บทที่ 1

บทนำ

การทดสอบที่เกี่ยวข้องกับสารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอจะบอกได้ว่า หยดเลือดหรือเศษเนื้อเยื่อนั้นเป็นของมนุษย์หรือสัตว์ และถ้าเป็นก็จะระบุได้ว่าเป็นของสัตว์ชนิดใด ทั้งนี้การจะบอกว่าเป็นของมนุษย์หรือสัตว์นั้นไม่ใช่เรื่องยาก แต่ยากตรงที่จะระบุให้ได้ว่าเป็นของสัตว์ชนิดใด ซึ่งหากต้องการระบุชนิดของสัตว์ให้ได้แน่นอนนั้นต้องหาให้ได้ว่า ส่วนของดีเอ็นเอส่วนใดที่จะสามารถนำมาใช้ระบุชนิดและมีความจำเพาะต่อสัตว์ชนิดนั้นๆ ทั้งนี้ตำแหน่งของดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ของสัตว์แต่ละชนิดนั้น เป็นส่วนของดีเอ็นเอที่อยู่บนยีนที่มีชื่อว่า ไซโตโครมบี (Cytochrome *b*) พบได้ในไมโตคอนเดรียซึ่งเป็นส่วนประกอบภายในเซลล์ทำหน้าที่ให้พลังงานแก่เซลล์ ส่วนของดีเอ็นเอที่ว่านี้เป็นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กสามารถพบได้ทั่วไปในสัตว์ทุกชนิดแต่มีความพิเศษตรงที่รหัสของดีเอ็นเอบริเวณนี้จะสร้างโปรตีนที่มีความจำเพาะสำหรับสัตว์ในแต่ละชนิด ดังนั้น หากเก็บเลือดหรือเศษชิ้นเนื้อของสัตว์ชนิดใดชนิดหนึ่งได้ ก็จะสามารถทำการวิเคราะห์ทางดีเอ็นเอได้ว่าเลือดหรือเศษชิ้นเนื้อนั้นเป็นของสัตว์ชนิดใด

สารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอ (Deoxyribonucleic acid : DNA) เป็นกรดนิวคลิอิก (Nucleic acid) ที่ทำหน้าที่เก็บข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต ดีเอ็นเอส่วนใหญ่อยู่ในรูปโครโมโซม (Chromosome) วางตัวอยู่ในส่วนนิวเคลียสภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ดีเอ็นเอประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เรียกว่า นิวคลิโอไทด์ (Nucleotide) ซึ่งเป็นสารประกอบไนโตรจีนัสเบส (Nitrogenous base) แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มพิวรีนเบส (Purine) ได้แก่ ไทมีน (Thymine: T) ไซโทซีน (Cytosine: C) และกลุ่มไพริมิดีนเบส (Pyrimidine) ได้แก่ อะดีนีน (Adenine: A) กัวนีน (Guanine: G) โดยสารประกอบไนโตรจีนัสเบสนี้จะรวมตัวกับน้ำตาลดีออกซีไรโบส (Deoxyribose sugar) และกรดฟอสฟอริก (Phosphoric acid) การเรียงลำดับของนิวคลิโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด ส่งผลให้เกิดความหลากหลายในลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอ ซึ่งจะมีความจำเพาะในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ดีเอ็นเอไมโตคอนเดรีย (Mitochondrial DNA หรือ mtDNA) เป็นดีเอ็นเอที่อยู่ในโครงสร้างที่เรียกว่า ไมโตคอนเดรีย (Mitochondria) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่อยู่ภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตจำพวกยูคาริโอติค (Eukariotic) ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนพลังงานจากอาหารให้อยู่ในรูปที่เซลล์สามารถนำไปใช้ภายในเซลล์ได้ ดีเอ็นเอของยูคาริโอติคส่วนใหญ่จะตรวจพบในนิวเคลียสของเซลล์ ซึ่งจะใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์มากกว่าการหากลุ่มชั้น การตรวจเพื่อระบุชนิดของสัตว์เป็นเพียงการหากลุ่มชั้นของสิ่งมีชีวิตเท่านั้นจึงไม่จำเป็นต้องใช้ดีเอ็นเอที่อยู่ภายในนิวเคลียส และเนื่องจากไมโตคอนเดรียเป็นส่วนประกอบของเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการสร้างพลังงาน พบในเซลล์หนึ่งๆ ได้หลายพันชุด ภายในไมโตคอนเดรียแต่ละชุดจะมีดีเอ็นเอ ที่มีลำดับดีเอ็นเอ 16,569 คู่เบส ดีเอ็นอของไมโตคอนเดรียเป็นดีเอ็นเอชนิดเดียวที่พบในไซโทพลาซึม ที่มาของมันนั้นไม่ได้มาจากการเกิดขึ้นใหม่เอง (De Novo) แต่ต้องได้รับการสืบทอดมาจากบรรพบุรุษ ซึ่งปกติแล้วอาศัยกฎของเมนเดลคือมาจากพ่อและแม่ แต่เนื่องจากเป็นดีเอ็นเอที่อยู่ในส่วนของไซโทพลาซึมเซลล์สืบพันธุ์พ่อซึ่งอยู่ในรูปของอสุจินั้นเอาเฉพาะส่วนหัวของอสุจิซึ่งมีนิวเคลียสอยู่เข้าไปในไข่ (Ovum) ของเพศแม่ แต่สลัดเอาส่วนที่เหลือซึ่งมีไมโตคอนเดรียอยู่เป็นจำนวนมากออกไป ดังนั้นเซลล์ของลูกที่ได้จึงมีแต่ไมโตคอนเดรียที่ได้จากแม่เท่านั้น ดีเอ็นเอไมโตคอนเดรียจึงเป็นประโยชน์ในการติดตามเชื้อสายทางมารดาได้ และสามารถนำไปใช้ในการระบุชนิดของสัตว์ในทางนิติวิทยาศาสตร์ได้ (สำนักงานตำรวจแห่งชาติ, 2553)

Cytochrome *b* เป็นหนึ่งใน Cytochromes ที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งอิเล็กตรอนในโซ่การหายใจของ Mitochondria ไซโตโครม (Cytochromes) มีหลายชนิดใช้ตัวอักษรเป็นชื่อชนิดของไซโตโครม เช่น ไซโตโครมเอ ไซโตโครมบี หรือไซโตโครมซี เป็นต้น ไซโตโครมจะรับและส่งอิเล็กตรอนจากไซโตโครมหนึ่งไปยังอีกไซโตโครมหนึ่งจนถึงออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายและไม่ส่งต่ออิเล็กตรอนให้แก่สารตัวใด ออกซิเจนที่ได้รับอิเล็กตรอนจะรวมกับโปรตอนที่มีอยู่ในสารละลายภายในไมโตคอนเดรียกลายเป็นน้ำ ดีเอ็นเอที่อยู่ในส่วนของยีนไซโตโครมบีเป็นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กและพบอยู่ในสัตว์ทุกชนิด แต่มีการสร้างโปรตีนที่มีความจำเพาะสำหรับสัตว์แต่ละชนิด จึงมีการนำเอาดีเอ็นเอในส่วนของยีนไซโตโครมบี มาใช้ในการตรวจคัดแยกสัตว์แต่ละ Species ออกจากกัน

การระบุสารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอของสัตว์ด้วยยีนไซโตโครมบีในไมโตคอนเดรียสามารถนำไปปรับใช้ในทางนิติวิทยาศาสตร์กรณีที่มีข้อพิพาททางกฎหมายเกิดขึ้นในคดีที่เกี่ยวข้องกับสัตว์ เช่น กรณีพิพาทเกี่ยวกับอาหารที่ประกอบขึ้นจากเนื้อสัตว์ กรณีที่มีการกล่าวอ้างว่าเลือดที่พบในที่เกิดเหตุเป็นของสัตว์ และในกรณีที่มีการลักลอบล่าสัตว์ป่า เป็นต้น ซึ่งกรณีต่างๆที่กล่าวมานี้ล้วนจำเป็นต้องมีหลักฐานยืนยันในการกระทำความผิด โดยเฉพาะวัตถุพยานนั้นเป็นเพียงเศษ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชิ้นส่วนใดชิ้นส่วนหนึ่งที่ไม่สามารถระบุชนิดของสัตว์นั้นได้ด้วยวิธีทางกายภาพหรือด้วยวิธีการทางชีวเคมี เช่น เศษชิ้นเนื้อ เศษผิวหนัง เศษกระดูก เป็นต้น

เนื่องจากตัวอย่างมีปริมาณดีเอ็นเอน้อยหรืออาจมีสภาพที่ไม่สมบูรณ์ ดังนั้นจึงต้องนำตัวอย่างมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยอาศัยหลักการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่ (DNA replication) จากดีเอ็นเอต้นแบบในหลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้นและได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่า ค้นพบครั้งแรกโดย Kary Mullis และคณะในปี 1983 โดยใช้หลักการเลียนแบบธรรมชาติที่อาศัยดีเอ็นเอต้นแบบเป็นจุดเริ่มต้นและมีเอนไซม์พวก DNA Polymerase ช่วยทำให้สายดีเอ็นเอยาวออกไปโดยเลือกจับเอานิวคลีโอไทด์ตัวใดตัวหนึ่งใน 4 ชนิดคือ dATP, dGTP, dCTP, dTTP เข้ามาต่อเป็นเบสคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบ (Template) ส่วนประกอบต่างๆในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมีดังนี้คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ (Template DNA), Thermostable DNA polymerase, Deoxynucleotide Triphosphate(dNTPs) ทั้ง 4 ชนิด, Oligonucleotide primer อย่างน้อย 1 คู่ และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ปริมาณดีเอ็นเอจะเพิ่มมากขึ้นได้ต้องอาศัยปฏิกิริยาที่ต่อเนื่องหลายๆ รอบ ซึ่งแต่ละรอบจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ

1. ขั้นตอน Denaturation เป็นการแยกสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยว โดยอาศัยความร้อนที่อุณหภูมิสูง 90-95 องศาเซลเซียส

2. ขั้นตอน Primer annealing เป็นขั้นตอนที่มีการลดอุณหภูมิลงมาที่ประมาณ 45-60 องศาเซลเซียส เพื่อให้ Primer สามารถเกาะติดกับดีเอ็นเอต้นแบบตรงบริเวณเบสคู่สม

3. ขั้นตอน Primer extension เป็นขั้นตอนการขยายสายดีเอ็นเอ โดยการต่อลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3’ ของ Primer แล้วมีการขยายดีเอ็นเอสายใหม่จากทิศทาง 5’ ไป 3’ โดยอาศัยการทำงานของเอ็นไซม์ Thermostable DNA polymerase เช่น Taq polymerase ซึ่งปกติใช้อุณหภูมิในช่วง 70-75 องศาเซลเซียส

ในกระบวนการ PCR ดีเอ็นเอไพรเมอร์ 2 เส้นจะจับกับเส้นดีเอ็นเอต้นแบบในตำแหน่งที่ห่างจากกัน ถึงบริเวณหัวและท้ายของช่วงดีเอ็นเอที่ต้องการจะสร้างขึ้นใหม่ ไพรเมอร์ไฮบริไดซ์เข้ากับสายตรงข้าม และเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ ทำให้เติมช่องว่างระหว่างไพรเมอร์ให้เต็มบริเวณที่อยู่ระหว่างไพรเมอร์ทั้งสองจะเพิ่มเป็นสองเท่าในแต่ละรอบของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ หลอดปฏิกิริยาจะถูกปรับเปลี่ยนอุณหภูมิในเครื่องปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ (Thermal Cycler) ในการสังเคราะห์ 10 รอบ ดีเอ็นเอจะถูกขยาย 2^{10} = 1024 เท่า 20 รอบ ประมาณล้านเท่า และ 30 รอบประมาณพันล้านเท่า ในทางทฤษฎี ดีเอ็นเอที่ปริมาณเป็นนาโนแกรมสามารถขยายให้ดีเอ็นเอเป็นกรัมได้โดยการใช้ PCR 30 รอบ ด้วยกระบวนการอัตโนมัติจึงทำให้ปริมาณปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นในเวลาไม่กี่ชั่วโมง PCR มีประโยชน์อย่างมากในการทำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สำเนาพันธุกรรมหรือการโคลนนิ่งดีเอ็นเอเพราะทำการเพิ่มจำนวนยีนก่อนที่จะโคลนนิ่ง PCR ทำให้ได้ลำดับเบสดีเอ็นเอจำเพาะปริมาณมากที่จะใช้เป็นต้นแบบ PCR สามารถถูกใช้เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอแม้มีอยู่ในตัวอย่างในปริมาณเพียงเล็กน้อย PCR สามารถประยุกต์ใช้ตรวจไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอซึ่งระบุบุคคลและพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดซึ่งสามารถตรวจได้จากตัวอย่างดีเอ็นเอแม้มีปริมาณเพียงเล็กน้อย (อุไรวรรณ, 2545)

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อทดสอบวิธีการที่มีความจำเพาะเจาะจงสำหรับการระบุสารพันธุกรรมของวัวด้วยการวิเคราะห์ยีน Cytochrome *b* ในไมโตคอนเดรีย

สมมติฐานของการศึกษา

หลังจากทำการศึกษาจะได้วิธีการที่มีความจำเพาะเจาะจงสำหรับการระบุสารพันธุกรรมของวัวด้วยการวิเคราะห์ยีน Cytochrome *b* ในไมโตคอนเดรีย

ขอบเขตการวิจัย

ขอบเขตประชากร

ตัวอย่างดีเอ็นเอของวัวพันธุ์พื้นเมืองในเขตภาคเหนือของประเทศไทยจำนวน 30 ตัว

ตัวอย่างดีเอ็นเอของมนุษย์ สุนัข ไก่ หมู และปลา

ขอบเขตการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการระบุสารพันธุกรรมของวัวพันธุ์พื้นเมืองในเขตภาคเหนือของประเทศไทยโดยทำการสุ่มตัวอย่างวัวพันธุ์พื้นเมืองจำนวน 30 ตัว ทำการเก็บตัวอย่างเลือดและเส้นขนของวัวตัวละ 5 เส้น แล้วนำมาสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) และทำการตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย Agarose gel electrophoresis โดยทำการตรวจสอบซ้ำอีกจำนวน 2 ครั้ง ก่อนทำการตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ใช้เพื่อตรวจแยกแยะออกจากดีเอ็นเอของ Species อื่นๆ จึงได้ทำการตรวจเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอของมนุษย์และสัตว์ชนิดอื่นอีก 4 ชนิด ได้แก่ สุนัข ไก่ หมู ปลา ชนิดละ 5 ตัวอย่าง ด้วยวิธีการเดียวกันนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นิยามศัพท์เฉพาะ

Cytochrome *b* หมายถึงยีนที่อยู่ในโครงสร้างของเซลล์ที่เรียกว่า ไมโตคอนเดรีย ทำหน้าที่เกี่ยวกับห่วงโซ่การหายใจภายในเซลล์

Phylogenetic หมายถึง เกี่ยวกับวิวัฒนาการของสัตว์

Short Tandem Repeat (STR) DNA หมายถึง ดีเอ็นเอส่วนที่ไม่ใช่ยีน (Non gene) ที่มีลักษณะเป็นชุดเบสซ้ำขนาด 2-7 เบส เรียงต่อกัน โดยมีจำนวนซ้ำในแต่ละตำแหน่งไม่เกิน 100 ครั้ง

Polymerase Chain Reaction (PCR) หมายถึง เทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่ (DNA replication) จากดีเอ็นเอต้นแบบในหลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้นและได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่า

Agarose gel electrophoresis หมายถึง เทคนิคที่ใช้แยกสาร วิเคราะห์ และเตรียมสารที่มีประจุไฟฟ้า เช่น กรดอะมิโน โปรตีน และ กรดนิวคลีอิก ให้บริสุทธิ์ โดยอาศัยหลักการที่ว่า เมื่อให้สนามไฟฟ้า สารที่มีประจุไฟฟ้าจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วที่ตรงข้ามกันด้วย อัตราเร็วในการเคลื่อนที่ ซึ่งขึ้นกับปริมาณประจุสุทธิบนโมเลกุลของสาร รูปร่างและขนาดของโมเลกุลของสารนั้น

Base pair (bp) หมายถึง คู่เบส เป็นการจับคู่เบส A กับ T และ G กับ C ในดีเอ็นเอเกลียวคู่ การจับคู่อาจเกิดขึ้นได้ในอาร์เอ็นเอในบางสถานการณ์

DNA polymerase เป็นเอนไซม์ที่สังเคราะห์สายลูกของดีเอ็นเอ (ภายใต้การนำของดีเอ็นเอต้นแบบ) อาจเกี่ยวข้องในการซ่อมแซมหรือการถ่ายแบบ

ประโยชน์ที่จะได้รับจากการศึกษา เชิงทฤษฎีและหรือเชิงประยุกต์

ทราบประสิทธิภาพของการคัดแยกสารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอของมนุษย์และสัตว์ออกจากกัน นำไปใช้ในการตรวจสอบอาหาร กรณีพิสูจน์ลึกลงไปถึงชนิดของสัตว์ที่เป็นตัวอย่างวัตถุพยาน และการนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบสายพันธุ์ของสัตว์ป่าที่ถูกลักลอบทำลายในกรณีที่มีการดำเนินคดีทางกฎหมายเกี่ยวกับปัญหาการลักลอบทำลายสัตว์ป่าประเภทวัว นอกจากนี้ยังเป็นประโยชน์ทางด้านงานสืบสวนสอบสวนกรณีมีการกล่าวอ้างว่าคราบโลหิตที่พบในบริเวณที่เกิดเหตุหรือที่พบติดอยู่บนเสื้อผ้า เครื่องนุ่งห่ม หรือส่วนใดส่วนหนึ่งของร่างกายผู้ต้องสงสัยนั้นเป็นของสัตว์ ก็สามารถทำการระบุได้ว่าเป็นคราบโลหิตของวัวหรือไม่ และเป็นจริงตามที่ถูกกล่าวอ้างหรือไม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved