บทที่ 1

บทนำ

การเสียชีวิตจากการจมน้ำยังเป็นปัญหาที่ยากต่อการวินิจฉัยในทางการแพทย์เนื่องจากลักษณะที่ตรวจพบบางอย่าง เช่น การเกิดฟองฟอด (fine forth) อยู่บริเวณจมูก ปาก หลอดลมและปอด cyanosis ปอดบวมน้ำ การมีจุดเลือดออกที่บริเวณผนังอวัยวะภายในนั้นไม่สามารถจะชี้ชัดได้ว่าผู้ตายนั้นเสียชีวิตจากการจมน้ำ เช่นอาการปอดบวมน้ำอาจพบผู้ที่เสียชีวิตด้วยโรคหัวใจ และการเกิดฟองฟอด (fine forth) อาจพบได้ในผู้ที่เสียชีวิตจากยาเสพย์ติด การที่จะวินิจฉัยว่าเป็นการเสียชีวิตจากการจมน้ำ ต้องระบุให้ได้ว่าผู้ตายได้มีการหายใจเอาน้ำหรือสิ่งปนเปื้อนเข้าไปมากจนไปขัดขวางการทำงานของระบบทางเดินหายใจ

โดยปกติแล้วในคนที่เสียชีวิตจากการจมน้ำนั้นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่บริเวณช่องปาก ลำคอ และคอหอยจะเข้าไปสู่กระแสเลือดได้ผ่านทางระบบเดินหายใจ *S. salivarius* เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่อาศัยอยู่บริเวณช่องปากของมนุษย์ จากการศึกษาและการทดลองจำนวนมากพบว่าส่วนใหญ่ในเลือดของผู้ที่เสียชีวิตจากการจมน้ำจะตรวจพบแบคทีเรียจำพวก *S. salivarius* ในขณะที่ผู้ที่เสียชีวิตจากสาเหตุอื่นไม่พบการปรากฏของแบคทีเรียชนิดนี้ *S. salivarius* จึงเป็นแบคทีเรียที่ช่วยในการวินิจฉัยผู้ที่เสียชีวิตจากการจมน้ำได้

แบคทีเรีย *Streptococcus salivarius*

S. salivarius เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ มีลักษณะกลมความยาวประมาณ 2 μm สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อและเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobes) ปกติแล้วจะเป็นเชื้อที่เจริญเติบโตอยู่บริเวณช่องปากของมนุษย์รวมไปจนถึงระบบทางเดินหายใจส่วนต้นเริ่มตั้งแต่อายุ 1 ปี เป็นเชื้อชนิดแรกที่มีการสร้างโคโลนีขึ้นหลังจากนั้นจึงมีแบคทีเรียชนิด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อื่นเข้ามา มีส่วนช่วยในการป้องกันเชื้อโรคแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกายและกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกาย เชื้อชนิดนี้โดยปกติแล้วนอกจากน้ำลายยังไม่พบในสารคัดหลั่งอื่นของมนุษย์ เช่น น้ำซับช่องคลอด (virginal fluid), ปัสสาวะ, น้ำอสุจิ (semen) และ เลือด ยกเว้นในกรณีผู้มีบาดแผลบริเวณช่องปาก และผู้ที่ติดเชื้อในกระแสเลือดเท่านั้น

เทคนิคการตรวจเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างเลือดของผู้ที่เสียชีวิตจากการจมน้ำนั้นเริ่มแรกทำโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วทำการนับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏขึ้นมาต่อมามีการพัฒนาเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะสูงขึ้น คือวิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมของแบคทีเรียโดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อชนิดของแบคทีเรียที่ต้องการจะตรวจสอบในตัวอย่างที่สนใจ

เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ถูกค้นพบขึ้นเมื่อ ปี 1983 โดย Kary Mullis และคณะ เป็นเทคนิคในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้นมาจากดีเอ็นเอแม่แบบ มีการทำปฏิกิริยาต่อเนื่องเป็นลูกโซ่ในหลอดทดลอง โดยอาศัยหลักการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอตามธรรมชาติ เทคนิค PCR นั้นต้องอาศัยดีเอ็นเอแม่แบบ (template), ไพร์เมอร์ (primer) ที่เป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆ มีลำดับเบสคู่สมกับดีเอ็นเอแม่แบบ, นิวคลีโอไทด์ (Deoxynucleotide triphosphates, dNTPs) 4 ชนิด (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) สำหรับเป็นวัตถุดิบในการสร้างสายดีเอ็นเอ, เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase และบัฟเฟอร์ การสร้างสายดีเอ็นเอจะทำโดยเครื่องเทอร์โมไซเคลอร์ (Thermocycler) ซึ่งสามารถปรับเปลี่ยนอุณหภูมิได้ตามต้องการ เทคนิค PCR สังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน มีขั้นตอนดังนี้

1. ขั้นตอน Denaturation เป็นการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90-95 °C เพื่อให้สายของดีเอ็นเอแม่แบบแยกออกจากกัน
2. ขั้นตอน Annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงเหลือ 45-60 °C เพื่อให้ไพร์เมอร์จับกับดีเอ็นเอแม่แบบ
3. ขั้นตอน Extension เป็นขั้นตอนการเพิ่มอุณหภูมิ 70-73 °C จะเป็นขั้นตอนการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอขึ้นมาใหม่โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ *Taq* DNA Polymerase

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

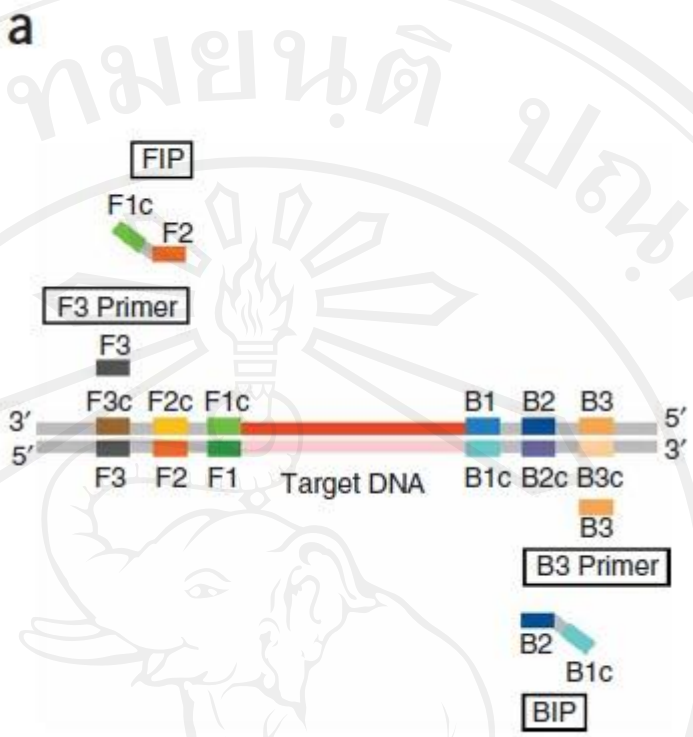
เทคนิค PCR ได้ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม แต่ข้อเสียของเทคนิค PCR นั้นนอกจากการทำงานต้องใช้ระยะเวลานานหลายชั่วโมงแล้ว ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณต้องอาศัยการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิที่แตกต่างกัน ทำให้เกิดความยุ่งยากและเสียเวลาในการทำงานเป็นอย่างมาก จึงได้มีผู้คิดค้นวิธีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่เรียกว่า เทคนิค Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) เทคนิคนี้เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค PCR แล้วพบว่าเป็นวิธีที่ใช้เวลาในกระบวนการทำน้อยกว่า และขั้นตอนการทำนั้นไม่ยุ่งยากเนื่องจากใช้อุณหภูมิในการทำเพียงอุณหภูมิเดียว การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ *S. salivarius* แต่เดิมจากการใช้เทคนิค PCR นั้นจึงเริ่มมีการปรับเปลี่ยนมาใช้เทคนิค LAMP แทน ในงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์มีการเริ่มทำในตัวอย่างที่เป็นน้ำลาย น้ำอสุจิ และปัสสาวะของมนุษย์เท่านั้น

เทคนิค Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)

Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) ถูกคิดค้นขึ้นโดย Tsugunori Notomi และคณะ ในปี 2000 เป็นวิธีในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ที่อุณหภูมิเดียวคือ 60-65 ˚C ตลอดการทำปฏิกิริยาโดยการทำงานของเอนไซม์ *Bst* DNA polymerase วิธีนี้จะใช้ไพร์เมอร์จำนวน 4-6 ตัว เพื่อจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ ทำให้เป็นวิธีที่มีความจำเพาะ และความไวสูง การทำงานที่อุณหภูมิเดียวสามารถทำได้ในเครื่องมือพื้นฐานเช่น incubator นอกจากนั้นยังใช้เวลาในการทำเพียง 1 ชั่วโมงเท่านั้น

กระบวนการของ LAMP เริ่มจากการออกแบบไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจง 4-6 ตัวแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มคือ Inner primer ประกอบด้วย Forward inner primer (FIP) และ Backward inner primer (BIP) กลุ่ม Outer primer ประกอบด้วย F3 primer (F3) และ B3 primer (B3) กลุ่ม Loop primer ประกอบด้วย Loop forward (LF) และ Loop backward (LB) ในส่วนของ LF และ LB ในบางกระบวนการอาจไม่จำเป็นต้องใช้ ไพร์เมอร์ที่สำคัญ 3 ชนิดคือ FIP, BIP, F3 และ B3 จะถูกออกแบบมาให้จำเพาะต่อตำแหน่ง 6 ตำแหน่งบนดีเอ็นเอแม่แบบ คือ F1c, F2c, F3c ที่บริเวณปลายด้าน 3’ และ B1, B2, B3 ที่ปลายด้าน 5’ (F ย่อมาจาก Forward, B ย่อมาจาก Backward และ c ย่อมาจาก Complementary)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 1 แสดงตำแหน่งการเข้าคู่ของไพร์เมอร์บนดีเอ็นเอแม่แบบ

การทำงานของ LAMP จะแบ่งออกเป็นสองขั้นตอนใหญ่ คือ ขั้นแรก Starting structure producing step ในขั้นตอนนี้จะเป็นการสร้างรูปแบบของดีเอ็นเอที่มีรูปร่างคล้ายดัมเบล (dumbbell-like DNA structure) เรียกว่า stem-loops เพื่อที่จะนำไปเป็นตัวเริ่มในกระบวนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอต่อไป ขั้นที่สอง Cycle amplification step จะเป็นขั้นตอนการเพิ่มดีเอ็นเอจาก stem-loops โดยเอนไซม์ *Bst* DNA polymerase

เมื่ออุณหภูมิประมาณ 60-65 ̊C สายดีเอ็นเอแม่แบบจะอยู่ในสภาวะที่บางส่วนยังเป็นสายคู่และบางส่วนจะคลายออกเป็นสายเดี่ยว มีการเริ่มกระบวนการ LAMP ดังนี้

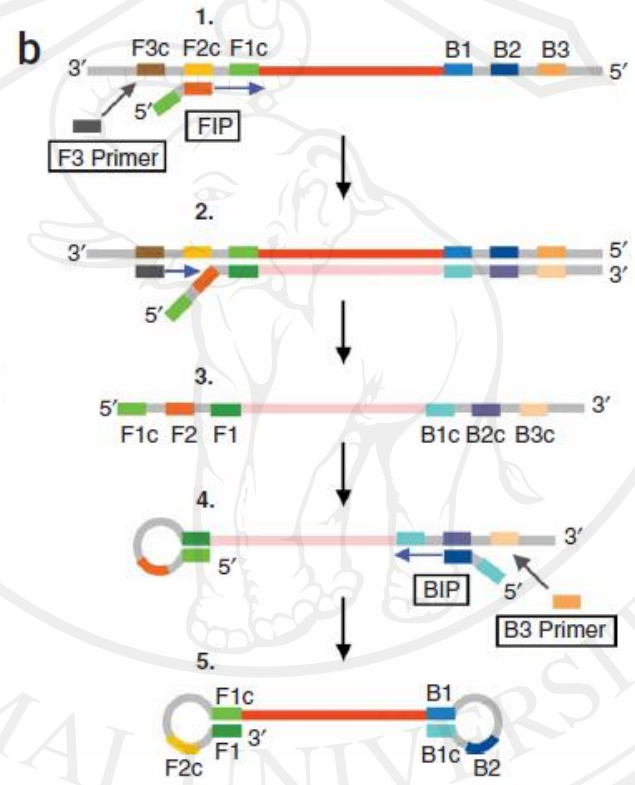
ขั้นตอน Starting structure producing (ภาพที่ 2)

1. ในขั้นแรก Forward inner primer (FIP) จะเข้าไปจับกับดีเอ็นเอแม่แบบโดยตำแหน่ง F2 บนไพร์เมอร์จะจับกับตำแหน่ง F2c บนดีเอ็นเอแม่แบบหลังจากนั้นจะมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอคู่สมสายใหม่ขึ้นมา
2. ไพร์เมอร์ F3 จะเข้าจับที่บริเวณ F3c บนดีเอ็นเอแม่แบบ เลาะสายดีเอ็นเอแล้วเกิดการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอใหม่
3. สายดีเอ็นเอสายแรกที่สังเคราะห์เมื่อถูกเลาะออกมา ทางด้านปลาย 5’ จะเกิดรูปแบบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ของ loop ขึ้นโดยตำแหน่ง F1c จะโค้งเข้าจับกับตำแหน่ง F1

4. ไพร์เมอร์ Backward inner primer (BIP) เข้าจับดีเอ็นเอสายที่ถูกเลาะ โดยตำแหน่ง B2 บนไพร์เมอร์จะจับกับตำแหน่ง B2c บนสายดีเอ็นเอ หลังจากนั้น ไพร์เมอร์ B3 จะเข้าจับกับตำแหน่ง B3c เพื่อเลาะสายดีเอ็นเอออกมา
5. สายดีเอ็นเอที่ถูกเลาะออกมานั้นทางด้านปลาย 3’ จะเกิดรูปแบบของ loop ขึ้นโดยตำแหน่ง B1c จะโค้งเข้าจับกับตำแหน่ง B1 ทำให้ดีเอ็นเอเกิดรูปแบบคล้ายดัมเบล (dumbbell-like DNA structure) เรียกว่า stem-loops



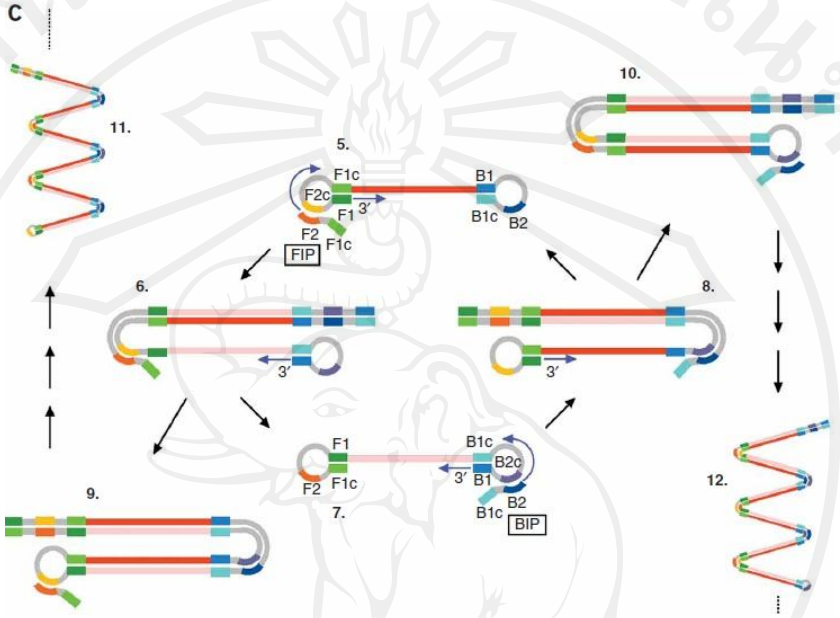
ภาพ 2 แสดงกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในขั้น Starting structure producing

ขั้นตอน Cycle amplification (ภาพที่ 3)

ในขั้นตอนนี้ไพร์เมอร์ Loop forward (LF) และ Loop backward (LB) จะมีส่วนช่วยในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอจาก stem-loops โดยในขั้นตอนนี้การสังเคราะห์จะเกิดขึ้นบริเวณ loop forward ที่ตำแหน่ง F1 การสังเคราะห์ที่บริเวณนี้ไม่จำเป็นอาศัยไพร์เมอร์เนื่องจากการเกิดการจับกันของตำแหน่ง F1และ F1c เป็นลักษณะของ self-primed DNA ในขณะเดียวกัน ไพร์เมอร์ FIP เข้า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จับบริเวณตำแหน่ง F2c เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเออีกหนึ่งสาย ทำให้เกิด stem-loops ขึ้นมาอีก 1 อัน การสังเคราะห์จะเริ่มอีกครั้งบริเวณ Loop forward จากไพร์เมอร์ BIP การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะดำเนินไปในลักษณะเช่นนี้จนกระทั่งสิ้นสุดกระบวนการ



ภาพ 3 แสดงกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในขั้น Cycle amplification

การตรวจสอบผลของเทคนิค LAMP สามารถทำได้ในหลายวิธีเช่น สามารถดูได้จากความขุ่นของตะกอน Magnesium pyrophosphate ซึ่งเป็นผลผลิตที่เกิดขึ้นในระหว่างการสร้างสายดีเอ็นเอ, ดูการเรืองแสง ในกรณีที่ใส่สารเรืองแสง เช่น SYBR GREEN I เมื่อมีสารพันธุกรรมสังเคราะห์ขึ้น สีของสารจะเปลี่ยนจากสีส้มเป็นสีเขียว ภายใต้แสง UV, การใช้เจลอิเลคโตรโฟลิซิส โดยนำ product LAMP ไปวิ่งผ่านวุ้นใสโดยอาศัยการแยกโดยกระแสไฟฟ้า จะปรากฏแถบดีเอ็นเอหลายแถบคล้ายขั้นบันไดในกรณีที่ให้ผลบวก

วัตถุประสงค์

เพื่อใช้เทคนิค Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) ในการตรวจสอบเชื้อ *Streptococcus salivarius* ในตัวอย่างเลือดของคนที่เสียชีวิตจากการจมน้ำเปรียบเทียบกับคนที่เสียชีวิตจากสาเหตุอื่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved