# การวิเคราะห์ messenger RNA เพื่อพิสูจน์จำแนกชนิดของสารคัดหลั่ง

ชัยรัตน์ มานะเสถียรกิจ พ.บ., อังคณา นิ่มนวล วท.บ.
โรงพยาบาลราชวิถี แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

# Abstract: Body-fluid Identification Using mRNA Analysis

Chairat Manasatienkij, M.D., Aungkana Nimnual, B.Sc.
Rajavithi Hospital, Khwaeng Thung Phayathai, Khet Ratchathewi, Krungthep Mahanakhon 10400
(E-mail: manasatienkij.c@gmail.com)
(Received: 21 November, 2022; Revised: 20 March, 2023; Accepted: 8 July, 2023)

Saliva, seminal fluid, sweat, or blood stains indicate different kinds of interaction between assailant and victim. The identification of biological origin of the tissue and body fluid collected from the crime scene or forensic evidence is crucial for criminal action reconstruction. Conventional analytical methods for body fluid identification consist of presumptive test for preliminary screening purpose and confirmatory test. The sensitivity of these conventional methods is usually the ratio of 1:400 to 1:100,000 dilution of the original body fluid specimen. There are also several limitations of the conventional method, such as long turnaround time, low specificity, and high amount of specimen consumption. Tissue-specific mRNA analysis has been recently developed and applied to identify body fluid and tissue type. Analytical sensitivity and specificity are greatly improved. It also enables the detection of multiple body fluids in a single reaction, significantly decreasing the specimen consumption. The analytical technique is the amplification of targeted nucleotide on specific mRNA strand by a PCR reaction. After the amplification, several novel detection technologies are applied.

Keywords: mRNA, Tissue and body fluid identification, Forensic RNA analysis, Biological trace evidence

## บทคัดย่อ

การระบุชนิดของเนื้อเยื่อ และสารคัดหลั่งจากร่างกายมนุษย์ เช่น เนื้อเยื่อผิวหนัง, น้ำลาย, น้ำอสุจิ, เหงื่อ หรือคราบเลือด ที่พบในสถานที่เกิดเหตุ และวัตถุพยานถือเป็นข้อมูลสำคัญในการเชื่อมโยงรูปแบบการกระทำความผิดทางอาญาหรือเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในการกำหนดข้อกล่าวหาในการดำเนินการตามกระบวนการยุติธรรม วิธีการดั้งเดิมที่ยังคงมีการใช้ในปัจจุบันสำหรับการระบุชนิดสารคัดหลั่งจากร่างกายมนุษย์มีอยู่หลากหลายวิธี ทั้งแบบที่เป็นการทดสอบเบื้องต้น (presumptive test or preliminary screening test) และการทดสอบยืนยัน (confirmatory test) การตรวจด้วยวิธีการเหล่านี้ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับระดับความไวของการทดสอบด้วยการเจือจางสารคัดหลั่งตั้งต้นลงไปเรื่อย ๆ และพบว่าสามารถทำการทดสอบได้ที่ระดับเจือจางประมาณ 1:400 – 1:100,000 ของสารคัดหลั่งตั้งต้นแล้วแต่ชนิดของสารคัดหลั่ง และวิธีการทดสอบแต่ทุกวิธีการทดสอบล้วนแล้วแต่มีความจำเพาะต่อชนิดของสารคัดหลั่งในระดับที่ต่ำ คือสามารถให้ผลบวกได้กับสารคัดหลั่งหรือสารปนเปื้อนอื่น ๆ ได้ อีกทั้งยังมีข้อจำกัดอีกหลายประการ เช่น การใช้ระยะเวลาในการตรวจพิสูจน์นาน และจำเป็นจะต้องใช้ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจเป็นปริมาณมากในการพิสูจน์ต่อครั้งดังนั้นในปัจจุบันจึงได้มีการพัฒนาเทคนิคในการตรวจเพื่อระบุชนิดของสารคัดหลั่งโดยตรวจการแสดงออกของยีน (gene expression) ด้วยการวิเคราะห์เอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ที่มีความจำเพาะต่อเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ เพื่อใช้ทดแทนวิธีการแบบเดิมส่งผลให้การตรวจวิเคราะห์มีความไวและความจำเพาะสูงขึ้นอย่างมากอีกทั้งยังสามารถระบุชนิดของเนื้อเยื่อและสารคัดหลั่งได้หลายชนิดในการทำปฏิกิริยาเพียงครั้งเดียว จึงไม่จำเป็นจะต้องใช้ปริมาณสิ่งส่งตรวจมากนัก เทคโนโลยีที่มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งสำหรับการตรวจวิเคราะห์รูปแบบใหม่นี้ ได้แก่ การเพิ่มปริมาณโครงสร้างพื้นฐานของกรดนิวคลีอิก (นิวคลีโอไทด์) ในตำแหน่งเป้าหมายบนสาย mRNA ด้วยปฏิกิริยา PCR และทำการตรวจวัดและวิเคราะห์ด้วยเทคโนโลยีอื่น ๆ ตามบริบทที่เหมาะสมต่อไป

คำสำคัญ: เอ็มอาร์เอ็นเอ, การระบุชนิดของเนื้อเยื่อ และสารคัดหลั่ง, การวิเคราะห์อาร์เอ็นเอทางนิติเวชศาสตร์, วัตถุพยานทางชีวภาพ

## บทนำ

บทความนี้ได้จากการรวบรวมวิเคราะห์เอกสาร และบทความทางวิชาการที่เกี่ยวกับการตรวจเพื่อระบุชนิดของสารคัดหลั่ง ซึ่งเผยแพร่เป็นภาษาอังกฤษหรือภาษาไทยเท่านั้นจำนวนทั้งสิ้น 63 ฉบับ โดยแบ่งเป็นการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวิเคราะห์ RNA จำนวน 34 ฉบับ การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีดั้งเดิมจำนวน 24 ฉบับ และการศึกษาอื่น ๆ อีก 5 ฉบับ โดยสืบค้นจากคำสำคัญได้แก่ mRNA profiling, body fluid identification, forensic science และ real-time RT-PCR จากฐานข้อมูล science direct, PubMed และ google scholar ที่ได้มีการเผยแพร่ตีพิมพ์ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1955 ถึง ค.ศ. 2022

เนื้อเยื่อ และสารคัดหลั่งทางชีวภาพ (biological secretion) จากร่างกายของมนุษย์ที่ตรวจพบในที่เกิดเหตุบนพื้นผิวของวัตถุพยาน หรือแม้แต่บนร่างกายของผู้เสียหายล้วนมีบทบาทสำคัญในการให้ความเห็นในทางนิติเวชศาสตร์ เนื่องจากชนิดรวมถึงที่มาของตัวอย่างเนื้อเยื่อ และสารคัดหลั่งที่ตรวจพบสามารถให้เบาะแสที่สำคัญในการเชื่อมโยงรูปแบบการกระทำความผิดทางอาญารวมทั้งสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ลำดับเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นได้เป็นอย่างดี เช่น คราบเลือดสามารถบ่งบอกรูปแบบของการต่อสู้ การทำร้ายร่างกาย หรือการฆาตกรรม การตรวจพบน้ำอสุจิ เซลล์ผิวหนังหรือน้ำลายภายในช่องคลอดสามารถบ่งบอกถึงอวัยวะที่ใช้ในการล่วงละเมิดทางเพศเป็นต้น เนื้อเยื่อ และสารคัดหลั่งที่มักจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับผู้ป่วยคดีหรือศพคดี และมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเป็นจำนวนมาก ได้แก่ เลือด น้ำอสุจิ น้ำลาย ของเหลวในช่องคลอด ปัสสาวะ และเหงื่อ การรายงานผลการตรวจพิสูจน์เนื้อเยื่อ และสารคัดหลั่งที่ได้มาจากการเก็บตัวอย่างทางการแพทย์ในหลาย ๆ กรณีจะมีความครบถ้วนสมบูรณ์ก็ต่อเมื่อมีการตรวจระบุชนิดของสารคัดหลั่งที่ตรวจพบควบคู่ไปพร้อมกับการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอเพื่อระบุยืนยันตัวบุคคลที่เป็นเจ้าของคราบสารคัดหลั่งนั้น จึงจะสามารถพิสูจน์ยืนยันได้ว่าผู้ต้องสงสัยมีส่วนเกี่ยวข้องในอาชญากรรม และมีพฤติการณ์การกระทำความผิดจริงตามที่ผู้เสียหายกล่าวอ้างหรือไม่

ขั้นตอนการตรวจที่ใช้กันโดยทั่วไปสำหรับการตรวจพิสูจน์ทางนิติวิทยาศาสตร์จากตัวอย่างทางชีววิทยา ได้แก่ การตรวจสอบด้วยตาเปล่า การตรวจพิสูจน์เบื้องต้น การตรวจยืนยัน และการตรวจเพื่อระบุเจ้าของสารคัดหลั่ง เช่น การตรวจหมู่เลือดหรือการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ วิธีการตรวจในแต่ละขั้นตอนอาจมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและสภาพของตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ วิธีการตรวจมาตรฐานที่เป็น gold standard สำหรับการระบุชนิดของเหลวในร่างกายในปัจจุบันได้แก่ การตรวจหาโปรตีนหรือสารเคมีที่จำเพาะต่อชนิดสารคัดหลั่งนั้น ๆ เช่น ฮีโมโกลบินในเลือด, PSA ในน้ำอสุจิ หรือ α-amylase ในน้ำลาย และการตรวจด้วยวิธีการทาง histology สำหรับการยืนยันน้ำอสุจิ (ตรวจพบตัวอสุจิ)[1]

แม้ว่าห้องปฏิบัติการทางนิติเวชศาสตร์ส่วนใหญ่จะสามารถตรวจพิสูจน์สารคัดหลั่งบางชนิดได้ในเบื้องต้น เช่น น้ำอสุจิ และเลือดจากวัตถุพยานแต่การตรวจวิเคราะห์เกือบทั้งหมดจะใช้เทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยา (Immunology) หรือการทดสอบด้วยปฏิกิริยาทางเคมี ซึ่งการทดสอบเหล่านี้ต้องใช้ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจเป็นจำนวนมาก และมีความแม่นยำไม่มากนัก อีกทั้งยังไม่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างเลือดปกติ และเลือดประจำเดือนได้จึงไม่ได้รับความนิยมในการนำมาใช้ตรวจพิสูจน์ชนิดของเนื้อเยื่อ และสารคัดหลั่งโดยทั่วไป แต่ในบางสถานการณ์การระบุชนิดของสารคัดหลั่งจากร่างกายเหล่านี้กลับมีความสำคัญอย่างยิ่งในการใช้เป็นหลักฐานประกอบข้อยืนยันหรือข้อโต้แย้งในข้อเท็จจริงตามกฎหมายเกี่ยวกับพฤติการณ์หรือรายละเอียดของการกระทำความผิดได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาวิธีการทดสอบที่มีประสิทธิภาพ และมีความแม่นยำสูงในการตรวจยืนยันชนิดของเนื้อเยื่อ และสารคัดหลั่งจากร่างกายของมนุษย์

### วิธีการตรวจแบบดั้งเดิมเพื่อระบุชนิดของตัวอย่างทางชีวภาพ

เทคนิคดั้งเดิมที่ใช้ในการระบุชนิดของเนื้อเยื่อ และสารคัดหลั่งจากร่างกายมนุษย์ในทางนิติเวชศาสตร์อาศัยหลักการการทดสอบทางเคมี การตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยา การทดสอบการเร่งปฏิกิริยาของโปรตีน หรือวิธีการทางสเปกโทรสโกปี โดยสามารถจำแนกวิธีการตรวจวิเคราะห์ตามชนิดของสารคัดหลั่งได้ดังนี้

#### เลือด

การทดสอบเลือดนิยมใช้การทดสอบทางเคมีเป็นหลัก ซึ่งเป็นการทดสอบที่มีความไวสูงแต่ขาดความจำเพาะ โดยอาศัยหลักการการเร่งปฏิกิริยาของกลุ่มฮีมที่เป็นส่วนประกอบอยู่ในฮีโมโกลบินวิธีที่นิยมใช้อย่างมากในการทดสอบเลือดคือการทดสอบฟีนอล์ฟทาลีน หรืออีกชื่อหนึ่งคือ การทดสอบ Kastle–Meyer ซึ่งวิธีการนี้ได้มีการศึกษาพบว่ามีความไวสามารถตรวจได้ในสารละลายเจือจาง 1:10,000 จากปริมาณตัวอย่างเลือดตั้งต้น 50 ไมโครลิตร[2] แต่ก็พบว่าสามารถให้ผลบวกลวงกับสารออกซิแดนท์อื่น ๆ ได้อีกเป็นจำนวนมาก

#### น้ำลาย

การทดสอบน้ำลายส่วนใหญ่เป็นการทดสอบโดยการตรวจหาเอนไซม์ α-amylase ในน้ำลายโดยมีการศึกษาการทดสอบน้ำลายด้วยหลักการนี้ด้วยชุดทดสอบ Rapignost®- Amylase พบว่ามีความไวสามารถตรวจตัวอย่างที่มีความเจือจางได้ถึง 1:1,000[3] แต่อย่างไรก็ตามเอนไซม์ α-amylase นี้ก็ยังสามารถตรวจพบได้ในสารคัดหลั่งอื่น ๆ ของมนุษย์ เช่น น้ำนม เหงื่อ น้ำอสุจิ ของเหลวในช่องคลอด อุจจาระ และยังพบได้ในสิ่งส่งตรวจจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่น ๆ อีกด้วย ทำให้ในระยะต่อมาได้มีการพัฒนาการทดสอบน้ำลายโดยใช้ RSID™-saliva test ซึ่งเป็นการทดสอบทางภูมิคุ้มกันโดยใช้ anti-human salivary anti-amylase antibodies พบว่าสามารถตรวจพบน้ำลายได้ในตัวอย่างที่มีปริมาณน้อยกว่า 1 ไมโครลิตร แต่ยังคงให้ผลบวกลวงได้ในน้ำลายหนู น้ำนมแม่ ปัสสาวะ อุจจาระ และตัวอย่างน้ำอสุจิ[4]

**น้ำอสุจิ**

ปัจจุบันวิธีมาตรฐานที่สามารถยืนยันคราบน้ำอสุจิได้อย่างแน่นอนคือการตรวจพบตัวอสุจิด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยการย้อมสีพิเศษชนิดต่าง ๆ แต่วิธีดังกล่าวยังมีข้อจำกัดในกรณีที่ตรวจไม่พบตัวอสุจิจากสิ่งส่งตรวจแม้จะมีน้ำอสุจิ ซึ่งอาจมีสาเหตุหลายอย่าง เช่น ภาวะหมันทั้งไม่มีตัวอสุจิ (azoospermia) หรือมีตัวอสุจิน้อย (oligospermia) จึงจำเป็นจะต้องทำการตรวจหาส่วนประกอบอื่น ๆ ของน้ำอสุจิแทนวิธีการที่เป็นที่นิยมมากที่สุดในปัจจุบันก็คือ การตรวจหาเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเตส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่หลั่งออกมาจากต่อมลูกหมาก มีการศึกษาพบว่า เทคนิคนี้มีความไวในการตรวจสารละลายเจือจางประมาณ 1:100,000 จากปริมาณตัวอย่างตั้งต้น 50 ไมโครลิตรได้[5] แต่การตรวจด้วยวิธีดังกล่าวก็ยังถือเป็นการตรวจในระดับคัดกรองเท่านั้นเนื่องจากไม่ได้มีความจำเพาะต่อน้ำอสุจิเท่านั้น แต่สามารถให้ผลบวกลวงกับสารเคมีประเภทอื่น ๆ ได้อีกเป็นจำนวนมาก

**สารคัดหลั่งจากช่องคลอด**

การตรวจเพื่อระบุชนิดของสารคัดหลั่งว่าเป็นสารคัดหลั่งจากช่องคลอดนั้นนิยมทำโดยการตรวจหาเซลล์ผนังช่องคลอดในสิ่งส่งตรวจด้วยวิธี Lugol's staining โดยทำการย้อมสีเซลล์ผนังช่องคลอดซึ่งมีไกลโคเจนอยู่ในปริมาณมากแล้วตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ แต่ปริมาณไกลโคเจนในเซลล์เยื่อบุผนังช่องคลอดนั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงระดับตามรอบประจำเดือนของสตรีส่งผลให้การทดสอบนี้ไม่น่าเชื่อถือมากนัก และยังให้ผลลบปลอมได้ง่าย นอกจากนี้การทดสอบนี้ยังสามารถให้ผลบวกลวงจากตัวอย่างปัสสาวะ เยื่อบุกระพุ้งแก้มและอวัยวะเพศชายได้อีกด้วย[6]

การทดสอบในระดับยืนยัน (confirmatory Test) เพื่อยืนยันชนิดสารคัดหลั่งที่นิยมใช้ในปัจจุบัน เช่น Crystal Test, RSID™-blood test, ABAcard® HemaTrace test strip, RSID™-saliva test, RSID™-Semen test เป็นต้น มีการศึกษาพบว่าชุดทดสอบส่วนใหญ่มีความไวสามารถตรวจตัวอย่างที่มีความเจือจางได้ 1:400[7] จะเห็นได้ว่าวิธีการทดสอบเหล่านี้ยังมีข้อจำกัดด้านความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ที่อยู่ในระดับต่ำ อีกทั้งยังสามารถเกิดผลบวกลวงได้ในการทดสอบ จึงไม่สามารถทำการตรวจวิเคราะห์ได้ในกรณีที่ต้องการความแม่นยำของผลการตรวจในระดับสูงอีกทั้งยังมีข้อจำกัดที่สำคัญของวิธีการตรวจแบบดั้งเดิมดังนี้

1. จำเป็นที่จะต้องทำการทดสอบโดยการใช้แต่ละเทคนิควิธีการแยกกันคราวละหนึ่งวิธีเท่านั้น ส่งผลให้ต้องสูญเสียตัวอย่างสิ่งส่งตรวจเป็นจำนวนมากในการทดสอบ[8]

2. ไม่สามารถทำการตรวจวิเคราะห์ได้ในกรณีที่สิ่งส่งตรวจเสื่อมสภาพ (degraded)

3. สิ่งส่งตรวจที่ผ่านการทดสอบด้วยปฏิกิริยาเคมีในรูปแบบต่าง ๆ มาก่อนหน้าแล้ว ไม่สามารถนำมาใช้ในการตรวจดีเอ็นเอสำหรับการตรวจระบุตัวบุคคลได้อีกต่อไป

**แนวคิดในการประยุกต์ใช้การตรวจวิเคราะห์ mRNA สำหรับการระบุชนิดของเนื้อเยื่อและสารคัดหลั่ง**

ความก้าวหน้าในทางนิติพันธุศาสตร์ได้นำไปสู่การพัฒนาวิธีการใหม่ ๆ ในหลากหลายรูปแบบ โดยการนำความรู้ และเทคนิคทางอณูชีววิทยามาประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างทางชีวภาพ เช่น การระบุความสัมพันธ์ทางสายโลหิต (kinship analysis) การพิสูจน์ความเป็นบิดามารดาและบุตร (paternity testing) และการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล (personal identification) ซึ่งการตรวจวิเคราะห์ที่เราคุ้นเคย และรับทราบกันดีเหล่านี้มักจะเป็นการตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมในส่วนที่เรียกว่าดีเอ็นเอ ทั้งดีเอ็นเอที่อยู่ภายในนิวเคลียส (nuclear DNA) และในไมโตคอนเดรีย (mitochondrial DNA) แต่ผลการตรวจจากดีเอ็นเอนี้ไม่สามารถระบุแยกแยะชนิดของชีววัตถุพยานได้ว่าเป็น เซลล์ผิวหนัง น้ำลาย น้ำอสุจิ หรือ เลือด ซึ่งการระบุยืนยันชนิดของชีววัตถุพยานนั้นอาจจะมีความสำคัญยิ่งยวดในการใช้เป็นพยานหลักฐานสำหรับการกระทำความผิดในบางกรณี

ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาใช้สำหรับการตรวจระบุชนิดของเนื้อเยื่อ และสารคัดหลั่งจากร่างกายมนุษย์ อีกทั้งยังสามารถใช้สิ่งส่งตรวจเดียวกันนี้ในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอเพื่อระบุยืนยันตัวบุคคลต่อไปได้ด้วย โดยเทคนิคทางชีวโมเลกุลเหล่านี้เริ่มต้นมาจากแนวคิดที่ว่าในเนื้อเยื่อ และเซลล์แต่ละชนิดจะมีระดับการแสดงออกของยีน (gene expression) ที่แตกต่างกัน ระดับของการแสดงออกที่แตกต่างกันนี้นำไปสู่การสังเคราะห์โปรตีน และการทำหน้าที่ที่แตกต่างกันของแต่ละเนื้อเยื่อ ชีวโมเลกุลที่เป็นตัวบ่งบอกถึงระดับการแสดงออกของยีนและพบว่ามีความจำเพาะเจาะจงต่อชนิดของเนื้อเยื่อ และเซลล์แต่ละชนิดนี้ได้แก่ กรดไรโบนิวคลีอิก (RNA) ซึ่งเป็นโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมทางชีวภาพต่าง ๆ ของเซลล์สำหรับชนิดของกรดไรโบนิวคลีอิก (RNA) ที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้แก่ microRNA (miRNA), circular RNA (circRNA) และ messenger RNA (mRNA) แต่อาร์เอ็นเอที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ง่ายได้ผลลัพธ์ที่แม่นยำ และเป็นที่นิยมสำหรับใช้ในการตรวจระบุชนิดของเนื้อเยื่อ และสารคัดหลั่งมากที่สุดคือ messenger RNA[9] แต่การตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมโดยการใช้ปฏิกิริยา PCR โดยทั่วไปนั้น ไม่สามารถใช้ในการวิเคราะห์เอ็มอาร์เอ็นเอได้ จึงจำเป็นจะต้องประยุกต์ใช้วิธีการที่มีความซับซ้อนมากขึ้น ได้แก่ การใช้ปฏิกิริยา Reverse Transcription และ Qualitative Real-time PCR เข้ามามีส่วนช่วย

เดิมการตรวจวิเคราะห์อาร์เอ็นเอ ไม่นิยมนำมาประยุกต์ใช้ในทางนิติเวชศาสตร์เนื่องจากความเชื่อเกี่ยวกับความไม่เสถียรของโมเลกุลอาร์เอ็นเอซึ่งเป็นโพลีนิวคลีโอไทด์สายเดี่ยวที่เสื่อมสลายได้โดยง่ายแต่ในช่วงสองถึงสามทศวรรษที่ผ่านมาได้มีการพัฒนาเทคโนโลยีในการตรวจวิเคราะห์ที่ดีขึ้น และแม่นยำมากขึ้น ส่งผลให้มีการศึกษาวิจัยจำนวนมากที่แสดงให้เห็นว่าสามารถทำการตรวจวิเคราะห์อาร์เอ็นเอได้ในวัตถุพยานทางนิติเวชศาสตร์ที่ถูกทิ้งไว้ในสภาวะแวดล้อมที่เสี่ยงต่อการเสื่อมสลาย เช่น งานวิจัยที่สามารถ

ตรวจพบเอ็มอาร์เอ็นเอ ได้จากคราบน้ำลายที่ถูกทิ้งไว้อย่างน้อย 365 วัน และจากสารคัดหลั่งจากช่องคลอดที่ถูกทิ้งไว้อย่างน้อย 547 วัน ในอุณหภูมิห้อง[10] การศึกษาวิจัยที่สามารถตรวจพบเอ็มอาร์เอ็นเอที่เป็น Hemoglobin marker (HBA และ HBB) ในคราบเลือดที่มีอายุ 30 และ 50 ปี[11] และการตรวจพบ mRNA markers ของน้ำอสุจิ และน้ำลายในตัวอย่างที่ถูกทิ้งไว้นานถึง 71 สัปดาห์ในสภาพแวดล้อมที่แห้ง และชื้นอย่างรุนแรง[12] และจากการศึกษาความไวของการใช้เอ็มอาร์เอ็นเอในการตรวจเพื่อระบุชนิดสารคัดหลั่งพบว่าสามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณอาร์เอ็นเอในระดับที่น้อยมาก คือ ระดับน้อยกว่า 200 พิโคกรัม –12 นาโนกรัม/ไมโครลิตร[13] ซึ่งปริมาณดังกล่าวเหมาะสมอย่างยิ่งสำหรับงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ เนื่องจากสารคัดหลั่งที่เก็บได้จากที่เกิดเหตุหรือวัตถุพยานมักจะมีปริมาณประมาณ 50 ไมโครลิตร ซึ่งจะมีปริมาณอาร์เอ็นเออยู่หลายร้อยนาโนกรัมถึงแม้จะเป็นคราบสารคัดหลั่งที่มีอายุนานแล้วก็ตาม[14] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับ specificity ของ mRNA marker เพื่อการระบุชนิดสารคัดหลั่งพบว่าไม่มีผลบวกลวงแต่อย่างใด[15] อีกทั้งเทคนิคการวิเคราะห์อาร์เอ็นเอและการศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของยีน ที่จำเพาะต่อเนื้อเยื่อนี้ยังสามารถพัฒนาต่อยอดไปใช้ในการประเมินอายุของชีววัตถุพยานบางประเภทได้อีกด้วย[16-17]

**Messenger RNA กับการตรวจเพื่อระบุยืนยันชนิดของเนื้อเยื่อและสารคัดหลั่ง**

แม้ว่าในทุก ๆ เซลล์ของมนุษย์หนึ่งคนจะมีดีเอ็นเอที่เหมือนกันทั้งหมด (ยกเว้นเซลล์สืบพันธุ์) แต่เซลล์ต่างชนิดกันในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของร่างกายมนุษย์ก็จะมีรูปร่าง และหน้าที่ที่แตกต่างกันไป อันเป็นผลมาจากการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกัน ระดับการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันนี้ก็จะส่งผลให้แต่ละเนื้อเยื่อมีการสร้างโปรตีนที่แตกต่างกัน การสังเคราะห์โปรตีนที่แตกต่างกันของเซลล์แต่ละชนิดนี้ควบคุมผ่านกระบวนการสังเคราะห์เอ็มอาร์เอ็นเอที่เกิดขึ้นภายในนิวเคลียส

Messenger RNA เป็นกรดนิวคลีอิกสายเดี่ยวท่อนสั้น ๆ ซึ่งแตกต่างจากดีเอ็นเอที่เป็นสายคู่เส้นยาวขนาดใหญ่ เอ็มอาร์เอ็นเอจะสามารถพบได้ทั้งในนิวเคลียส และไซโตพลาสซึมโดยจะถูกสังเคราะห์ขึ้นภายในนิวเคลียสด้วยกระบวนการ transcription ถอดรหัสข้อมูลจากสายดีเอ็นเอในส่วนที่เป็นยีน และด้วยการที่เอ็มอาร์เอ็นเอมีลักษณะเป็นนิวคลีโอไทด์สายเดี่ยวท่อนสั้นจึงสามารถเคลื่อนที่ทะลุผนังกั้นนิวเคลียสออกมาสู่ไซโตพลาสซึมได้ แตกต่างจาก nuclear DNA ซึ่งจะอยู่เฉพาะภายในนิวเคลียสเท่านั้น หน้าที่ของเอ็มอาร์เอ็นเอ จึงเป็นเสมือนกับแม่พิมพ์ต้นแบบในการแปลรหัสพันธุกรรมจากสายดีเอ็นเอให้เกิดมีการสังเคราะห์โปรตีนชนิดต่าง ๆ ขึ้นโดยกระบวนการแปลรหัส (translation) ซึ่งจะเกิดขึ้นที่ไรโบโซมซึ่งอยู่อย่างอิสระในไซโตพลาสซึมหรือเกาะติดอยู่ที่ rough endoplasmic reticulum (RER) จากความรู้พื้นฐานดังกล่าวจึงสามารถนำคุณสมบัติของอาร์เอ็นเอนี้มาประยุกต์ใช้ในการตรวจระบุชนิดของเนื้อเยื่อ และสารคัดหลั่งด้วยการตรวจวิเคราะห์ tissue-specific mRNA

การตรวจจำแนกชนิดของเนื้อเยื่อ และสารคัดหลั่งด้วย mRNA marker มีข้อดีคือมีความจำเพาะสูง (high specificity) เนื่องจากการแสดงออกของยีนบางชนิดจะมีความจำเพาะกับเซลล์แต่ละชนิดและมีความไวของการตรวจสูง (high sensitivity) จากการตรวจวิเคราะห์โดยใช้ปฏิกิริยา PCR ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณของเอ็มอาร์เอ็นเอในหลอดทดลองให้มากขึ้นเป็นล้านเท่าได้ในระยะเวลาเพียง 1 ถึง 2 ชั่วโมง

**วิธีการตรวจวิเคราะห์ mRNA marker ในปัจจุบัน**

การตรวจวิเคราะห์ mRNA markers เพื่อระบุชนิดของตัวอย่างชีวภาพเริ่มพัฒนาขึ้นตั้งแต่ปี ค.ศ. 1999 โดย Baue และคณะได้เริ่มทำการตรวจเพื่อแยกความแตกต่างระหว่างเลือดประจำเดือน และเลือดปกติเป็นผลสำเร็จ[18] ต่อมาจึงได้มีคณะผู้ทำการศึกษาวิจัยอื่น ๆ ทำการศึกษาวิจัยเพื่อขยายขอบเขตของชนิดสิ่งส่งตรวจ และพัฒนาความจำเพาะความไวของวิธีการตรวจเรื่อยมา จนกระทั่งปัจจุบันสามารถทำการตรวจวิเคราะห์ mRNA markers ชนิดต่าง ๆ เพื่อระบุชนิดของเนื้อเยื่อ และสารคัดหลั่งจากร่างกายได้อย่างหลากหลายโดยมี mRNA markers ที่สำคัญ และเป็นที่นิยมตามตารางที่ 1 ดังนี้

**ตารางที่ 1** mRNA markers ที่ใช้ในการระบุชนิดของสารคัดหลั่งในงานด้านนิติพันธุศาสตร์[19]

| Body Fluid | Gene | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Blood | SPTB | HBB | AMICA1 | C1QR1 | MNDA | GlycoA |
| | PBGD | ALAS2 | AQP9 | C5R1 | NCF2 | |
| | HBA | ALOX5AP | ARHGAP26 | CASP1 | CD3G | |
| Menstrual blood | MMP11 | MMP10 | | | | |
| | MMP7 | | | | | |
| Saliva | STATH | HTN1 | PRB4 | SPRR3 | KRT6A | |
| | HTN3 | PRB1-3 | SPRR1A | KRT4 | KRT13 | |
| Semen | PSA | PRM2 | | | | |
| | PRM1 | SEMG1 and SEM2 | | | | |
| Vaginal secretions | HBD1 | ESR1 | Lactobacillus crispatus | | | |
| | MUC4 | Lactobacillus gasseri | | | | |
| Sweat | DCD | | | | | |
| | CDSN | | | | | |
| Skin | LOR | | | | | |
| | KRT9 | | | | | |
| Seminal fluid | TGM4 | | | | | |
| Reference genes | ACTB | 18S rRNA | UCE | Ribosomal protein S15 | | |
| | GAPDH | TEF | G6PDH | | | |

**Endpoint RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)**

ดังที่ได้กล่าวไว้แล้วในเบื้องต้นว่าโมเลกุลของอาร์เอ็นเอมีลักษณะเป็นโพลีนิวคลีโอไทด์สายเดี่ยว จึงจำเป็นจะต้องทำการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์สายคู่ซึ่งถอดแบบแม่พิมพ์มาจากอาร์เอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการนิวคลีโอไทด์สายคู่ซึ่งสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่นี้เรียกว่า Complementary DNA (cDNA) โดยเกิดขึ้นจากการนำอาร์เอ็นเอแม่พิมพ์ตั้งต้น (RNA template) มาทำปฏิกิริยา Reversed Transcription ให้เกิดการสังเคราะห์ cDNA ขึ้นจากนั้นจึงจะใช้ cDNA ที่สังเคราะห์ได้นี้เป็นแม่พิมพ์สำหรับทำปฏิกิริยา PCR ต่อไป โดยทำการเพิ่มปริมาณ (amplification) ตามจำนวนวงรอบ (cycle) จนครบตามที่กำหนด PCR-product ที่เกิดขึ้นภายหลังจากการสิ้นสุดกระบวนการเพิ่มปริมาณนี้ (end point) จึงจะถูกนำมาวัดวิเคราะห์ต่อไปด้วยวิธีการต่างๆ เช่น gel electrophoresis[12] หรือ capillary electrophoresis (CE)[15]

การตรวจวิเคราะห์อาร์เอ็นเอด้วยเทคนิค และวิธีการในลักษณะนี้จะได้ผลดี และมีความแม่นยำสูงก็ต่อเมื่อสามารถทำการสกัดแยกอาร์เอ็นเอออกมาจากสิ่งส่งตรวจได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่งผลให้มีการพัฒนาวิธีการสกัดหลากหลายวิธีในปัจจุบันแต่วิธีการที่ได้รับความนิยมเป็นพิเศษ ได้แก่ การใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปที่สามารถแยกดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอออกมาจากสิ่งส่งตรวจได้พร้อม ๆ กัน นอกจากนี้ก็ยังมีชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่ใช้สำหรับสกัดอาร์เอ็นเอโดยเฉพาะด้วยเทคนิค coated magnetic beads หรือเทคนิค silica based ซึ่งนิยมใช้สำหรับงานวิจัยด้านพันธุศาสตร์ที่ตรวจระดับการแสดงออกของยีนโดยเฉพาะ อีกทั้งในทุกขั้นตอนของห้องปฏิบัติการจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทำความสะอาดพื้นที่ และภาชนะที่ใช้ทุกชนิดให้ปราศจากการปนเปื้อนของสารต่าง ๆ ที่อาจทำลายอาร์เอ็นเอและสารละลายที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์จะต้องได้รับการรับรองมาตรฐานว่าปราศจาก RNase/DNase และ Nuclease

**Quantitative Realtime RT-PCR**

ในปัจจุบันการตรวจวิเคราะห์ mRNA markers ในเชิงปริมาณสำหรับการศึกษา และวิจัยในหลากหลายรูปแบบนิยมใช้เทคนิค Quantitative Realtime RT-PCR โดยจะทำการเพิ่มปริมาณนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการศึกษาอย่างจำเพาะเจาะจงเช่นเดียวกับกระบวนการ endpoint PCR แต่มีความแตกต่างกันตรงที่จะมีการติดตามวัดปริมาณการเพิ่มของนิวคลีโอไทด์เป้าหมายในทุก ๆ วงรอบของกระบวนการ PCR ในขณะที่ปฏิกิริยากำลังดำเนินอยู่ตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งสิ้นสุดปฏิกิริยา (real-time detection) โดยใช้ตัวตรวจจับ (probe) ร่วมกับนิวคลีโอไทด์ต้นแบบ (Primer) 1 คู่ ที่ถูกออกแบบมาให้มีความจำเพาะเจาะจงอย่างมากต่อ

นิวคลีโอไทด์เป้าหมายที่ต้องการจะตรวจ คุณสมบัติของ probe ที่นิยมใช้กันคือจะมีการติดฉลากสี Fluorescence เอาไว้ที่ probe ฉลากเหล่านี้จะเรืองแสงขึ้นเมื่อ primer เกิดมีการทำปฏิกิริยากับนิวคลีโอไทด์เป้าหมาย การวัดปริมาณของนิวคลีโอไทด์เป้าหมายในสิ่งส่งตรวจอาศัยการตรวจวัดสัญญาณสารเรืองแสงที่ถูกปล่อยออกมานี้ โดยความเข้มของแสงที่วัดได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณนิวคลีโอไทด์ที่เพิ่มขึ้นจากปฏิกิริยา PCR ในแต่ละวงรอบ

การใช้งานในเชิงวิเคราะห์ปริมาณด้วย Real time RT-PCR จำเป็นจะต้องมี Reference gene สำหรับการปรับเทียบ (calibrate) เพื่อให้ได้ผลลัพธ์ที่แม่นยำ โดย reference gene ที่นิยมนำมาใช้สำหรับการศึกษานิยมเลือกยีนที่มีการแสดงออกตลอดเวลา (house-keeping gene) เช่น GAPDH, UCE, G6PD และ 18SRNA[19] จะเห็นได้ว่าการตรวจวิเคราะห์อาร์เอ็นเอไม่ว่าจะเป็นเทคนิค endpoint RT-PCR หรือ realtime RT-PCR ต่างก็ต้องทำการสังเคราะห์ cDNA เสียก่อนจึงจะสามารถทำการเพิ่มปริมาณนิวคลีโอไทด์ด้วยปฏิกิริยา PCR ได้ ทำให้ในปัจจุบันเริ่มมีการปรับปรุงผลิตภัณฑ์รูปแบบใหม่ ๆ ที่สามารถสังเคราะห์ cDNA และทำ PCR ในหลอดปฏิกิริยาเดียวกันได้ (one-step qRT-PCR)[20] ถึงแม้ว่าความไว (sensitivity) ของผลิตภัณฑ์แบบใหม่นี้จะน้อยกว่าการทำปฏิกิริยาแบบ two-step แต่ก็นับว่ามีความซับซ้อนน้อยกว่า รวดเร็วกว่า และสามารถลดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อน ดังนั้นจึงเหมาะสำหรับการตรวจคัดกรองตัวอย่างที่มีจำนวนมาก และต้องการผลการตรวจที่รวดเร็วในปัจจุบันพบว่าทั้ง end point RT-PCR และ realtime RT-PCR ต่างก็ยังถูกใช้เป็นวิธีการหลักสำหรับการวัดระดับการแสดงออกของยีน หรือวัดปริมาณนิวคลีโอไทด์เป้าหมาย โดยบางงานวิจัยเชื่อว่าเทคนิค realtime RT-PCR มีความไว และความจำเพาะมากกว่า end-point RT-PCR[21] แต่ก็มีบางงานวิจัยที่อ้างว่าความไวของทั้งสองเทคนิคนี้ใกล้เคียงกัน[18]

**Massive parallel หรือ Next-generation Sequencing**

Massive parallel sequencing (MPS) เป็นเทคโนโลยีการหาลำดับเบสที่พัฒนาขึ้นใหม่ มีความสามารถในการระบุลำดับเบสของนิวคลีโอไทด์ได้อย่างรวดเร็วในปริมาณมาก ๆ (high-throughput) และมีความไวสูงในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของสารพันธุกรรม (high sensitivity) ทำให้เป็นเทคนิคที่นิยมนำมาใช้สำหรับงานวิจัยปัจจุบันอย่างแพร่หลาย สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้หลายด้าน เช่น การหาลำดับเบสของอาร์เอ็นเอ (RNA-sequencing), การศึกษาความหลายหลากของแบคทีเรีย Metagenomic sequencing (Metagenome) การหาลำดับเบสของสารพันธุกรรมทั้งหมด Whole genome sequencing (WGS), การเลือกอ่านเฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วน เช่น Exome sequencing, Targeted Sequencing และ panel sequencing รวมถึงการตรวจวิเคราะห์ Epigenome sequencingด้วย

การตรวจในงานด้านนิติเวชศาสตร์ก็เริ่มมีการนำเทคโนโลยี MPS มาใช้สำหรับการวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ในรูปแบบต่าง ๆ เช่น การตรวจวิเคราะห์ autosomal STR, autosomal SNP, Y หรือ X chromosome STR, Y SNPs หรือ mitochondrial sequence สำหรับการตรวจเพื่อระบุชนิดของสารคัดหลั่งนี้ก็ได้มีการประยุกต์นำเทคโนโลยี MPS มาใช้โดยอาศัยพื้นฐานหลักการการตรวจวิเคราะห์อาร์เอ็นเอตามที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น อีกทั้งยังสามารถระบุลำดับเบสของดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอจากตัวอย่างเดียวกันได้อีกด้วย[22] แต่เทคโนโลยีนี้ยังมีข้อจำกัดที่สำคัญคือ เครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ มีราคาค่อนข้างสูง และต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะในการวิเคราะห์ผลการตรวจ

ปัจจุบันยังไม่มีแนวทาง และเกณฑ์มาตรฐานสำหรับการตรวจวิเคราะห์ mRNA marker ในการระบุชนิดสารคัดหลั่งที่ชัดเจนในระดับสากลโดยเฉพาะอย่างยิ่งแนวทางในการแปลผลที่ยังคงแตกต่างกันในแต่ละประเทศ ยกเว้นกลุ่มประเทศ EU ซึ่งเริ่มมีการพัฒนาระบบการให้คะแนน (scoring) ความน่าเชื่อถือในการแปลผลโดยการวิเคราะห์ผลด้วย mRNA marker หลายตัวสำหรับการระบุสารคัดหลั่ง 1 ชนิด วิธีการตรวจแบบนี้ได้รับการนำไปใช้จริงในทางปฏิบัติและตีพิมพ์เผยแพร่แล้วในประเทศเนเธอร์แลนด์ โดย Netherlands Forensic Institute (NFI) ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2010[23] ปัจจุบันตัวอย่างที่เก็บได้จากคดีความผิดทางเพศทุกรายของ NFI จะได้รับการตรวจวิเคราะห์ mRNA marker อย่างไรก็ดียังไม่มีการเผยแพร่ตีพิมพ์การนำวิธีการตรวจวิเคราะห์ไปใช้ในคดีต่าง ๆ จริงในประเทศอื่น ๆ อย่างเป็นทางการ สำหรับในประเทศไทยยังไม่พบหน่วยงานใดที่เปิดให้บริการตรวจวิเคราะห์ระบุชนิดของสารคัดหลั่งโดยการใช้ mRNA marker

ในขั้นตอนของการสร้างแนวทางปฏิบัติสำหรับการตรวจวิเคราะห์เอ็มอาร์เอ็นเอด้วยเทคนิค qRT-PCR จำเป็นจะต้องมีการ normalisation reference genes ก่อนใช้งานจริงเพื่อให้ได้ผลการทดสอบที่น่าเชื่อถือโดยยึดถือตามแนวทางปฏิบัติ MIQE-guidelines (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) ซึ่งครอบคลุมตั้งแต่รายละเอียดของการเก็บตัวอย่าง การทดสอบความใช้ได้ของวิธีการทดสอบ (Validation method) การตั้งค่าต่าง ๆ สำหรับการทดสอบ และการวิเคราะห์ข้อมูล สำหรับการแปลผลการตรวจวิเคราะห์แบบ qRT-PCR ดังนั้นหากจะพัฒนา และนำ mRNA marker เพื่อระบุชนิดสารคัดหลั่งมาเป็นแนวทางมาตรฐานสำหรับประเทศไทยก็สมควรจะต้องสร้างวิธีปฏิบัติมาตรฐานตั้งแต่วิธีการสกัดอาร์เอ็นเอ การทดสอบแสดงออกของ mRNA การตรวจสอบความใช้ได้ของ Reference gene สำหรับการทำ qRT-PCR การวิเคราะห์ผล การแปรผล และการรายงานผล รวมทั้งการทำ Inter lab comparison ภายในเครือข่ายทางนิติพันธุศาสตร์

## สรุป (Conclusion)

การระบุชนิดของสารคัดหลั่งจากร่างกายมนุษย์ที่พบในสถานที่เกิดเหตุ และวัตถุพยานมีบทบาทสำคัญในการให้ความเห็นในทางนิติเวชอย่างยิ่ง เนื่องจากชนิด และที่มาของตัวอย่างสารคัดหลั่งที่ตรวจพบสามารถให้เบาะแสที่สำคัญในการเชื่อมโยง

รูปแบบในการกระทำความผิดทางอาญารวมทั้งสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ลำดับเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นได้เป็นอย่างดี ในปัจจุบันจึงได้มีการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ mRNA marker สำหรับการตรวจระบุชนิดสารคัดหลั่งเพื่อใช้ทดแทนวิธีการทดสอบแบบดั้งเดิมซึ่งไม่มีความจำเพาะต่อชนิดของสารคัดหลั่งและกระบวนการทดสอบยังทำลายตัวอย่างที่จะใช้ในการตรวจพิสูจน์ในขั้นตอนต่อ ๆ ไปอีกด้วย ข้อได้เปรียบที่สำคัญของการตรวจวิเคราะห์ mRNA markers เพื่อระบุชนิดของตัวอย่างชีวภาพ คือสามารถตรวจระบุแยกแยะสารคัดหลั่งได้หลายชนิดด้วยการทำปฏิกิริยาเพียงครั้งเดียว และยังสามารถทำการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอเพื่อระบุยืนยันตัวบุคคลโดยใช้ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจเดียวกันได้อีกด้วย การตรวจวิเคราะห์ mRNA marker คือการตรวจหาลำดับเบสของอาร์เอ็นเอเป้าหมายซึ่งได้มีการทดสอบแล้วว่ามีความจำเพาะต่อเนื้อเยื่อหรือสารคัดหลั่งแต่ละชนิด จึงถือได้ว่าเป็นการทดสอบในระดับยืนยัน (confirmatory method) นอกจากนี้ยังเป็นการตรวจวิเคราะห์ที่มีความไวสูงมาก จึงใช้ปริมาณสิ่งส่งตรวจเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เทคนิคทางห้องปฏิบัติการที่นิยมนำมาใช้สำหรับการตรวจ mRNA marker เพื่อระบุชนิดของสารคัดหลั่งในปัจจุบันได้แก่ การตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Endpoint RT-PCR, Quantitative Realtime RT-PCR และ Massive parallel หรือ Next-generation Sequencing ซึ่งมีความไว (sensitivity) สูงขึ้นเรียงตามลำดับและมีความจำเพาะในระดับยืนยันด้วยกันทั้งสิ้นเนื่องจากเป็นการตรวจหาลำดับเบสในอาร์เอ็นเอเป้าหมายแบบเดียวกันแต่เทคนิคเหล่านี้ก็ยังมีความยุ่งยากในการตรวจวิเคราะห์ และค่าใช้จ่ายมากขึ้นเรียงตามลำดับเช่นเดียวกัน

ในปัจจุบันวิธีการตรวจวิเคราะห์ mRNA marker เพื่อระบุชนิดของสารคัดหลั่งหรือเนื้อเยื่อจากตัวอย่างที่เก็บจากสถานที่เกิดเหตุ หรือวัตถุพยานเริ่มเป็นที่นิยมอย่างแพร่หลายในต่างประเทศ แต่ยังมิได้มีการใช้กันอย่างแพร่หลายนักสำหรับงานนิติเวชศาสตร์และนิติวิทยาศาสตร์ในประเทศไทยเนื่องด้วยข้อจำกัดด้านทรัพยากรและเกณฑ์มาตรฐานในการรายงานผล อีกทั้งยังมีสิ่งที่จำเป็นจะต้องทำ คือการทดสอบความเสถียรของ mRNA marker ในสิ่งส่งตรวจแต่ละประเภทในสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกันหากในอนาคตประเทศไทยสามารถใช้วิธีการวิเคราะห์ mRNA marker นี้ในการตรวจเพื่อระบุชนิดของเนื้อเยื่อ และสารคัดหลั่งจากร่างกายมนุษย์มาใช้ได้อย่างแพร่หลายก็น่าจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการตรวจพิสูจน์ทางนิติเวชศาสตร์ และนิติวิทยาศาสตร์สำหรับผู้ป่วยคดี และศพคดีของประเทศ

## References


1. Wasserstrom A, Frumkin D, Davidson A, Shpitzen M, Herman Y, Gafny R. Demonstration of DSI-semen-A novel DNA methylation-based forensic semen identification assay. Forensic Sci Int Genet 2013;7(1):136-42.
2. Johnston E, Ames CE, Dagnall KE, Foster J, Daniel BE. Comparison of presumptive blood test kits including hexagon OBTI. J Forensic Sci 2008;53(3):687-9.
3. Tröger HD, Schuck M, Tutsch-Bauer E. Nachweis von Speichelspuren Mittels Teststreifen [Detection of saliva traces using test strips]. Forensic Sci Int 1984;25(2):143-6.
4. Old JB, Schweers BA, Boonlayangoor PW, Reich KA. Developmental validation of RSID-saliva: a lateral flow immunochromatographic strip test for the forensic detection of saliva. J Forensic Sci 2009;54(4):866-73.
5. Allen SM. An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of seminal fluid using a monoclonal antibody to prostatic acid phosphatase. J Immunoassay 1995;16(3):297-308.
6. Hausmann R, Pregler C, Schellmann B. The value of the Lugol's iodine staining technique for the identification of vaginal epithelial cells. Int J Legal Med 1994;106(6):298-301.
7. Idris B, Goodwin WH. Evaluating the sensitivity of presumptive and confirmatory tests for body fluids. Forensic Sci Int Genet 2022;8:276-8.
8. Roeder AD, Haas C. Body fluid identification using mRNA profiling. Methods Mol Biol 2016;1420:13-31.
9. Sijen T. Molecular approaches for forensic cell type identification: On mRNA, miRNA, DNA methylation and microbial markers. Forensic Sci Int Genet 2015;18:21-32.
10. Setzer M, Juusola J, Ballantyne J. Recovery and stability of RNA in vaginal swabs and blood, semen, and saliva stains. J Forensic Sci 2008;53(2):296-305.
11. Zhao H, Wang C, Yao L, Lin Q, Xu X, Hu L, et al. Identification of aged bloodstains through mRNA profiling: Experiments results on selected markers of 30- and 50-year-old samples. Forensic Sci Int 2017;272:e1-e6.
12. Sirker M, Schneider PM, Gomes I. A 17-month time course study of human RNA and DNA degradation in body fluids under dry and humid environmental conditions. Int J Legal Med 2016; 130(6):1431-8.
13. Juusola J, Ballantyne J. Multiplex mRNA profiling for the identification of body fluids. Forensic Sci Int 2005;152(1):1-12.
14. Valore EV, Park CH, Quayle AJ, Wiles KR, McCray PB Jr, Ganz T. Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. J Clin Invest 1998;101:1633-42.
15. Haas C, Hanson E, Kratzer A, Bär W, Ballantyne J. Selection of highly specific and sensitive mRNA biomarkers for the identification of blood. Forensic Sci Int Genet 2011;5(5):449-58.
16. Manasatienkij C, Nimnual A. Forensic blood stain aging using reverse transcription real-time PCR. Forensic Science International: Reports 2021;3.

17. Alshehhi S, McCallum NA, Haddrill PR. Quantification of RNA degradation of blood-specific markers to indicate the age of bloodstains. Forensic Sci Int Genet 2017;6:e453-5.
18. Bauer M, Kraus A, Patzelt D. Detection of epithelial cells in dried blood stains by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. J Forensic Sci 1999;44(6):1232-6.
19. Jakubowska J, Maciejewska A, Pawłowski R. mRNA profiling in identification of biological fluids in forensic genetics. Problems of Forensic Sciences 2011;57:204-15.
20. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. Nat Protoc 2006;1(3):1559-82.
21. Nussbaumer C, Gharehbaghi-Schnell E, Korschineck I. Messenger RNA profiling: a novel method for body fluid identification by real-time PCR. Forensic Sci Int 2006;157(2-3):181-6.
22. Sulewska A, Niklinska W, Kozlowski M, Minarowski L, Naumnik W, Niklinski J, et al. Detection of DNA methylation in eucaryotic cells. Folia Histochem Cytobiol 2007;45(4):315-24.
23. van den Berge M, Maaskant-van Wijk PA, Sijen T, van Soest S, Ypma RJF. Weight of evidence from mRNA data: Implementation of an LR-system for forensic body fluid identification in casework. Forensic Sci Int Genet 2022;8:210-2.