



การตรวจยืนยันคราบน้ำอสุจิด้วยเทคนิค Real-time PCR

สมฤทัย สัตย์มัน วท.บ.^{1*}

ชัชวิน ระวังภัย พ.บ., ว.ว. (นิติเวชศาสตร์), อ.ว. (เวชศาสตร์ครอบครัว)^{1*}

ชัยรัตน์ มานะเสถียรกิจ พ.บ., ว.ว. (นิติเวชศาสตร์), Dr.Med (นิติพิษวิทยา)²

¹ ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ประเทศไทย

² งานนิติเวชวิทยา กลุ่มงานพยาธิวิทยา โรงพยาบาลราชวิถี กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ประเทศไทย

* ผู้ติดต่อ, อีเมล: chachawin.rng@gmail.com

Vajira Med J 2016; 60(1): 43-52

<http://dx.doi.org/10.14456/vmj.2016.3>

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาความจำเพาะของเทคนิค real-time PCR ในการตรวจยืนยันคราบน้ำอสุจิทางนิติเวชศาสตร์

วิธีดำเนินการวิจัย: ผู้วิจัยเก็บตัวอย่างเลือด น้ำลายและน้ำอสุจิจากอาสาสมัครจำนวน 18 ราย ตัวอย่างทั้งหมด 54 ตัวอย่างได้รับการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ (forensic DNA typing) และเอ็มอาร์เอ็นเอ (messenger RNA;mRNA) โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป GlobalFiler® PCR amplification และการตรวจวิเคราะห์ mRNA ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบความจำเพาะของยีนโปรตามีนทู (Protamine 2 gene; PRM2) ต่อตัวอสุจิโดยใช้ยีนบีตาทูโมโครโกลบูลิน (β -2-microglobulin gene; B2M) เป็นตัวควบคุมคุณภาพภายในของการตรวจวิเคราะห์

ผลการวิจัย: รูปแบบสารพันธุกรรม (forensic DNA profile) ของตัวอย่างเลือด น้ำลาย และน้ำอสุจิจากอาสาสมัครรายเดียวกันมีรูปแบบสารพันธุกรรมที่ตรงกันทุกประการ ตัวอย่างเลือด น้ำลายและน้ำอสุจิทั้ง 54 ตัวอย่างมีการแสดงออกของยีน B2M ทุกตัวอย่าง และมีเพียงตัวอย่างน้ำอสุจิเท่านั้นที่มีการแสดงออกของยีน PRM2

สรุป: ยีน PRM2 มีประสิทธิภาพสูงในการเป็นตัวบ่งชี้ที่มีความจำเพาะต่ออสุจิ และเทคนิค real-time PCR เป็นเทคนิคที่มีความเหมาะสมอย่างยิ่งในการนำมาใช้ตรวจยืนยันคราบน้ำอสุจิในสิ่งส่งตรวจทางนิติเวชศาสตร์



Confirmatory Semen Detection Using Real-Time PCR Technique

Somruetai Satmun BSc¹

Chachawin Rangabphai MD^{1*}

Chairat Manasatienkij MD, Dr.Med (Forensic Toxicology)²

¹ Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University

² Forensic Medicine Division, Department of Pathology, Rajavithi Hospital, Department of Medical Services, Ministry of Public Health

* Corresponding author, email address: chachawin.rng@gmail.com

Vajira Med J 2016; 60(1): 43-52

<http://dx.doi.org/10.14456/vmj.2016.3>

Abstract

Objective: To study the specificity of real-time PCR technique for confirmatory semen detection

Methods: Eighteen samples each of blood, saliva, and semen were collected from 18 male volunteers. All 54 samples were subjected to forensic DNA typing and mRNA analysis. DNA templates were amplified using the GlobalFiler[®] PCR amplification kit. For mRNA analysis protamine 2 (PRM2), a sperm specific gene, was analyzed using β -2-microglobulin gene (B2M), a cellular housekeeping gene, as the internal control.

Results: DNA profiles of all blood, saliva and semen samples from the same volunteers demonstrated exactly similar profiles. For mRNA analysis, B2M was expressed in all 54 samples but only the 18 semen samples showed specific amplification with PRM2.

Conclusions: PRM2 gene was a very effective marker for semen identification. Real-time PCR technique could be suitable for confirmatory detection of semen in medico-legal trace evidence collection.

Keywords: Real-time PCR, Messenger RNA, Protamine 2, Spermatozoa, DNA analysis

บทนำ

ในปัจจุบันการตรวจวัดอุทยานที่ได้จากผู้ป่วยคดีความผิดทางเพศที่มีความสำคัญที่สุดคือการตรวจเพื่อยืนยันคราบน้ำอสุจิ เพื่อหาตัวอสุจิหรือส่วนประกอบของน้ำอสุจิโดยการตรวจเพื่อยืนยันว่าเป็นน้ำอสุจินั้นสามารถตรวจได้หลายวิธีด้วยกัน เช่น การตรวจหาเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเตส (acid phosphatase) การตรวจหาโปรสแตสเปซิฟิกแอนติเจน (prostate-specific antigen) และการย้อมสีพิเศษชนิดต่าง ๆ เพื่อตรวจหาตัวอสุจิภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การตรวจหาเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเตสนั้นเป็นการตรวจในระดับคัดกรอง มีความแปรปรวนในการแปลผลสูง และมีการกำหนดระยะเวลาในการอ่านและแปลผลจึงอาจทำให้เกิดผลลบปลอมได้¹⁻³ และแม้ว่าเอนไซม์ชนิดนี้มีความเข้มข้นสูงในน้ำอสุจิ แต่ยังสามารถตรวจพบเอนไซม์ชนิดนี้ได้ในอุจจาระและพืชหลายชนิดส่งผลให้เกิดผลลบปลอมได้เช่นกัน⁴ สำหรับการตรวจหาโปรสแตสเปซิฟิกแอนติเจนจะให้ผลลบภายใน 48 ชั่วโมงหลังจากมีการหลั่งน้ำอสุจิ ดังนั้นหากมีการตรวจเกิดขึ้นหลังจาก 48 ชั่วโมงอาจทำให้เกิดผลลบปลอมได้⁵ ในการตรวจหาตัวอสุจิด้วยกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานอาศัยหลักการย้อมสีพิเศษชนิดต่าง ๆ โดยวิธีการนี้ยังมีปัจจัยที่มีผลทำให้การตรวจพบตัวอสุจิลดลงคือ ระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างและปริมาณของตัวอสุจิ⁶ นอกจากนี้ในกรณีที่ เป็นน้ำอสุจิของผู้ที่มีความผิดปกติ เช่น ผู้ที่เป็นหมันอาจตรวจไม่พบตัวอสุจิ ทำให้เกิดความผิดพลาดในการแปลผลได้ ซึ่งในกรณีนี้จำเป็นต้องทำการทดสอบอย่างอื่นร่วมด้วยจึงจะสามารถแปลผลได้

จากเหตุผลที่กล่าวมาข้างต้นประกอบกับในขณะนี้ประเทศไทยยังไม่มีมีการตรวจยืนยันคราบน้ำอสุจิที่เป็นการตรวจในระดับยืนยัน ซึ่งจากงานวิจัยในต่างประเทศมีการนำความรู้และเทคนิคทางอณูชีววิทยามาประยุกต์ใช้กับงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ในการตรวจพิสูจน์ตัวอย่างทางชีวภาพ เช่น เลือด น้ำลาย น้ำอสุจิ เป็นต้น โดยเทคนิคที่นำมาใช้เป็นการตรวจในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอ เพื่อระบุถึงแหล่งที่มาของตัวอย่างทางชีวภาพนั้น ๆ โดยมีการศึกษาพบว่าเทคนิค multiplex reverse transcriptase polymerase chain reaction (multiplex RT-PCR) สามารถระบุได้ว่าของเหลวที่นำมาตรวจวิเคราะห์มีน้ำอสุจิและเลือดปนอยู่ร่วมกัน⁷ และ

ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับการตรวจยืนยันคราบน้ำอสุจิ โดยการตรวจวิเคราะห์ยีนโปรตามีนวันร่วมกับยีนโปรตามีนทูด้วยเทคนิค multiplex quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (multiplex quantitative RT-PCR)⁸ และเทคนิค multiplex RT-PCR⁹ พบว่ายีนทั้ง 2 ชนิดมีความจำเพาะต่อตัวอสุจิและยีนนี้ไม่ให้ผลบวกกับตัวอย่างอื่นนอกจากน้ำอสุจิอีกด้วย

กลุ่มของยีนโปรตามีนอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 16 ของมนุษย์¹⁰ ประกอบด้วยยีนโปรตามีนวัน (protamine1; PRM 1) ยีนโปรตามีนทู (protamine2; PRM2) ยีน gene4 และยีน TNP2¹¹ โดยยีนโปรตามีนวัน และยีนโปรตามีนทูทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีนโปรตามีนวัน (P1) และกลุ่มของโปรตีนโปรตามีนทู (P2) ตามลำดับ ซึ่งโปรตีนโปรตามีนวันพบได้ในสัตรีที่มีกระดูกสันหลังทุกชนิดและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม^{10, 12-14} ส่วนโปรตีนโปรตามีนทูพบได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมบางชนิด เช่น มนุษย์ และหนู^{10, 12, 14-16}

ในช่วงท้ายของกระบวนการ spermiogenesis จะมีการแทนที่ transition protein ด้วย phosphorylated protamine ทั้งโปรตีนโปรตามีนวันและโปรตีนโปรตามีนทูส่งผลให้ 85 เปอร์เซ็นต์ของดีเอ็นเออสุจิจับอยู่กับโปรตีนโปรตามีนในรูปของ nucleoprotamine complex และ 15 เปอร์เซ็นต์ของดีเอ็นเออสุจิจับกับฮิสโตนหรือโปรตีนชนิดอื่น ๆ¹⁷ ดีเอ็นเอของอสุจิจะหดตัวแน่นอยู่บริเวณส่วนหัวของอสุจิ หากมีปัจจัยภายนอกมารบกวนอาจส่งผลให้ตัวอสุจิมีความผิดปกติได้ ในบางกรณีที่ตัวอสุจิขาดโปรตีนโปรตามีนที่จับกับดีเอ็นเอจะทำให้เกิดความผิดปกติในขั้นตอน chromatin packaging ทำให้เป็นหมันได้

โปรตีนโปรตามีนที่อยู่ในรูปของ nucleoprotamine complex มีส่วนช่วยให้ตัวอสุจิเคลื่อนที่ได้เร็วขึ้น ซึ่งช่วยเพิ่มโอกาสในการผสมกับไข่ได้¹⁰ อีกทั้งยังช่วยป้องกันสารพันธุกรรมของอสุจิจากปัจจัยภายนอกที่สามารถทำลายสารพันธุกรรมได้¹⁸⁻²¹

จากการศึกษาในอดีดยีนโปรตามีนทูมีระดับการแสดงออกของยีน (mRNA transcript levels) มากกว่ายีนโปรตามีนวัน²² ประกอบกับมีการศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของยีนโปรตามีนทูในตัวอย่างสารคัดหลั่งจากร่างกายมนุษย์ชนิดต่าง ๆ โดยพบว่าในบางการศึกษาที่มีการ

แสดงออกของยีนโปรตามีนทูในตัวอย่างน้ำอสุจิ และไม่พบการแสดงออกของยีนโปรตามีนทูในตัวอย่างประเภทอื่น ๆ^{7, 9} เช่น เลือด (peripheral blood) เลือดประจำเดือน (menstrual blood) น้ำลาย สารคัดหลั่งจากช่องคลอด (vaginal secretion) เป็นต้น ขณะเดียวกันในบางการศึกษาพบว่ามีการแสดงออกของยีนโปรตามีนทูในตัวอย่างอื่นนอกเหนือจากน้ำอสุจิ^{8, 23} และยีนนี้ยังมีข้อจำกัดบางประการ เช่น ไม่พบการแสดงออกของยีนในตัวอย่างน้ำอสุจิที่ไม่มีตัวอสุจิ ซึ่งในปัจจุบันยังไม่เคยมีการทดสอบความไวและความจำเพาะของยีนโปรตามีนทูในประเทศไทย ผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการศึกษายีนดังกล่าว

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเชิงทดลอง

การคำนวณขนาดตัวอย่าง

จากการศึกษาในอดีตพบว่าเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริงสามารถนำมาใช้ในการตรวจยืนยันคราบน้ำอสุจิได้และมีความจำเพาะค่อนข้างสูง^{8,9} ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยจึงประมาณค่าความจำเพาะของเทคนิคนี้ในการตรวจยืนยันน้ำอสุจิเท่ากับร้อยละ 90 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เท่ากับ $90 \pm 10\%$ ซึ่งจากการคำนวณด้านล่างจะได้ n (จำนวนตัวอย่างที่ไม่ใช่น้ำอสุจิ) คือ 35 ตัวอย่าง

$$\begin{aligned} \text{จากสูตร } n &= \frac{Z_{\alpha/2}^2 pq}{d^2} \\ &= \frac{(1.96)^2 \times (0.9) \times (1-0.9)}{(0.1)^2} \\ &= 34.5744 \end{aligned}$$

ซึ่งจำนวน n คือ จำนวนตัวอย่างที่ไม่ใช่น้ำอสุจิ (ตัวอย่างเลือดและน้ำลาย) และเนื่องจากผู้วิจัยเก็บตัวอย่าง 3 ชนิดจากอาสาสมัครแต่ละราย ได้แก่ ตัวอย่างเลือด น้ำลายและน้ำอสุจิ ดังนั้นจำนวนอาสาสมัครจึงเท่ากับ 18 คน ($35 \div 2$)

เกณฑ์การคัดเข้า

อาสาสมัครเพศชายที่มีอายุระหว่าง 20-50 ปี เนื่องจากเป็นช่วงวัยเจริญพันธุ์ ไม่มีโรคประจำตัวและได้รับความยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษร

เกณฑ์การคัดออก

อาสาสมัครเพศชายที่มีความผิดปกติของระบบสืบพันธุ์ ซึ่งเป็นสาเหตุให้ไม่มีการหลั่งน้ำอสุจิหรือมีการหลั่งน้ำอสุจิแต่ไม่มีตัวอสุจิ

วิธีการวิจัย

การคำนวณขนาดตัวอย่างและกระบวนการเก็บตัวอย่างรวมถึงระเบียบวิธีวิจัยได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาลและได้รับความยินยอมจากอาสาสมัครอย่างถูกต้องตามหลักจริยธรรมการวิจัยในคนเรียบร้อยแล้ว

1. การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างเลือด: ใช้การเจาะบริเวณปลายนิ้วและใช้ไม้พันสำลีซับเลือดเป็นหยด ปล่อยให้ไม้พันสำลีแห้งที่อุณหภูมิห้องและเก็บในช่องกระดาษ

ตัวอย่างน้ำลาย: ให้อาสาสมัครบ้วนน้ำลายใส่ในภาชนะที่จัดเตรียมให้ จากนั้นหยดน้ำลายปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงบนไม้พันสำลี ปล่อยให้ไม้พันสำลีแห้งที่อุณหภูมิห้องและเก็บในช่องกระดาษ

ตัวอย่างน้ำอสุจิ: อาสาสมัครเป็นผู้เก็บน้ำอสุจิด้วยตนเอง โดยเก็บในภาชนะที่จัดเตรียมให้และนำส่งผู้วิจัย ซึ่งจะนำน้ำอสุจิหยดลงบนสไลด์ เพื่อตรวจหาตัวอสุจิภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อตรวจพบตัวอสุจิจะหยดน้ำอสุจิปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงบนไม้พันสำลี ปล่อยให้ไม้พันสำลีแห้งที่อุณหภูมิห้องและเก็บในช่องกระดาษ

2. การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอของตัวอย่างเลือด น้ำลายและน้ำอสุจิใช้ชุดสกัด NucleoSpin® Tissue XS ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาวัดปริมาณด้วยเครื่อง Micro UV-Vis Fluorescence Spectrophotometer จากนั้นนำตัวอย่างดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณในบริเวณที่สนใจจำนวน 24 ตำแหน่ง ได้แก่ CSF1PO, D3S1358, D5S818,

D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, FGA, TH01, TPOX, vWA, Y indel, Amelogenin, DYS391, D2S441, D19S433, D22S1045, SE33, D10S1248, D1S1656, D12S391 และ D2S1338 ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป GlobalFiler® PCR amplification โดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบจำนวน 2 นาโนกรัมในปฏิกิริยาปริมาตร 25 ไมโครลิตร ด้วยเครื่อง GeneAmp® PCR System 9700 จำนวน 28 รอบ มีการควบคุมคุณภาพด้วยดีเอ็นเอควบคุมคุณภาพเชิงบวก (DNA control 007 ความเข้มข้น 0.1 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) และตัวควบคุมคุณภาพเชิงลบ (negative control) นำตัวอย่างดีเอ็นเอและตัวควบคุมคุณภาพที่เพิ่มปริมาณเรียบร้อยแล้วมาตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง 3500xL genetic analyzer ควบคู่กับดีเอ็นเอมาตรฐาน (allelic ladder) โดยใช้ Hi-Di™ formamide จำนวน 9.6 ไมโครลิตร และ GeneScan™ 600 LIZ® size standard v2.0 จำนวน 0.4 ไมโครลิตร วิเคราะห์ผลด้วยซอฟต์แวร์ GeneMapper® ID-X เวอร์ชัน 1.4

3. การตรวจวิเคราะห์อาร์เอ็นเอ

การสกัดอาร์เอ็นเอของตัวอย่างเลือด น้ำลายและน้ำอสุจิใช้ชุดสกัด NucleoSpin® RNA ตามคำแนะนำของ บริษัทผู้ผลิต โดยใช้ Dithiothreitol ความเข้มข้น 1 โมลต่อลิตร ในการย่อยสลายเยื่อหุ้มเซลล์ อาร์เอ็นเอที่สกัดได้จะถูกวัดปริมาณด้วยเครื่อง Micro UV-Vis fluorescence spectrophotometer จากนั้นกำจัดดีเอ็นเอที่อาจปนเปื้อนมาจากกระบวนการสกัดโดยนำตัวอย่างอาร์เอ็นเอมาทำปฏิกิริยากับ genomic DNA wipeout buffer ตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่ได้จะเป็นแม่แบบในกระบวนการสังเคราะห์คอมพลีเมนต์ดีเอ็นเอ (complementary DNA) โดยใช้อาร์เอ็นเอแม่แบบจำนวน 2 นาโนกรัม ในปฏิกิริยาปริมาตร 20 ไมโครลิตร ของชุดน้ำยาสำเร็จรูป QuantiTect® reverse transcription ซึ่งประกอบด้วยไพรเมอร์ชนิด random, oligo dT ตีออกซินิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต เอนไซม์รีเวิร์สทรานสคริปเตสและบัฟเฟอร์ มีการควบคุมคุณภาพด้วยตัวควบคุมคุณภาพเชิงลบ 2 ชนิด คือ ตัวควบคุมคุณภาพเชิงลบที่ไม่เติมเอนไซม์รีเวิร์สทรานสคริปเตสในปฏิกิริยา และตัวควบคุมคุณภาพเชิงลบที่ไม่เติมอาร์เอ็นเอแม่แบบในปฏิกิริยา เมื่อสิ้นสุดกระบวนการสังเคราะห์จะได้คอมพลีเมนต์ดีเอ็นเอ

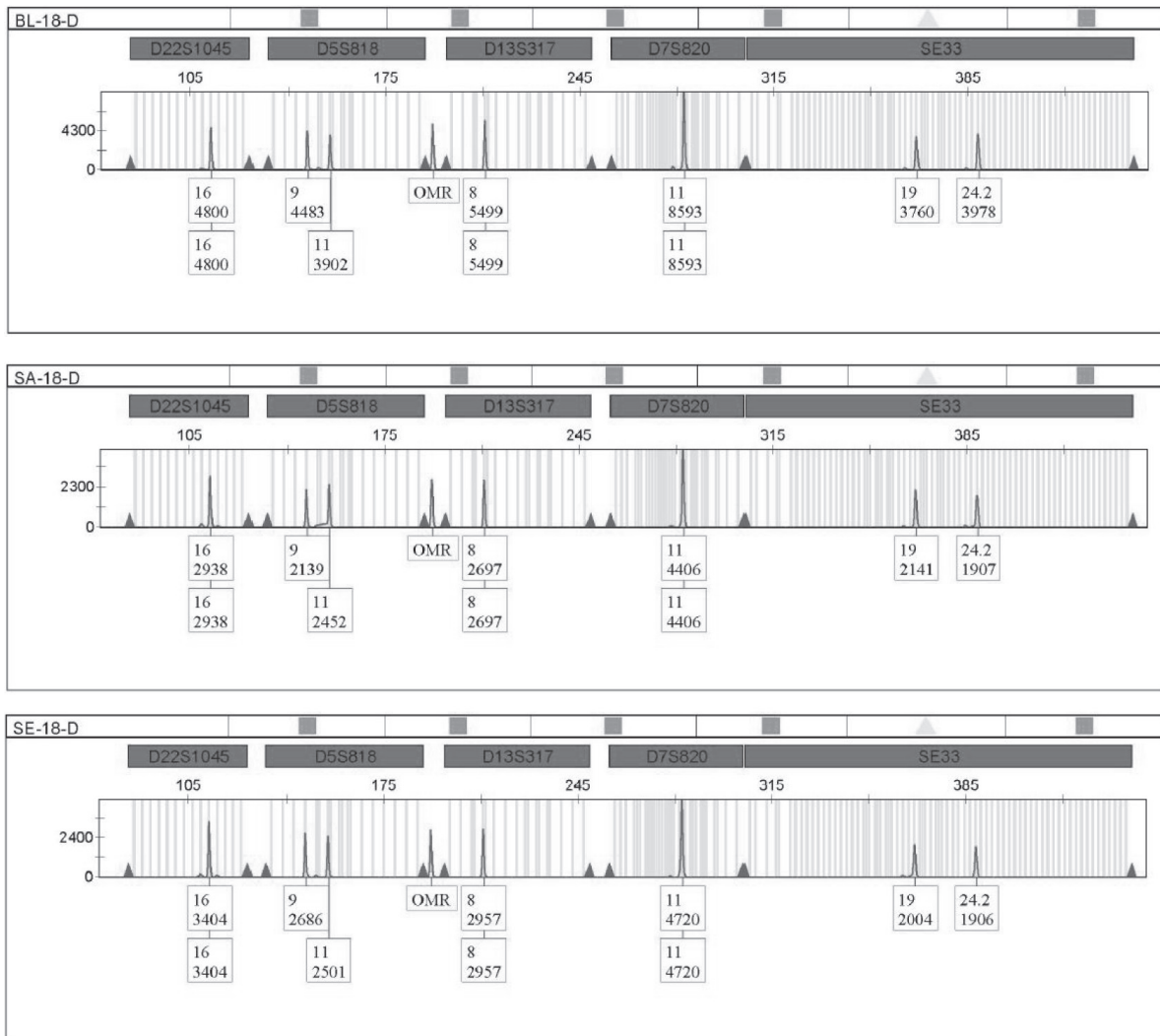
สายเดี่ยว จากนั้นนำคอมพลีเมนต์ดีเอ็นเอและตัวควบคุมคุณภาพเชิงลบมาเพิ่มปริมาณคอมพลีเมนต์ดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป QuantiFast® probe assay โดยใช้คอมพลีเมนต์ดีเอ็นเอ จำนวน 2 นาโนกรัม ในปฏิกิริยาปริมาตร 20 ไมโครลิตร และใช้ไพรเมอร์ชนิดไฮโดรไลซิส ซึ่งติดฉลากด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ FAM และ IBFQ ที่ปลาย 3' และ 5' ของไพรเมอร์ ตามลำดับ คอมพลีเมนต์ดีเอ็นเอถูกเพิ่มปริมาณด้วยเครื่อง real-time PCR LightCycler® 480 Real-Time PCR System ภายใต้สภาวะที่ผู้ผลิตกำหนดจำนวน 50 รอบ และวิเคราะห์ผลด้วยซอฟต์แวร์ LightCycler 480

4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูล โดยใช้ ค่าความจำเพาะ (specificity), ค่าทำนายผลบวก (positive predictive value), ค่าทำนายผลลบ (negative predictive value) และค่าความถูกต้อง (accuracy)

ผลการวิจัย

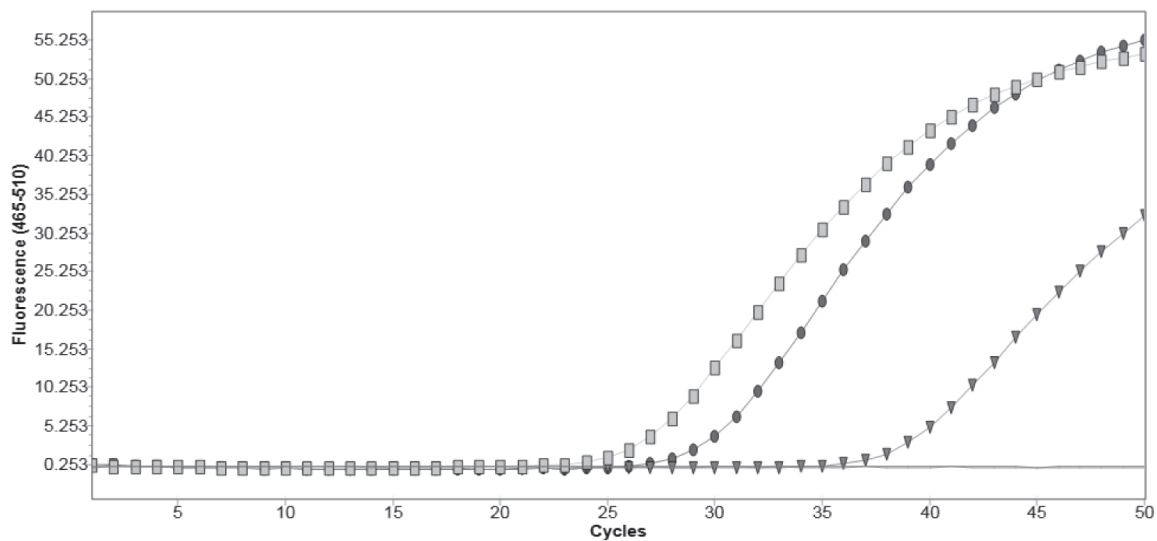
จากการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของตัวอย่างทั้ง 54 ตัวอย่างและตัวควบคุมคุณภาพพบว่าตัวควบคุมคุณภาพเชิงลบไม่ปรากฏรูปแบบสารพันธุกรรมใด ๆ และตัวควบคุมคุณภาพเชิงบวกมีรูปแบบสารพันธุกรรมที่ตรงกับรูปแบบสารพันธุกรรมอ้างอิงจากบริษัทผู้ผลิต ตัวอย่างเลือด น้ำลายและน้ำอสุจิของอาสาสมัครรายที่ 1 ถึง 17 จำนวน 51 ตัวอย่างสามารถระบุอัลลีลได้ครบทั้ง 24 ตำแหน่ง (full DNA profile) และพบว่ามีพิกที่ไม่สามารถระบุอัลลีลได้ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป GlobalFiler® PCR amplification จำนวน 3 พิกได้แก่ ตัวอย่างเลือดเลขที่ 18 (BL-18-D) จำนวน 1 พิก, ตัวอย่างน้ำลายเลขที่ 18 (SA-18-D) จำนวน 1 พิกและตัวอย่างน้ำอสุจิเลขที่ 18 (SE-18-D) จำนวน 1 พิก (รูปที่ 1) เนื่องจากพิกดังกล่าวปรากฏอยู่นอกขอบเขตที่จะสามารถระบุอัลลีลได้ (out of marker range: OMR) ซึ่งตัวอย่างทั้ง 3 ตัวอย่างข้างต้นมาจากอาสาสมัครรายที่ 18 โดยพิกดังกล่าวอยู่ระหว่างขอบเขตของตำแหน่ง D5S818 และตำแหน่ง D13S317 ที่ตำแหน่ง D5S818 ของตัวอย่างเลือดเลขที่ 18 ตัวอย่างน้ำลายเลขที่ 18 และตัวอย่างน้ำอสุจิเลขที่ 18 ปรากฏ 2 อัลลีลตรงกัน คือ อัลลีล 9 และ 11 ส่วนตำแหน่ง D13S317 ปรากฏ 1 อัลลีลที่ตรงกัน คือ อัลลีล 8



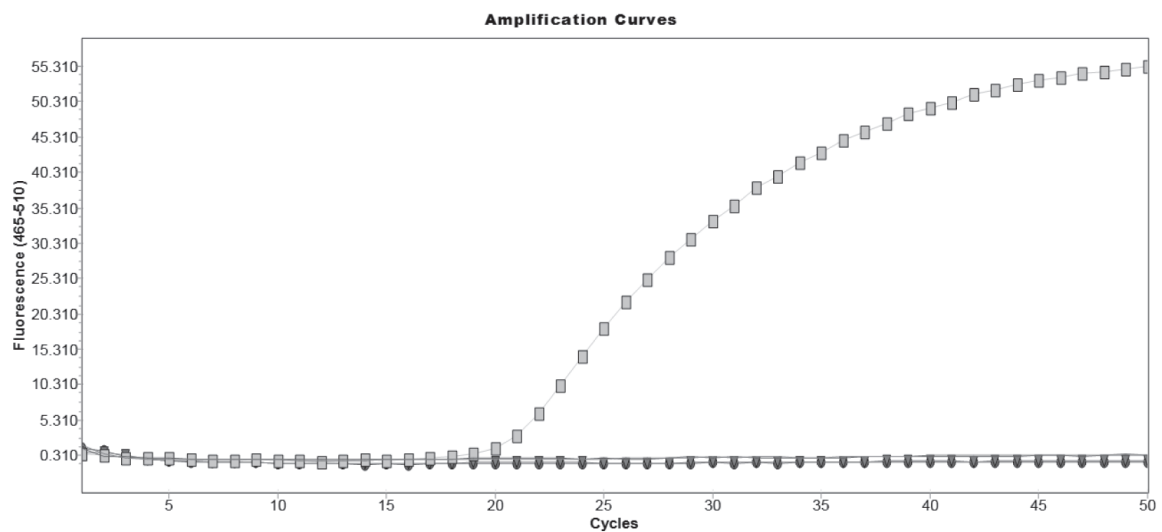
รูปที่ 1: พิกัด OMR (out of marker range) ของตัวอย่างเลือด (BL-18-D) น้ำลาย (SA-18-D) และน้ำอสุจิ (SE-18-D) จากอาสาสมัครรายที่ 18 ซึ่งพิกัด OMR อยู่ระหว่างขอบเขตของตำแหน่ง D5S818 และ D13S317 โดย สามเหลี่ยมสีแดงแสดงถึงขอบเขตของแต่ละตำแหน่ง

จากการตรวจวิเคราะห์เอ็มอาร์เอ็นเอด้วยเทคนิค Real-time PCR พบว่ากราฟที่ปรากฏไม่มีการแสดงให้เห็นถึงการเพิ่มปริมาณของยีนบีตาทูโมโครโกลบูลินและยีนโปรตามีนทูในตัวอย่างคุณภาพเชิงลบที่ไม่เติมเอนไซม์รีเวิร์สทรานสคริปเตสในปฏิกิริยา และตัวอย่างคุณภาพเชิงลบที่ไม่เติมเอ็มอาร์เอ็นเอแม่แบบในปฏิกิริยา ดังรูปที่ 2 และ 3 จากการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างทั้ง 54 ตัวอย่าง พบว่ากราฟ

แสดงให้เห็นถึงการเพิ่มปริมาณของยีนบีตาทูโมโครโกลบูลินในทุกตัวอย่าง นอกจากนี้กราฟยังแสดงให้เห็นถึงการเพิ่มปริมาณของยีนโปรตามีนทูในตัวอย่างน้ำอสุจิ 18 ตัวอย่าง ในขณะที่ตัวอย่างเลือด 18 ตัวอย่างและตัวอย่างน้ำลาย 18 ตัวอย่าง ปรากฏกราฟที่ไม่มีการแสดงให้เห็นถึงการเพิ่มปริมาณของยีนโปรตามีนทูในตัวอย่างดังกล่าว



รูปที่ 2: กราฟจากการเพิ่มปริมาณยีนบีตาทูโมโครโกลบูลินด้วยเทคนิค Real-time PCR จำนวน 50 รอบ ของตัวอย่างเลือด (●) น้ำลาย (▼) น้ำอสุจิ (■) จากอาสาสมัครรายที่ 1 และตัวควบคุมคุณภาพเชิงลบ (negative control) (—) แทน ตัวควบคุมคุณภาพเชิงลบที่ไม่เติมเอนไซม์รีเวิร์สทรานสคริปเตสในปฏิกิริยา และ — แทน ตัวควบคุมคุณภาพเชิงลบที่ไม่เติมอาร์เอ็นเอแม่แบบในปฏิกิริยา)



รูปที่ 3: กราฟจากการเพิ่มปริมาณยีนโปรตามีนทูด้วยเทคนิค Real-time PCR จำนวน 50 รอบ ของตัวอย่างเลือด (●) น้ำลาย (▼) น้ำอสุจิ (■) จากอาสาสมัครรายที่ 1 และตัวควบคุมคุณภาพเชิงลบ (negative control) (แทน ตัวควบคุมคุณภาพเชิงลบที่ไม่เติมเอนไซม์รีเวิร์สทรานสคริปเตสในปฏิกิริยา และ แทน ตัวควบคุมคุณภาพเชิงลบที่ไม่เติมอาร์เอ็นเอแม่แบบในปฏิกิริยา)

ตารางที่ 1:

จำนวนตัวอย่างเลือด น้ำลายและน้ำอสุจิที่พบการแสดงออกของยีนโปรตามีนทู (real-time PCR บวก) และไม่พบการแสดงออกของยีนโปรตามีนทู (real-time PCR ลบ) จากการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-time PCR

	เลือดและน้ำลาย (36 ตัวอย่าง)	น้ำอสุจิ (18 ตัวอย่าง)
Real-time PCR บวก	0 (0%)	18 (100%)
Real-time PCR ลบ	36 (100%)	0 (0%)

จากการคำนวณค่าทางสถิติพบว่าเทคนิค real-time PCR มีความจำเพาะในการตรวจยืนยันคราบน้ำอสุจิเท่ากับร้อยละ 100 และมีค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ และค่าความถูกต้อง เท่ากับร้อยละ 100 (ตารางที่ 1)

วิจารณ์

ตัวอย่างเลือด น้ำลายและน้ำอสุจิรวม 54 ตัวอย่าง แสดงรูปแบบสารพันธุกรรมของเพศชายจากการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ (forensic DNA typing) และเมื่อเปรียบเทียบรูปแบบสารพันธุกรรมจากตัวอย่างเลือด น้ำลาย และน้ำอสุจิของอาสาสมัครจำนวน 18 รายพบว่า รูปแบบสารพันธุกรรมที่ได้จากตัวอย่างเลือด น้ำลายและน้ำอสุจิของอาสาสมัครรายเดียวกันมีรูปแบบสารพันธุกรรมที่ตรงกันทั้ง 24 ตำแหน่ง โดยในตัวอย่างเลือด น้ำลายและน้ำอสุจิของอาสาสมัครรายที่ 18 พบพีค OMR เนื่องจากพบพีคดังกล่าวเป็นอัลลีลที่พบได้น้อย (rare allele) ดังนั้นการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความถี่อัลลีล (allele frequency) จะทำให้สามารถระบุอัลลีลของพีค OMR ดังกล่าวได้อย่างถูกต้อง นอกจากนี้รูปแบบสารพันธุกรรมของอาสาสมัครแต่ละรายมีความแตกต่างกันจึงสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการตรวจวิเคราะห์เพื่อยืนยันตัวบุคคลได้

แม้การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอจะมีประสิทธิภาพในการนำมาตรวจวิเคราะห์เพื่อยืนยันตัวบุคคล แต่การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอไม่สามารถระบุถึงแหล่งที่มาของตัวอย่างนั้น ๆ ได้ ว่าเป็นของเหลวชนิดใด ในบางกรณีการตรวจเพื่อระบุชนิดของเหลวต้องสงสัยถือเป็นสิ่งที่มีความสำคัญ ยกตัวอย่างเช่น การตรวจเพื่อยืนยันว่าเป็นคราบน้ำอสุจิในคดีข่มขืน เป็นต้น

จากการใช้เทคนิค Real-time PCR ตรวจวิเคราะห์เอ็มอาร์เอ็นเอ พบว่าตัวอย่างทั้ง 54 ตัวอย่าง มีการแสดงออกของยีนบีตาทูไมโครโกลบูลิน เนื่องจากเป็น housekeeping gene²⁴⁻²⁷ และพบว่ามีการแสดงออกของยีนโปรตามีนทูอย่างจำเพาะในตัวอย่างน้ำอสุจิ ขณะที่ไม่พบการแสดงออกของยีนชนิดนี้ในตัวอย่างเลือดและน้ำลาย โดยผลที่ได้รับจากงานวิจัยนี้มีความสอดคล้องกับผลงานวิจัยก่อนหน้า^{7, 8, 23}

ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่ายีนโปรตามีนทูเป็นยีนที่มีประสิทธิภาพในการนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ที่มีความจำเพาะต่อน้ำอสุจิ และเทคนิค Real-time PCR เป็นเทคนิคที่เหมาะสมในการนำมาใช้ตรวจยืนยันคราบน้ำอสุจิในสิ่งส่งตรวจทางนิติวิทยาศาสตร์

