บทที่ 2

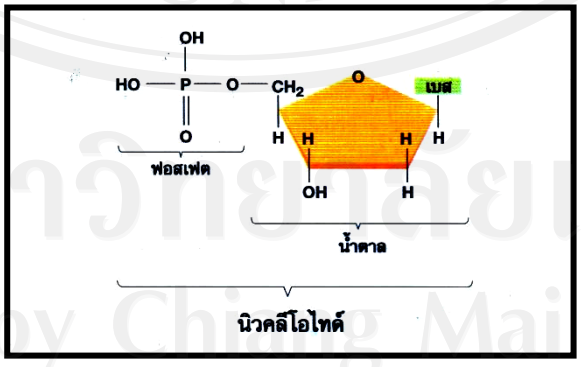
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีของกรดนิวคลีอิก

กรดดีออกซิไรโบนิวคลีอิก (Deoxyribonucleic acid: DNA) หรือดีเอ็นเอ ประกอบด้วยหน่วยน้ำตาล เบส และหมู่ฟอสเฟต ในสัดส่วนเท่า ๆ กัน คือ 1: 1: 1 (ภาพ 1) ซึ่งเมื่อโมเลกุลของทั้ง 3 ชนิดมารวมกัน จะได้เป็นหน่วยที่เล็กที่สุดของดีเอ็นเอที่เรียกว่า นิวคลีโอไทด์ (Nucleotide) นิวคลีโอไทด์หลาย ๆ อันมาเชื่อมต่อกันเป็นเส้นยาวจะเรียกว่า โพลีนิวคลีโอไทด์ (Polynucleotide) (ธานินทร์, 2538) ความแตกต่างของดีเอ็นเอเกิดจากการเรียงตัวของเบสบนสายดีเอ็นเอนั้น ๆ มีความแตกต่างกัน เบสที่พบทั่วไปในดีเอ็นเอมี 4 ชนิด และสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม แต่ละกลุ่มมีความแตกต่างในองค์ประกอบและโครงสร้างดังนี้ (วิชัยและคณะ, 2541)

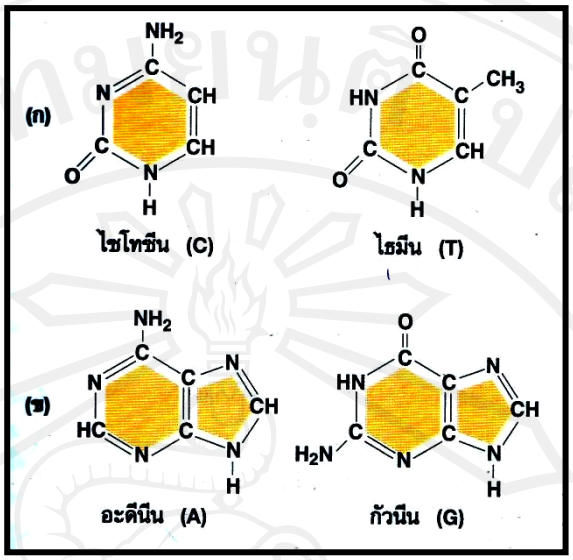
1. **เบสพิริมิดีน (Pyrimidine)** มีโครงสร้างหลักประกอบด้วยวงแหวน 1 วง เบสในกลุ่มนี้ได้แก่ โซโทซีน (Cytosine: C) และ ไธมีน (Thymine: T) (ภาพ 2ก)

2. **เบสพิวรีน (purine)** มีโครงสร้างหลักประกอบด้วยวงแหวน 2 วง คือวงแหวนพิริมิดีนเชื่อมกับวงแหวนอิมิดาโซล (Imidazole) เบสในกลุ่มนี้ได้แก่ อะดินีน (Adenine: A) และ กวานีน (Guanine: G) (ภาพ 2ข)



ภาพ 1 โครงสร้างของนิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วย น้ำตาล เบส และหมู่ฟอสเฟต
ที่มา : ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ...จากสารพันธุกรรมสู่เทคโนโลยีพิสูจน์บุคคล หน้า 2

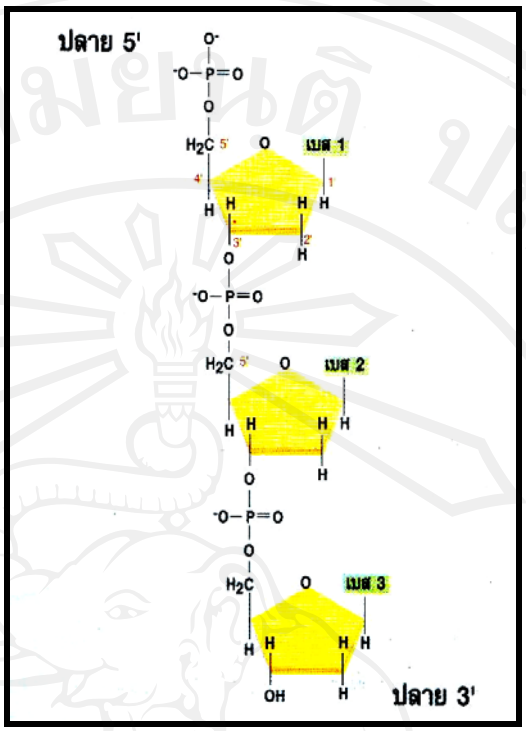
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 2 โครงสร้างเบสที่พบบนสายดีเอ็นเอ (ก) เบสพิริมิดีน (ข) เบสพิวรีน
ที่มา : ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ...จากสารพันธุกรรมสู่เทคโนโลยีพิสูจน์บุคคล หน้า 3

เบสบนดีเอ็นเอจะต่อกับน้ำตาลดีออกซีไรโบสซึ่งมีคาร์บอน 5 อะตอม ที่ตำแหน่ง C-1' โดยมีหมู่ฟอสเฟตเป็นตัวเชื่อมระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 3' ของน้ำตาลโมเลกุลหนึ่งกับคาร์บอนตำแหน่งที่ 5' ของน้ำตาลโมเลกุลที่อยู่ถัดไปด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ (ภาพ 3) ทำให้สายโพลีนิวคลีโอไทด์ที่เกิดขึ้นมีทิศทางคือ ปลายข้างหนึ่งเป็นปลาย 5' และอีกข้างหนึ่งเป็นปลาย 3' หมู่ฟอสเฟตทำให้ดีเอ็นเอมีประจุเป็นลบและมีคุณสมบัติเป็นกรด ความยาวของดีเอ็นเอเกิดจากการเรียงตัวกันของเบส 4 ชนิดในภาพแบบต่าง ๆ กันซึ่งทำให้ดีเอ็นเอเป็นแหล่งเก็บข้อมูลที่แตกต่างกันได้เป็นจำนวนมาก ตัวอย่างเช่น ดีเอ็นเอที่ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ 1000 ตัว จะมีการเรียงตัวให้ข้อมูลที่ต่างกันได้ถึง 4^{1000} แบบ ข้อมูลที่แตกต่างกันที่บรรจุอยู่ในโมเลกุลดีเอ็นเอเป็นตัวกำหนดคุณสมบัติที่สำคัญของสิ่งมีชีวิตในการควบคุมกิจกรรมต่าง ๆ ของเซลล์ และควบคุมลักษณะของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

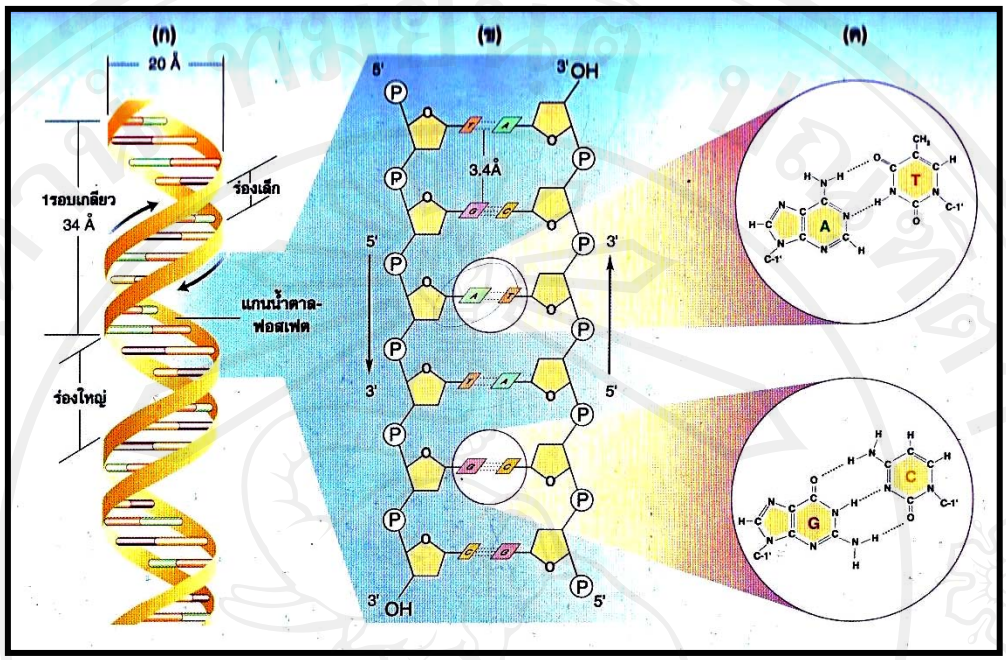


ภาพ 3 สายนิวคลีโอไทด์ที่เชื่อมกันด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์แสดงทิศทางจากปลาย 5'→3'

ที่มา : ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ...จากสารพันธุกรรมสู่เทคโนโลยีพิสูจน์บุคคล หน้า 3

ในปี พ. ศ. 2496 นักชีววิทยาชาวอเมริกัน ชื่อ เจมส์ ดี วัตสัน และนักฟิสิกส์ชาวอังกฤษ ชื่อ ฟรานซิส เอช ซี คริก จากมหาวิทยาลัยเคมบริดจ์ ได้เสนอโครงสร้างสามมิติของดีเอ็นเอมาโดยอาศัยข้อมูลจากภาพเอกซ์เรย์ดิฟแฟรกชั่น (X-Rays diffraction pattern) ของผลึกดีเอ็นเอและจากข้อมูลองค์ประกอบทางเคมีของดีเอ็นเอ โดยเสนอว่าดีเอ็นเอมีโครงสร้างเป็นเกลียวคล้ายขดลวดสปริงเรียกว่า ฮีลิกซ์ (Helix) และเกลียวของดีเอ็นเอมีลักษณะเป็นเกลียวคู่เวียนขวา (Right handed double helix) (ดาวรุ่ง, 2546) การพันเกลียวของดีเอ็นเอทำให้เกิดเป็นร่องขึ้น 2 ขนาด คือร่องขนาดใหญ่ และร่องขนาดเล็ก (ภาพ 4 ก) เกลียวคู่นี้คือสายพอลินิวคลีโอไทด์สองสายที่มีทิศสวนทางกัน โดยมีน้ำตาลและหมู่ฟอสเฟตเป็นแกนของเกลียว (DNA backbone) และมีเบสอยู่ภายในเกลียว (ภาพ 4 ข) โดยมีระนาบของเบสตั้งฉากกับแกนของเกลียวในลักษณะเหมือนราวบันไดวนกับขั้นบันได แต่ละรอบเกลียวประกอบด้วยเบส 10 คู่ เกลียวคู่ของดีเอ็นเอถูกยึดด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบสที่อยู่บนสายตรงกันข้ามกัน โดยมี A จับคู่กับ T ด้วยพันธะไฮโดรเจน 2 พันธะ และ C จับกับ G ด้วยพันธะไฮโดรเจน 3 พันธะ (ภาพ 4 ค) นอกจากนี้ยังมีแรงไฮโดรโฟบิคช่วยยึดโครงสร้างเกลียวคู่ให้มีความเสถียร (วิชัยและคณะ, 2541)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 4 โครงสร้างเกลียวคู่ของดีเอ็นเอ (ก) มีน้ำตาลและหมู่ฟอสเฟตเป็นแกน (ข) มีเบสภายในทำหน้าที่ยึดสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ด้วยพันธะไฮโดรเจน (ค)
ที่มา : ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ...จากสารพันธุกรรมสู่เทคโนโลยีพิสูจน์บุคคล หน้า 5

ด้วยความจำเพาะเจาะจงของคู่เบสเช่นนี้ ทำให้สามารถกำหนดลำดับเบสของเส้นดีเอ็นเอสายที่จะไปจับกับอีกเส้นได้ หากรู้ลำดับเบสของเส้นดีเอ็นเอนั้น แม้ว่าพันธะไฮโดรเจนจะค่อนข้างอ่อน แต่เนื่องจากโมเลกุลของดีเอ็นเอประกอบด้วยหลาย ๆ คู่เบส ทำให้มีพันธะเหล่านี้จำนวนมากสามารถสร้างความเสถียรให้แก่ดีเอ็นเอได้ ในภาวะปกติแล้วสายดีเอ็นเอไม่เคยแยกจากกัน แต่ถ้าดีเอ็นเออยู่ในที่ที่มีอุณหภูมิสูงใกล้จุดเดือด เช่น 94-95°C หรือในตัวกลางที่เป็นกรดหรือด่างรุนแรง เช่น pH<3 หรือ pH>10 จะพบว่าสายดีเอ็นเอแยกจากกันเป็นสองเส้นที่มีเบสเป็นคู่สมกัน (Complementary) เรียกขบวนการนี้ว่า Denaturation หรือภาษาพูดเรียกการหลอม (Melting) การเสียสภาพโดยทั่วไปหมายความว่า โครงรูป (Conformation) ตามธรรมชาติของโมเลกุลขนาดใหญ่ถูกเปลี่ยนไปเป็นรูปแบบอื่นบางรูป และเมื่ออุณหภูมิเย็นลง เช่นที่ประมาณ 50-65°C ดีเอ็นเอจะ ค่อย ๆ กลับเข้ามาจับกันเป็นเส้นคู่ใหม่ได้อีก ขั้นตอนนี้เรียกว่า Annealing หรือ การฟื้นคืนสภาพ (Renaturation) จากการค้นพบว่าดีเอ็นเอเป็นลักษณะเส้นคู่ ทำให้ได้ข้อสรุปของการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอ โดยดีเอ็นเอจะแยกสายออกเป็นเส้นเดี่ยวสองเส้น แล้วใช้ดีเอ็นเอแต่ละเส้นนั้นเป็นแม่แบบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ของการสร้างดีเอ็นเอเส้นใหม่ต่อไป ทำให้ได้ดีเอ็นเอเส้นคู่ใหม่ (Double strands) 2 คู่ ที่มีลำดับเบสเช่นเดียวกันกับดีเอ็นเอเส้นที่เป็นแม่แบบทุกประการ (ธานินทร์, 2538)

