มข้นที่เป็นมาตรฐานที่ทุกงานวิจัยใช้กันคือ 0.32 U/ µl ที่ความเข้มข้นสุดท้าย ในส่วนของ *Bst* DNA polymerase นี้ผู้ศึกษาได้ทดลองทำการเจือจางเป็นสองเท่าพบว่าไม่สามารถทำได้

จากการคำนวณค่า Performance Characteristics ของการทดสอบเทคนิคพบว่า sensitivity ของการทดสอบเท่ากับ 100 % แสดงให้เห็นว่าเทคนิคแลมป์นั้นมีความไวสูง, specificity ของการทดสอบเท่ากับ 93% ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าค่า specificity นี้อยู่ที่ประสิทธิภาพของไพรเมอร์ขึ้นอยู่กับว่ามีการออกแบบไพรเมอร์ได้จำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายได้มากแค่ไหน, false negative rate ของการทดสอบเท่ากับ 0% แสดงให้เห็นว่าโอกาสที่จะเกิดกรณีที่ตัวอย่างผลบวก (positive) จะให้ผลเป็นผลลบ (negative) นั้นมีน้อยมาก ซึ่งก็ขึ้นอยู่กับวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างด้วย, false positive rate ของการทดสอบเท่ากับ 7% แสดงให้เห็นว่า มีโอกาสที่จะพบกรณีที่ตัวอย่างผลลบ (negative) จะให้ผลเป็นผลบวก (positive) นั้นเป็น 7 รายในการตรวจ 100 ราย ซึ่งปัจจัยที่ทำให้เกิดกรณีเช่นนี้ก็เป็นดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น, predictive value positive ของการทดสอบเท่ากับ 94% แสดงให้เห็นว่าโอกาสที่การตรวจที่เป็นผลบวก (positive) จะเป็นตัวอย่างที่เป็นผลบวก (positive) จริง อยู่ที่ 94 ราย จาก 100 ราย และ predictive value negative ของการทดสอบเท่ากับ 100% แสดงให้เห็นว่าโอกาสที่การตรวจที่เป็นผลลบ (negative) จะเป็นตัวอย่างที่เป็นผลลบ (negative) จริง อยู่ที่ 100 ราย จาก 100 ราย นอกจากนี้เมื่อทำการทดสอบสมมติฐานด้วยไคสแควร์พบว่าเทคนิคแลมป์สามารถตรวจวัดยีน Amelogenin Y ในเพศชาย และเพศหญิงได้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นว่าเทคนิคแลมป์มีประสิทธิภาพที่จะสามารถตรวจระบุแยกเพศชายออกจากเพศหญิงได้

การทดสอบความไวของเทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification

สำหรับการทดสอบความไวของเทคนิคแลมป์ในตัวอย่างน้ำสกัดดีเอ็นเอจากวิธีสกัดแบบฟีนอลคลอโรฟอร์ม และทำการวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nano Drop พบว่า ปริมาณดีเอ็นเอที่ 2261, 1130.5, 556.25, 141.3125 และ 70.5625 นาโนกรัม สามารถตรวจพบแถบขั้นบันไดการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และปริมาณดีเอ็นเอที่ 35.328125 นาโนกรัม ไม่สามารถตรวจพบแถบขั้นบันไดการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยของ Chu *et al.* ที่บอกว่า ปริมาณดีเอ็นเอน้อยสุดที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส คือ 10 นาโนกรัม (Chu *et al.*, 2010) ที่เป็นเช่นนี้ผู้ศึกษาคาดว่าเป็นเพราะข้อจำกัด และความแตกต่างของการทดลองทั้งในเรื่องของตัวอย่างดีเอ็นเอที่ Chu *et al.* ใช้ ซึ่งมาจากไมโตคอนเดรียอาจจะพบได้มาก copy กว่าดีเอ็นเอจากจากนิวเคลียส และวิธีการสกัดดีเอ็นเอซึ่ง Chu *et al.* ใช้ตัวอย่างจากเยื่อบุกระพุ้งแก้ม (buccal cell) แต่สำหรับการทดลองของผู้ศึกษาใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอสกัดจากเลือด ซึ่งผู้ศึกษามีความเห็นว่า ในเลือดอาจจะมีตัวยับยั้ง (inhibitor) ที่ไปรบกวนปฏิกิริยาของเทคนิคแลมป์ทำให้ประสิทธิภาพของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมนั้นถดถอยลงซึ่งตรงกับงานวิจัยของ Deguo *et al.*ที่บอกว่า วิธีการสกัดมีผลต่อการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเทคนิคแลมป์เนื่องจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคแลมป์จะมีประสิทธิภาพก็ต่อเมื่อใช้ดีเอ็นเอแม่แบบที่มีความบริสุทธิ์สูง และ Deguo ได้อธิบายว่าตัวรบกวนซึ่งอาจจะเป็น organic หรือ inorganic substance เช่น detergents, antibiotics, phenolic compounds, enzymes, polysaccharides, fats, proteins และ salts ซึ่งอาจจะไปยับยั้งปฏิกิริยาของเทคนิคแลมป์ได้ รวมถึงไปมีผลโดยอ้อมต่อการทำงานของไพรเมอร์ (Deguo *et al.*, 2008) สำหรับการที่เลือกดูผลในอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เนื่องจาก ประการที่หนึ่ง อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเหมาะสำหรับที่จะใช้ดูผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ (สุรินทร์, 2552) ซึ่งตรงกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการจะตรวจวัดนั่นคือ Amelogenin Y gene ซึ่งเป็นดีเอ็นเอเป้าหมายในระดับยีน ประการที่สอง เนื่องจากเทคนิคแลมป์เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูง ความไวสูง และความจำเพาะสูง ดังนั้น การตรวจวัดจึงไม่ควรจะยุ่งยาก กล่าวคือ ควรจะตรวจวัดได้ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และจากการทดสอบพบว่าสามารถมองเห็นได้ในอะกาโรสเจลจึงไม่จำเป็นที่จะต้องใช้อะคริลาไมด์ (acylamide gel) อีก

ในส่วนของการดูผลนั้นผู้ศึกษาได้ทำการทดสอบการดูผลการเรืองแสงด้วยการใช้ ethidium bromide ซึ่งเติมเข้าไปหลังจากที่ผ่านขั้นตอนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคแลมป์แล้ว โดยเริ่มแรกนั้นผู้ศึกษาได้ใช้ปริมาณที่เหมาะสมตามที่ Eiken web site บอกไว้คือความ

เข้มข้น 0.5 μg/ml ซึ่งผู้ศึกษาได้ทำการเตรียม ethidium bromide ที่จะใช้สำหรับการดูผลการเรืองแสงจาก stock 10 mg/ml โดยมีวิธีการคำนวณดังนี้

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

เมื่อ C_1 = ความเข้มข้นของ stock = 10 mg/ml = 10000 μg/ml
V_1 = ปริมาตรที่จะต้องดูดจาก stock = ต้องการหา
C_2 = ความเข้มข้นสุดท้าย = 0.5 μg/ml
V_2 = ปริมาตรสุดท้าย = 25 μl

แทนค่า (10000 μg/ml) V_1 = (0.5 μg/ml) (25 μl)

$$V_1 = \frac{(0.5\ \mu g/ml)\ (25\ \mu l)}{(10000\ \mu g/ml)}$$

V_1 = 0.00125 μl

นั่นคือ ต้องดูดจาก stock 10 mg/ml มา 0.00125 μl ใส่ลงไปในหลอดปฏิกิริยา *25* μl

เมื่อทำการทดสอบ EtBr ความเข้มข้น 0.5 μg/ml แล้วพบว่าหลอดผลบวกเห็นการเรืองแสงชัดเจน และหลอดผลลบมืดทึบกว่าหลอดผลบวกแต่ยังมีความมืดทึบไม่พอจึงทำการเจือจางความเข้มข้นลงไปอีกเป็น 2 เท่า พบว่าเป็นปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ทำให้เห็นความแตกต่างระหว่างหลอดผลบวก และหลอดผลลบได้ชัดเจนที่สุด นั่นคือ ความเข้มข้นเท่ากับ 0.25 μg/ml ซึ่งต้องดูดจาก stock 10 mg/ml มาดังนี้

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

เมื่อ C_1 = ความเข้มข้นของ stock = 10 mg/ml = 10000 μg/ml
V_1 = ปริมาตรที่จะต้องดูดจาก stock = ต้องการหา
C_2 = ความเข้มข้นสุดท้าย = 0.25 μg/ml
V_2 = ปริมาตรสุดท้าย = 25 μl

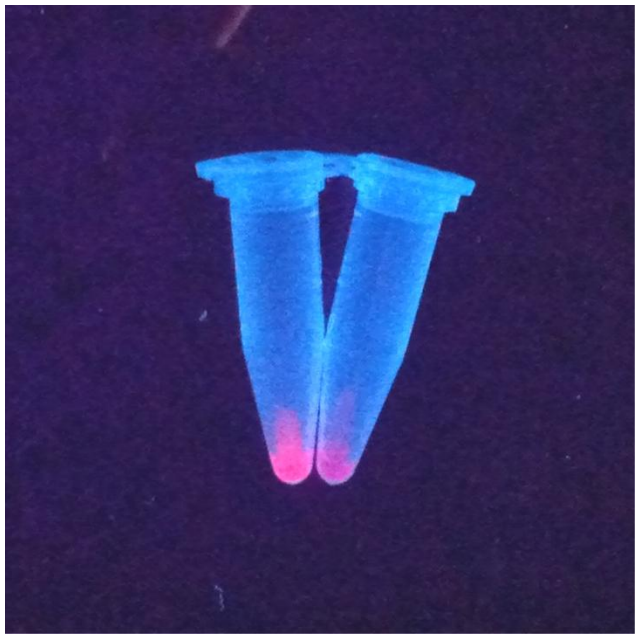
แทนค่า (10000 μg/ml) V_1 = (0.25 μg/ml) (25 μl)

$$V_1 = \frac{(0.25\ \mu g/ml)\ (25\ \mu l)}{(10000\ \mu g/ml)}$$

V_1 = 0.000625 μl

นั่นคือ ต้องดูดจาก stock 10 mg/ml มา 0.000625 μl ใส่ลงไปในหลอดปฏิกิริยา *25* μl

จากความเข้มข้นที่เหมาะสมดังกล่าวนั้นแตกต่างจากความเข้มข้นของ Eiken web site ที่ได้บอกไว้ว่าปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมเท่ากับ 0.5 μg/ml และผลการทดลองของผู้ศึกษาแสดงไว้ดังภาพ 21



ภาพ 21 ทดสอบการดูผลเรืองแสงด้วย EtBr
ทางด้านซ้าย คือ Positive ทางด้านขวา คือ Negative

สำหรับการนำไปใช้งานจริงนั้นจะต้องทำการเตรียม working reagent เพื่อให้ง่ายต่อการปิเปตสารซึ่งผู้ศึกษาได้ทำการเตรียมความเข้มข้นของ working reagent เป็น 6.25 μg/ml สำหรับการปิเปตใช้ 1 μl ต่อหนึ่งหลอดปฏิกิริยา 25 μl ซึ่งสามารถคำนวนการเตรียม working reagent ได้ดังนี้

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

เมื่อ C_1 = ความเข้มข้นของ stock = 10000 μg/ml
V_1 = ปริมาตรที่จะต้องดูดจาก stock = ต้องการหา
C_2 = ความเข้มข้นของ working reagent ที่ต้องการ = 6.25 μg/ml
V_2 = ปริมาตรของ working reagentที่ต้องการ = 1000 μl

แทนค่า $(10000\ \mu g/ml)\ V_1 = (6.25\ \mu g/ml)\ (1000\ \mu l)$

$$V_1 = \frac{(6.25\ \mu g/ml)\ (1000\ \mu l)}{(10000\ \mu g/ml)}$$

$$V_1 = 0.625\ \mu l$$

นั่นคือ ต้องดูดจาก stock 10 mg/ml มา 0.625 μl แล้วเต้มน้ำ 999.375 μl

การนำเทคนิค LAMP ไปประยุกต์ในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์

จากหลากหลายงานวิจัยที่นำเทคนิคแลมป์ไปประยุกต์ใช้ต่างพบว่าเทคนิคแลมป์นั้นดีกว่าเทคนิคพีซีอาร์มาก ทั้งในด้านความมีประสิทธิภาพ ความไว ความจำเพาะ ความรวดเร็วและความประหยัด และจากการศึกษาของผู้ทำการศึกษาเองก็พบว่า ข้อดีของเทคนิคแลมป์ที่กล่าวได้ว่าเหนือกว่าเทคนิคพีซีอาร์อย่างแน่นอนนั้นก็คือ ความรวดเร็ว และความประหยัด(cheapness) กล่าวคือ เทคนิคแลมป์ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยารวมถึงขั้นตอนการดูผล น้อยกว่าเทคนิคพีซีอาร์เป็นอย่างมาก และค่าใช้จ่ายในด้านอุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในเทคนิคก็ประหยัดกว่าเทคนิคพีซีอาร์เพราะเพียงแค่ใช้ เครื่องแช่อบ (incubate) ก็สามารถทำได้แล้ว ในส่วนของประสิทธิภาพเทคนิค (efficiency) จะดีกว่าเทคนิคพีซีอาร์หรือไม่นั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ ด้วยเช่น วิธีการสกัดชนิดของตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง เป็นต้น เนื่องจากว่าวิธีการสกัด และชนิดของตัวอย่างนั้น มีผลต่อประสิทธิภาพของเทคนิค เพราะว่าตัวอย่างบางชนิดอาจมีตัวรบกวนปนอยู่ ยิ่งใช้วิธีการสกัดที่ไม่สามารถขจัดตัวรบกวนออกไปได้อาจทำให้ประสิทธิภาพของเทคนิคลดลง จนอาจทำให้ได้ผลเท่าๆ กับพีซีอาร์ หรือด้อยกว่าพีซีอาร์ได้ แต่ถึงอย่างไรโดยปกติแล้วเทคนิคแลมป์ย่อมมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าเทคนิคพีซีอาร์ซึ่งดูได้จาก *Bst*. DNA polymerase ที่ใช้นั้น ทำงานภายใต้อุณหภูมิเดียว แต่ *Taq* DNA polymerase ต้องทำงานเป็นวัฏจักรซึ่งการทำงานเป็นรอบวัฏจักรนี้ย่อมทำให้ประสิทธิภาพของเอนไซม์ (enzyme) เสื่อมถอยเร็วกว่า ในด้านของความจำเพาะ(specificity) ก็ขึ้นอยู่กับการออกแบบชุดไพรเมอร์ซึ่งการที่จะได้ชุดไพรเมอร์ชุดหนึ่งๆ เพื่อมาใช้ปฏิบัติงานจริงนั้น จำเป็นต้องมีการทดสอบความจำเพาะกับดีเอ็นเอที่มีความใกล้เคียงกันทางชนิด และสายพันธุ์เพื่อให้แน่ใจว่าชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบมีความจำเพาะกับตำแหน่งที่สนใจจริงๆ สำหรับความไว (sensitivity) ของเทคนิคนั้นก็ขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของเทคนิคด้วย แต่โดยปกติแล้วเทคนิคแลมป์ย่อมมีความไวที่เหนือกว่าพีซีอาร์ซึ่งสามารถดูได้จากความเข้มของแถบดีเอ็นเอในการทดสอบความไว จะพบว่าในระดับที่ดีเอ็นเอแม่แบบเท่ากันความเข้มแถบดีเอ็นเอของแลมป์จะมีความเข้ม และเห็นได้ชัดกว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้จากพีซีอาร์ นอกจากข้อดีที่ได้กล่าวมาเทคนิคแลมป์มีข้อจำกัดในด้านของการตรวจวัดดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กในระดับ STRs (short tandem repeats) ที่ใช้ในการระบุบุคคลเนื่องจากว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้จะมีลักษณะเป็นขั้นบันไดไม่สามารถบอกขนาด

ของดีเอ็นเอได้อย่างแน่นอน ซึ่งโดยจุดประสงค์ของเทคนิคแล้วใช้สำหรับตรวจคัดกรองเบื้องต้นว่าใช่หรือไม่ใช่ มีหรือไม่มีเท่านั้น

สำหรับงานวิจัยนี้ทำการทดสอบประสิทธิภาพ และความไวของเทคนิคแลมป์สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้จริงในทางนิติวิทยาศาสตร์ในกรณีของการข่มขืนกระทำชำเราเพื่อตรวจหาว่ามีดีเอ็นเอของมนุษย์เพศชายอยู่ในช่องคลอดหรือไม่ซึ่งสามารถนำไปเป็นกรณีของการศึกษาต่อยอดงานวิจัยต่อไปได้ หรือในกรณีของพิบัติภัยอาจนำไปตรวจสอบว่าศพที่พบนั้นเป็นมนุษย์เพศชายหรือเพศหญิงโดยอาจจะเพิ่มชุดไพรเมอร์ที่จะใช้ตรวจวัด Amelogenin X ขึ้นมาอีกชุดหนึ่ง และถ้าต้องการประหยัดงบประมาณ และเวลาในการทดสอบอาจจะทำการออกแบบชุดไพรเมอร์ชุดเดียวที่สามารถตรวจสอบได้ทั้ง Amelogenin X และ Amelogenin Y ในรูปแบบของการนำไพรเมอร์มาผสมกัน ในกรณีของการตรวจพิสูจน์เลือด ว่าเลือดในที่เกิดเหตุนั้นเป็นของมนุษย์เพศชายหรือเพศหญิงอาจนำงานวิจัยนี้ไปประยุกต์ใช้ร่วมกับวิธีการตรวจเลือดโดยใช้ antihuman serum เพื่อตรวจสอบก่อนว่าเป็นเลือดมนุษย์หรือไม่ แล้วจึงนำวิธีแลมป์ไปตรวจสอบระบุเพศต่อไป การประยุกต์ใช้ร่วมกับวิธีอื่นๆ เช่นนี้เป็นการช่วยประหยัดงบประมาณในการเพิ่มชุดไพรเมอร์ในการตรวจสอบได้เช่นกัน เพื่อความมั่นใจในการตรวจพิสูจน์ว่าหลอดที่ทำการทดสอบนั้นน่าเชื่อถืออาจทำการเพิ่มเติมสารที่เป็น internal standard ลงไปเพื่อดูความถูกต้องของการทดสอบนอกเหนือไปจากการใช้ชุดควบคุมผลบวก และชุดควบคุมผลลบซึ่งเป็น external control เทคนิคแลมป์ นอกจากจะตรวจคัดกรองเบื้องต้นในตัวอย่างที่เป็น มนุษย์ สัตว์อื่น แบคทีเรีย ไวรัส และโปรโตซัวแล้ว ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจดีเอ็นเอพืชได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในทางนิติวิทยาศาสตร์ในด้านของการตรวจคัดกรองว่าเป็นสารเสพติดประเภท ฝิ่น กัญชาหรือไม่ ซึ่งข้อดีที่สำคัญของเทคนิคแลมป์ อีกประการหนึ่งก็คือ สามารถนำออกไปตรวจวัดในภาคสนามได้โดยร่วมกับเครื่องมือที่ออกแบบมาเพื่อตรวจวัดความขุ่นได้ในตัวซึ่งก็จะทำให้ง่ายต่อการตรวจพิสูจน์ที่รวดเร็วมากยิ่งขึ้น ในส่วนนี้ควรจะมีการศึกษาค้นคว้าเพื่อพัฒนาต่อยอดงานวิจัยของผู้ศึกษาต่อไป