Conflict of interest

ไม่มี

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ได้รับการสนับสนุนจากทุนบัณฑิตศึกษา (Siriraj Graduate Scholarship) คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาลและทุนวิทยานิพนธ์บัณฑิตศึกษา (Siriraj Graduate Thesis Scholarship) คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ วรวิทย์ ไวยวุฒิ จากสถาบันนิติวิทยาศาสตร์ กระทรวงยุติธรรม สำหรับคำแนะนำอันทรงคุณค่ายิ่งในการดำเนินงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. Redhead P, Brown MK. The acid phosphatase test two minute cut-off: an insufficient time to detect some semen stains. *Sci Justice*. 2013 Jun;53(2):187-91.
2. Lewis J, Jones S, Baxter F, Siemieniuk A, Talbot R. The fallacy of the two-minute acid phosphatase cut off. *Sci Justice*. 2012 Jun;52(2):76-80.
3. Evers H, Heidorn F, Gruber C, Lasczkowski G, Risse M, Dettmeyer R, et al. Investigative strategy for the forensic detection of sperm traces. *Forensic Sci Med Pathol*. 2009;5(3):182-8.
4. Hooft PJ, van de Voorde HP. Interference of body products, food and products from daily life with the modified zinc test and the acid phosphatase test. *Forensic Sci Int*. 1994 Jun 10; 66(3):187-96.
5. Macaluso M, Lawson L, Akers R, Valappil T, Hammond K, Blackwell R, et al. Prostate-specific antigen in vaginal fluid as a biologic marker of condom failure. *Contraception*. 1999 Mar;59(3):195-201.
6. Allery JP, Telmon N, Miesusset R, Blanc A, Rouge D. Cytological detection of spermatozoa: comparison of three staining methods. *J Forensic Sci*. 2001 Mar;46(2):349-51.
7. Fleming RI, Harbison S. The development of a mRNA multiplex RT-PCR assay for the definitive identification of body fluids. *Forensic Sci Int Genet*. 2010 Jul;4(4):244-56.
8. Juusola J, Ballantyne J. mRNA profiling for body fluid identification by multiplex quantitative RT-PCR. *J Forensic Sci*. 2007 Nov;52(6):1252-62.
9. Juusola J, Ballantyne J. Multiplex mRNA profiling for the identification of body fluids. *Forensic Sci Int*. 2005 Aug 11;152(1):1-12.
10. Oliva R, Dixon GH. Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1991; 40:25-94.
11. Engel W, Keime S, Kremling H, Hameister H, Schluter G. The genes for protamine 1 and 2 (PRM1 and PRM2) and transition protein 2 (TNP2) are closely linked in the mammalian genome. *Cytogenet Cell Genet*. 1992;61(2):158-9.
12. McKay DJ, Renaux BS, Dixon GH. The amino acid sequence of human sperm protamine P1. *Biosci Rep*. 1985 May;5(5):383-91.
13. McKay DJ, Renaux BS, Dixon GH. Human sperm protamines. Amino-acid sequences of two forms of protamine P2. *Eur J Biochem*. 1986 Apr 1;156(1):5-8.
14. Yoshii T, Kuji N, Komatsu S, Iwahashi K, Tanaka Y, Yoshida H, et al. Fine resolution of human sperm nucleoproteins by two-dimensional electrophoresis. *Mol Hum Reprod*. 2005 Sep;11(9): 677-81.
15. Gusse M, Sautiere P, Belaiche D, Martinage A, Roux C, Dadoune JP, et al. Purification and characterization of nuclear basic proteins of human sperm. *Biochim Biophys Acta*. 1986 Oct 29;884(1):124-34.
16. Bower PA, Yelick PC, Hecht NB. Both P1 and P2 protamine genes are expressed in mouse, hamster, and rat. *Biol Reprod*. 1987 Sep;37(2): 479-88.
17. Oliva R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update*. 2006 Jul-Aug;12(4):417-35.
18. Sanchez-Pena LC, Reyes BE, Lopez-Carrillo L, Recio R, Moran-Martinez J, Cebrian ME, et al. Organophosphorous pesticide exposure alters sperm chromatin structure in Mexican agricultural workers. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2004 Apr 1; 196(1):108-13.

19. Sega GA, Alcota RP, Tancongco CP, Brimer PA. Acrylamide binding to the DNA and protamine of spermiogenic stages in the mouse and its relationship to genetic damage. *Mutat Res.* 1989 Aug;216(4):221-30.
20. Sega GA. Adducts in sperm protamine and DNA vs. mutation frequency. *Prog Clin Biol Res.* 1991;372:521-30.
21. Xie Q, Sun H, Liu Y, Ding X, Fu D, Liu K. Adduction of biomacromolecules with acrylamide (AA) in mice at environmental dose levels studied by accelerator mass spectrometry. *Toxicol Lett.* 2006 May 25;163(2):101-8.
22. Steger K, Pauls K, Klonisch T, Franke FE, Bergmann M. Expression of protamine-1 and -2 mRNA during human spermiogenesis. *Mol Hum Reprod.* 2000 Mar;6(3):219-25.
23. Sakurada K, Ikegaya H, Fukushima H, Akutsu T, Watanabe K, Yoshino M. Evaluation of mRNA-based approach for identification of saliva and semen. *Leg Med (Tokyo).* 2009 May;11(3):125-8.
24. Peterson PA, Cunningham BA, Berggard I, Edelman GM. 2-Microglobulin--a free immunoglobulin domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1972 Jul;69(7):1697-701.
25. Grey HM, Kubo RT, Colon SM, Poulik MD, Cresswell P, Springer T, et al. The small subunit of HL-A antigens is beta 2-microglobulin. *J Exp Med.* 1973 Dec 1;138(6):1608-12.
26. Shi C, Zhu Y, Su Y, Chung LW, Cheng T. Beta2-microglobulin: emerging as a promising cancer therapeutic target. *Drug Discov Today.* 2009 Jan ;14(1-2):25-30.
27. Moreno LI, Tate CM, Knott EL, McDaniel JE, Rogers SS, Koons BW, et al. Determination of an effective housekeeping gene for the quantification of mRNA for forensic applications. *J Forensic Sci.* 2012 Jul;57(4):1051-8.