จีโนม (Genome) เป็นคำผสมระหว่างคำว่า Gene + Chromosome ดังนั้น Human Genomes หมายถึง ดีเอ็นเอที่ประกอบเป็นสารพันธุกรรมทั้งหมดที่มีอยู่ในโครโมโซมในนิวเคลียสของแต่ละเซลล์มนุษย์ (อมรา, 2546) โดยทั่วไปสิ่งมีชีวิตจำนวนมากจะมีโครโมโซมเรียงตัวกันเป็นคู่ หรือดิพลอยด์ (Diploid cell: 2n) จีโนมของคนจะประกอบด้วยส่วนที่อยู่ในนิวเคลียสและส่วนที่อยู่ในไมโตคอนเดรีย จีโนมในนิวเคลียสเป็นดีเอ็นเอเส้นยาวเกลียวคู่ มีขนาด $3x10^9$ เบส กระจายอยู่ในโครโมโซม 23 แท่ง จีโนมในไมโตคอนเดรียเป็นดีเอ็นเอรูปวงกลมขนาดเล็กเพียง 16,569 เบส ดีเอ็นเอเกือบทั้งหมดในไมโตคอนเดรียทำหน้าที่เป็นยีนซึ่งจะถูกถอดรหัสเพื่อสร้างอาร์เอ็นเอของไรโบโซม (rRNA), ทีอาร์เอ็นเอ (tRNA) หรือแปลรหัสเป็นสายพอลิเปปไทด์ แต่ดีเอ็นเอในนิวเคลียสส่วนใหญ่เป็นลำดับเบสที่ไม่ใช่รหัส (Non-coding sequence) ซึ่งมียีนอยู่เพียง 50,000-100,000 ยีน คิดเป็น 5-10% ของจีโนมทั้งหมด ขนาดของยีนแต่ละยีนก็จะแตกต่างกันมากตั้งแต่ขนาดเล็กเพียง 0.1 กิโลเบส ได้แก่ ยีนของอาร์เอ็นเอขนาดเล็กที่พบในนิวเคลียส (Small nuclear RNA) ไปจนถึงยีนขนาด 2,000 กิโลเบส ที่พบอยู่บนโครโมโซมเพศหญิง โดยเฉลี่ยยีนของมนุษย์จะมีขนาดประมาณ 5-10 กิโลเบส ซึ่งสร้างโปรตีนที่มีกรดอะมิโนโดยเฉลี่ยประมาณ 300 ตัว ภายในยีนจะมีลำดับเบสบางส่วนที่ไม่ใช่รหัสและถูกตัดออก เรียกว่า อินทรอน (Intron) และส่วนที่เป็นรหัส (Coding sequences) เรียกว่า เอ็กซอน (Exon) ส่วนของจีโนมเกือบ 80% ไม่ใช่รหัส และพบนอกยีน เรียกว่า ส่วนที่ไม่ใช่ยีน (Extragenic) ซึ่งในบริเวณนี้จะพบลำดับเบสซ้ำ (Repetitive sequences) ที่ยังไม่ทราบหน้าที่ชัดเจน (วิชัยและคณะ, 2541)

ดีเอ็นเอที่เป็นเบสซ้ำ (Repetitive DNA)

ดีเอ็นเอในจีโนมของคนประมาณ 30% ประกอบด้วยส่วนที่มีลำดับเบสซ้ำ ดีเอ็นเอบางชุดพบว่า มีจำนวนซ้ำในจีโนมมากกว่า 100,000 ครั้ง ลำดับเบสซ้ำเหล่านี้มีความแตกต่างกันทั้งขนาดและจำนวนซ้ำ สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ เบสซ้ำต่อเนื่อง (Tandem repeats) และ เบสซ้ำกระจาย (Interspersed repeats)

1. เบสซ้ำต่อเนื่อง (Tandem Repeats)

เบสซ้ำต่อเนื่องคือ เบสที่มีการเรียงตัวของเบสซ้ำต่อกันเป็นช่วงยาว ได้แก่ แซทเทลไลท์ (Satellite) มินิแซทเทลไลท์ (Minisatellite) และไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellite) ซึ่งถูกแบ่งออกตามจำนวนซ้ำและความยาวของหน่วยซ้ำ ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

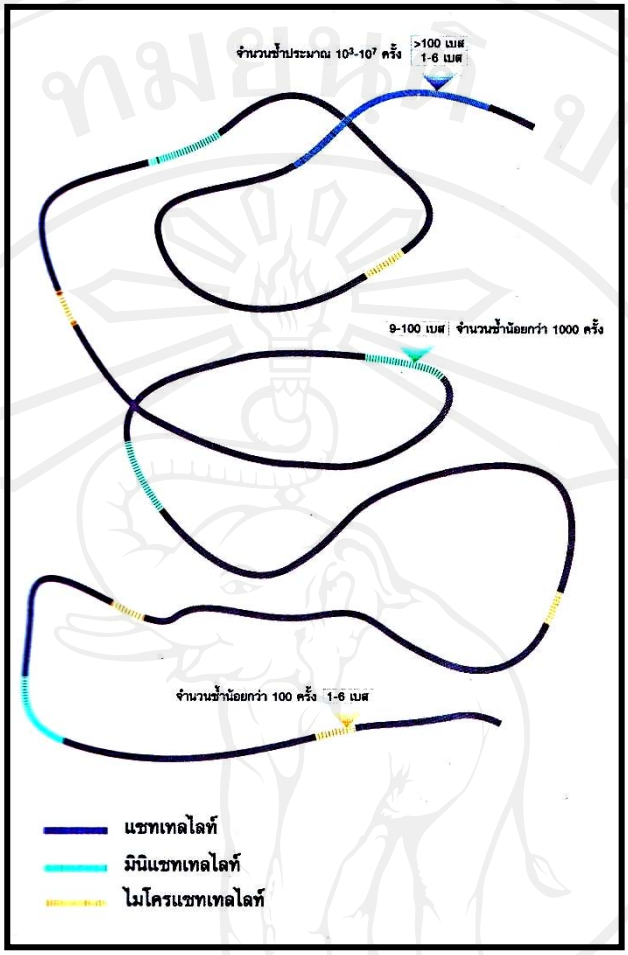
1.1 แซทเทลไลท์ (Satellite) คือ เบสซ้ำสั้นขนาด 1-6 เบส หรือเบสซ้ำยาวขนาดหลายร้อยเบส โดยมีจำนวนซ้ำแต่ละตำแหน่งตั้งแต่ 10^3-10^7 ครั้ง ซึ่งจัดเป็นพวกที่มีการซ้ำของเบสเป็นจำนวนมาก (Highly repetitive DNA) แซทเทลไลท์แต่ละแบบจะพบเพียง 1 หรือ 2 ตำแหน่งต่อโครโมโซม และมักจะพบบริเวณเซนโทรเมียร์ (Centromere)

1.2 มินิแซทเทลไลท์ (Minisatellite) คือ เบสซ้ำขนาด 9-100 เบสที่มีจำนวนซ้ำตั้งแต่ 10 และไม่เกินพันครั้ง ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มที่มีการซ้ำของเบสระดับปานกลาง (Moderately repetitive DNA) ดร. เจฟฟรีย์ และคณะ เป็นกลุ่มแรกที่ค้นพบวิธีการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยนำเบสซ้ำนี้มาใช้เป็นดีเอ็นเอตรวจสอบ จากการศึกษาพบว่ามินิแซทเทลไลท์จำนวนมากมีความคล้ายคลึงกันของลำดับเบส หรือมีลำดับเบสแกน (Core sequence) เดียวกัน ดีเอ็นเอในบริเวณนี้มีความหลากหลายสูงเนื่องจากความแตกต่างในจำนวนซ้ำ บางครั้งจึงมีผู้เรียกว่า Variable Number of Tandem Repeats หรือ VNTR

1.3 ไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellite) คือ เบสซ้ำขนาด 1-6 เบส เช่น $(A)_n$, $(CA)_n$, $(TAA)_n$, $(GATA)_n$ เมื่อ n เป็นจำนวนซ้ำ โดยที่มีจำนวนซ้ำแต่ละตำแหน่งไม่เกิน 100 ครั้ง บางครั้งอาจเรียกเบสซ้ำชนิดนี้ว่า Simple Sequence Repeats (SSR) หรือ Short Tandem Repeats (STRs) เบสซ้ำชนิดนี้พบกระจายอยู่บริเวณต่าง ๆ ของจีโนมประมาณ 10^4-10^5 ตำแหน่ง ความหลากหลายของจำนวนซ้ำที่พบในบริเวณนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจดีเอ็นเอได้ และเนื่องจากไมโครแซทเทลไลท์จำนวนมากถูกพบกระจายอยู่ทั่วไปในโครโมโซมทำให้มีการนำมาใช้ในการสร้างแผนที่จีโนม (Genome mapping) (วิชัยและคณะ, 2541) (ภาพ 5)

หน้าที่ของลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลท์ยังไม่ทราบแน่ชัด มีไมโครแซทเทลไลท์บางส่วนที่มีการอนุรักษ์ (Conserve) โดยพบอยู่ที่ตำแหน่งเดียวกันในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด บางส่วนทำหน้าที่ได้เนื่องจากอยู่ในส่วนนำรหัสของยีน โดยพบอยู่ที่ตำแหน่งเดียวกันในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดจะจับกับโปรตีนที่จำเพาะได้ และทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นการแสดงออกของยีน (Enhancer) โดยความแปรปรวนของจำนวนซ้ำมีผลต่อการควบคุมการทำงานของยีนความยาวของ STR จะแตกต่างกันในแต่ละบุคคล Satellite DNA ชนิด Minisatellite และ Microsatellite เป็นกลุ่มดีเอ็นเอที่แสดงความเป็น Polymorphism ระหว่างบุคคล ความเป็น Polymorphism เกิดจากจำนวนซ้ำที่ต่างกันในระหว่างบุคคลจึงนำมาทำประโยชน์ในการสร้างตำแหน่งแผนที่ต่าง ๆ บนจีโนม (อมรา, 2546) และประยุกต์ใช้ในการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอที่เฉพาะของแต่ละบุคคลได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 5 การเรียงตัวของเบสซ้ำลักษณะต่าง ๆ

ที่มา : ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ...จากสารพันธุกรรมสู่เทคโนโลยีพิสูจน์บุคคล หน้า 17

2. เบสซ้ำกระจาย (Interpersed Repeats)

คือกลุ่มของเบสซ้ำที่พบกระจายอยู่ที่บริเวณต่าง ๆ ในจีโนม ในลักษณะที่ต่างจากกลุ่มเบสซ้ำแบบต่อเนื่อง คือ จะไม่พบซ้ำกันเป็นช่วงต่อเนื่องแต่จะอยู่ในลักษณะเดี่ยว (Individual unit) กระจายทั่วไป ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อยตามความยาวของเบสซ้ำ

2.1 Short Interpersed Nuclear Element (SINE) เป็นเบสซ้ำกระจายสั้น มีขนาดประมาณ 130-300 เบส พบอยู่ในจีโนมในลักษณะที่อยู่เดี่ยว ๆ

2.2 Long Interpersed Nuclear Element (LINE) เป็นเบสซ้ำกระจายยาว มีขนาดตั้งแต่ 500 เบสขึ้นไป พบประมาณ 1-2% ของจีโนม (วิชัยและคณะ, 2541)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ดีเอ็นเอที่พบในสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันจะมีขนาดต่างกันตั้งแต่ดีเอ็นเอที่มีจำนวนพันเบสในไวรัสและแบคทีเรียไปจนถึงดีเอ็นเอขนาดพันล้านเบสในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง ภายในเซลล์ของยูแคริโอต ดีเอ็นเอจะอยู่ภายในนิวเคลียสและกระจายอยู่บนโครงสร้างที่เรียกว่า โครโมโซม (Chromosome) โครโมโซมของยูแคริโอตประกอบด้วยดีเอ็นเอรวมตัวกับโปรตีนอย่างมีแบบแผน โครงสร้างหน่วยพื้นฐานของโครโมโซม เรียกว่านิวคลีโอโซม (Nucleosome) (วิชัยและคณะ, 2541)

นอกจากนี้ดีเอ็นเอยังเป็นหน่วยพื้นฐานของยีน ซึ่งเปรียบเหมือนรหัสทางพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตทั้งมวลไม่ว่าจะเป็น สัตว์ พืช แบคทีเรีย และสิ่งมีชีวิตเล็ก ๆ อย่างอื่น และเนื่องจากในเซลล์มนุษย์ทุกเซลล์ที่มีนิวเคลียสจะมีดีเอ็นเออยู่ เช่น เม็ดเลือดขาว เซลล์รากผม เซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้ม ในน้ำลาย ตัวอสุจิ และชิ้นเนื้อ เป็นต้น ดังนั้นเซลล์เหล่านี้จึงเป็นเซลล์ที่มีความสำคัญในการพิสูจน์สิ่งต่าง ๆ ที่เกิดกับมนุษย์ เช่น พิสูจน์โรคทางพันธุกรรม พิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือด และพิสูจน์ทางนิติเวชศาสตร์เพื่อสืบหาผู้กระทำผิดจากหลักฐานต่าง ๆ ดังที่กล่าวข้างต้น โดยแผงยีนของมนุษย์จะอยู่ในโครโมโซมของคนมี 23 คู่ เรียกว่า Diploid genome ซึ่งโครงสร้างทางเคมีของดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นเส้นยาวเรียงต่อกันของนิวคลีโอไทด์ที่มีเบสเป็นส่วนประกอบการเรียงตัวของลำดับเบสนี้เอง ที่เป็นรหัสสำหรับลักษณะของสิ่งมีชีวิตและยังสามารถถ่ายทอดไปยังลูก-หลานได้

ตามทฤษฎีแล้วถ้าไม่ใช่ฝาแฝดไข่ใบเดียวกัน (Identical twins) ดีเอ็นเอของแต่ละคนจะมีการเรียงตัวของเบสที่ต่างกัน เกิดความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ ทำให้เกิดความหลากหลายหรือดีเอ็นเอโพลีมอร์ฟิซึม (DNA polymorphism) ซึ่งลักษณะนี้จะเป็นเอกลักษณ์ของแต่ละบุคคล ดังเหตุผลที่ว่าโครโมโซมของคนที่มีอยู่ 46 แท่ง โดยครึ่งหนึ่ง (23 แท่ง) มาจากพ่อและอีกครึ่งหนึ่ง (23 แท่ง) มาจากแม่ สมมติว่าการถ่ายทอดโครโมโซมแต่ละแท่งที่มาจากพ่อและแม่เป็นในลักษณะที่เป็นอิสระต่อกัน จะสามารถคำนวณรูปแบบต่าง ๆ ของโครโมโซมที่ถ่ายทอดไปยังลูกหลานได้ถึง 2^{23} ลักษณะ และในกรณีของลูกก็อาจมีรูปแบบของโครโมโซมที่ได้จากพ่อและแม่เป็นแบบต่าง ๆ ได้ถึง 2^{46} ลักษณะที่เป็นเช่นนี้ก็เพราะในระหว่างการแยกตัวของโครโมโซมคู่เหมือน (Homozygous) ระหว่างการแบ่งตัวแบบไมโอซีส (Meiosis) จะเกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วน (Crossing over) ของโครโมโซมคู่เหมือน ซึ่งเป็นผลให้เกิดการรวมตัวใหม่ของยีน (Gene recombination) ซึ่งจะถูกถ่ายทอดไปยังรุ่นลูก ทำให้เซลล์สืบพันธุ์แต่ละเซลล์มียีนที่แตกต่างกัน ดังนั้นดีเอ็นเอของแต่ละคนจึงมีความแตกต่างกัน แม้ว่าจะเกิดมาจากพ่อ แม่เดียวกันก็ตาม (นำชัยและคณะ, 2546) สามารถนำไปตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลได้อย่างชัดเจนและแม่นยำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประโยชน์และการประยุกต์ใช้ดีเอ็นเอในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ (วิชัยและคณะ, 2541)

การตรวจพิสูจน์บุคคล (Individual identification)

ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน วิธีการที่นำมาใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลแบ่งออกเป็นการตรวจลักษณะทางกายภาพของบุคคลนั้น ๆ เช่น ลายพิมพ์นิ้วมือ ลักษณะเส้นผม หรือเส้นขน และการตรวจทางห้องปฏิบัติการทางคลินิก เช่น การตรวจสอบหมู่เลือด การตรวจหาโปรตีนในซีรั่ม การตรวจเอนไซม์ อย่างไรก็ตามวิธีการทั้ง 2 ประเภทมีข้อจำกัดในการนำมาใช้เพื่อพิสูจน์บุคคล เนื่องจากลักษณะทางกายภาพนั้นอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงตามอายุ หรือ สิ่งแวดล้อมของบุคคลนั้นทำให้เกิดความไม่แน่นอนในการแปลผล ปัจจุบันมีเทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรมที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจดีเอ็นเอเพื่อพิสูจน์ และบ่งบอกบุคคล ได้แก่การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค RFLP (Restriction Enzyme Fragment Length Polymorphism) และการตรวจลายพิมพ์ ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) การนำเทคโนโลยีดังกล่าวมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุดในการพิสูจน์บุคคลนั้น ต้องมีตัวเลขทางสถิติเป็นตัวบ่งบอกถึงความน่าเชื่อถือของเทคโนโลยี เพราะตัวเลขดังกล่าว เป็นค่าที่แสดงข้อมูลความถี่ของการกระจายตัวของอัลลีลทั้งหมดในแต่ละตำแหน่ง (Locus) ของประชากรกลุ่มนั้น ๆ

การศึกษาการกระจายตัวของอัลลีลนอกจากจะเป็นการนำข้อมูลดังกล่าว สามารถนำไปคำนวณค่าทางสถิติที่เกี่ยวข้องกับการบอกค่าความน่าจะเป็นหรือ โอกาสที่จะพบว่าบุคคล 2 คน ที่ไม่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือดมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกันหรือเรียกว่า ค่า Pm (Matching Probability) โดยทั่วไปการเลือกตำแหน่งเพื่อนำมาใช้ตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอนั้นต้องพิจารณาเลือกตำแหน่งที่ให้ค่า Pm ต่ำ ซึ่งตำแหน่งเหล่านี้มักจะมีเปอร์เซ็นต์ของค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้ (Heterozygosity) สูงเช่นเดียวกัน เปอร์เซ็นต์ของค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้ เป็นค่าที่บ่งชี้ว่าในประชากรจำนวน 100 คน มีลักษณะอัลลีลเป็นแบบเฮทเทอโรไซโกตในแต่ละตำแหน่งจำนวนเท่าไหร่ ถ้าต้องการลดค่า Pm ให้ต่ำลง หมายถึงการเพิ่มศักยภาพภายในการบ่งบอกบุคคลให้สูงขึ้น สามารถทำได้โดยการเพิ่มจำนวนตำแหน่งหลาย ๆ ตำแหน่ง ซึ่งค่า Pm ลดลง แสดงถึงโอกาสที่บุคคลจะมีลักษณะดีเอ็นเอที่เหมือนกันน้อยลงไปอีก

การพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือด

ในปัจจุบันความจำเป็นของการตรวจหาความสัมพันธ์ระหว่างพ่อกับลูกเป็นที่ต้องการมากขึ้นในสังคมทั่วไป ไม่เพียงแต่ในประเทศไทยเท่านั้น ในประเทศสหรัฐอเมริกาหรือประเทศต่างๆ ในทวีปยุโรปได้มีการตรวจเพื่อพิสูจน์ความสัมพันธ์ลักษณะนี้มากขึ้นเช่นกัน โดยจุดประสงค์ในการตรวจนั้นเพื่อไปใช้เป็นหลักฐานที่สำคัญส่วนหนึ่งสำหรับประกอบการพิจารณาทางกฎหมาย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในศาล เช่น กรณีการฟ้องร้องเพื่อเรียกค่าเลี้ยงดูบุตรเมื่อสตรีถูกทอดทิ้ง หรือการตรวจเพื่อรับรองความเป็นบุตรเมื่อเกิดการอพยพย้ายถิ่นฐาน

เนื่องจากเทคโนโลยีที่นำมาใช้ในการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอนั้นได้ถูกพัฒนาโดยเฉพาะเพื่อนำมาใช้ในการตรวจหาความสัมพันธ์ระหว่างพ่อกับลูก และการชี้เฉพาะบุคคล ซึ่งไม่เพียงเป็นการตรวจเพื่อพิสูจน์ให้ทราบว่าใช่หรือไม่ใช่เท่านั้น แต่ยังสามารถชี้ได้ว่าใครเป็นพ่อที่แท้จริง หากมีผู้ต้องสงสัยที่เข้าข่ายในลักษณะว่าเคยมีความสัมพันธ์กับแม่ของเด็ก (พ่อโดยคำกล่าวหา) การพิสูจน์ทำโดยเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพ่อโดยคำกล่าวหากับเด็ก หากผลการเปรียบเทียบดีเอ็นเอของเด็กไม่ตรงกับแถบดีเอ็นเอของพ่อโดยคำกล่าวหา แสดงว่าพ่อโดยคำกล่าวหากับเด็กไม่มีความสัมพันธ์กันในฐานะพ่อกับลูกอย่างแน่นอนและไม่สามารถโต้แย้งได้ อย่างไรก็ตาม การตรวจที่พบโดยทั่วไปนั้นเป็นการตรวจเพื่อพิสูจน์ความเป็นพ่อมากกว่าการตรวจพิสูจน์ความเป็นแม่ เนื่องจากเป็นแม่ผู้ให้กำเนิดลูกดังนั้นย่อมไม่มีความผิดพลาดอย่างแน่นอน แต่กระนั้นก็ดีถ้าหากเกิดความผิดพลาดน่าจะเป็นความผิดพลาดเนื่องจากสับเปลี่ยนบุตรตอนแรกคลอด ซึ่งมีความจำเป็นต้องตรวจเพื่อพิสูจน์ความเป็นแม่เช่นเดียวกัน

การตรวจสอบความเป็นพ่อ (Paternity test)

การตรวจสอบความเป็นพ่อ หรือสายสัมพันธ์ทางเครือญาติ จะแตกต่างจากการตรวจพิสูจน์บุคคล โดยในการตรวจสอบความเป็นพ่อนี้ การคำนวณความน่าจะเป็นของความเป็นพ่อคิดจากค่าดัชนีความเป็นพ่อ (Paternity Index) ซึ่งมีวิธีการคำนวณที่แตกต่างออกไป โดยจะคิดจากลักษณะทางพันธุกรรม (Genotype) ของชายที่สงสัยเป็นเกณฑ์

Paternity Index (PI) หมายถึง โอกาสที่ชายที่ต้องสงสัยจะถ่ายทอดอัลลีลหนึ่งใด แล้วลูกจะมีลักษณะดีเอ็นเอเช่นนั้น เมื่อเปรียบเทียบกับชายทั่ว ๆ ไปในประชากร โดยเมื่อชายที่ต้องสงสัยมีจีโนไทป์ของอัลลีลนั้นเป็นโฮโมไซโกต ความน่าจะเป็นที่จะถ่ายทอดอัลลีลนั้นไปสู่ลูกจะมีค่าเท่ากับ 1 แต่เมื่อชายที่ต้องสงสัยมีจีโนไทป์ของอัลลีลนั้นเป็นเฮเทอโรไซโกต ความน่าจะเป็นที่จะถ่ายทอดอัลลีลนั้นไปสู่ลูกจะมีค่าเท่ากับ 0.5 (1/2)

การตรวจหลักฐานทางนิติเวชศาสตร์

การสืบสวนทางนิติเวชศาสตร์ปัจจุบันนี้ นอกจากจะใช้วิธีการหาผู้กระทำผิดโดยการสืบหาพยานหลักฐานหรือพยานบุคคลแล้ว หลักฐานทางวิทยาศาสตร์ได้มีส่วนช่วยในการวินิจฉัย หรือตัดสินในคดีที่เกิดขึ้นได้เป็นอย่างมาก หลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่พบส่วนมากเป็นคราบเลือด คราบอสุจิ เส้นผม เส้นขนที่ตรวจพบตามเสื้อผ้าของผู้เสียหาย หรือผู้ต้องสงสัย รวมถึงหลักฐานที่พบในสถานที่เกิดเหตุสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ทั้งสิ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในการประยุกต์ใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากหลักฐานทางนิติเวชศาสตร์กระทำได้โดยการเจาะเลือดของผู้ต้องสงสัยทั้งหมดมาตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และนำมาเปรียบเทียบกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากหลักฐานที่พบในที่เกิดเหตุ

การตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการพิสูจน์บุคคลในระยะแรกใช้วิธีตรวจจากดีเอ็นเอส่วนมินิแซทเทลไลท์ โดยใช้เป็นโพรบในการทำ RFLP โดยโพรบที่ใช้จะตรวจสอบดีเอ็นเอครั้งละหลาย ๆ ตำแหน่ง แล้วค่อยพัฒนามาเป็นโพรบที่ใช้ตรวจสอบตำแหน่งเดียว แต่มีรูปแบบของจำนวนอัลลีลมาก เกิดจากการที่มีจำนวนชุดซ้ำของส่วนมินิแซทเทลไลท์แตกต่างกันการตรวจสอบจะตรวจจากหลายตำแหน่งโดยใช้โพรบชนิดต่าง ๆ แต่ละตำแหน่งมีจำนวนอัลลีลสูง บางตำแหน่งอาจมีมากกว่า 20 อัลลีลในประชากร เมื่อตรวจดีเอ็นเอจากหลายตำแหน่งพร้อมกัน ความน่าจะเป็นที่บุคคลจะมีจีโนไทป์หนึ่ง เมื่อคำนวณจากความถี่ของอัลลีลที่ตำแหน่งต่าง ๆ จะมีค่าต่ำมาก แสดงถึงมีความจำเพาะกับแต่ละบุคคล หรือมีความเป็นเอกลักษณ์สูง แต่เนื่องจากขนาดของอัลลีลที่แตกต่างกันจากการตรวจสอบส่วนมินิแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอนี้มีขนาดใหญ่ บางอัลลีลอาจแตกต่างกันหลายพันคู่เบส อาจวิเคราะห์ผลผิดพลาดได้จึงมีความขัดแย้งในเรื่องนี้

RFLP (Restriction Enzyme Fragment Length Polymorphism) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจความแตกต่างของดีเอ็นเอโดยมีพื้นฐานมาจากวิธีการ เซาเธิ่นบลอทติ่ง (Southern blotting) ที่ถูกพัฒนาขึ้นในปี พ.ศ. 2518 โดยนักวิทยาศาสตร์ชาวสก็อตแลนด์ ชื่อ เอ็ดเวอร์ด เซาเธิ่น (Edward Southern) โดยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) มาตัดดีเอ็นเอ ณ ตำแหน่งจำเพาะแล้วจึงนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกตัดนี้ไปแยกตามขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอนั้น ๆ จะเห็นได้ว่าเทคนิค RFLP นี้เป็นเทคนิคที่ให้ผลการทดลองเป็นแถบดีเอ็นเอจำนวนมาก แสดงว่าเทคนิคนี้อาศัยหลักการในการตรวจหาความแตกต่างของจำนวนเบสซ้ำในหลายตำแหน่งบนโครโมโซมในคราวเดียวกัน ดังนั้นการใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบที่เหมาะสม หรือการใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบมากกว่าหนึ่งชนิด จะทำให้เราสามารถบ่งชี้ถึงความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอ 2 เส้น หรือความแตกต่างของดีเอ็นเอจากคนสองคนได้อย่างชัดเจน (นำชัยและคณะ, 2546)

การตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอส่วนมากใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เพราะเทคนิค PCR ต้องการตัวอย่างดีเอ็นเอที่ใช้ตรวจจำนวนน้อย ใช้ระยะเวลาในการทดสอบน้อย และใช้ได้ในตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีสภาพไม่สมบูรณ์ โดยหลักการของ PCR (Principle of Polymerase Chain Reaction) มีดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

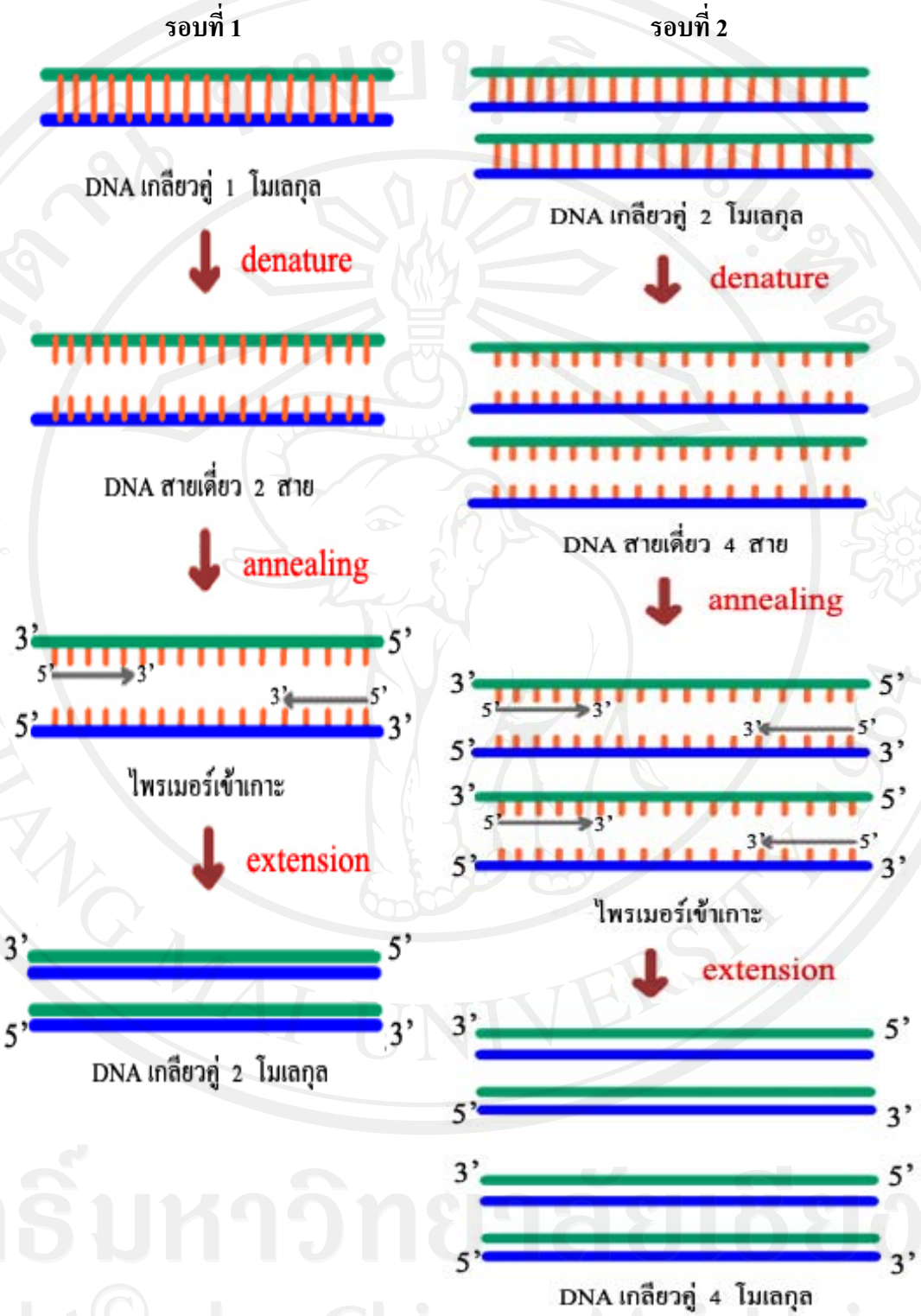
เทคนิค PCR กับการตรวจรูปแบบดีเอ็นเอ

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสหรือ เทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction: PCR) เทคนิคในการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอที่ต้องการได้เป็นล้าน ๆ เท่าในหลอดทดลอง (นำชัยและคณะ, 2546) ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายซึ่งอยู่ในสารละลายร่วมกับดีเอ็นเออื่น ๆ ในเวลาเพียง 2-3 ชั่วโมงเท่านั้น เทคนิค PCR นี้มีข้อดีที่ว่าไม่จำเป็นต้องทำให้ชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวให้บริสุทธิ์ก่อน สามารถแยกส่วนของดีเอ็นเอที่สนใจได้โดยไม่ต้องนำไปขยายเพิ่มปริมาณในเซลล์หรือนำไปโคลน การทำ PCR คือ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสซ้ำกันหลาย ๆ รอบ เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอปริมาณเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ หัวใจของเทคนิค PCR นี้อยู่ที่จำเป็นต้องมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ (DNA primer) 2 ชนิด ซึ่งเป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ขนาดสั้น ๆ ยาวประมาณ 20-24 เบส โดยที่ไพร์เมอร์นี้จะต้องมีลำดับเบสที่เป็นเบสคู่สม (Complementary) กันในตำแหน่งหัว (ปลาย 3') และตำแหน่งส่วนท้าย (ปลาย 5') ของดีเอ็นเอเป้าหมาย และเป็นการกำหนดความยาวของการจำลองโมเลกุลดีเอ็นเอให้อยู่ในช่วงเฉพาะที่ไพร์เมอร์หัวท้ายนี้เท่านั้น การจับของไพร์เมอร์ต่อดีเอ็นเอเป้าหมายมีดังนี้ ไพร์เมอร์ชนิดหนึ่งจะจับที่ปลาย 5' ของสายเดี่ยวสายหนึ่งของโมเลกุลของยีน โดยมีไพร์เมอร์อีกชนิดหนึ่งจับที่ปลาย 3' ของสายเดี่ยวอีกสายหนึ่งของโมเลกุลของยีน (เมื่อทำให้ดีเอ็นเอโมเลกุลของยีนแยกจากสายคู่เป็นสายเดี่ยวแล้ว) (อมรา, 2546)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในรอบแรกจะพบว่า ผลผลิตที่ได้ไม่ได้มีเฉพาะส่วนของดีเอ็นเอบริเวณที่เป็นเป้าหมายเท่านั้น แต่ได้โมเลกุลดีเอ็นเอที่มีสายหนึ่งยาวมากเพราะเป็นต้นแบบเดิม อีกสายหนึ่งเป็นคู่สมมีปลาย 5· เริ่มต้นจากปลาย 5· ของไพร์เมอร์ที่ใช้ ส่วนปลาย 3· ยาวออกไปนอกบริเวณที่ต้องการ ในรอบที่สองยังคงได้ผลผลิตที่มีสายหนึ่งยาวมาก หรือมีปลาย 3· ที่ยาวเกินส่วนที่ต้องการ จนถึงรอบที่สามจึงเริ่มมีโมเลกุลดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากับเป้าหมายที่ต้องการ ซึ่งจะเพิ่มปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ส่วนโมเลกุลที่มีปลาย 3· ยาว จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นรอบละสองโมเลกุลเท่านั้น โดยโมเลกุลที่มีปลาย 3· ยาวดังกล่าวนี้สังเคราะห์มาจากดีเอ็นเอต้นแบบเริ่มต้นที่เป็นสายยาว

เมื่อเปรียบเทียบกันจะพบว่า การสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยรวมเพิ่มขึ้นแบบทวีคูณรอบละ 2 เท่า แต่โมเลกุลที่มีปลาย 3· ยาว เพิ่มขึ้นแบบสม่ำเสมอรอบละ 2 โมเลกุล ถ้าประสิทธิภาพของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสมบูรณ์ จะสามารถคำนวณปริมาณดีเอ็นเอเมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอครบ 30 รอบ ได้ดีเอ็นเอชุดใหม่จำนวน 2^{30} หรือประมาณ 1 พันล้านเท่าในทางทฤษฎี ดีเอ็นเอที่มีปริมาณเป็นนาโนกรัมสามารถขยายให้ดีเอ็นเอเป็นกรัมได้โดย การใช้ PCR จำนวน 30 รอบ (อุไรวรรณ, 2545)

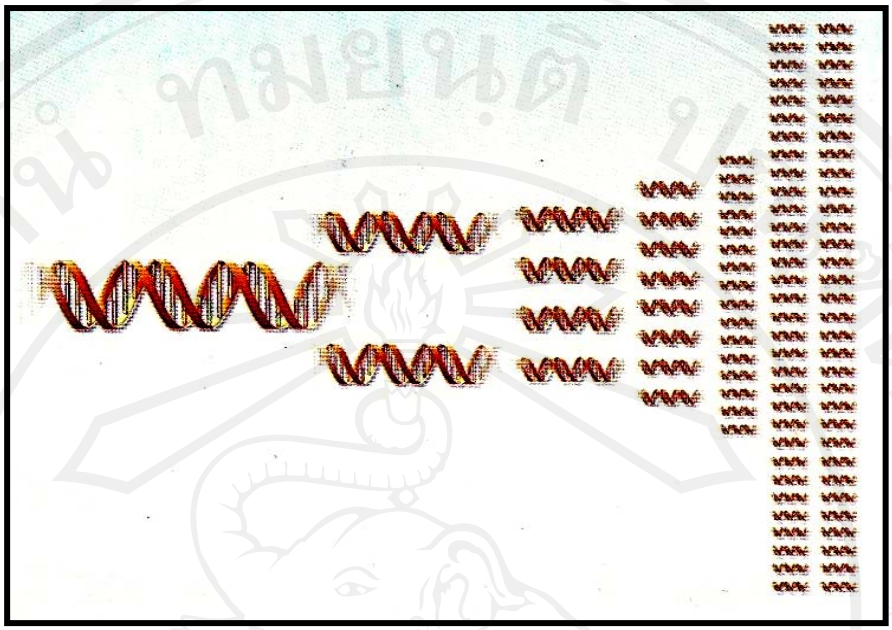
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 6 การทำเทคนิคพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ภายนอกเซลล์

ที่มา: http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/dna/chapter/chapter4application.htm (20 ธันวาคม 2553)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 7 แสดงปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นในลักษณะ 2^n โดยเทคนิคพีซีอาร์

ที่มา : ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ...จากสารพันธุกรรมสู่เทคโนโลยีพิสูจน์บุคคล หน้า 42

ข้อกำหนดในการทำ PCR คือต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ ซึ่งอาจทราบลำดับเบสทั้งหมดหรือทราบเฉพาะส่วนปลายก็ได้ เพื่อการออกแบบสังเคราะห์ไพร์เมอร์มาใช้ในปฏิกิริยาต่อไป บริเวณหรือส่วนดีเอ็นเอที่เกิดการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณขึ้น จะมีขนาดความยาวเท่ากับชิ้นดีเอ็นเอจากปลาย 5' ของไพร์เมอร์หนึ่งถึงปลาย 5' ของไพร์เมอร์อีกชนิดหนึ่งนั้นเอง

ขั้นตอนการทำ PCR ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังนี้

1. Denaturation การทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบสายคู่แยกออกเป็นสายเดี่ยว โดยการเพิ่มอุณหภูมิของปฏิกิริยา

2. Annealing เป็นขั้นที่ไพร์เมอร์ที่มีเบสเป็นคู่สมกับส่วนปลายของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายและมีปริมาณมากกว่าชิ้นดีเอ็นเออื่น ๆ มากมายเข้ามาจับคู่กับส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ เมื่อลดอุณหภูมิของปฏิกิริยาลงมา

3. Primer Extension เป็นขั้นที่ปรับอุณหภูมิให้เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (DNA polymerase) เอนไซม์จะทำหน้าที่สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพร์เมอร์โดยมีดีเอ็นเอเป้าหมายเดิมเป็นต้นแบบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เนื่องจากเทคนิค PCR เป็นเทคนิคที่มีความไว (Sensitivity) สูง สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นล้าน ๆ เท่าได้อย่างรวดเร็ว โดยใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้นเพียงเล็กน้อยก็สามารถตรวจสอบได้ ดังนั้นจึงต้องระมัดระวังการปนเปื้อนของดีเอ็นเอจากภายนอก เช่น จากอากาศ ผิวหนัง ผม เป็นต้น เพื่อป้องกันปัญหาดังกล่าวจึงควรทำ PCR ในบริเวณที่สะอาดไม่ปะปนกับการทดลองอื่น ในการทำ PCR ต้องใช้สารเคมีต่าง ๆ ดังนี้

1. บัฟเฟอร์ (10X buffer) ใช้สำหรับทำปฏิกิริยา โดยมีความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของที่จะใช้จริง ซึ่งจะใส่ในปริมาณ 1 ใน 10 ของปริมาตรรวมทั้งหมดของปฏิกิริยา

2. dNTP ประกอบด้วย dATP, dCTP, dGTP, dTTP ความเข้มข้นอย่างละ 1 มิลลิโมลาร์ (mM) ในปฏิกิริยาจะใส่ในปริมาณ 1 ใน 10 ของปริมาตรรวมของปฏิกิริยา เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็นชนิดละ 100 ไมโครโมลาร์ (μM)

3. ไพร์เมอร์ (Forward primer และ Reverse primer) ที่นิยมใช้คือโอลิโกนิวคลีโอไทด์ขนาด 20-24 นิวคลีโอไทด์ มีองค์ประกอบของเบส G และ C อยู่ระหว่าง 40-60 %

4. ดีเอ็นเอเป้าหมาย (DNA template) ใช้ได้ทั้งดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีและดีเอ็นเอที่มีคุณภาพไม่ดีนัก เช่น ดีเอ็นเอจากคราบเลือด เป็นต้น

5. เอนไซม์ เนื่องจากขั้นตอนในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR ต้องมีการทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพด้วยความร้อน เอนไซม์ที่ใช้จึงเลือกใช้เอนไซม์ที่ทนได้ในอุณหภูมิสูงคือ Taq DNA polymerase (อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานคือ 72ºC)

เมื่อทำการเพิ่มดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR แล้ว ต้องนำมาแยกขนาดบนตัวกลางที่เหมาะสม เพื่อทำการวิเคราะห์ผลลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ได้ โดยเทคนิคที่นิยมคือ เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis technique) ซึ่งมีหลักการทำดังนี้

การแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis of DNA)

อิเล็กโทรโฟรีซิส เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโมเลกุลของสารที่มีประจุออกจากกันโดยใช้กระแสไฟฟ้า โดยให้สารที่มีประจุนั้นเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางชนิดหนึ่งในสารละลาย สารที่มีประจุต่างกันจะเคลื่อนที่ไปในทิศทางตรงกันข้าม นอกจากประจุแล้วอัตราการเคลื่อนที่ยังขึ้นอยู่กับขนาดรูปร่างโมเลกุล แรงเคลื่อนไฟฟ้า และตัวกลางที่ใช้ด้วย

โมเลกุลของดีเอ็นเอประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟตจำนวนมากสารละลายของดีเอ็นเอจึงมีประจุเป็นลบเมื่อ pH เป็นกลาง เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าโมเลกุลของดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก เนื่องจากหมู่ฟอสเฟตเป็นส่วนประกอบของนิวคลีโอไทด์ทุกชนิด ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะมีหมู่ฟอสเฟตอยู่น้อยกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ ดังนั้นจะพบว่าประจุต่อมวลโมเลกุล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ของดีเอ็นเอทุกขนาดมีค่าเท่ากัน ความเร็วในการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอจึงขึ้นอยู่กับขนาดเป็นส่วนใหญ่ อย่างไรก็ตามมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอด้วย ดังนี้

1. ขนาดของโมเลกุล ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ ดังนั้นถ้าต้องการทราบขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอ สามารถทำได้โดยการนำมาวิ่งผ่านเจลในชุดอิเล็กโทรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดโมเลกุลแล้ว ทั้งนี้จะต้องเปรียบเทียบในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสคราวเดียวกันเท่านั้น

2. โครงแบบของดีเอ็นเอ (Configuration) กรณีที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากัน ดีเอ็นเอที่มีโครงแบบเป็นวงแหวนที่พันเกลียวซ้อนจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอปลายเปิดแบบเส้นตรง และดีเอ็นเอแบบเส้นตรงจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอแบบวงแหวนที่มีช่องเปิด

3. เปอร์เซ็นต์และชนิดของเจล ถ้าเพิ่มความเข้มข้นหรือเปอร์เซ็นต์เจล โมเลกุลของดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ได้ช้าลง โดยเจลที่นิยมใช้กับกรดนิวคลีอิก คือเจลพอลิอะครีลาไมด์ (Polyacrylamide gel) และ เจลอะกาโรส (Agarose gel) โดยเจลพอลิอะครีลาไมด์ใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กระหว่าง 6-1000 คู่เบส ได้มีประสิทธิภาพมากที่สุด เจลพอลิอะครีลาไมด์มีอำนาจในการจำแนกสูงมาก สามารถจำแนกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันแม้เพียง 1 bp ก็สามารถแยกออกจากกันได้ ส่วนเจลอะกาโรสใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ประมาณ 200 bp จนถึงกว่า 5 kb มีอำนาจจำแนกต่ำกว่าเจลพอลิอะครีลาไมด์แต่มีช่วงการจำแนกสูงกว่า (อุไรวรรณ, 2545)

4. แรงเคลื่อนไฟฟ้า (Voltage) ถ้าเพิ่มแรงเคลื่อนไฟฟ้าดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ได้เร็วขึ้น ในการแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ต้องใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าที่เหมาะสม ถ้าใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าสูงเกินไป ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ได้เร็วแต่การแยกตัวจะไม่ดี ถ้าใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าต่ำเกินไป ดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ช้าแยกตัวได้ดี แต่แถบดีเอ็นเอจะไม่คมชัด เพราะเกิดการแพร่ของดีเอ็นเอ

5. บัฟเฟอร์ที่ใช้ ชนิดของบัฟเฟอร์มีผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้มี 3 ชนิดคือ TAE (Tris-acetate, EDTA), TBE (Tris-borate, EDTA) และ TPE (Tris-phosphate, EDTA) ซึ่งมีข้อดีและข้อเสียต่างกัน TBE นิยมใช้ที่ความเข้มข้น 0.5 เท่า ใช้แยกดีเอ็นเอได้ดี มีความสามารถเป็นบัฟเฟอร์ (Buffering capacity) ได้ดี แต่สามารถเกิดปฏิกิริยากับเจลอะกาโรสได้ จึงไม่เหมาะถ้าต้องการนำดีเอ็นเอกลับมาใช้อีก

เจลพอลิอะครีลาไมด์ (Polyacrylamide gel) นิยมนำมาใช้ในการแยกดีเอ็นเอมากที่สุด เนื่องจากดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ ที่ใช้มีขนาดของโมเลกุลเล็ก ดังนั้นการใช้เจลพอลิอะครีลาไมด์จึงเหมาะสมที่จะเป็นตัวกลางมากที่สุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เจลพอลิอะครีลาไมด์ (Polyacrylamide gel)

เจลพอลิอะครีลาไมด์เกิดจากการรวมตัวของ Acrylamide และ Bisacrylamide (N',N'-Methylenebisacrylamide) โมเลกุลเดี่ยวมารวมตัวกัน เกิดเป็นพอลิเมอร์ซึ่งมีลักษณะเป็นร่างแห เป็นโมเลกุลที่สังเคราะห์ขึ้นทางเคมี ทำให้เสถียรภาพโดย TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylene Diamine) จึงมีความสม่ำเสมอควบคุมขนาดได้ ไม่ทำปฏิกิริยากับสารเคมีใด มีความใส มีความคงตัวของ pH อุณหภูมิ และมี Ionic strength กว้าง สามารถปรับขนาดของช่องพอลิเมอร์ได้ จึงเหมาะสมสำหรับเป็นตัวกลางในการแยกโมเลกุลของโปรตีนและดีเอ็นเอ

อะครีลาไมด์ และ บิสอะครีลาไมด์ โมเลกุลเดี่ยว เป็นสารที่เป็นพิษและสามารถดูดซึมผ่านทางผิวหนังได้ จึงควรสวมถุงมือขณะปฏิบัติงาน พอลิอะครีลาไมด์ที่ใช้กันทั่ว ๆ ไปมี 2 ชนิดคือ Non-denaturing polyacrylamide gels สำหรับแยกโมเลกุลของดีเอ็นเอที่เป็นเกลียวคู่ตามสภาพธรรมชาติ และทำให้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอสายคู่บริสุทธิ์ และ Denaturing polyacrylamide gels สำหรับแยกและทำให้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวผ่านการทำให้เสียสภาพแล้ว โดยเติมยูเรียลงไปในเจล ให้มีความเข้มข้น 7-8 โมลาร์และทำให้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวบริสุทธิ์ (อุไรวรรณ, 2545) gel ทั้ง 2 ชนิด มีวิธีเตรียมเหมือนกัน ต่างกันเฉพาะการเติม หรือไม่เติมยูเรียเท่านั้น

การตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอนอกจากจะเข้าใจวิธีการตรวจอย่างชัดเจนแล้ว จำเป็นต้องรู้ว่าวิธีการตรวจที่ใช้มีประสิทธิภาพมากน้อยเพียงใด โดยทั่วไปประสิทธิภาพของการตรวจดีเอ็นเอนั้นสังเกตได้จากหลาย ๆ ปัจจัยรวมกัน ไม่ว่าจะเป็น ค่ากำลังการแยกแยะ ค่ากำลังการคัดออก และค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity) เป็นต้น ซึ่งจะได้อธิบายดังต่อไปนี้

ดีเอ็นเอในการวิเคราะห์ประชากร

ประชากร (Population) หมายถึงกลุ่มของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งที่อาศัยอยู่ในบริเวณหนึ่งในช่วงเวลาหนึ่ง ในประชากรจะมีการผสมพันธุ์กันระหว่างสมาชิกในประชากร ดังนั้นประชากรจึงมีลักษณะเป็นแหล่งรวมยีน (Gene pool) ที่ควบคุมลักษณะต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิต โดยยีนที่ควบคุมลักษณะหนึ่ง ๆ อาจมีได้หลายรูปแบบ (Allelic form) และความถี่ของยีนแต่ละอัลลีลอาจจะเปลี่ยนแปลงได้ตลอดเวลา ขอบเขตของประชากร บางครั้งอาจไม่ได้แบ่งแยกอย่างชัดเจน อาจเกิดการถ่ายเทยีน (Gene flow) ระหว่างประชากรที่อยู่ต่างพื้นที่ โดยเฉพาะในสัตว์ที่มีการเคลื่อนย้ายถิ่นฐานได้ ไม่ว่าจะเป็นสัตว์บกหรือสัตว์น้ำก็ตาม ทำให้มีการถ่ายเทยีนถึงกันและกันได้ การศึกษาทางพันธุศาสตร์ประชากร อาศัยการตรวจวัดลักษณะของสมาชิกในประชากรจำนวนมาก โดยอาจตรวจสอบจากลักษณะที่ปรากฏเป็นฟีโนไทป์ หรือตรวจสอบจากจีโนไทป์ในรูปของความถี่ของจีโนไทป์ หรือความถี่ของอัลลีลต่าง ๆ ของยีนที่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ ในประชากร การมีรูปแบบของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อัลลีลที่แตกต่างกันเป็นพื้นฐานของความหลากหลายทางพันธุกรรม ซึ่งมีความสำคัญในการวิวัฒนาการ เพราะถ้าไม่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม ความสามารถในการอยู่รอดที่สภาวะต่าง ๆ ก็จะลดน้อยลง อาจเกิดการสูญพันธุ์ได้ การประมาณค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม จะใช้วิธีวัดจากความถี่ของอัลลีลหรือความถี่ของจีโนไทป์

สมดุลของฮาร์ดีและไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg equilibrium: HWE)

ในปี ค.ศ. 1908 ฮาร์ดี (G.H. Hardy) เป็นนักคณิตศาสตร์ชาวอังกฤษ และไวน์เบิร์ก (W. Weinberg) เป็นแพทย์ชาวเยอรมัน ต่างคนต่างค้นพบว่า ในประชากรที่สมาชิกเป็น Diploid (2n) ความถี่ของจีโนไทป์จะมีความสัมพันธ์กับความถี่ของอัลลีล และเกิดความสมดุลในประชากร ถ้าประชากรเป็นไปตามเงื่อนไขต่าง ๆ ต่อไปนี้ คือ มีการผสมพันธุ์อย่างสุ่ม มีประชากรขนาดใหญ่หรือมีสมาชิกมาก ยีนไม่มีการกลายพันธุ์ หรือไม่มีการอพยพย้ายถิ่นฐาน และไม่มีการคัดเลือก หลักการที่ค้นพบต่อมาได้ตั้งเป็นกฎ เรียกตามผู้ค้นพบว่า กฎของ Hardy -Weinberg (ดาวรุ่ง, 2546) ตัวอย่างเช่น ลักษณะที่ควบคุมด้วยยีน 1 คู่ที่มีรูปแบบของอัลลีล 2 แบบ ถ้าให้สัญญาลักษณ์เป็น A และ a จะมีจีโนไทป์ได้ 3 แบบ คือ AA, Aa และ aa ความถี่ของอัลลีลเด่น A ให้แทนด้วย p และความถี่ของอัลลีลด้อย a ให้แทนด้วย q เนื่องจากมีรูปแบบของอัลลีลเพียง 2 แบบ ดังนั้น ผลรวมความถี่ของอัลลีลทั้งหมดที่ตำแหน่งนี้จะเท่ากับ 1

$$p + q = 1$$

ถ้ากำหนดให้ประชากรมีขนาดใหญ่ สมาชิกในประชากรมีการผสมแบบสุ่ม คือ เพศผู้และเพศเมียทุกจีโนไทป์มีโอกาสผสมพันธุ์ได้เท่า ๆ กัน หรือทุกอัลลีลจากเพศผู้และเพศเมียมีโอกาสผสมพันธุ์ได้เท่า ๆ กัน ไม่มีการคัดเลือก (Selection) ไม่มีการอพยพย้ายถิ่น (Migration) ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน (Mutation) และมีการกระจายตัวของอัลลีลปกติตามกฎเมนเดล จะพบว่าประชากรที่อยู่ในสมดุลของฮาร์ดีและไวน์เบิร์ก ซึ่งจะสามารถคาดคะเนค่าความถี่ของจีโนไทป์โฮโมไซโกตแบบเด่น AA ได้เท่ากับ p^2 ความถี่ของจีโนไทป์เฮเทอโรไซโกต Aa เท่ากับ 2pq และความถี่ของจีโนไทป์โฮโมไซโกตแบบด้อย aa = q^2 เมื่อรวมความถี่ของจีโนไทป์ทุกแบบของยีนที่ตำแหน่งนั้นจะเท่ากับ 1

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

การตรวจสอบประชากรเพื่อพิสูจน์สภาพสมดุลตามกฎของ Hardy - Weinberg อาจทำได้หลายวิธี เช่น สุ่มตัวอย่างประชากรรุ่นต่อไป (รุ่นลูก) เพื่อเปรียบเทียบว่าค่าความถี่ของอัลลีลเปลี่ยนแปลงไปหรือไม่ แต่ส่วนมากแล้ว คำถามมักเกิดขึ้นเมื่อมีตัวอย่างประชากรเดียว โดยไม่มี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ข้อมูลประชากรรุ่นลูกให้เปรียบเทียบ อย่างไรก็ตาม การตรวจสอบจากตัวอย่างประชากรเดียวก็ทำได้เช่นกัน เนื่องจากการถามว่าประชากรอยู่ในสภาพสมดุลตามกฎของ Hardy - Weinberg หรือไม่ ก็เหมือนเป็นการถามว่าจีโนไทป์ 3 ชนิด เช่น AA, Aa, aa มีอยู่ด้วยความถี่เท่ากับ p^2, 2pq, q^2 ตามลำดับหรือไม่ ถ้าความถี่เท่ากันก็สรุปได้ว่าประชากรนั้นอยู่ในสภาพสมดุล ถ้าความถี่ไม่เท่ากันก็แสดงว่าประชากรนั้นไม่อยู่ในสภาพสมดุล ทำได้โดยการทดสอบ Chi-square test (X^2) เพื่อเปรียบเทียบค่าสังเกต หรือค่าที่สำรวจได้จากประชากรกับค่าคาดหวังว่าเท่ากันหรือไม่ ค่าสังเกตหมายถึง จำนวนของจีโนไทป์แต่ละชนิดที่สำรวจได้ ส่วนค่าคาดหวังหมายถึง จำนวนของจีโนไทป์แต่ละชนิดที่คาดคะเนตามค่า p^2, 2pq และ q^2 (ดาวรุ่ง, 2546)

สิ่งมีชีวิตพวกที่มีการผสมข้ามตามธรรมชาติ และอยู่ในประชากรขนาดใหญ่มักอยู่ในสมดุลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กอยู่แล้ว เนื่องจากประชากรมีขนาดใหญ่ ผลที่เกิดจากการกลายพันธุ์หรือการคัดเลือกจะมีน้อย แต่ก็มีประชากรจำนวนมากที่ไม่อยู่ในสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก เช่น สิ่งที่มีชีวิตที่สืบพันธุ์โดยไม่ใช้เพศ หรือเกิดจากสาเหตุอื่น ทั้งนี้ต้องแน่ใจก่อนว่าผลการตรวจสอบที่เบี่ยงเบนไปจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ไม่ได้เกิดจากความบกพร่องของการสุ่มตัวอย่าง หรือจำนวนตัวอย่างที่สุ่มมาไม่เพียงพอ ทำให้คำนวณค่าความถี่อัลลีลคลาดเคลื่อน การสรุปผลตามสมดุลฮาร์ดีและไวน์เบิร์กจึงไม่น่าเชื่อถือ

การประมาณค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (Estimation of Genetic Diversity)

วิธีการประมาณค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรมีหลายแบบ ดังจะอธิบายต่อไปนี้

1. การประมาณค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมจากค่าสัดส่วนของเฮเทอโรไซโกตที่ตรวจพบ (Observed Heterozygosity: H_o) โดยจะคิดสัดส่วนระหว่างจำนวนสมาชิกที่มีจีโนไทป์เป็นเฮเทอโรไซโกต ต่อจำนวนสมาชิกทั้งหมด ซึ่งการประมาณค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมวิธีนี้ผลที่ได้จะขึ้นกับอยู่จำนวนตัวอย่างที่สุ่มมา ถ้าจำนวนตัวอย่างที่สุ่มมามีน้อย อัลลีลที่ได้ก็จะน้อย สัดส่วนของเฮเทอไซโกตที่ตรวจพบอาจเบี่ยงเบนไปได้

2. การประมาณค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยการใช้ค่า Gene diversity (h) ซึ่งไม่ค่อยขึ้นกับขนาดประชากรเท่ากับวิธีอื่น ๆ โดยคำนวณได้จากสูตร (Bhoopat, 1996)

$$\text{Heterozygosity}(h) = \frac{n(1-\sum pi^2)}{n-1}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อ pi = ความถี่ของแต่ละอัลลีล

n = จำนวนอัลลีลที่ทำการสำรวจ

h = ค่า Heterozygosity ที่คาดหวัง

N = จำนวนกลุ่มตัวอย่าง

ค่าที่ใช้ในการคำนวณค่า Gene diversity (h) คือ ความถี่ของอัลลีลต่าง ๆ ในประชากร โดย h เป็นความน่าจะเป็นที่พบว่าอัลลีล 2 อัลลีล ที่ตำแหน่งหนึ่งของสมาชิกที่สุ่มมามีความแตกต่างกัน ซึ่งก็คือค่าเฮเทอโรไซโกตที่คาดหวัง เมื่อประชากรอยู่ในสมดุล (Expected Heterozygosity: H_e) ดังนั้นจึงมักแทนค่า Gene diversity ด้วย H_e ในการวิเคราะห์ประชากรมักจะตรวจสอบด้วยดีเอ็นเอหลายตำแหน่ง ดังนั้นจึงคำนวณค่า H_e ของแต่ละตำแหน่ง แล้วคิดเป็นค่าเฉลี่ยของทุกตำแหน่ง

ค่ากำลังการแยกแยะ (Power of Discrimination: PD

ค่ากำลังการแยกแยะ (Power of Discrimination: PD) เป็นค่าที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพของดีเอ็นเอ ว่าสามารถแยกแยะแต่ละบุคคลออกจากกันได้มากน้อยเพียงใดซึ่งค่า PD ที่สูงสามารถแยกความแตกต่างของบุคคลได้สูง และค่านี้จะเป็นประโยชน์ในแง่ของการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล โดยคำนวณได้จากสูตร (Zarrabeitia *et al*., 2006)

Power of Discrimination in Females (PD_F)

$$PD\,(\text{female sample}) = 1 - 2\left(\sum Pi^2\right)^2 + \sum Pi^4$$

Power of Discrimination in Males (PD_M)

$$PD\,(\text{male sample}) = 1 - \sum Pi^2$$

เมื่อ Pi คือค่าความถี่ของแต่ละอัลลีล

ค่ากำลังการคัดออก (Power of Exclusion: PE)

ค่ากำลังการคัดออก (Power of Exclusion: PE) เป็นอีกค่าหนึ่งที่บ่งบอกประสิทธิภาพของการตรวจดีเอ็นเอได้ ค่านี้จะเป็นค่าที่สามารถคัดคนที่ไม่ใช่บิดาออกไปได้ซึ่งมีประโยชน์ในการพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือด โดยมีสูตรการคำนวณที่น่าสนใจ 2 สูตร (Zarrabeitia *et al*., 2006) คือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

$$PE\ (trio) = 1 - \sum Pi^2 + \sum Pi^4 - \left(\sum Pi^2\right)^2$$

$$PE\ (motherless) = 1 - 2\left(\sum Pi^2\right) + \sum Pi^3$$

เมื่อ Pi คือค่าความถี่ของแต่ละอัลลีล

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การตรวจดีเอ็นเอเพื่อพิสูจน์ความเป็นเอกลักษณ์บุคคล หรือการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือด ส่วนใหญ่จะทำการตรวจจากดีเอ็นเอส่วนที่เป็น Microsatellite หรือ STR ซึ่งจะมีหน่วยซ้ำของเบส 1-6 คู่เบส โดยจำนวนซ้ำแต่ละตำแหน่งไม่เกิน 100 ครั้ง ความยาวของดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ จะแตกต่างกันในแต่ละบุคคล ทำให้เกิดความหลากหลาย (Polymorphisms) ในประชากร ความแตกต่างของจำนวนซ้ำที่พบในบริเวณนี้จึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ได้

จากที่กล่าวมาแล้วในข้างต้นว่า Microsatellite หรือ STR เป็นดีเอ็นเอที่นิยมมาใช้ในการตรวจเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลและการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือด มีความน่าเชื่อถือมากในปัจจุบัน ดังนั้นจึงมีการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์กันมาก และประเทศไทยเองก็ได้ทำการศึกษา เช่น Chantratita *et al.* (2001) ได้ทำการศึกษา Microsatellite DNA ทั้ง 9 ตำแหน่ง คือ D3S1358, vWA, FGA, TH01, TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317 และ D7S820 ในกลุ่มประชากรไทยจำนวน 100 คน ที่ไม่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือด โดยใช้ชุดสำเร็จรูป (AmpFlSTR profiler kit) ในการตรวจสอบดีเอ็นเออีก 5 ปี ต่อมาได้มีการทำการศึกษา Microsatellite DNA 15 ตำแหน่ง คือ D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D5S818 และ FGA ในกลุ่มประชากรไทยเพื่อให้ได้ข้อมูลและนำไปใช้ประโยชน์ในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลของประชากรไทย (Rerkamnuaychoke *et al.*, 2006) ในปีเดียวกันนี้ Bhoopat *et al.* ได้ทำการศึกษา Microsatellite DNA อีก 9 ตำแหน่ง คือ D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, TH01, vWA, TPOX และ LPL โดยได้ทำการศึกษาในกลุ่มคนไทยที่ไม่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือดเดียวกันจำนวน 545 คน และจากการศึกษาพบว่าสามารถนำมาใช้ในการตรวจพิสูจน์บุคคลได้

การตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ บางกรณีที่มีความซับซ้อน เช่น การตรวจพิสูจน์ความเป็นพี่น้องเพศหญิงร่วมบิดาเดียวกัน โดยผู้ที่เป็นบิดาไม่สามารถร่วมตรวจได้ เช่น บิดา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ได้เสียชีวิตไปแล้ว หรือกรณีพี่น้องร่วมบิดาแต่ต่างมารดา ต้องการพิสูจน์ว่าทั้งคู่เป็นพี่น้องกันจริงหรือไม่ กรณีดังกล่าวเหล่านี้ต้องใช้ความจำเพาะของการตรวจพิสูจน์โดยต้องอาศัยการตรวจดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์บนโครโมโซมเพศหญิงของบุคคลเหล่านั้นเปรียบเทียบกันเท่านั้น รวมทั้งการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ระหว่างย่ากับหลานสาว ดังนั้นโครโมโซมเพศหญิงจึงมีประโยชน์สำหรับการพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดและการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลในงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ อย่างไรก็ตามก่อนจะนำมาใช้จริงจำเป็นจะต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับค่าความถี่ของอัลลีลต่าง ๆ ที่ปรากฏในตำแหน่งของดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ เหล่านั้นในกลุ่มประชากรที่สนใจ

จากการศึกษาอย่างมากมายในต่างประเทศ พบว่า บนโครโมโซมเพศหญิงมีลักษณะของ Microsatellite DNA หลายตำแหน่ง โดยแบ่งออกเป็นกลุ่ม ๆ ตามตำแหน่งที่อยู่บนโครโมโซม และมีโอกาสที่จะถูกถ่ายทอดไปยังบุคคลที่มีสายเลือดเดียวกันได้ ลักษณะดีเอ็นเอเหล่านี้จะมีความหลากหลาย (Polymorphism) ทำให้สามารถใช้แยกแยะบุคคลต่าง ๆ ออกจากกัน และยังสามารถตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดได้ จากการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมนั้นเป็นที่ทราบกันดีแล้วว่าลูกจะได้รับการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมจากพ่อและแม่คนละครึ่ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งลักษณะของโครโมโซมเพศหญิง (X-chromosome) ตัวหนึ่งจากพ่อจะถูกถ่ายทอดไปยังลูกผู้หญิงทุกคนทำให้เราสามารถตรวจเปรียบเทียบลักษณะดีเอ็นเอบนโครโมโซมเพศหญิงในลูกผู้หญิงทุกคนเพื่อบ่งชี้ความสัมพันธ์เป็นพี่น้องร่วมบิดาเดียวกันได้ นอกจากนี้ยังช่วยพิสูจน์ความสัมพันธ์แบบพ่อกับลูกสาว โดยได้เริ่มมีการศึกษากันอย่างกว้างขวางในต่างประเทศ เช่น Edelmann *et al*. (2001) ได้ศึกษาความหลากหลายของ Microsatellite marker DXS101 ในประชากรของประเทศเยอรมนี โดยใช้ QIAamp DNA blood kit ในการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดจากประชากร 564 คน (ผู้หญิง 348 คน และผู้ชาย 216 คน) ที่ไม่มีความสัมพันธ์กันทางสายเลือด และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค PCR ตรวจสอบ PCR product โดยใช้ Capillary electrophoresis พบว่า ตำแหน่ง DXS101 มีความหลากหลายของจำนวนเบสซ้ำเป็น CTT_m-ATT_n ซึ่งมีทั้งหมด 18 อัลลีล มีความยาวของจำนวนคู่เบสอยู่ในช่วง 179-233 คู่เบส (bp) มีค่าความหลากหลาย (Polymorphism Information Content: PIC) เท่ากับ 0.884 มีค่าโอกาสการคัดออก (Mean Exclusion Chance: MEC) เท่ากับ 0.879 และมีค่ากำลังการแยกแยะ (Power of Discrimination in Females: PD_F) เท่ากับ 0.978 ซึ่งเป็นค่าที่สูงมากสามารถใช้ในการแยกแยะบุคคลออกจากกันได้ในการตรวจสอบการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมระหว่างตำแหน่ง DXS101 กับตำแหน่ง DXS6807 พบว่าทั้งสองตำแหน่งมีการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมเป็นอิสระต่อกัน สรุปได้ว่า Microsatellite marker DXS101 มีความหลากหลายสูง จึงสามารถนำมาใช้ประโยชน์ใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

งานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์และใช้ในการตรวจสอบหาความสัมพันธ์ทางเครือญาติ (Kinship testing) ได้

Wiegand *et al*. (2003) ได้ทำการศึกษา X-STRs 3 ตำแหน่ง คือ DXS6800, DXS101 และ DXS8377 โดยทำการเปรียบเทียบประชากรผู้หญิงและผู้ชาย ในประเทศเยอรมนีและออสเตรีย ทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดจากประชากร Innsbruck ประเทศออสเตรีย จำนวน 405 คน (ผู้หญิง 270 คน และ ผู้ชาย 135 คน) และ ประชากรของ Ulm ประเทศเยอรมนี จำนวน 323 คน (ผู้หญิง 214 คน และผู้ชาย 109 คน) โดยใช้ 5% Chelex 100 จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR ตรวจสอบ PCR product โดย Capillary electrophoresis พบว่าประชากรทั้งสองประเทศมีความคล้ายคลึงกันมากโดยอาศัยค่าที่คำนวณได้ทางสถิติ โดยในตำแหน่ง DXS101 มีค่าความหลากหลาย (PIC) ในประชากรของประเทศเยอรมนีและออสเตรีย เท่ากับ 0.871 และ 0.8579 ค่ากำลังการแยกแยะ (PD) ในประชากรของประเทศเยอรมนีและออสเตรีย เท่ากับ 0.974 และ 0.968 และในตำแหน่ง DXS8377 มีค่าความหลากหลาย (PIC) ในประชากรของประเทศเยอรมนีและออสเตรีย เท่ากับ 0.900 และ 0.920 ค่ากำลังการแยกแยะ (PD) ในประชากรของประเทศเยอรมนีและออสเตรีย เท่ากับ 0.983 และ 0.989 สามารถสรุปได้ว่า X-STRs ทั้ง 3 ตำแหน่ง สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในงานการตรวจพิสูจน์หาความสัมพันธ์ทางเครือญาติ (Kinship analysis) และโดยเฉพาะตำแหน่ง DXS101 และ DXS8377 มีประโยชน์อย่างมากที่สามารถใช้การตรวจพิสูจน์ความเป็นบุพการี (Paternity testing)

Edelmann *et al*. (2004) ได้ทำการศึกษาความถี่ของอัลลีลของ Microsatellites บนโครโมโซมเพศหญิง (X-chromosome) ในประชากรที่แตกต่างกันโดยทำการศึกษาทั้งหมด 9 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่ง GTA172D05, DXS101, DXS7424, DXS6800, DXS6807, DXS6809, DXS6801, DXS6789 และ DXS8377 ทำการเก็บตัวอย่างจากประชากรชนพื้นเมืองในประเทศ Peru (118 Alleles), Ireland (110 Alleles), Germany (900 Alleles) และ Ethiopia (123 Alleles) เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยการใช้เทคนิค PCR ตรวจสอบ PCR product โดยการใช้ Capillary electrophoresis ABI 310 sequencer พบว่า ความถี่ของอัลลีลมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อทำการเปรียบเทียบจำนวนอัลลีลที่ได้จากการสังเกต กับจำนวนอัลลีลที่ได้จากการคาดหวัง และไม่มี Homogeneity ระหว่างประชากรที่ทำการสำรวจ ทำการตรวจสอบยืนยันโดยใช้ Chi-square test จะพบความแตกต่างมากระหว่างประชากรเปรูและเอธิโอเปีย ในประชากรของเยอรมันตำแหน่ง DXS101 กับ DXS7424 มีการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมอย่างไม่เป็นอิสระต่อกัน (Edelmann *et al*., 2002) การที่จะตรวจสอบ Linkage equilibrium ของอัลลีลในประชากรจะต้องสนใจประวัติการอพยพย้ายถิ่นฐานของประชากรด้วยเพื่อให้อยู่ในสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Zarrabeitia *et al*. (2004) ได้ทำการศึกษา X-linked microsatellite ในประชากรทางตอนเหนือของประเทศสเปน 5 ตำแหน่ง คือ HPRTB, DXS101, ARA, DXS7423 และ DXS8377 ทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากประชากรที่อาศัยอยู่ใน Cantabria 244 คน ที่ไม่มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกันทางสายเลือด และอีก 147 คนอาศัยอยู่ในชุมชน Basque ทำการสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยใช้เทคนิค PCR ตรวจสอบ PCR product โดยใช้ Capillary electrophoresis ABI 310 analyzer พบว่าตำแหน่ง DXS101 มีค่ากำลังการแยกแยะในผู้หญิง (PD_F) เท่ากับ 0.974 ค่ากำลังการแยกแยะในผู้ชาย (PD_M) เท่ากับ 0.879 ค่ากำลังการคัดออก (PE trio) เท่ากับ 0.868 และค่า (PE motherless) เท่ากับ 0.778 สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ได้

Gomes *et al*. (2006) ได้ทำการศึกษา Short Tandem Repeat Markers บน X-chromosome ตำแหน่ง DXS7423, DXS101, DXS8377 และ HPRTB เก็บตัวอย่างเลือดจากประชากรชาว Galician ที่อาศัยอยู่ทางตอนเหนือของสเปน จำนวน 65 คน (ผู้หญิง 29 คน และผู้ชาย 36 คน) ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค PCR ใช้ Fluorochrome-labelled primer ตรวจสอบ PCR product โดย Capillary electrophoresis system ABI 310 พบว่า STRs ตำแหน่ง DXS101 มีขนาดของ Fragment อยู่ระหว่าง 187-223 bp มี 12 Alleles การวิเคราะห์ความถี่ของอัลลีลระหว่างผู้หญิงกับผู้ชาย จากตัวอย่างที่ศึกษา ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ได้

Coletti *et al*. (2006) ได้ทำการศึกษาการกระจายตัวของอัลลีลใน X- STRs ทั้ง 6 ตำแหน่ง คือ DX6789, HumARA, DXS7423, DXS6807, DXS101 และ DXS8377 ในตัวอย่างประชากรของอิตาลี โดยทำการเก็บตัวอย่างเลือดจาก Umbrian 100 คน (50 คน จาก Perugia และ 50 คน จาก Terni) ที่ไม่มีความสัมพันธ์กันทางสายเลือด ทำการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ QIAmpDNAMiniKits (Qiagen) จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค PCR วิเคราะห์ผลดีเอ็นเอโดยใช้ Cell lines 9947A (Applied Biosystems, USA) และ K562 (Promega, USA) พบว่า ความถี่ของอัลลีลไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ตามสมดุลของฮาร์ดี-ไวน์เบริ์ก (Hardy-Weinberg Equilibrium) ตำแหน่ง DXS101 มีจำนวน 16 Alleles เมื่อคำนวณค่าทางสถิติโดยใช้ Software powerstats v 2.1 มีค่ากำลังการแยกแยะเท่ากับ 0.960 และค่ากำลังการคัดออก เท่ากับ 0.745 สามารถนำไปใช้ในการตรวจพิสูจน์ความเป็นปัจเจกบุคคลได้

Turrina *et al*. (2007) ได้ทำการพัฒนาและตรวจพิสูจน์ทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ของ STRs บน X-chromosome 12 ตำแหน่ง คือ DXS7132, DXS8387, DXS6809, DXS7133, DXS6789, DXS7424, GATA172D05, HPRTB, DXS7423, GATA31E08, DXS101 และ DXS6807 โดยทำการเก็บตัวอย่างเลือดจำนวน 200 คน (ผู้หญิง 100 คน และ ผู้ชาย 100 คน) ที่ไม่มี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกันทางสายเลือด ที่อาศัยอยู่ทางตอนเหนือของประเทศอิตาลี ทำการสกัดดีเอ็นเอโดย GenomicPrep blood DNA isolation kit จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค PCR วิเคราะห์ผล PCR product โดยใช้ Capillary electrophoresis ABI PRISM 3100 avant genetic analyzer และวิเคราะห์ข้อมูล Genotype โดยใช้ GeneScan software v 3.7 สามารถสรุปได้ว่า 12 X-STRs สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการตรวจพิสูจน์หาความสัมพันธ์ทางสายเลือด (Paternity deficiency)

Cybulska *et al*. (2008) ได้ทำการศึกษาความหลากหลาย (Polymorphism) ของ STRs 4 ตำแหน่ง คือ HPRTB, DXS7432, DXS101 และ DXS8377 โดยทำการเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอจากเลือดผู้ชาย ในประชากรของ Belarusian และ Slovak จำนวน 180 คน และ 116 คน ตามลำดับ ทำการสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค PCR ตรวจสอบ PCR product โดยใช้ Capillary electrophoresis 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems) ใช้ Positive control 2 ตัว คือ K526 และ NA9947A วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ GeneScan-500 ROX international land standard สามารถสรุปได้ว่า ตำแหน่ง DXS8377 และ DXS101 มีความหลากหลายสูงมาก เมื่อเปรียบเทียบกับประชากรของโปแลนด์ และ เยอรมัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ฐานข้อมูลของ STRs จากประชากร Belarus และ Slovakia สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ได้

เป็นที่ทราบกันดีแล้วว่าการแปลผลการตรวจเพื่อบ่งชี้ความน่าเชื่อถือในการพิสูจน์จะมากหรือน้อยนั้นต้องอาศัยข้อมูลค่าความถี่ต่าง ๆ ที่พบในดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ เหล่านั้น ดังนั้นจึงทำการศึกษาหาความถี่ของอัลลีลต่าง ๆ ที่พบในดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ ในกลุ่มประชากรไทยภาคเหนือที่คาดว่าจะมีการถ่ายทอดลักษณะในแต่ละคนเป็นอิสระต่อกัน เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดและการพิสูจน์บุคคลในภาคเหนือได้ เนื่องจากในกลุ่มประชากรคนไทยยังไม่มีการทำวิจัยในตำแหน่ง DXS101 แต่งานวิจัยในลักษณะนี้ได้มีการศึกษากันในหลายประเทศอย่างกว้างขวาง ยกตัวอย่างเช่น Chen and Pu (2004) ได้ทำการศึกษาข้อมูลของโครโมโซมเพศหญิงในตำแหน่ง DXS10011, DXS101, DXS6789, DXS7132, DXS8377 และ DXS9895 ในประชากรชาวไต้หวัน โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากเลือด จำนวน 448 คน (ผู้หญิง 135 คน และผู้ชาย 313 คน) สำหรับตำแหน่ง DXS101 จากนั้นนำมาทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR เมื่อทำการเปรียบเทียบจากค่าที่คำนวนได้ทางสถิติ พบว่า ตำแหน่ง DXS101 มีค่า Heterozygosity เท่ากับ 0.830 และมีค่าการแยกแยะ (PD) เท่ากับ 0.932 ซึ่งถือว่าเป็นค่าที่สูงสำหรับใช้ในการแยกแยะความเป็นเอกลักษณ์บุคคลได้ เมื่อวิเคราะห์ถึงความหลากหลายของจำนวนอัลลีล พบว่าในตำแหน่ง DXS101 มีจำนวนอัลลีลทั้งหมด 14 อัลลีล ซึ่งถือได้ว่ามีความหลากหลายมากเมื่อเทียบกับจำนวนอัลลีลของตำแหน่งอื่น ๆ อีก 5 ตำแหน่ง สามารถสรุปได้ว่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

X-STRs ทั้ง 6 ตำแหน่ง สามารถนำมาใช้ในการตรวจหาความเป็นบุพการีเมื่อเกิดการโต้แย้งในกรณีของเด็กหญิงได้

Shin *et al*. (2005) ได้ทำการศึกษาวิเคราะห์ X-Linked STRs จำนวน 18 ตำแหน่งคือ DXS6807, DXS8378, DXS9895, DXS9902, DXS6801, DXS7132, DXS981, DXS9898, DXS6789, DXS101, DXS6797, GATA172D05, GATA165B12, HPRTB, GATA31E08, DXS8377 และ DXS7423 ในประชากรเกาหลีที่ไม่มีความสัมพันธ์กันทางสายเลือดกันโดยตรง จำนวน 401 คน (ผู้หญิง 181 คน และผู้ชาย 220 คน) โดยสกัดดีเอ็นเอจากเลือดหรือเยื่อบุกระพุ้งแก้ม โดยใช้ Genomic DNA isolation kit จากนั้นเพิ่มประมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR ตรวจสอบ PCR product โดยใช้ 5% Denaturing polyacrylamide gel และย้อมเจลด้วย Silver staining พบว่า เมื่อทำการเปรียบเทียบค่าความถี่ของ อัลลีลทั้ง 13 ตำแหน่ง ในประชากรเกาหลี กับประชากรของเยอรมัน มีเพียง 2 ตำแหน่ง (DXS9895 และ DXS7132) ที่มีการถ่ายทอดลักษณะของอัลลีลแบบไม่เป็นอิสระต่อกัน ส่วนอีก 11 ตำแหน่ง (DXS6807, DXS8378, DXS9902, DXS6801, DXS981, DXS9898, DXS6789, DXS101, DXS6797, GATA172D05, GATA165B12, HPRTB, GATA31E08, DXS8377 และ DXS7423) ซึ่งมีการถ่ายทอดลักษณะของอัลลีลแบบเป็นอิสระต่อกัน ในการเปรียบเทียบกับประชากรของจีน พบเพียง 2 ตำแหน่งคือ HPRTB และ DXS9895 ที่มีการถ่ายทอดลักษณะของอัลลีลแบบไม่เป็นอิสระต่อกัน การหาความถี่ของอัลลีลในตำแหน่ง DXS101 และ HPRTB มีการถ่ายทอดลักษณะของอัลลีลแบบเป็นอิสระต่อกันในประชากรสเปน (Zarrabeitia *et al*., 2002) และสามารถสรุปได้ว่า 18 X-STRs ในประชากรเกาหลีใช้ประโยชน์ในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์และใช้ในการตรวจสอบหาบิดา (Paternity tests) ได้

Yu *et al*. (2005) ได้ศึกษาความหลากหลายของ X-STRs 11 ตำแหน่ง คือ DXS7133, DXS6799, DXS8378, DXS7423, DXS6804, HPRTB, DXS7424, DXS7132, DXS6789, DXS101 และ DXS1214 ในประชากรชาวฮั่น (Han) ที่อาศัยอยู่ทางตอนเหนือของประเทศจีน โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดจำนวน 204 คน (ผู้หญิง 110 คน และ ผู้ชาย 94 คน) โดยใช้ Chelex 100 จากนั้นนำมาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR เมื่อทำการเปรียบเทียบจากค่าที่คำนวนได้ทางสถิติ พบว่า ตำแหน่ง DXS101 มีค่า Heterozygosity (h) เท่ากับ 0.8276 ค่าความหลากหลาย (PIC) เท่ากับ 0.8156 ค่ากำลังการแยกแยะในผู้หญิง (PD_F) เท่ากับ 0.9553 และค่ากำลังการแยกแยะในผู้ชาย (PD_M) เท่ากับ 0.7648 ซึ่งมีค่าสูงมากกว่าตำแหน่งอื่น ๆ ที่ทำการศึกษา ยกเว้นในตำแหน่ง DXS6789 และพบว่าจำนวนอัลลีลของตำแหน่ง DXS101 ที่พบในประชากรชาวฮั่น ที่อาศัยอยู่ทางตอนเหนือของประเทศจีน มีความหลากหลายของอัลลีลทั้งหมด 10 อัลลีล ในการศึกษาความถี่ของอัลลีล X-STRs ทั้ง 11 ตำแหน่ง สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Liu *et al*. (2006) ได้ทำการศึกษารูปแบบความหลากหลายทางพันธุกรรมของ X-STRs 10 ตำแหน่ง คือ DXS7133, DXS6799, DXS8387, DXS7423, DXS6804, HPRTB, DXS7424, DXS7132, DXS6789 และ DXS101 ในประชากรมองโกเลียที่อาศัยอยู่ทางตอนเหนือของประเทศจีน โดยการสกัดดีเอ็นเอจากเลือด จำนวน 100 คน (ผู้หญิง 53 คน และผู้ชาย 47 คน) ที่ไม่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือดกันโดยตรง จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR ผลจากการวิเคราะห์ค่าทางสถิติพบว่า X-STRs ทั้ง 10 ตำแหน่ง มีประสิทธิภาพสูงในงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ได้ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Martins *et al*. (2008) ได้ทำการสร้างฐานข้อมูลทางพันธุกรรมของ X-chromosome ในประชากรชาวเปรู จำนวน 5 ตำแหน่ง คือ DXS6854, DXS7424, DXS101, DXS6808 และ DXS7123 โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มของผู้หญิงและผู้ชาย จำนวน 90 คน โดยไม่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือดกันโดยตรง จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR และนำไปหาลำดับเบสโดยใช้เครื่อง ALF express automated sequencer พบว่าเมื่อทดสอบ Exact test ในประชากรชาวเปรู ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างผู้หญิงและผู้ชาย เมื่อทำการเปรียบเทียบทั้ง 5 ตำแหน่ง พบว่า ตำแหน่ง DXS101 มีค่ากำลังการแยกแยะในผู้หญิง (PD_F) เท่ากับ 0.9657 และมีค่ากำลังการแยกแยะในผู้ชาย (PD_M) เท่ากับ 0.8546 ซึ่งเป็นค่าที่สูงกว่าในตำแหน่ง DXS7424, DXS6854, DXS7132 และ DXS6808 แต่ X-STRs ทั้ง 5 ตำแหน่ง ก็ยังสามารถใช้เป็นเครื่องมือในการปฏิบัติงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ได้ในประชากรชาวเปรูได้

Gu and Li (2006) ได้ทำการวิเคราะห์ STRs บน X-chromosome ทั้ง 10 ตำแหน่ง คือ DXS7133, DXS6799, DXS8378, DXS7423, DXS6804, HPRTB, DXS7424, DXS7132, DXS6789 และ DXS101 โดยทำการเก็บตัวอย่างเลือดจำนวน 98 คน (ผู้หญิง 45 คน และผู้ชาย 53 คน) ที่ไม่มีความสัมพันธ์กันทางสายเลือดของประชากรกลุ่มชาติพันธ์ Ewenke อาศัยอยู่ใน Neimengu ทางตอนเหนือของประเทศจีน ทำการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ Chelex-100 จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค PCR ตรวจสอบ PCR product โดยการย้อม Silver staining สรุปได้ว่าความถี่ของอัลลีลทั้ง 10 X-STRs ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญตามกฎสมดุลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก และข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้มีประสิทธิภาพที่จะนำไปใช้ในการตรวจพิสูจน์บุคคล (Individual identification) ในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์

Gao *et al*. (2007) ได้ทำการศึกษาความถี่ของอัลลีลของ STRs ทั้ง 10 ตำแหน่ง โดยทำการเก็บตัวอย่างเลือดของประชากรที่อาศัยอยู่ในยูนานของประเทศจีน ทำการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ Chelex-100 และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค PCR ตรวจสอบ PCR product โดยใช้การแยกใน 8% Denaturing PAGE gel (ความเข้มข้นของ Urea 7M) แล้วย้อมสีด้วย Silver staining

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สรุปได้ว่าค่าความถี่ของอัลลีล ทั้ง 10 ตำแหน่ง เมื่อใช้สถิติในการวิเคราะห์ข้อมูล ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ตามสมดุลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก และสามารถใช้ในการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือด (Paternity case) ได้

นอกจากนี้ยังมีการนำประโยชน์ของดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์มาใช้ในการตรวจเคสคดีต่าง ๆ เช่นงานวิจัยของ Barbaro *et al*. (2006) ได้ศึกษารูปแบบของ X-STRs เพื่อการตรวจพิสูจน์ประวัติของการตรวจพิสูจน์ความเป็นบุพการีที่มีเพียงบิดาหรือมารดามาตรวจ (Deficiency paternity) โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดของมารดาและลูกสาว พร้อมทั้งสกัดดีเอ็นเอจากรากผมของเด็กผู้หญิงซึ่งถูกฆาตกรรม โดยใช้ DNA IQ™ tissue and hair extraction kit จากนั้นนำมาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR ใช้ X-STRs เพื่อจะตรวจหาความสัมพันธ์ว่าเป็นลูกของมารดาและเป็นพี่สาวของเด็กหญิงหรือไม่ สำหรับการทำ PCR ของ X-STRs ใช้ Mentype® argus X-UL ซึ่งเป็นชุด Kit ที่มีความน่าเชื่อถือโดยทดสอบกับ X- chromosomal STR marker ที่มีการถ่ายทอดลักษณะของอัลลีลอย่างเป็นอิสระต่อกัน 5 ตำแหน่งคือ DXS8378, DXS7132, HPRTB, DXS7423 และ Amelogenin นอกจากนี้ยังได้มีการทดสอบเพิ่มเติมในตำแหน่งที่เป็น Triplex คือ DXS101, DXS6789, HumSTRX1 และตำแหน่งที่เป็น Duplex คือ DXS7133, GATA172D05 ผลจากการศึกษาพบว่า X-STRs สามารถใช้ในกรณีของการตรวจพิสูจน์หาบุพการีในกรณีที่ไม่มีบิดามาตรวจด้วย และสามารถใช้ในงานพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลได้

Toni *et al*. (2006) ได้ศึกษาการนำมาใช้ประโยชน์ของ X-chromosome ในการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดที่เกี่ยวกับการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์พี่สาว-น้องสาว จากรายงาน Subject S1 และ S2 มีแม่ที่ต่างกัน ส่วน S1 พ่อได้เสียชีวิตแล้ว และ S2 อ้างว่า พ่อของ S1 เป็นพ่อของตน การตรวจพิสูจน์ได้ใช้ X-chromosome 4 ตำแหน่ง คือ DXS101, HPRTB, STRX1 และ DXS8377 พบว่า เมื่อใช้สถิติในการคำนวณหาค่า Likelihood Ratio (LR) ของ X-chromosome ทั้ง 4 ตำแหน่ง มีค่าเท่ากับ 495.8 ส่วนค่า LR ของ Autosomal marker ทั้ง 16 ตำแหน่งที่ใช้ในงานทางนิติวิทยาศาสตร์ (D3S1358, vWA, FGA, D8S1179, D21S11, D18S51, D13S317, D7S820, D16S539, THO1, TPOX, CSF1PO, SE33, YNZ22 และ D1S80) มีค่าเท่ากับ 701.1 จะเห็นได้ว่าค่า LR จาก X-chromosome ทั้ง 4 ตำแหน่ง มีค่าต่ำกว่าค่า LR ของ Autosomal marker ทั้ง 16 ตำแหน่งเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ดังนั้นการใช้ X-chromosome ก็เพียงพอที่จะใช้ตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ในกรณีพี่สาว-น้องสาว

เนื่องจากกลุ่มประชากรที่ต่างเชื้อชาติหรือต่างภูมิภาคกันข้อมูลพื้นฐานเหล่านั้นจะมีความแตกต่างกันได้ไม่มากก็น้อย ดังนั้นจำเป็นต้องทำการวิจัยเพื่อให้ได้ข้อมูลสำหรับกลุ่มประชากรในภูมิภาคของตนเอง เพื่อนำมาใช้ให้ถูกต้องและแม่นยำที่สุด จึงมีการศึกษาเพิ่มมากขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในหลาย ๆ ประเทศดังนี้ Gomes *et al*. (2007) ได้ทำการวิเคราะห์ X-STRs 10 ตำแหน่ง (DXS8378, DXS9898, DXS8377, HPRTB, GATA172D05, DXS7423, DXS6809, DXS7132, DXS101 และ DXS6789) ในประชากรแอฟริกัน 3 กลุ่ม โดยทำการสกัดดีเอ็นจากประชากรชายทั้ง 3 กลุ่ม ที่ไม่มีความเกี่ยวข้องกันทางสายเลือดกันโดยตรง จำนวน 237 คน (Angola 74 คน Mozambique 112 คน และ Uganda 51 คน) จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR เมื่อคำนวณทางสถิติพบว่า ค่าโอกาสการคัดออก (MEC) และค่ากำลังการแยกแยะ (PD) สามารถช่วยยืนยันได้ว่า X-STRs ทั้ง 10 ตำแหน่ง สามารถนำมาใช้ในงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ได้ และใช้ในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล (Identification) และการพิสูจน์หาความสัมพันธ์ทางเครือญาติ (Kinship analysis) ได้

Nagai *et al*. (2009) ได้ทำการหาลำดับเบส (Sequence polymorphisms) ของตำแหน่ง DXS6789, DXS8377 และ DXS101 ในประชากรอาเซียน 3 ประเทศ โดยสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด จากทั้ง 3 ประเทศ จำนวน 280 คน (ญี่ปุ่น 130 คน บังคลาเทศ 61 คน และอินโดนีเซีย 89 คน) ซึ่งไม่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือดกันโดยตรง จากนั้นนำมาทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR เมื่อทำการหา Sequence polymorphism พบว่าในตำแหน่ง DXS101 มี Sequence polymorphism ในประชากรญี่ปุ่น 7 อัลลีล ในประชากรบังคลาเทศมี 9 อัลลีล และในประชากรอินโดนีเซียมี 8 อัลลีล สรุปได้ว่า จำนวนอัลลีลที่มีในแต่ละตำแหน่งของประชากรทั้ง 3 ประเทศสามารถใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลได้

จากทฤษฎีดังที่กล่าวไว้ข้างต้นทำให้ทราบว่าค่าความถี่ของอัลลีลต่าง ๆ ที่พบในดีเอ็นเอมีความสำคัญในหลาย ๆ ด้าน ดังนั้นจึงต้องการทำการศึกษาเพื่อหาความถี่ของอัลลีลต่าง ๆ ที่จะพบใน ดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ในกลุ่มประชากรหญิงคนไทยภาคเหนือที่ไม่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือด เพื่อนำมาใช้ในการคำนวณหาโอกาสความสัมพันธ์ทางสายเลือด และสามารถนำผลการวิจัยมาใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงในการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลในภาคเหนือได้

จากงานวิจัยข้างต้นจึงเลือกศึกษาในตำแหน่ง DXS101 เพราะจำนวนชุดเบสซ้ำ (STR) ของดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ที่ตำแหน่ง DXS101 มีความหลากหลายสูงมากและมีประสิทธิภาพในการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางเครือญาติ (Kinship testing) การตรวจพิสูจน์ความเป็นบุพการี (Paternity Index) และการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล (Identification) ในหลาย ๆ ประเทศที่ได้ทำการศึกษามา ดังนั้นจึงคัดเลือกมาทำการศึกษาในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลและการพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดในกลุ่มประชากรคนไทยภาคเหนือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved