การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโครแซทเทลไลท์ DYS390 DYS391 และ DYS393 ในคนไทย

โดย
นางสาวตุลยาภรณ์ อัครพัฒน์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโครแซทเทลไลท์ DYS390 DYS391 และ DYS393 ในคนไทย

โดย

นางสาวตุลยาภรณ์ อัครพัฒน์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

NUCLEOTIDE SEQUENCE ANALYSIS OF DYS390 DYS391 AND DYS393 MICROSATELLITE IN THAI

By

Tulyaporn Akkarapat

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree

MASTER OF SCIENCE

Program of Forensic Science

Graduate School

SILPAKORN UNIVERSITY

2008

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร อนุมัติให้วิทยานิพนธ์เรื่อง “การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโครแซทเทลไลท์ DYS390 DYS391 และ DYS393 ในคนไทย” เสนอโดย นางสาวตุลยาภรณ์ อัครพัฒน์ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

……..
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริชัย ชินะตังกูร)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
วันที่..........เดือน.................... พ.ศ...........

ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธงชัย เตโชวิศาล
2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกพันธ์ บางยี่ขัน
3. รองศาสตราจารย์ พ.ต.อ.หญิง ดร.พัชรา สินลอยมา

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนาพร ชื่นอิ่ม)
............/......................../..............

.... กรรมการ .... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จตุรงค์ พุทธพรทิพย์) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธงชัย เตโชวิศาล)
............/......................../.............. ..../......................../..............

.... กรรมการ .... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกพันธ์ บางยี่ขัน)(รองศาสตราจารย์ พ.ต.อ.หญิง ดร.พัชรา สินลอยมา)
............/......................../.............. ..../......................../..............

49312319 : สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

คำสำคัญ : ดีวายเอส390, ดีวายเอส391, ดีวายเอส393, ไมโครแซทเทลไลท์, ลำดับนิวคลีโอไทด์

ตุลยาภรณ์ อัครพัฒน์ : การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโครแซทเทลไลท์ DYS390 DYS391 และDYS393 ในคนไทย. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: ผศ.ดร.ธงชัย เตโชวิศาล, ผศ.ดร.เอกพันธ์ บางยี่ขัน และ รองศาสตราจารย์ พ.ต.อ.หญิง ดร.พัชรา สินลอยมา. 94 หน้า.

การวิจัยนี้มีจุดประสงค์ที่จะศึกษาความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลท์ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโครแซทเทลไลท์ DYS390 DYS391 และDYS393 ในชายไทย ได้คัดเลือกชายไทยจำนวน 10 คน ที่ไม่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือด และมีภูมิลำเนาแตกต่างกัน ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดด้วย QIAamp® DNA mini kit แล้วทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อไมโครแซทเทลไลท์ DYS390 DYS391 และDYS393 ทำการสกัดดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้ให้บริสุทธิ์ด้วย Gel/PCR DNA fragments extraction kit และทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค dye terminator cycle sequencing kit จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโครแซทเทลไลท์ พบว่า DYS393 มีความหลากหลายมากที่สุด โดยมีค่า maximum distance เท่ากับ 0.024 และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ตรงกัน 14.72% ขณะที่ DYS390 มีความหลากหลายปานกลาง โดยมีค่า maximum distance เท่ากับ 0.01169 และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ตรงกัน 11.98% ส่วน DYS391 มีความหลากหลายน้อยที่สุด โดยมีค่า maximum distance เท่ากับ 0.0066 และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ตรงกัน 6.10% จากข้อมูลการศึกษาความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลท์และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโครแซทเทลไลท์ DYS390 DYS391 และDYS393 ในชายไทยนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญในการคัดเลือกไมโครแซทเทลไลท์ที่เหมาะสมสำหรับชายไทย เพื่อใช้ประกอบการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลได้

สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ปีการศึกษา 2551

ลายมือชื่อนักศึกษา..

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ 1. .... 2. .... 3. ....

49312319 : MAJOR : FORENSIC SCIENCE
KEY WORDS : DYS390 ,DYS391 ,DYS393 , MICROSATELLITE, NUCLEOTIDE SEQUENCE

TULYAPORN AKKARAPAT : NUCLEOTIDE SEQUENCE ANALYSIS OF DYS390 DYS391 AND DYS393 MICROSATELLITE IN THAI. THESIS ADVISORS: ASST. PROF. THONGCHAI TAECHOWISAN, Ph.D., ASST. PROF. EAKAPHUN BANGYEEKHUN, Ph.D., AND ASSOC. PROF.POL.COL. PATCHARA SINLOYMA., Ph.D. 94 pp.

The purpose of this study was to study the polymorphism of microsatellite and nucleotide sequence of microsatellite DYS390 DYS391 and DYS393 in Thai males. In this study selected Thai male of 10 unrelated individuals and different geographical locations. DNA extraction from blood was carried out by the QIAamp mini kit. The microsatellite fragments were amplified using the Polymerase chain reaction (PCR) technique by specific primer of microsatellite DYS390 DYS391 and DYS393. The PCR products were purified using Gel/PCR DNA fragments extraction kit and nucleotide sequence analysis was carried out by dye terminator cycle sequencing kit. The results from nucleotide sequence analysis of these microsatellites showed that DYS 393 had the highest polymorphism with the maximum distance was 0.024 and 14.72% nucleotide sequence non-identity, DYS 390 had the moderate polymorphism with the maximum distance was 0.01169 and 11.98% nucleotide sequence non-identity, where as DYS391 had the least polymorphism with the maximum distance was 0.0066 and 6.10% nucleotide sequence non-identity. These data of polymorphism and nucleotide sequence of DYS390 DYS391 and DYS393 in Thai males could be database for selecting the suitable microsatellite marker for Thai male individual identification.

Program of Forensic Science Graduate School, Silpakorn University Academic Year 2008
Student's signature..
Thesis Advisors' signature 1. .... 2. .... 3. ....

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธงชัย เตโชวิศาล ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้การสนับสนุนวัสดุอุปกรณ์ในการทำวิจัย ให้คำปรึกษาแนะนำ ให้กำลังใจช่วยเหลือและตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วง นอกจากนี้ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกพันธ์ บางยี่ขัน และรองศาสตราจารย์ พ.ต.อ.หญิง ดร. พัชรา สินลอยมา กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รวมทั้งคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่านที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจสอบวิทยานิพนธ์ ทำให้วิทยานิพนธ์มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอพระขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ ช่วยอำนวยความสะดวก และสนับสนุนข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการทำงานวิจัย และขอขอบพระคุณผู้บริจาคโลหิตทุกท่านที่ให้การช่วยเหลือให้ตัวอย่างในงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่และเพื่อน ๆ จากสาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากรทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ สนับสนุนและให้กำลังใจมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัวที่เป็นกำลังใจสำคัญในการศึกษาและการทำงาน ทำให้ผู้วิจัยทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย .... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .... จ

กิตติกรรมประกาศ........ ฉ

สารบัญตาราง .... ฌ

สารบัญภาพ .... ฎ

บทที่

1 บทนำ........ 1

  ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา........ 1

  วัตถุประสงค์ของการวิจัย........ 3

  สมมติฐานของการวิจัย........ 3

  ขอบเขตของการวิจัย 3

  ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ........ 3

  กรอบแนวคิด 4

2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง........ 5

  ความรู้เบื้องต้นทางพันธุศาสตร์ 5

  จีโนมมนุษย์ ดีเอ็นเอ และยีน........ 5

    จีโนม........ 5

    สารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอ........ 10

    ยีน 19

    การถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมโดยการแบ่งเซลล์........ 24

  การกลายพันธุ์ในยีนมนุษย์........ 25

    มิวเตชั่น 26

    การควบคุมอัตราการเกิดมิวเตชั่นในร่างกายมนุษย์ 27

    ขนาดของมิวเตชั่น........ 27

    ชนิดของมิวเตชั่น........ 28

  การสกัดดีเอ็นเอและเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับดีเอ็นเอ........ 31

    การเก็บและการรักษาวัตถุพยานทางชีวภาพ........ 31

    การสกัดดีเอ็นเอ........ 33

บทที่ หน้า
การสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป QIAamp DNA Mini kit 35
ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส หรือ Polymerase Chain Reaction 36
การแปลผลการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 44
การวิเคราะห์ลำดับเบส 44
เทคนิคทางอณูชีวภาพที่ใช้ในงานทางนิติวิทยาศาสตร์ 46
ประโยชน์และการประยุกต์ใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 51
งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 55
3 วิธีดำเนินการวิจัย 59
การเก็บตัวอย่าง 59
อุปกรณ์และสารเคมี 59
วิธีการทดลอง 61
4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล 67
5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ 78
สรุปผลการวิจัย 78
ข้อเสนอแนะ 79

บรรณานุกรม 80

ภาคผนวก 83
ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมี 84
ภาคผนวก ข ลำดับเบสของของคนไทยจำนวน 10 ตัวอย่าง 86

ประวัติผู้วิจัย 94

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 การเก็บรวบรวมวัตถุพยานเพื่อตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ 31

2 แหล่งที่มาของดีเอ็นเอและค่าเฉลี่ยของปริมาณดีเอ็นเอ ได้จากเซลล์หรือเนื้อเยื่อ 34

3 ปริมาณตัวอย่างที่ใช้และปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปQIAamp DNA Mini Kit................................... 35

4 Primer sequence ที่ใช้ในการศึกษา 61

5 โปรแกรมการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ 64

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1 โครโมโซมเกิดจากการที่โมเลกุลพันขดทับกันแน่น 8

2 องค์ประกอบของจีโนมมนุษย์.. 9

3 โครงสร้างเบสที่พบบนสายดีเอ็นเอ เบสพิวรีน และเบสไพริมิดีน 11

4 โครงสร้างเกลียวคู่ของดีเอ็นเอ 13

5 การพันตัวของสายดีเอ็นเอจนกลายเป็นโครโมโซม 14

6 โครโมโซมของมนุษย์ แสดงในรูปแบบของแผนที่ยีน 15

7 การจัดเรียงตัวของดีเอ็นเอและโปรตีนในโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอต 16

8 การแสดงรูปร่างของโครโมโซม 17

9 กระบวนการถอดรหัสและแปลรหัส 24

10 การแบ่งเซลล์ (ก) แบบไมโทซิส (ข) แบบไมโอซิส.. 25

11 การกลายพันธุ์ระดับโครโมโซม.. 30

12 ขั้นตอนของพีซีอาร์ใน 1 รอบปฏิกิริยา... 38

13 ผลการทำ Multiple sequence alignment ของไมโครแซทเทลไลท์ DYS390 68

14 ผลการทำ Multiple sequence alignment ของไมโครแซทเทลไลท์ DYS391 71

15 ผลการทำ Multiple sequence alignment ของไมโครแซทเทลไลท์ DYS393 73

16 แสดงความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ ของไมโครแซทเทลไลท์ DYS390
ในชายไทย 76

17 แสดงความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ ของไมโครแซทเทลไลท์ DYS393
ในชายไทย 77

บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

จากสภาพสังคมที่มีความเจริญก้าวหน้าทางเทคโนโลยีในปัจจุบัน ส่งผลให้การเกิดอาชญากรรมที่เกิดขึ้นในประเทศไทยมีความซับซ้อนและรุนแรงมากขึ้น บางครั้งยากที่จะหาบุคคลใดที่รู้เห็นเหตุการณ์ทำให้ผู้กระทำผิดเป็นจำนวนมากรอดพ้นจากการถูกจับกุมเพราะขาดพยานหลักฐานหรือพยานหลักฐานไม่ชัดเจน ซึ่งผู้กระทำผิดส่วนมากจะเป็นเพศชาย และในสภาพสังคมปัจจุบันการไปมาหาสู่หรือการคมนาคมมีความสะดวกมากขึ้น บางครั้งผู้กระทำผิดจะไม่ใช่คนในพื้นที่นั้นๆ จึงต้องอาศัยการพิสูจน์ทางวิทยาศาสตร์เป็นเครื่องมือสำคัญในการพิสูจน์ความจริง ในอดีตวิธีที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์มักตรวจดูจากหมู่เลือด ตรวจรูปแบบต่างๆ ของโปรตีนเอ็นไซม์ที่ปรากฏในเม็ดเลือดแดง หรือตรวจความหลากหลายของรูปแบบโปรตีนรวมทั้งการตรวจชนิดของเนื้อเยื่อเป็นหลัก แต่ในปัจจุบันความก้าวหน้าทางด้านเทคโนโลยีดีเอ็นเอได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้กับงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ โดยเฉพาะคดีที่ขาดประจักษ์พยาน ซึ่งโดยส่วนใหญ่ของสภาพคดีที่รุนแรงถึงแก่ชีวิต วัตถุพยานที่พบในสถานที่เกิดเหตุมักเป็น คราบเลือด คราบอสุจิ เส้นผม เส้นขน คราบน้ำลาย อาวุธและเสื้อผ้าของผู้เสียหายหรือผู้กระทำความผิดเป็นต้น ซึ่งหลักฐานดังกล่าวข้างต้นจะมีสารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอ เป็นส่วนประกอบที่สามารถนำมาสกัดดีเอ็นเอแล้วนำลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาเปรียบเทียบกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอของผู้ต้องสงสัยได้ หากลายพิมพ์ดีเอ็นเอเป็นแบบเดียวกันก็สามารถเชื่อได้ว่า หลักฐานที่พบในที่เกิดเหตุนั้นเป็นของผู้ต้องสงสัยดังกล่าว เนื่องจากคนแต่ละคนจะมีดีเอ็นเอ หรือ ลำดับนิวคลีโอไทด์บนจีโนมเป็นเอกลักษณ์เฉพาะบุคคลและ ยีนบางตัวก็มีส่วนรับผิดชอบสำหรับพัฒนาการของระบบต่างๆในร่างกาย เช่น ระบบหัวใจและหลอดเลือด สมอง ปอด กระเพาะและลำไส้ เป็นต้น แต่ยีนส่วนอื่น มีหน้าที่ควบคุมลักษณะของแต่ละคน เช่น รูปหน้า สีนัยน์ตา ความสูง สีผิว เชื้อชาติ และอื่นๆ โดยโครโมโซมเพศจะถูกกำหนดโดยการรวมตัวกันของยีนบางประเภท โดยเฉพาะอย่างยิ่ง มนุษย์จะได้รับ โครโมโซม X จากแม่ และได้รับโครโมโซม X หรือ Y จากพ่อ ทำให้มีการจำแนกในระดับจีโนไทป์เพื่อการตรวจพิสูจน์บุคคล หรือตรวจความหลากหลายของอัลลีลของยีนบนโครโมโซม

Microsatellite หรือ Short tandem repeat markers (STR markers) คือ ดีเอ็นเอที่มีการซ้ำกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ มีความยาวประมาณ 1-6 คู่เบส เรียงตัวซ้ำต่อเนื่องกันหลายชุด โดยพบกระจายอยู่ทั่วจีโนม แต่ละบุคคลจะมีจำนวนชุดซ้ำไม่เท่ากัน ซึ่งจำนวนซ้ำๆนี้จะเป็นลักษณะเฉพาะที่ทำให้เกิดความแตกต่างกันในแต่ละบุคคล ในโครโมโซมร่างกายมี STR อยู่หลายแสนตำแหน่ง (loci) แต่นำมาใช้ในทางนิติเวชประมาณ 20 ตำแหน่งเท่านั้น STR จึงมีประโยชน์ในการศึกษาวิวัฒนาการ หรือศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรมได้ดี ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะที่ทำให้เกิดความแตกต่างจากบุคคลอื่น เนื่องจากทำให้พบพอลิมอร์ฟิซึมได้บ่อย กล่าวคือมีความไวในการแยกความแตกต่าง (Sensitivity) ที่ดีบนโครโมโซม ซึ่งเป็นลำดับเบสสายสั้นๆที่มีการเรียงตัวซ้ำๆ กระจายอยู่บนเส้นดีเอ็นเอ

แม้ว่าการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จะมีการพัฒนาวิธีการตรวจพิสูจน์ในขั้นตอนต่างๆ อยู่ตลอดเวลาเพื่อให้การตรวจพิสูจน์มีความรวดเร็วและทันสมัยมากขึ้น แต่เมื่อต้องนำผลการตรวจวิเคราะห์ที่ได้เข้าสู่กระบวนการทางกฎหมาย จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ผู้ตรวจพิสูจน์ต้องยืนยันได้ว่าผลการตรวจนั้นมีความถูกต้องแม่นยำเพียงใด และมีสิ่งใดเป็นเกณฑ์ในการพิสูจน์ว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอนั้นเป็นแบบเดียวกับผู้ต้องสงสัย แล้วมีความน่าเชื่อถือเพียงใด ต้องอาศัยค่าทางสถิติต่างๆ ในการสนับสนุนด้วย หรือค่าอื่นๆ ที่ช่วยสร้างความเชื่อมั่นในผลการตรวจวิเคราะห์ เป็นต้น

สำหรับงานวิจัยของ Kayser et al.(1997) ได้ประเมิน Y ไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 13 ตำแหน่ง คือ DYS19,DYS388,DYS385,DYS388,DYS389I/II,DYS390,DYS391,DYS392, YACI, YACII,DXYS156Y ใน 48 ประชากรที่แตกต่างกันรวม 3,825 คน พบว่า DYS19, DYS389I,DYS389II,DYS390,DYS391,DYS392 และ DYS393 มีประโยชน์มากในทางนิติเวชสามารถใช้ในการระบุตัวบุคคล และระบุการสืบเชื้อสายของฝ่ายชายได้เป็นอย่างดี ส่วน Krawozak และ Roewer (1999) ศึกษาไมโครแซทเทลไลท์ในโครโมโซม Y 8 ตำแหน่ง คือDYS19,DYS389I ,DYS389II,DYS390,DYS391,DYS392,DYS393 และDYS385 ในประชากรชาวคอเคเซียน พบว่าแฮโปลไทป์ที่สร้างได้มีความสามารถในการแยกแยะบุคคลสูง ดังนั้น ผู้วิจัยจึงสนใจจะทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโครแซเท็ลไลท์ของ DYS390,DYS391และ DYS393 ในคนไทยเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญในการคัดเลือกไมโครแซเท็ลไลท์ที่เหมาะสมสำหรับชายไทย และเพื่อใช้ประกอบการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลได้

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

2.1 เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโครแซทเทลไลท์ ตำแหน่งDYS930 DYS391 และ DYS 393 ในคนไทย

2.2 เพื่อศึกษาความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโครแซทเทลไลท์ ตำแหน่ง DYS390 DYS391 และDYS393 ในการนำไปใช้ในงานทางนิติวิทยาศาสตร์

3. สมมติฐานของการวิจัย

สามารถทราบถึงความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโครแซทเทลไลท์ ตำแหน่ง DYS390 DYS391 และ DYS393 ที่แท้จริง และนำเอาข้อมูลมาทำการวิเคราะห์ได้

4. ขอบเขตของการวิจัย

4.1 ทำการเจาะเลือด กลุ่มตัวอย่างที่ได้จากอาสาสมัครที่มีภูมิเลาเนาแตกต่างกันและไม่มีความสัมพันธ์กันทางสายเลือด โดยเลือกจากจังหวัดกรุงเทพมหานคร 3 ตัวอย่าง จังหวัดนครปฐม 3 ตัวอย่าง จังหวัดเชียงใหม่ 2 ตัวอย่าง จังหวัดนครศรีธรรมราช 2 ตัวอย่าง

4.2 ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโครแซทเทลไลท์ DYS390 DYS391 และ DYS393 ในคนไทย

4.3 ศึกษาความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโครแซทเทลไลท์ ตำแหน่ง DYS390 DYS391 และDYS393 คนไทย และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์และสรุปผล

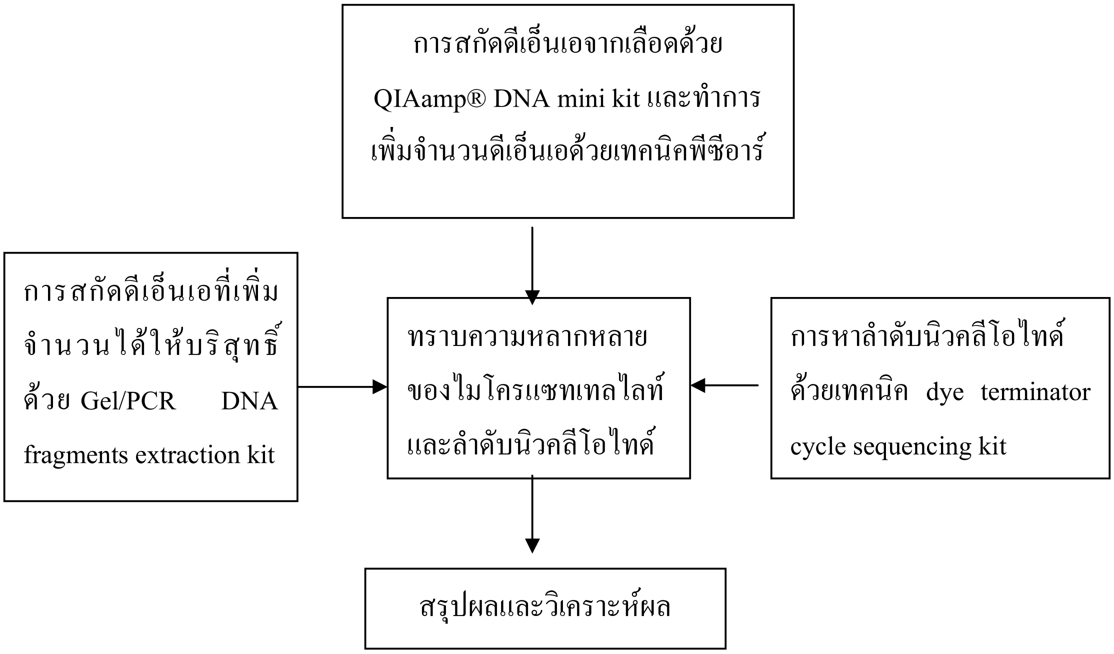
6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

6.1 ทราบถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง DYS390 DYS391 และ DYS393 ในคนไทย

6.2 ได้ข้อมูลความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโครแซทเทลไลท์ ตำแหน่ง DYS390 DYS391 และ DYS393 ในคนไทย

6.3 สามารถนำไปใช้เป็นฐานข้อมูลในงานวิจัยด้านลายพิมพ์ดีเอ็นเอของคนไทย

7. กรอบแนวคิด


การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดด้วย QIAamp® DNA mini kit และทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์
การสกัดดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้ให้บริสุทธิ์ด้วย Gel/PCR DNA fragments extraction kit
ทราบความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลท์และลำดับนิวคลีโอไทด์
การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค dye terminator cycle sequencing kit
สรุปผลและวิเคราะห์ผล

บทที่ 2

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

1. ความรู้เบื้องต้นทางพันธุศาสตร์

มนุษย์มีดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid, DNA) เป็นสารพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายทอดมาจากพ่อครึ่งหนึ่งและจากแม่อีกครึ่งหนึ่ง จึงมีความจำเพาะแตกต่างกันในแต่ละบุคคล โดยมีข้อยกเว้นสำหรับฝาแฝดแท้เท่านั้นที่มีดีเอ็นเอเหมือนกัน ข้อมูลทางพันธุกรรมที่อยู่ในดีเอ็นเอจะถูกนำมาสร้างโปรตีนหลากหลายอย่าง เช่น โปรตีนโครงสร้าง โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ในกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) โปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่งออกซิเจนไปยังส่วนต่างๆของร่างกาย ได้แก่ ฮีโมโกลบิน และโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นฮอร์โมนควบคุมระดับน้ำตาลในกระแสเลือด ได้แก่ อินซูลิน เป็นต้น ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าดีเอ็นเอคือสิ่งที่กำหนดลักษณะและคุณสมบัติของมนุษย์ รวมทั้งเก็บและถ่ายทอดข้อมูลพันธุกรรมไปสู่ลูกหลานรุ่นต่อ ๆ ไป

2. จีโนมมนุษย์ ดีเอ็นเอ และ ยีน (Genome, DNA and Gene)

2.1 จีโนม (Genome)

จีโนม เป็นคำผสมระหว่างคำว่ายีน + โครโมโซม ดังนั้น จีโนมมนุษย์ หมายถึงสารพันธุกรรมทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตซึ่งบรรจุอยู่ในเซลล์ โดยมีอยู่ในสองส่วน คือ ในนิวเคลียส และในไมโตคอนเดรีย (mitochondria) กว่าร้อยละ 99.99 ของจีโนมที่อยู่ในนิวเคลียส มีเพียงส่วนน้อยที่พบในไมโตคอนเดรีย โดยทั่วไปเมื่อกล่าวถึงจีโนมมนุษย์ มักจะหมายถึงสารพันธุกรรมในนิวเคลียสเท่านั้น

2.1.1 จีโนมที่พบในนิวเคลียส หรือ นิวเคลียร์- ดีเอ็นเอ

เป็นดีเอ็นเอเส้นตรงยาวเกลียวคู่ซึ่งอยู่ในนิวเคลียส มีขนาด 3.2 x 10^9 คู่เบสกระจายอยู่ในโครโมโซม 23 แท่ง พบมากถึงร้อยละ 99.9995 ของจีโนมทั้งหมด นิวเคลียร์- ดีเอ็นเอ (Nuclear DNA) ชนิดนี้มีแหล่งกำเนิด 2 แหล่ง คือ ดีเอ็นเอที่ได้จากไข่ (แม่) และดีเอ็นเอที่ได้จากพ่อ (สเปิร์ม) นิวเคลียร์ - ดีเอ็นเอ (Nuclear DNA) จึงเป็นตัวกำหนดลักษณะเฉพาะบุคคล และถูกนำมาใช้ในการศึกษา การถ่ายทอดโรคทางพันธุกรรม หรือการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์หรือ

มิวเตชั่น (mutation) รวมทั้งใช้ในงานด้านนิติเวช และการพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือด โดยแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ

2.1.1.1ยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างโปรตีนที่จำเป็นต่อการทำงานของเซลล์ในร่างกาย พบร้อยละ 25 ของจำนวน nuclear DNA ทั้งหมด โดยเฉลี่ยยีนของมนุษย์จะมีขนาดประมาณ 27 กิโลเบส แต่มีเพียง 1.3 กิโลเบสที่ใช้ในการถอดรหัสเพื่อสังเคราะห์โปรตีนที่มีขนาดกรดอะมิโนประมาณ 430 ตัว ลำดับเบสภายในยีนส่วนที่ไม่ใช่รหัสและถูกตัดออกเรียกว่า อินทรอน (intron) ซึ่งจะแทรกอยู่กับส่วนที่ถอดรหัสได้ (coding sequences) เรียกว่า เอ็กซอน (exon)

2.1.1.2ลำดับเบสที่ไม่มีหน้าที่ในการสร้างโปรตีน (extragenic) แต่ยังไม่ทราบหน้าที่ที่ชัดเจน พบร้อยละ 75 ของจำนวน nuclear DNA ทั้งหมด แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ ลำดับเบสเฉพาะ (non repetitive DNA/unique sequence) และลำดับเบสซ้ำ (repetitive DNA)

ลำดับเบสแบบซ้ำ เป็นส่วนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เรียงซ้ำกันเป็นระยะ ลำดับเบสซ้ำเหล่านี้มีความแตกต่างกันทั้งขนาดและจำนวนซ้ำ แบ่งเป็นชนิดย่อยได้ 2 ชนิด คือ ลำดับเบสซ้ำแบบกระจาย และลำดับเบสซ้ำต่อเนื่อง ดังนี้

ก. ลำดับเบสซ้ำแบบกระจาย (interspersed repetitive sequence) คือกลุ่มของเบสซ้ำที่พบกระจายอยู่ที่บริเวณต่าง ๆ ในจีโนมในลักษณะเดี่ยว ๆ ไม่ต่อเนื่อง (individual unit) แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อยตามความยาวของเบสซ้ำ คือ เบสซ้ำกระจายแบบสั้น (short interspersed elements หรือ SINES) และเบสซ้ำกระจายแบบยาว (long interspersed elements หรือ LINES)

ข. เบสซ้ำต่อเนื่อง (tandemly repeated sequence) คือกลุ่มของเบสซ้ำที่เรียงตัวเป็นชุด ๆ ต่อเนื่องกันเป็นช่วงยาว พบกระจายอยู่ทั่วไปตลอดจีโนมอย่างต่อเนื่องหรือรวมเป็นกลุ่มอยู่ในโครโมโซม การซ้ำของลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นนี้อาจเกิดได้จาก การเกิดครอสซิ่งโอเวอร์ในระหว่างการจำลองตัวของดีเอ็นเอที่มีการแลกเปลี่ยนยีนบนโครโมโซมทั้งสองที่เข้ามาจับคู่กันได้ไม่เท่ากัน หรืออาจเกิดจากการเลื่อนไปของสายดีเอ็นเอ (strand slippage) ในระหว่างการจำลองตัวของดีเอ็นเอ จึงมีความแปรผันหลากหลาย (genetic polymorphism) ในจีโนมมนุษย์ เบสซ้ำแบบต่อเนื่องแบ่งได้เป็น 3 ชนิดตามจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำและความยาวของชุดที่ซ้ำ ดังนี้

แซทเทลไลท์ (satellite) คือดีเอ็นเอที่มีการซ้ำกันของลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นระยะยาว โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำนั้นมีความยาวประมาณ 300 คู่เบส มีจำนวน

ซ้ำแต่ละตำแหน่งตั้งแต่ 1,000 ถึง 10,000,000 ครั้ง พบได้เพียง 1-2 ตำแหน่งต่อโครโมโซม และมักจะพบบริเวณเซนโทรเมียร์ (cemtromere)

มินิแซทเทลไลท์ (minisatellite) คือดีเอ็นเอที่มีการซ้ำกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ปานกลาง โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำนั้นมีความยาวประมาณ 9-100 คู่เบส มีจำนวนซ้ำตั้งแต่ 10 แต่ไม่เกิน 1,000 ครั้ง มักพบที่ตำแหน่งเทโลเมียร์ (telomere) ดร.เจฟฟรีย์และคณะเป็นกลุ่มแรกที่ค้นพบวิธีการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยนำเบสซ้ำนี้มาใช้เป็นดีเอ็นเอตรวจสอบ จากการศึกษาพบว่ามินิแซทเทลไลท์จำนวนมากมีความคล้ายคลึงกันของลำดับเบส หรือมีลำดับเบสแกน (core sequence) เดียวกัน ดีเอ็นเอในบริเวณนี้มีความหลากหลายสูง เนื่องจากความแตกต่างในจำนวนซ้ำ บางครั้งจึงมีผู้เรียกว่า variable number of tandem repeats หรือ VNTR

ไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) หรือ short tandemly repeated sequence (STR) หรือ simple sequence repeat (SSR) คือดีเอ็นเอที่มีการซ้ำกันของลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นช่วงสั้น ๆ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำนั้นมีความยาวประมาณ 1-6 คู่เบส เช่น (A)n, (CA)n, (TAA)n, (GATA)n, เมื่อ n เป็นจำนวนซ้ำ โดยมีจำนวนซ้ำในแต่ละตำแหน่งไม่เกิน 100 ครั้ง พบกระจายอยู่ทั่วไปในจีโนมประมาณ 10,000 -100,000 ตำแหน่ง โดยพบว่าในบุคคลแต่ละคนจะมีจำนวนชุดเบสซ้ำนี้ไม่เท่ากัน ความหลากหลายของจำนวนซ้ำที่พบในบริเวณนี้จึงสามารถนำมาใช้ประยุกต์ในการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้

2.1.2 จีโนมที่พบในไมโตคอนเดรีย หรือไมโตคอนเดรียล-ดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA)

ไมโตคอนเดรียล- ดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA) เป็นดีเอ็นเอรูปวงกลมสายเดี่ยว (circular single-strand DNA) ขนาดเล็กเพียง 16,569 คู่เบส พบเพียงร้อยละ 0.0005 ของจีโนมทั้งหมด ได้รับการถ่ายทอดมาจากแม่เท่านั้น ซึ่งมีอยู่ 500-1,000 ชุด ในเซลล์แต่ละเซลล์ และประกอบด้วย 16,000-16,500 คู่เบส ปัจจุบันการศึกษาไมโตคอนเดรียล- ดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA) มีประโยชน์มากทั้งในงานด้านนิติเวช และการศึกษาโรคทางพันธุกรรมที่เกิดจากการมิวเตชั่น (mutation) ในไมโตคอนเดรียล-ดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA) รวมทั้งใช้ศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมในมนุษย์ (genetic variation) และความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อชาติได้

เซลล์ปกติแต่ละเซลล์จะมีจีโนม 2 ชุด ในนิวเคลียสเรียกว่า ดิพพลอยด์ (diploid) ได้แก่ เซลล์ที่ประกอบด้วยเนื้อเยื่อ และอวัยวะ ส่วนเซลล์สองชนิด ที่มีจีโนมเพียงชุดเดียวเรียกว่า แฮพพลอยด์ (haploid) ได้แก่ เซลล์สืบพันธุ์คืออสุจิ (sperm) และไข่ (egg) นอกจากนี้เซลล์ปกติแต่ละเซลล์ ยังมีจีโนมในไมโตคอนเดรียอีกหลายชุด โดยที่ไมโตคอนเดรียในแต่ละเซลล์มีจำนวนมากมายแตกต่างกัน

จีโนมในในนิวเคลียสอยู่บนโครโมโซม (chromosome) ประกอบด้วยโมเลกุลดีเอ็นเอ ที่พันขดทับกันแน่น มีทั้งหมด 23 คู่ แบ่งเป็น

ก. โครโมโซมที่ไม่ใช่โครโมโซมเพศ (autosomal chromosome หรือ autosome) มี 22 คู่ในเพศชาย และเพศหญิง

ข. โครโมโซมเพศ (sex chromosome)ซึ่งเพศชายมีโครโมโซมเพศเอ็กซ์ (X) และโครโมโซมวาย(Y) อย่างละ1 โครโมโซม ขณะที่เพศหญิงมีโครโมโซมเอ็กซ์(X) 2 โครโมโซม

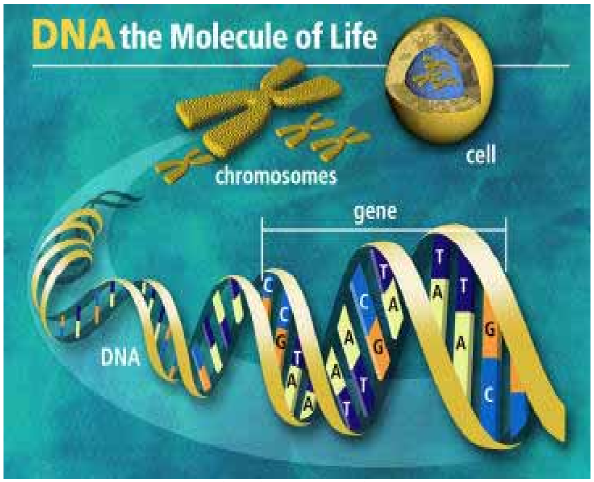
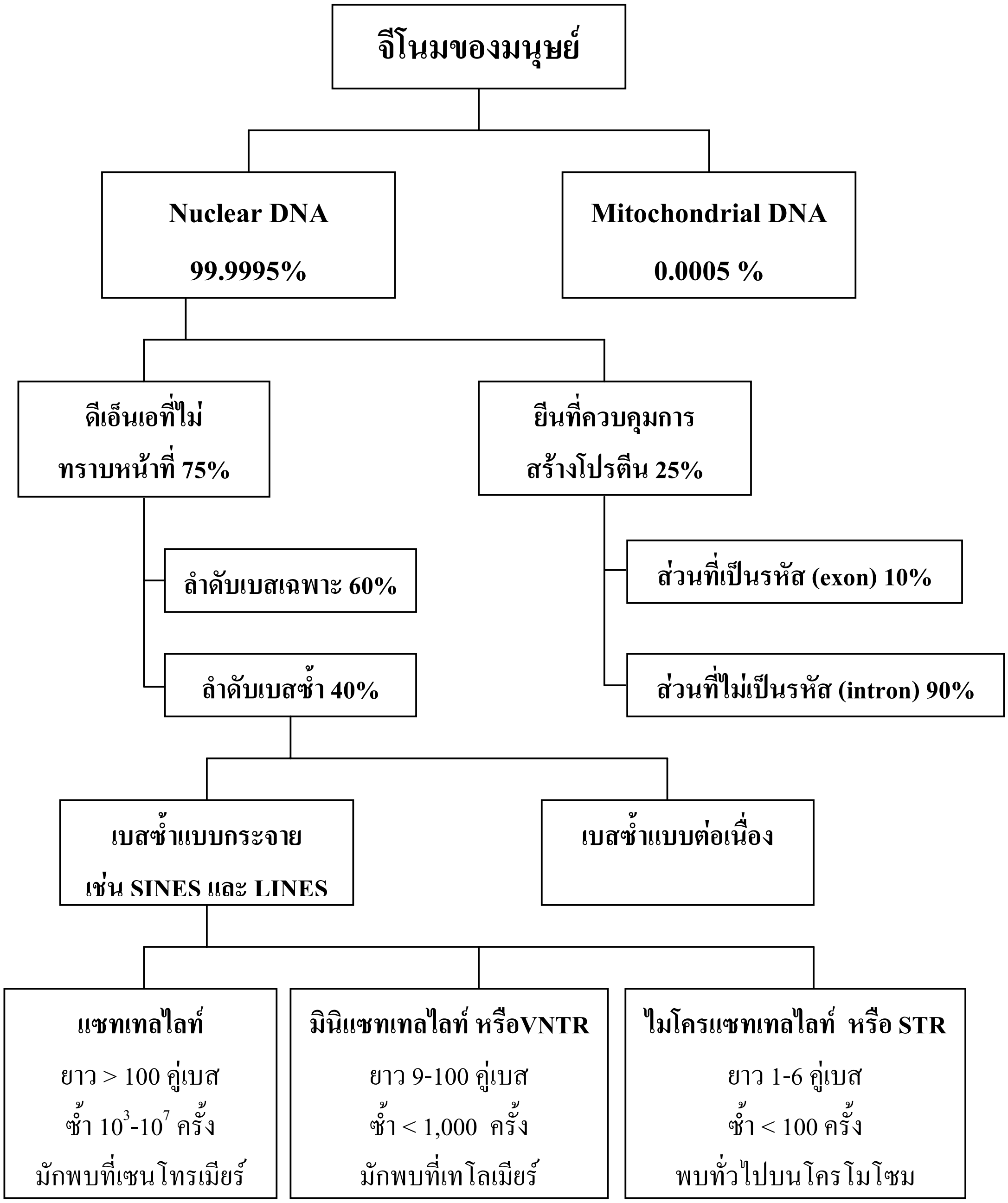


Photo courtesy U.S. DOE, Human Genome Project

ภาพที่ 1 โครโมโซมเกิดจากการที่โมเลกุลพันขดทับกันแน่น

ที่มา : Available from http://www.science.howstuffwork.com/gene-pool.htm

จีโนมในนิวเคลียสของมนุษย์แต่ละชุดมีความยาวของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) หรือเรียกสั้นๆว่าเบส(base) ประมาณ 3,000 ล้านคู่เบส (3.2×10^9 bp หรือ 3,200 Mp) ยาวประมาณ 1 เมตร และมียีน(gene) อยู่ประมาณ 30,000 ยีน อันเป็นแหล่งข้อมูลทางพันธุกรรมจำนวนมากมายมหาศาลที่รวบรวมสิ่งต่างๆ เกี่ยวกับการทำงานของชีวิตมนุษย์ตั้งแต่เกิดไปจนตาย


จีโนมของมนุษย์
Nuclear DNA
99.9995%
Mitochondrial DNA
0.0005 %
ดีเอ็นเอที่ไม่ทราบหน้าที่ 75%
ยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีน 25%
ลำดับเบสเฉพาะ 60%
ลำดับเบสซ้ำ 40%
ส่วนที่เป็นรหัส (exon) 10%
ส่วนที่ไม่เป็นรหัส (intron) 90%
เบสซ้ำแบบกระจาย
เช่น SINES และ LINES
เบสซ้ำแบบต่อเนื่อง
แซทเทลไลท์
ยาว > 100 คู่เบส
ซ้ำ 10^3-10^7 ครั้ง
มักพบที่เซนโทรเมียร์
มินิแซทเทลไลท์ หรือVNTR
ยาว 9-100 คู่เบส
ซ้ำ < 1,000 ครั้ง
มักพบที่เทโลเมียร์
ไมโครแซทเทลไลท์ หรือ STR
ยาว 1-6 คู่เบส
ซ้ำ < 100 ครั้ง
พบทั่วไปบนโครโมโซม

ภาพที่ 2 องค์ประกอบของจีโนมมนุษย์

ที่มา : ปรับปรุงจาก วรรณา ทองนพคุณ, ชนินทร์ ลิ่มวงศ์ และเพทาย เย็นจิตโสมนัส. สาระน่ารู้อณูพันธุศาสตร์. กรุงเทพฯ : เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น, 2548.

2.2 สารพันธุกรรม หรือดีเอ็นเอ

จากผลงานของชาร์ล ดาร์วิน (Charles Darwin) 1874 ที่ได้เสนอทฤษฎีวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตและผลงานของการทดลองของ กรีเกอร์ เมนเดล (Gregor Mendel)1900 ที่ได้เสนอกฎการถ่ายทอดลักษณะ 2 กฎ คือกฎการแยกตัวของยีน (Law of segregation of gene) และกฎการรวมตัวกันอย่างอิสระของยีนบนโครโมโซมต่างคู่ในเซลล์สืบพันธุ์ (Law of independent assortment) เผยแพร่จนรู้จักกันดีทั่วโลก นักวิทยาศาสตร์พยายามที่จะศึกษาค้นคว้าเพื่อพิสูจน์ว่าสารพันธุกรรมเป็นสารเคมีชนิดไหน โดยมีหลักเกณฑ์การพิจารณาว่าสารพันธุกรรมควรจะมีคุณสมบัติดังนี้

1. สามารถสร้างโมเลกุลใหม่ที่เหมือนเดิม (replication) ในระหว่างที่มีการเจริญเติบโตและการแบ่งเซลล์
2. มีโครงสร้างถาวร หรือเกิดการเปลี่ยนแปลง (mutation) ได้น้อย
3. มีข้อมูลทางพันธุกรรม (genetic information) ของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ทั้งหมด
4. สามารถจะถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรมนี้ไปยังเซลล์รุ่นต่อไปได้

ในปี ค.ศ.1868 Johann Friedrich Miescher นักศึกษาชาวสวิสสามารถแยกสารเคมีตัวหนึ่งได้จากเซลล์ที่เกิดหนอง (pus cell) สารนี้มีไนโตรเจนและฟอสฟอรัส เป็นองค์ประกอบในปริมาณสูง และพิสูจน์ได้ว่าสารนี้ไม่ใช่คาร์โบไฮเดรต ไลปิด และโปรตีน จึงตั้งชื่อสารตัวนี้ว่านิวคลีอิน(nuclein) ทำให้ Miescher ได้เสนอรายงานการค้นพบของตนเอง ในปี ค.ศ.1869 แต่บรรณาธิการวารสารต้องการทำการทดลองซ้ำด้วยตนเอง จึงทำให้ผลงานของ Miescher ได้รับการตีพิมพ์ช้าไปอีกสองปี คือ ค.ศ.1871 ขณะนั้นยังไม่พบความสำคัญของนิวคลีอิน จนถึงปี ค.ศ.1940 จึงมีการพบสายโพลีนิวคลีโอไทด์ (polynucleotide chain) ในนิวคลีอิน ต่อมานักวิทยาศาสตร์หลายท่านได้พยายามแยกสารประกอบชนิดต่างๆ จากเซลล์ของสิ่งมีชีวิตและสารประกอบต่างๆ เหล่านี้มาทำการทดลองค้นคว้า จนในที่สุดก็พิสูจน์ได้ว่า สารพันธุกรรมก็คือกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) ซึ่งได้แก่ ดีเอ็นเอ(DNA=deoxyribonucleic acid) และ อาร์เอ็นเอ (RNA=ribonucleic acid)

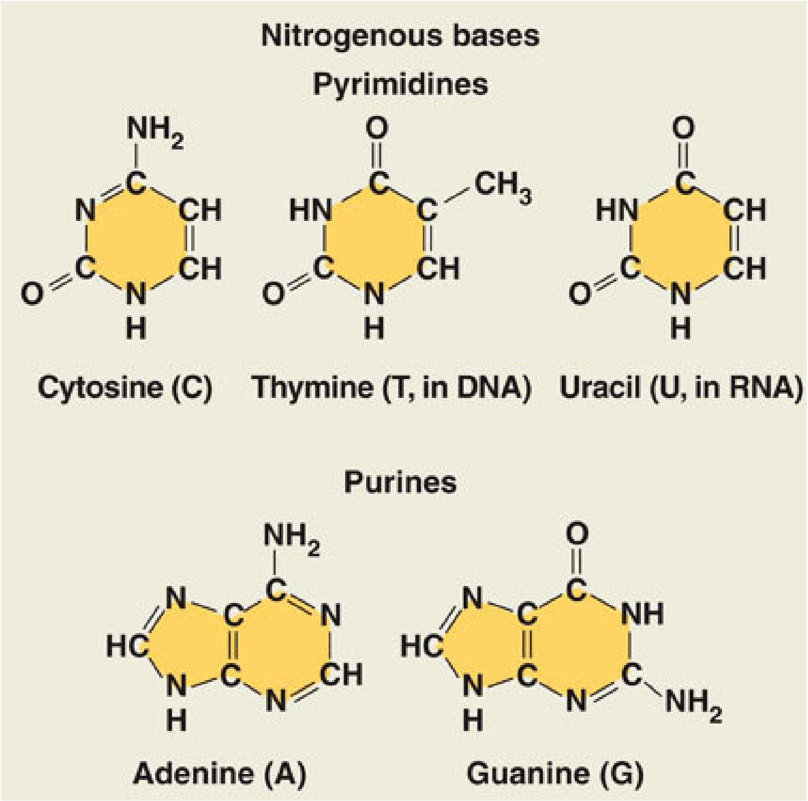
2.2.1 โครงสร้างและองค์ประกอบของดีเอ็นเอ (Structure and DNA composition)

ดีเอ็นเอ (DNA) ย่อมาจาก ดีออกซีไรโบนิวคลีอิก แอซิด (deoxyribonucleic acid) ประกอบด้วยหน่วยโครงสร้างพื้นฐาน เรียกว่า นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) หลายๆ นิวคลีโอไทด์มาต่อกัน แต่ละนิวคลีโอไทด์จะประกอบด้วยหน่วยย่อย 3 หน่วยดังนี้ คือ

2.2.1.1 น้ำตาลดีออกซีไรโบส (deoxyribose sugar) คือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 ตัวและหมู่ไฮดรอกซี (OH) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ของน้ำตาลมีออกซิเจนอะตอมหายไป เหลือเพียงไฮโดรเจนอะตอม

2.2.1.2 ไนโตรจีนัสเบส (nitrogenous base) แบ่งออกเป็น2 กลุ่ม คือ เบสพิวรีน (purine base) มี 2 ชนิด ได้แก่ อะดีนีน (adenine) ใช้อักษรย่อเป็น A และกัวนีน(guanine) ใช้อักษรย่อเป็น G และเบสไพริมิดีน (pyrimidine base)) มี 2 ชนิด ได้แก่ ไทมีน(thymine) ใช้อักษรย่อเป็นT และ ไซโตซีน ใช้อักษรย่อเป็นC

2.2.1.3 กรดฟอสโฟริก(phosphoric acid) หรือ H_3PO_4


Nitrogenous bases
Pyrimidines
Cytosine (C)
Thymine (T, in DNA)
Uracil (U, in RNA)
Purines
Adenine (A)
Guanine (G)

ภาพที่ 3 โครงสร้างเบสที่พบบนสายดีเอ็นเอ เบสพิวรีน และเบสไพริมิดีน
ที่มา : Available from http://www.bio.miami.edu/~cmallery/150/chemistry/c8.5x27b.bases.jpg

หน่วยย่อยทั้ง 3 ส่วน จะมาต่อกันเป็นนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิด โดยที่ไนโตรจีนัสเบสจะต่อกับคาร์บอน(C) ตำแหน่งที่ 1 ของน้ำตาลดีออกซีไรโบส ถ้าเป็นไพริมีดีนจะใช้

ตำแหน่งที่ 1 มาต่อกับคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ของน้ำตาลดีออกซีไรโบส สำหรับกรดฟอสโฟริกจะต่อกับคาร์บอน(C) ตำแหน่งที่ 5 ของน้ำตาลดีอ๊อกซีไรโบส แต่ถ้าเป็นการต่อกันของไนโตรจีนัสเบส และน้ำตาลดีออกซีไรโบสโดยไม่มีกรดฟอสโฟริก เข้ามาต่อกับน้ำตาลดีออกซีไรโบสด้วยองค์ประกอบดังกล่าวเรียกว่า นิวคลีโอไซด์ (nucleoside) ดังนั้นจะเห็นว่านิวคลีโอไทด์ และนิวคลีโอไซด์ของ ดีเอ็นเอมีอยู่เพียง 4 ชนิดเท่านั้น แต่ละชนิดจะแตกต่างกันตรงที่มีเบสแตกต่างกัน จึงมีชื่อเรียกนิวคลีโอไทด์ และนิวคลีโอไซด์ ทั้ง 4 ของดีเอ็นเอ ดังนี้

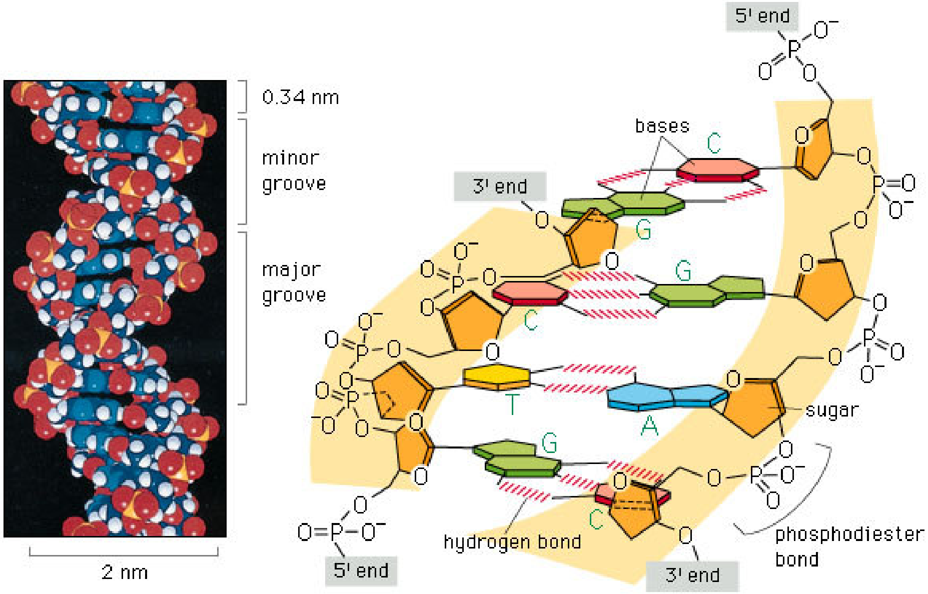
เบส	**นิวคลีโอไทด์**	**ตัวย่อ**
อะดีนีน(A)	ดีออกซีอะดีโนซีน (deoxyadenosine)	dA
กัวนีน(G)	ดีออกซีกัวโนซีน (deoxyguanosine)	dG
ไซโตซีน(C)	ดีออกซีไซติดีน (deoxycytidine)	dC
ไทมีน(T)	ดีออกซีไทมิดีน (deoxythymidine)	dT

เบส	**นิวคลีโอไซด์**	**ตัวย่อ**
อะดีนีน(A)	ดีออกซีอะดีโนซีน 5’ โมโนฟอสเฟต หรือ ดีออกซีอะดิไนลิก แอซิด	dAMP
กัวนีน(G)	ดีออกซีกัวโนซีน 5’ โมโนฟอสเฟต หรือดีออกซีกัวไนลิก แอซิด	dGMP
ไซโตซีน(C)	ดีออกซีไซติดีน 5’ โมโนฟอสเฟต หรือดีออกซีไซติไดลิก แอซิด	dCMP
ไทมีน(T)	ดีออกซีไทมิดีน 5’ โมโนฟอสเฟต หรือดีออกซีไทมิไดลิก แอซิด	dTMP

เบสจะเชื่อมต่ออยู่กับน้ำตาลดีออกซีไรโบส (deoxyribose) คาร์บอน 5 อะตอม โดยมีหมู่ฟอสเฟต(PO_4) เชื่อมกับคาร์บอนของโมเลกุลน้ำตาลที่ตำแหน่ง 5’ ส่วนโมเลกุลน้ำตาลที่ตำแหน่ง 3’ จะต่อกับหมู่ไฮดรอกซี (OH) เพื่อจะเชื่อมต่อกับหมู่ฟอสเฟตของนิวคลีโอไทด์ตัวต่อไปด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์(phosphodiester) เช่นนี้เรื่อยไปจนกลายเป็นสายโพลีนิวคลีโอไทด์ โดยมีปลายข้างหนึ่งเป็นปลาย 5’ และอีกข้างหนึ่งเป็นปลาย 3’

เมื่อสายโพลีนิวคลีโอไทด์ 2 สายที่มีทิศสวนทางกันมาเชื่อมจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจน โดยเบสที่เป็นคู่สมกันคือ A เป็นคู่สมกับ T จับกันด้วยพันธะไฮโดรเจน 2 พันธะ

ส่วน C เป็นคู่สมกับ G จับกันด้วยพันธะไฮโดรเจน 3 พันธะ จะทำให้สายโพลีนิวคลีโอไทด์หมุนตัวเป็นเกลียวคู่เวียนขวา (right-handed double helix) ลักษณะเหมือนราวบันไดวนกับขั้นบันได เส้นผ่าศูนย์กลางของเกลียวมีขนาด 2 nm แต่ละรอบจะประกอบด้วยเบส 10 คู่ ยาว 3.4 nm การหมุนเป็นเกลียวของสายโพลีนิวคลีโอไทด์จะทำให้เกิดร่อง (groove) 2 ชนิด ที่มีระยะห่างของร่องไม่เท่ากัน จึงเรียกแตกต่างกันว่า major groove และ minor groove ลักษณะของดีเอ็นเอดังกล่าวเป็นโครงสร้างแบบ B DNA ดังแสดงในภาพที่ 3

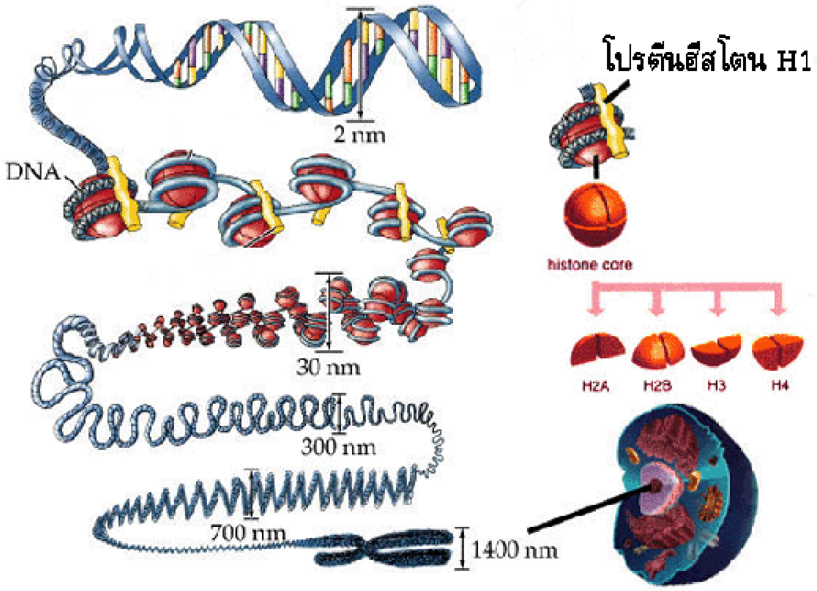


ภาพที่ 4 โครงสร้างเกลียวคู่ของดีเอ็นเอ

ที่มา : Available from http://www.uic.edu/classes/phar/phar331/lecture4

สายเกลียวของดีเอ็นเอจะพันอยู่รอบโปรตีนฮีสโตน (histone) ที่รวมตัวกัน 4 ชนิด ประกอบด้วยฮีสโตน H_2A, H_2B, H_3 และ H_4 อย่างละ 2 โมเลกุล โดยพันแบบเวียนซ้าย 1.8 รอบ หรือประมาณ 145 คู่เบส เรียกว่านิวคลีโอโซม (nucleosome) ระหว่างนิวคลีโอโซมจะเชื่อมกันด้วยสายโพลีนิวคลีโอไทด์ยาวประมาณ 60 คู่เบส โดยมีโปรตีนฮีสโตน H_1 เกาะอยู่ที่สายเชื่อม

ต่อมาสายนิวคลีโอโซมจะพันตัวเป็นเกลียวขนาดใหญ่ขึ้นเรียกโซลีนอยด์ (solenoid) โซลีนอยด์จะพันเป็นเกลียวที่ใหญ่ขึ้นอีกเรียกว่าฟิลาเมนต์ (filament) ซึ่งมีลักษณะเป็นขด จากนั้นฟิลาเมนต์จะมีการพันตัวเป็นเกลียวอีกครั้งเรียก ซูเปอร์คอยด์ฟิลาเมนต์ (supercoiled filament) ซึ่งเมื่อขดของซูเปอร์คอยล์ ฟิลาเมนต์อัดตัวกันแน่นก็จะกลายเป็นแท่งโครโมโซม



ภาพที่ 5 การพันตัวของสายดีเอ็นเอจนกลายเป็นโครโมโซม

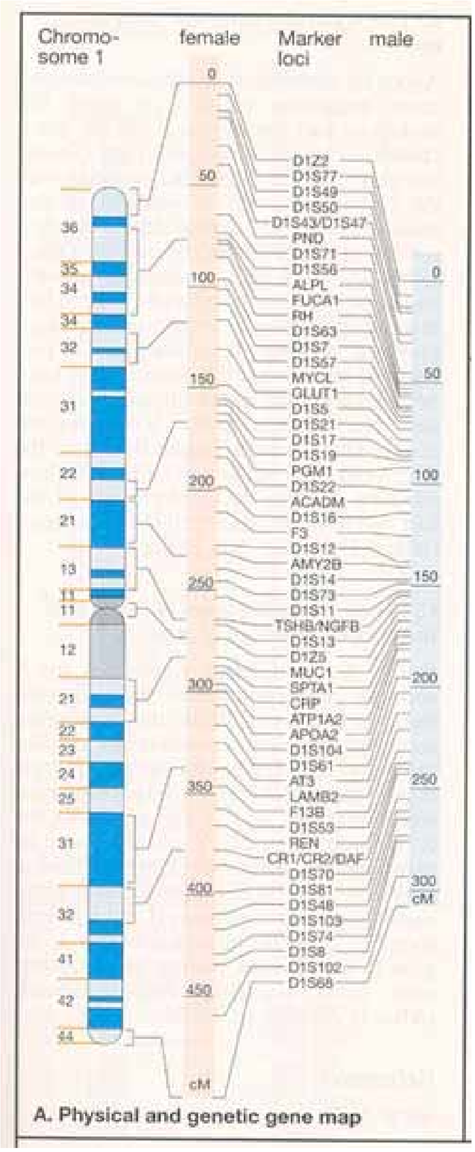
ที่มา : Available from http://www.masterorg.wu.ac.th/source/content.php? menu_id=18&menuid =3&paths=stpark.

จากภาพที่ 4 แสดงการพันตัวของสายดีเอ็นเอ ที่มีการลดความยาวลงจนสามารถบรรจุภายในเซลล์ได้ โดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่เพิ่มขึ้นของดีเอ็นเอในแต่ละระยะมีดังนี้

เส้นผ่านศูนย์กลางของดีเอ็นเอสายคู่เป็น	2	nm
เส้นผ่านศูนย์กลางของนิวคลีโอโซมเป็น	10	nm
เส้นผ่านศูนย์กลางของโซลีนอยด์เป็น	30	nm
เส้นผ่านศูนย์กลางของฟิลาเมนต์เป็น	300	nm
เส้นผ่านศูนย์กลางของซูเปอร์คอยล์ ฟิลาเมนต์เป็น	700	nm
เส้นผ่านศูนย์กลางของโครโมโซมระยะเมตาเฟสเป็น	1,400	nm

โครโมโซมของคนมีทั้งหมด 46 โครโมโซม (2n = 46) เมื่อนำมาจัดเป็นคู่ (homologous chromosome) จะได้ 23 คู่ โดยมี 22 คู่ เหมือนกันทั้งในเพศชายและเพศหญิงเรียกว่า ออโตโซม (autosome) ส่วนอีก 1 คู่ จะต่างกันเรียกว่า โครโมโซมเพศ (sex Chromosome) ซึ่งเพศหญิงมีโครโมโซมแบบ XX ส่วนเพศชายมีโครโมโซมแบบ XY โครโมโซม Y จะมีขนาดเล็กกว่าโครโมโซม X มาก การจำแนกโครโมโซมตามขนาดและลักษณะไว้เป็นกลุ่มๆเรียกว่า คารีโอไทป์

(karyotype) เมื่อย้อมสีโครโมโซมโดยใช้สีเคมี พบว่ามีบางส่วนของโครโมโซมจะติดสีย้อมเข้มมาก เรียกโครโมโซมส่วนนี้ว่าเฮเทอโรโครมาทิน (heterochromatin) ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่มียีน (gene) และบางส่วนจะติดสีจาง ๆ เรียกส่วนนี้ว่ายูโครมาทิน (euchromatin) ซึ่งเป็นส่วนที่เป็นที่ตั้งของยีน

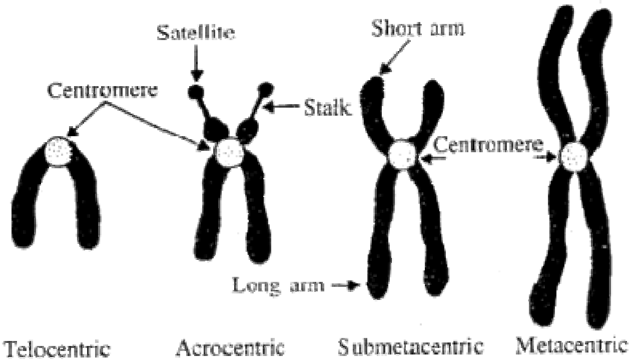

Chromosome 1
female
Marker loci
male
0
50
100
150
200
250
300
350
400
450
cM
36
35
34
34
32
31
22
21
13
11
11
12
21
22
23
24
25
31
32
41
42
44
D1Z2
D1S77
D1S49
D1S50
D1S43/D1S47
PND
D1S71
D1S56
ALPL
FUCA1
RH
D1S63
D1S7
D1S57
MYCL
GLUT1
D1S5
D1S21
D1S17
D1S19
PGM1
D1S22
ACADM
D1S16
F3
D1S12
AMY2B
D1S14
D1S73
D1S11
TSHB/NGFB
D1S13
D1Z5
MUC1
SPTA1
CRP
ATP1A2
APOA2
D1S104
D1S61
AT3
LAMB2
F13B
D1S53
REN
CR1/CR2/DAF
D1S70
D1S81
D1S48
D1S103
D1S74
D1S8
D1S102
D1S68
0
50
100
150
200
250
300
cM
A. Physical and genetic gene map

ภาพที่ 6 โครโมโซมของมนุษย์ แสดงในรูปแบบของแผนที่ยีน

ที่มา : Available from http://www.rmutphysics.com/charud/oldnews/97/index97.htm

2.2.2 การจัดเรียงตัวของดีเอ็นเอและโปรตีนในโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอท

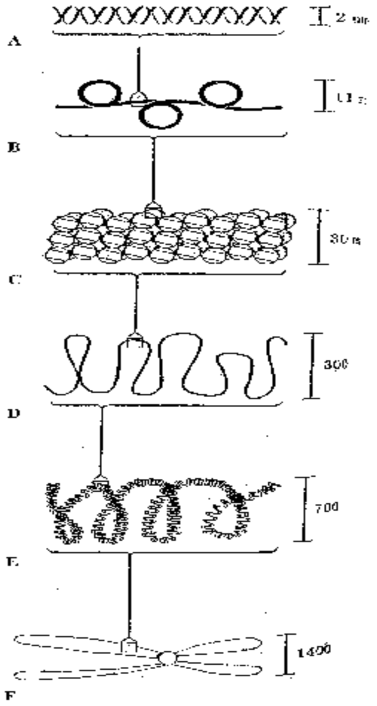
สายโครมาตินขณะที่ยังไม่มีการพันเกลียวเกิดขึ้นจะมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 11 นาโนเมตร เมื่อเกิดการพันเกลียวและสั้นขึ้นจะทำให้ได้สายโครมาตินที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางใหญ่ขึ้นเป็น 300 อังสตรอม หรือ 30 นาโนเมตร หรือที่เรียกว่า โซลีนอยด์ (solenoid) ซึ่งการพันเกลียวแต่ละรอบจะมีนิวคลีโอโซมประมาณ 6 นิวคลีโอโซม หลังจากนั้นสายโครมาตินที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 นาโนเมตร หรือโซลีนอยด์นี้จะเกิดการพันเกลียวต่อไป และมีการม้วนตัวจนเกิดห่วงขึ้นเป็นจำนวนมาก และทำให้มีเส้นผ่าศูนย์กลางใหญ่ขึ้นจากเดิมเป็น 300 นาโนเมตร และจะมีการพันเกลียวต่อไปจนได้เส้นผ่าศูนย์กลางใหญ่ขึ้นเป็น 700 นาโนเมตร ซึ่งจะกลายเป็นโครมาติดของโครโมโซมในระยะเมทาเฟสนั่นเอง ดังนั้น โครโมโซมในระยะเมทาเฟสจะมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 1400 นาโนเมตร



ภาพที่ 7 การจัดเรียงตัวของดีเอ็นเอและโปรตีนในโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอต
ที่มา : Available from http://www.sc.chula.ac.th/courseware/2305262/context/text8/subtext8/body_subtext8.html

เซลล์พวกยูคาริโอทนอกจากจะมีดีเอ็นเอในนิวเคลียสแล้ว ยังมีดีเอ็นเอปริมาณน้อยอยู่ในไมโทคอนเดรียและในคลอโรพลาสต์ของเซลล์ที่สังเคราะห์แสงคิดเป็นประมาณ 0.1% ของดีเอ็นเอทั้งหมด ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียและคลอโรพลาสต์จะมีขนาดเล็กเป็นวงแหวนเกลียวคู่ มีมวลโมเลกุล ประมาณ 10,000 กิโลดาลตัน และไม่อยู่รวมกับฮิสโตน ดีเอ็นเอเหล่านี้บรรจุข้อความทางพันธุกรรมที่จะถูกถ่ายทอดมาเป็นอาร์เอ็นเอ และโปรตีนในไมโทคอนเดรีย และคลอโรพลาสต์ อย่างไรก็ตามโปรตีนอื่นๆในไมโทคอนเดรีย ประมาณ 95% จะถูกสร้างมาจากดีเอ็นเอในนิวเคลียส ตัวอย่างการศึกษาไมโทคอนเดรียของยีสต์ พบว่า ไซโตโครมในเมมเบรนของ

ไมโตคอนเดรียสร้างมาจากยีนในดีเอ็นเอของไมโตคอนเดรียร่วมกับยีนในดีเอ็นเอของนิวเคลียส โปรตีนนี้มีความสำคัญในห่วงโซ่หายใจ (respiratory chain) ของเซลล์



ภาพที่ 8 แสดงรูปร่างของโครโมโซม

ที่มา : Available from http://www.sc.chula.ac.th/courseware/2305262/context/text8/subtext8/body_subtext8.html

2.2.3 รูปร่างของโครโมโซม

สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีจำนวนโครโมโซมที่แน่นอน และโครโมโซมแต่ละแท่งจะมีขนาดและรูปร่างคงที่ด้วย โดยในสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งอาจมีโครโมโซมที่มีรูปร่างแบบเดียวหรือหลายแบบก็ได้ถ้าใช้ตำแหน่งเซนโทรเมียร์บนโครโมโซมเป็นหลัก สามารถจะแบ่งโครโมโซมออกได้เป็น 4 แบบคือ

2.2.3.1 เมทาเซนทริก โครโมโซม (metacentric chromosome) คือ โครโมโซมที่มีตำแหน่งเซนโทรเมียร์อยู่ตรงกลาง ทำให้แขนทั้ง 2 ข้างของโครโมโซมยาวเท่ากัน เมื่อโครโมโซมชนิดนี้ถูกดึงเข้าสู่ขั้วเซลล์ระหว่างที่มีการแบ่งเซลล์ จะเห็นโครโมโซมเป็นรูปตัววี (v shape)

2.2.3.2 ซับเมทาเซนทริก โครโมโซม (submetacentric chromosome) คือ โครโมโซมที่มีตำแหน่งเซนโ ทรเมียร์อยู่ใกล้กับตำแหน่งตรงกลางโครโมโซม ทำให้มีแขนข้างหนึ่งสั้น และแขนอีกข้างหนึ่งยาว เมื่อโครโมโซมชนิดนี้ถูกดึงเข้าสู่ขั้วเซลล์ระหว่างที่มีการแบ่งเซลล์ จะเห็นโครโมโซมเป็นรูปตัวเจ (j shape)

2.2.3.3 เอโครเซนทริกโครโมโซม (acrocentric chromosome) คือ โครโมโซมที่มีตำแหน่งเซนโทรเมียร์อยู่ค่อนไปทางปลายใดปลายหนึ่งของโครโมโซม ทำให้มีแขนข้างหนึ่งสั้นและแขนอีกข้างหนึ่งยาวเช่นเดียวกัน เมื่อโครโมโซมชนิดนี้ถูกถึงเข้าสู่ขั้วเซลล์ จะเห็นโครโมโซมเป็นรูปตัวเจ (j shape)

2.2.3.4 เทโลเซนทริกโครโมโซม (telocentric chromosome) คือ โครโมโซมที่มีตำแหน่งเซนโทรเมียร์อยู่ที่ปลายข้างหนึ่งของโครโมโซม ทำให้มีแขนเพียงข้างเดียว เมื่อโครโมโซมชนิดนี้ถูกดึงเข้าสู่ขั้วเซลล์ จะเห็นโครโมโซมเป็นรูปแท่ง (rod shape) (ภาพที่ 8) ปกติรูปร่างของโครโมโซมเหล่านี้เปลี่ยนแปลงน้อยมาก แต่บางครั้งถ้าโครโมโซมเหล่านี้กระทบกับรังสีต่างๆ เช่น รังสีเอกซ์ รังสีคอสมิก รังสีแกมมา หรือสารเคมีต่างๆ อาจทำให้โครโมโซมหรือโครมาติดเกิด การแตกหักได้ ทำให้เกิดปลายเหนียว (sticky end) ขึ้น 2 ด้าน ซึ่งมีผลทำให้โครงสร้างของโครโมโซมมีโอกาสเปลี่ยนแปลงไปได้3ทางคือ

ก. เกิดการขาดหายไปของชิ้นส่วนของโครโมโซมที่ไม่มีเซนโทรเมียร์

ข. เกิดการต่อกันใหม่ของชิ้นส่วนของโครโมโซมที่ขาดออกจากกัน ทำให้ได้โครงสร้างของโครโมโซมเหมือนเดิม

ค. ปลายที่แตกหักปลายหนึ่งหรือทั้งสองปลาย อาจจะไปต่อกับปลายที่แตกหัก ตำแหน่งอื่นบนโครโมโซมเดียวกัน หรือต่อกับโครโมโซมต่างคู่กันได้ ทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซมต่างคู่กัน

2.2.4 ดีเอ็นเอมรดกจากพ่อแม่สู่ลูก

ระหว่างที่เซลล์มีการแบ่งตัว ดีเอ็นเอที่อยู่ทั้งหมดในเซลล์นั้น จะมีการจำลองหรือคัดลอก ลำดับเบสของตัวเองขึ้นมา โดยมาขั้นตอน ดังนี้

2.2.4.1 สายดีเอ็นเอทั้งสองที่เป็นเกลียวคู่จะแยกออกจากกันคล้ายกับการรูดซิปเปิด ขั้นตอนนี้เริ่มจากการคลายเกลียวออกและสลายพันธะไฮโดรเจน ที่ยึดระหว่างเบสออกจากกันจนสายโพลีนิวคลีโอไทด์ (polynucleotide chain) เปิดออก

2.2.4.2 ดีเอ็นเอแต่ละสายทำตัวเป็นแม่แบบ (template) เพื่อสายสายใหม่ที่เป็นเบสคู่สม ขึ้นมาประกบบนสายเดิมในทิศทางจาก 5’ ไป 3’ เสมอ ได้สายดีเอ็นเอใหม่เพิ่มขึ้น

สองสาย ที่มีลักษณะเหมือนเดิมทุกประการเรียกว่า การจำลองตัวแบบกึ่งอนุรักษ์ (semiconservative replication)

การจำลองสายของดีเอ็นเอ ในลักษณะนี้ทำให้ข้อมูลพันธุกรรมที่มีอยู่ในดีเอ็นเอ ทั้งหมดของพ่อและแม่ ถูกสร้างขึ้นใหม่เรื่อยๆ และถ่ายทอดต่อไปยังรุ่นลูกได้

2.3 ยีน (gene)

ยีน คือส่วนของโมเลกุลดีเอ็นเอ บริเวณที่ทำหน้าที่ เป็นรหัสสำหรับการสังเคราะห์โปรตีน ขนาดของยีน อาจเป็นได้ตั้งแต่เล็กมากไม่ถึง 100 คู่เบส ไปจนถึงหลายๆ ล้านคู่เบส ปัจจุบันเชื่อว่าจำนวนยีนของมนุษย์มีไม่ต่ำกว่า 30,000 ยีน

ยีนมีอยู่กระจัดกระจายทั่วทุกโครโมโซมในจีโนม ประมาณร้อยละ 10 ของลำดับเบสในจีโนมมนุษย์ (คือราว 300 ล้านคู่เบส) เท่านั้นที่เป็นยีน ที่เหลืออีกร้อยละ 90 นั้นไม่ได้เป็นองค์ประกอบของยีน และยังไม่ทราบแน่ชัดมีหน้าที่อะไร

2.3.1 โครงสร้างของยีน

ถ้าดูที่ระดับดีเอ็นเอ ของยีนหนึ่งๆ จะมีลำดับเบสบางส่วนเท่านั้น ที่ถูกถอดรหัสเป็นโปรตีนโดยแบ่งลำดับเบสได้เป็น 2 ส่วน หลักๆ คือ

เอ็กซอน (exon) หมายถึงลำดับเบสบนโมเลกุลดีเอ็นเอ ที่สามรถถอดรหัสเป็นเป็นเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA หรือ messenger RNA) ได้

อินทรอน (intron) หมายถึง ลำดับเบสที่ไม่สามารถเข้ารหัสเป็นโปรตีนได้ (non-coding sequence) ซึ่งแทรกอยู่ระหว่างอินทรอน

2.3.2 โครงสร้างที่เป็นองค์ประกอบอื่นของยีน

นอกเหนือจากเอ็กซอนและอินทรอนแล้ว ยีนยังมีโครงสร้างอื่นที่ร่วมกันทำหน้าที่ต่างๆที่ระดับโมเลกุล โดยที่โครงสร้างเหล่านั้นอาจไม่ได้อยู่ในลำดับเบสของยีนนั้นๆ แต่อาจเป็นลำดับเบสที่อยู่ไกลออกไปมากๆ ก็ได้

โปรโมเตอร์ (promoter) อยู่ที่ด้าน 5’ ของยีน จะเป็นบริเวณที่เอนไซม์ อาร์เอ็นเอโพลีเมอเรส (RNA polymerase) เข้ามาจับเพื่อเริ่มต้นการสร้าง

Upstream element เป็นส่วนหนึ่งของโปรโมเตอร์ มีส่วนสำคัญในการจับโปรตีน ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของยีน หรือควบคุมการกระตุ้น หรือยับยั้งการสร้างเอ็มอาร์เอ็นเอ จากยีนนั้น

Enhancer และ silencer ทำหน้าที่คล้าย Upstream element โดย enhancer จะกระตุ้นการทำงานของยีน ในขณะที่ silencer จะยับยั้งการทำงาน ทั้งสองส่วนนี้จะควบคุมการทำงานของยีนได้โดยไม่ขึ้นกับทิศทางและตำแหน่ง

2.3.3 การถ่ายทอดพันธุกรรมของยีน

ลูกจะได้รับยีนจากพ่อหนึ่งชุด และจากแม่อีกหนึ่งชุด โดยที่บุตรชายจะได้รับโครโมโซม Y จากพ่อ และโครโมโซม X จากแม่ ในขณะที่บุตรสาวจะได้โครโมโซม X ทั้งจากพ่อและจากแม่

2.3.4 การแสดงออกของยีน (gene expression) ที่ระดับเซลล์

การแสดงออกของยีน (gene expression) หรือการทำหน้าที่ต่างๆ ของยีนในเซลล์ทุกเซลล์ เป็นกระบวนการที่ถูกกำหนดไว้อย่างชัดเจน และมีการควบคุมอย่างเคร่งครัด

ในภาวะปกติ เซลล์แต่ละเซลล์ในร่างกายมนุษย์มียีนในจีโนมอยู่ครบถ้วนทุกยีนเหมือนๆ กัน แต่มียีนเพียงร้อยละ 20 เท่านั้นที่มีการแสดงออกเกิดขึ้นในเวลาที่เหมาะสมของแต่ละยีน โดยในเซลล์ต่างชนิดกันจะมีการแสดงออกเป็นโปรตีนได้ต่างกันขึ้นอยู่กับหน้าที่ของเซลล์นั้นๆ ยกตัวอย่างเช่น เซลล์สมอง เซลล์กล้ามเนื้อ และเซลล์ผิวหนังมียีนทุกยีนครบชุดเหมือนๆ กัน แต่เซลล์ผิวหนังและเซลล์กล้ามเนื้อไม่มีการสร้างโปรตีน A ที่ทำหน้าที่ในเซลล์สมอง ส่วนเซลล์สมองก็ไม่มีโปรตีนB ที่ทำหน้าที่ในเซลล์กล้ามเนื้อ และไม่มีโปรตีน C ที่ทำหน้าที่ในเซลล์ผิวหนังเป็นต้น

2.3.5 การแสดงออกของยีน (gene expression) ที่โมเลกุล

ยีนมีการแสดงออกที่โมเลกุลเป็น 2 ขั้นตอน คือ การสร้าง mRNA จาก DNA เรียกว่า การถอดรหัส (transcription) และการสร้างโปรตีนจาก mRNA เรียกว่า การแปลรหัส (translation)

2.3.6 การลอกแบบสารพันธุกรรม

การลอกแบบสารพันธุกรรมหรือข้อความทางพันธุกรรม (replication) คือการสังเคราะห์ดีเอ็นเอใหม่ให้เหมือนดีเอ็นเอคู่เดิมเป็นกระบวนการลอกแบบสารพันธุกรรมให้ดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้นมาใหม่มีลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์เหมือนดีเอ็นเอเดิมที่ใช้เป็นแม่แบบ (template) เมื่อพิจารณาถึงโอกาสที่จะเป็นไปได้ในกรณีนี้มี 3 วิธีดังนี้คือ

2.3.6.1 วิธีอนุรักษ์ (conservative) คือการที่ดีเอ็นเอเดิมเป็นแม่พิมพ์โดยสร้างดีเอ็นเอใหม่หนึ่งคู่ให้เหมือนดีเอ็นเอเดิม

2.3.6.2 วิธีกึ่งอนุรักษ์ (semiconservative) คือการที่ดีเอ็นเอคู่เดิมถูกแยกออกเป็นสายเดี่ยว (single strand) แล้วเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่มาประกบเข้าคู่กับสายเก่าโดยอาศัยกฎการจับคู่ของเบส ผลที่ได้คือ ดีเอ็นเอสองคู่แต่ละคู่ประกอบด้วยดีเอ็นเอเดิมหนึ่งสายและดีเอ็นเอใหม่อีกหนึ่งสายจึงเป็นการคงดีเอ็นเอเดิมไว้เพียงครึ่งเดียว

2.3.6.3 วิธีกระจาย (dipersive) คือการที่ดีเอ็นเอคู่เดิมถูกตัดออกเป็นช่วงๆ แล้วแยกออกเป็นสองส่วน แต่ละส่วนก็จะมีดีเอ็นเอใหม่สร้างขึ้นมาซ่อมแซมส่วนที่ขาดหายไปจนครบสมบูรณ์ ผลที่ได้คือดีเอ็นเอใหม่ทั้งสองคู่จะมีส่วนของดีเอ็นเอเก่าอยู่กระจัดกระจายตลอดเกลียวคู่

ในกระบวนการจำลองโมเลกุลของดีเอ็นเอเป็นแบบวิธีกึ่งอนุรักษ์ โดยเริ่มต้นจากโมเลกุลเดิมของดีเอ็นเอที่ประกอบด้วยโพลีนิวคลีโอไทด์ 2 สายทิศทางสวนกันและขนานกัน โพลีนิวคลีโอไทด์แต่ละสายจะทำหน้าที่เป็นแม่แบบเพื่อจะสร้างโพลีนิวคลีโอไทด์สายใหม่ขึ้นมาเข้าคู่ ที่เรียกว่า เป็นแบบกึ่งอนุรักษ์นั้น อย่างไรก็ตามทิศทางของการสร้างโพลีนิวคลีโอไทด์สายใหม่นั้นจะมีทิศทางเป็นแบบ 5’ -> 3’ เสมอ ดังนั้นในการจำลองโมเลกุลของดีเอ็นเอจะมีการสร้างโพลีนิวคลีโอไทด์สายใหม่สายหนึ่งแบบยาวตลอดเรียกสายนี้ว่า สายลีดดิง (leading strand) สำหรับโพลีนิวคลีโอไทด์สายใหม่อีกสายหนึ่งไม่สามารถสร้างต่อเนื่องกันเป็นสายยาวตลอดไปได้ เพราะทิศทางการสร้างสวนกับทิศทางการคลายเกลียวของโมเลกุลเดิมของดีเอ็นเอ จึงมีการสร้างโพลีนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ขึ้นมาก่อนแล้วจึงมาต่อกันเป็นสายยาว เพื่อให้ทิศทางการสร้างเป็นแบบ 5’ -> 3’ เช่นกัน เรียกสายนี้ว่า สายแลกกิง (lagging strand) โพลีนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆนี้ ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ประมาณ 1,000 ถึง 2,000 นิวคลีโอไทด์ เรียกโพลีนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆนี้ว่า โอคาซากิ แฟรกเมนท์ (Okazaki fragments) ซึ่งเป็นการให้เกียรติกับผู้ค้นพบคือ ไรจิ โอคาซากิ (Reiji Okazaki)

สำหรับกระบวนการจำลองโมเลกุลของดีเอ็นเอ เริ่มต้นด้วยมีเอนไซม์เฮลิเคส ทำหน้าที่สลายพันธะไฮโดรเจน (H-bond) เพื่อให้เกลียวคู่ของดีเอ็นเอเริ่มแยกออกจากกัน ทำให้เกิดส่วนที่โป่งออกมา (bubble) จากนั้นจะมีเฮลิกซ์ ดีสเตบิไลซิงโปรตีน เข้าไปจับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวเพื่อป้องกันไม่ให้กลับคืนเป็นเกลียวคู่อีก และจะมีเอนไซม์ดีเอ็นเอไจเลส ทำหน้าที่คลายปมเหนือจุดแยก (replication fork) โดยการตัดสายหนึ่งของดีเอ็นเอออก เพื่อทำให้เกิดการคลายเกลียว และทำให้เกิดการคลายปมแล้ว จึงทำหน้าที่ต่อจุดที่ตัดนั้นกลับเข้าไปดังเดิม บริเวณที่โป่งออกของสายดีเอ็นเอนั้นจะเป็นจุดเริ่มของการจำลองโมเลกุล (initiation point) โดยมีเอนไซม์ไพรเมสสร้างสายอาร์เอ็นเอเริ่มต้น (RNA primer) จากนั้นจะเป็นหน้าที่ของดีเอ็นเอโพลีเมอเรส 3 ทำหน้าที่เติมนิวคลีโอไทด์ที่ปลายด้าน 3’-OH ของสายอาร์เอ็นเอเริ่มต้นนั้นในทิศทาง 5’ -> 3’ ไปเรื่อยๆ ตามทิศทางของการคลายเกลียว โดยใช้ดีเอ็นเอสายเดิมเป็นแม่แบบ ก็จะได้ดีเอ็นเอสายใหม่ยาวตลอด เป็นสายลีดดิง (leading strand) สำหรับการสังเคราะห์โพลีนิวคลีโอไทด์สายใหม่อีกสายหนึ่งนั้น เอนไซม์ไพรเมสจะสร้างสายอาร์เอ็นเอเริ่มต้น (RNA primer) ขึ้นมาเช่นเดียวกัน และเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส 3 จะทำหน้าที่เติมนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3’-OH ของสายอาร์เอ็นเอ

เริ่มต้นนี้แต่จะได้โพลีนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอสายนั้นๆ คือ โอคาซากิ แฟรกเมนท์ (Okazaki fragment) โดยทิศทางการสังเคราะห์จะสวนกับทิศทางของการคลายเกลียวของโมเลกุลของดีเอ็นเอเดิม แต่ทิศทางยังคงเป็นแบบ 5’ -> 3’ เช่นเดิม เมื่อมีการคลายเกลียวของโมเลกุลของดีเอ็นเอเดิมต่อไปอีก เอนไซม์ไพรเมสก็จะสร้างสายอาร์เอ็นเอเริ่มต้นอีก และเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส 3 ก็จะทำหน้าที่เติมนิวคลีโอไทด์ที่ปลาย 3’-OH ของสายอาร์เอ็นเอเริ่มต้นต่อไปอีกก็จะได้สายโอคาซากิแฟรกเมนท์อีก การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากสายแม่แบบนี้เป็นเช่นนี้เรื่อยๆไป จึงเรียกสายนี้ว่า สายแลกกิง (lagging strand) หลังจากนั้นจะเป็นหน้าที่ของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส 1 ทำการตัดสายอาร์เอ็นเอเริ่มต้น (RNA primer) ออกไปทั้งหมด และเติมนิวคลีโอไทด์ที่ปลาย 3’-OH ของสายดีเอ็นเอ สั้นๆ หรือโอคาซากิ-แฟรกเมนท์ จนกระทั่งเหลือช่องว่างเฉพาะปลาย 3’-OH และ 5-PO_4 หรือที่เรียกว่า นิค (nick) เท่านั้น สุดท้ายจะเป็นหน้าที่ของเอนไซม์ดีเอ็นเอไลเกส (DNA ligase) ที่จะเชื่อมปลาย 3’-OH และ 5’-PO_4 เข้าด้วยกันด้วยพันธะเอสเตอร์ (ester bond)ก็จะได้สายดีเอ็นเอสายยาวตลอดสาย

สรุปขั้นตอนต่างๆได้ดังนี้คือ การแยกสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ที่เป็นแม่พิมพ์ออกจากกัน จากนั้นเริ่มสร้างสายดีเอ็นเอเส้นใหม่จากแม่พิมพ์ทั้งสองสายของดีเอ็นเอเดิม ต่อมาเติมดีออกซีนิวคลีโอไทด์ตัวใหม่ลงไปในสายดีเอ็นเอที่กำลังสร้างอยู่ เกิดเกลียวคู่ของดีเอ็นเอใหม่ แล้วจึงหยุดการสังเคราะห์

2.3.7 กระบวนการถอดรหัส (transcription)

กระบวนการถอดรหัส (transcription) เป็นกระบวนการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ โดยใช้สายใดสายหนึ่งของดีเอ็นเอเป็นแม่แบบสำหรับการถอดรหัสออกมาเป็นเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA หรือ messenger RNA) ซึ่งกระบวนการนี้ต้องใช้เอนไซม์อาร์เอ็นเอโพลีเมอเรส (RNA polymerase) เข้ามาช่วย กระบวนการนี้จะเกิดในนิวเคลียส

การถอดรหัส จะเริ่มเมื่ออาร์เอ็นเอโพลีเมอเรส (RNA polymerase) มาจับที่จุดเริ่มต้นของยีนที่ด้าน 5’ ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ และเริ่มถอดรหัสที่โคดอนเริ่มต้นดำเนินต่อไปจนถึงส่วนปลายของยีนด้าน 3’ โดยลำดับเบสของเอ็มอาร์เอ็นเอ จะเป็นเบสคู่สม (complementary base pair)กับ DNA แม่แบบที่ถูกใช้คัดลอกรหัส โดยการอ่านสายดีเอ็นเอ เริ่มจากด้าน3’ ไปยัง 5’ เพื่อสร้างอาร์เอ็นเอในทิศ 5’ ไป 3’ แต่ในอาร์เอ็นเอจะมีการทดแทนเบส T(thymine) ในดีเอ็นเอด้วย เบสU(uracil) สำหรับโมเลกุลอาร์เอ็นเอ ที่สร้างขึ้นมาใหม่จากการถอดรหัส(transcription) ซึ่งเรียกว่า “hnRNA” (มีลำดับเบสถอดแบบมาจากดีเอ็นเอ)จะต้องผ่านกระบวนการ เปลี่ยนแปลง (RNA processing) ดังต่อไปนี้ก่อนจะได้เป็นเอ็มอาร์เอ็นเอ

การตัดและเชื่อม (excision and splicing) คือการกำจัดเอาอินทรอนออกไปและนำเอ็กซ์มาต่อกัน

แค็บปิ้ง (capping) เป็นการเติมหมู่สารเคมี เมธิวกัวนิน (methyl guanine)ที่ด้านปลาย 5’

โพลีอะดีนิลเลชั่น(polyadenylation)เป็นการเติมเบส A (adenine)หลายตัวที่ด้าน 3’

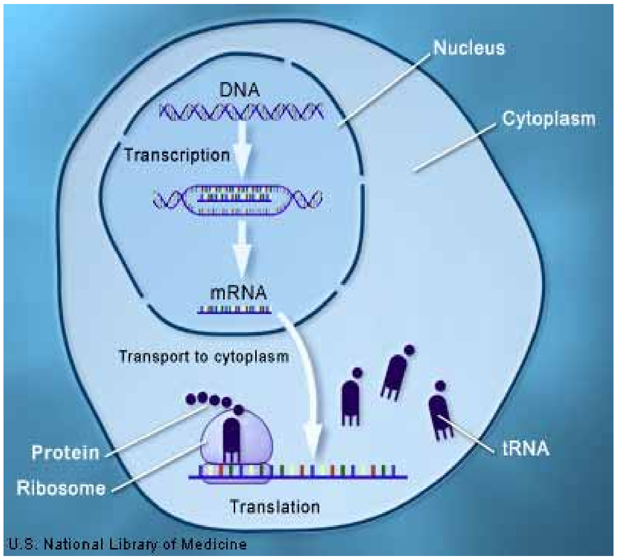
เอ็มอาร์เอ็นเอ ที่ผ่านกระบวนการแล้ว จะถูกส่งออกจากนิวเคลียสของเซลล์ไปยังไซโตพลาสสม (cytoplasm) เรียกว่า การขนส่ง (transport)

2.3.8 กระบวนการแปลรหัส (translation)

เป็นกระบวนการแปลลำดับ ของเบสของเอ็มอาร์เอ็นเอ ให้เป็นลำดับของกรดอะมิโนที่ต่อกันเป็นโพลีเปปไทด์(polypeptide) หรือ โปรตีนนั่นเอง ซึ่งกระบวนการนี้เกิดขึ้นในไซโตพลาสสม ของเซลล์ ที่ไรโบโซม (ribosome) โดยมีไรโบโซมอล-อาร์เอ็นเอ หรืออาร์-อาร์เอ็นเอ(ribosomal RNA,rRNA) เป็นตัวนำทรานสเฟอร์-อาร์เอ็นเอ หรือทีอาร์เอ็นเอ(transfer RNA,tRNA)มาอ่านเบสของเอ็นอาร์เอ็นเอจากจุดที่เป็นรหัสเริ่มต้น (initiation codon) คือ AUG แล้วอ่านไปทีละ3 เบส โดยทุกๆ 3 เบส จะมีรหัสตรงกับทีอาร์เอ็นเอ 1 ชนิด และทีอาร์เอ็นเอแต่ละชนิดก็จะนำกรดอะมิโน(amino acid)จำเพาะมาต่อเป็นสายโปรตีน

ลำดับเบส 3 เบสบนสายเอ็ม-อาร์เอ็นเอ ที่แปลรหัสเป็นกรดอะมิโน เรียกว่า เอ็ม-อาร์เอ็นเอ โคดอน (mRNA codon) ในขณะที่เบส3 เบสบนทีอาร์เอ็นเอจับกับโคดอน เรียกว่า แอนติโคดอน(anticodon)

ทีอาร์เอ็นเอ 1 ตัว จะมีกรดอะมิโนจำเพาะจับอยู่ เช่น AUG จะมีเมไธโอนีน (methionine)เป็นต้น ยกเว้น 3 โคดอนคือ UGA, UAA,UAG ซึ่งเป็นโคดอนหยุด(stop codon)ที่จะไม่มีกรดอะมิโนจับอยู่ ดังนี้เมื่อทีอาร์เอ็นเอถูกอ่านมาถึงโคดอน 3 ตัวนี้ กระบวนการแปลรหัสก็จะหยุด และการสร้าสายโพลีเปปไทด์(polypeptide) ก็จะเสร็จสิ้น



ภาพที่ 9 กระบวนการถอดรหัส (transcription) และ กระบวนการแปลรหัส (translation)
ที่มา :Available from http://www.creationwiki.org/pool/images/0/0e/Transcription_translation.jpg

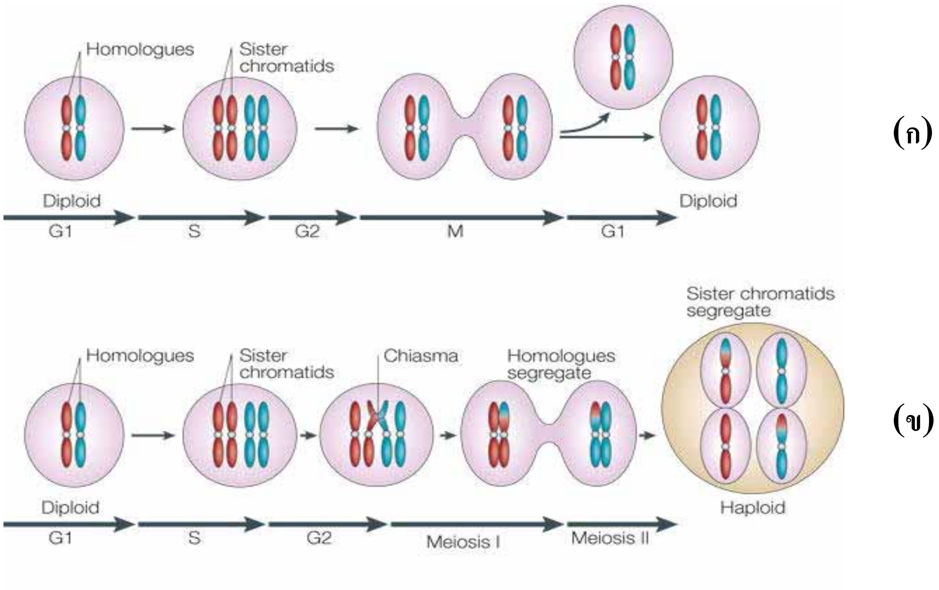
2.4 การถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมโดยการแบ่งเซลล์

ร่างกายของมนุษย์ต้องมีการแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ไว้ใช้เพื่อการเจริญเติบโตหรือทดแทนเซลล์เก่าที่ตายไป และใช้ในการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ การแบ่งเซลล์มี 2 แบบคือ

2.4.1 การแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (mitosis) คือการแบ่งเซลล์ภายในร่างกาย (somatic cell) เป็นขบวนการเพิ่มจำนวนเซลล์โดยที่โครโมโซมยังคงมีจำนวนเท่ากับเซลล์เริ่มต้น ทำให้ได้เซลล์ใหม่ 2 เซลล์ที่มีลักษณะเหมือนเดิมทุกประการ

2.4.2 การแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (meiosis) คือการแบ่งเซลล์สืบพันธุ์ (gamete) เป็นขบวนการสำคัญที่จะรักษาจำนวนโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตให้คงที่โดยการลดจำนวนโครโมโซมของเซลล์สืบพันธุ์ครึ่งหนึ่ง โดยแยกคู่โครโมโซมที่เหมือนกันออกไปอยู่เซลล์ใหม่แต่ละเซลล์ซึ่งจะเจริญต่อไปเป็นเซลล์สืบพันธุ์ที่มีจำนวนโครโมโซมเท่ากันทุกเซลล์และแต่ละเซลล์จะมีปริมาณยีนเท่ากัน การแยกคู่ออกจากกันของโครโมโซมคู่เหมือนเป็นกระบวนการที่เป็นอิสระต่อกัน (independent assortment) ทำให้เซลล์สืบพันธุ์ที่สร้างขึ้นอาจมีโครโมโซมที่มาจากพ่อบางส่วนจากแม่บางส่วนปะปนกัน และเกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซมคู่เหมือนระหว่างการเกิดครอสซิ่งโอเวอร์(crossing over) เป็นผลให้มีการรวมตัวกันใหม่ของยีน (gene recombination) ซึ่งจะถ่ายทอดผ่านเซลล์สืบพันธุ์ไปสู่รุ่นลูก ทำให้เกิดความแตกต่างของยีนในรุ่นต่อ ๆ ไป ดังนั้น

จึงพบว่าแต่ละคนจะมีดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ของตนเอง แม้แต่พี่น้องที่เกิดจากพ่อแม่เดียวกัน ยกเว้นกรณีฝาแฝดเหมือนซึ่งเกิดจากไข่ใบเดียวกันจะมีดีเอ็นเอเหมือนกันทุกประการ


Homologues
Sister chromatids
Diploid
G1
S
G2
M
G1
Diploid
(ก)
Sister chromatids segregate
Homologues
Sister chromatids
Chiasma
Homologues segregate
Diploid
G1
S
G2
Meiosis I
Meiosis II
Haploid
(ข)

ภาพที่ 10 การแบ่งเซลล์ (ก) แบบไมโทซิส (ข) แบบไมโอซิส
ที่มา : Available from http://www.oggynademy.com/basicsciences/fetology/genetics.

3. การกลายพันธุ์ในยีนมนุษย์ (Human Gene Mutation)

ร่างกายมนุษย์มียีนซึ่งควบคุมลักษณะทางพันธุกรรมเป็นตัวกำหนดลักษณะโครงสร้างและหน้าที่การทำงานของอวัยวะต่างๆ

การกลายพันธุ์หรือมิวเตชั่น(mutation) ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติเป็นกลไกที่ทำให้เกิดความผันแปรและความหลากหลายทางพันธุกรรม(genetic variation and diversity)ส่งผลให้มนุษย์มีวิวัฒนาการต่อเนื่องกันมาช้านานเพื่อดำรงและรักษาเผ่าพันธุ์ของตนเองให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนไป

โดยทั่วไป ถ้ามิวเตชั่นเกิดขึ้นแล้วยังคงอยู่ในประชากรมากกว่าร้อยละ 1 มักจะพบว่าให้คุณต่อมนุษย์โดยรวมมากกว่าให้โทษ ตามหลักของกระบวนการคัดเลือกสายพันธุ์ตามธรรมชาติ (อาจมีข้อยกเว้นในบางกรณี) และการเปลี่ยนแปลงลักษณะนี้จะถือว่าเป็นความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic polymorphism)

3.1 มิวเตชั่น คือ การเปลี่ยนแปลงแบบถาวรในปริมาณหรือโครงสร้างของดีเอ็นเอ (change in DNA sequence) ที่นำไปสู่การเปลี่ยนแปลงลักษณะที่แสดงออก(phenotype) ในทางมนุษยพันธุศาสตร์ มิวเตชั่นใช้กับการเปลี่ยนแปลงที่ทำให้เกิดโรค

มิวเตชั่นเกิดขึ้นได้ 2 ประเภท คือ

3.1.1 เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ (spontaneous mutation)

มิวเตชั่นที่เกิดขึ้นเองระหว่างกระบวนการทำงานของเซลล์สามารถเกิดได้ตลอดเวลาในทุกๆ เซลล์ ทุกๆ ช่วงของการเจริญเติบโต อัตราการเกิดจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของยีนแต่ละยีน

เกิดจากความผิดพลาดในกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส(meiosis) ทำให้มีการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของโครโมโซม เรียกว่า ภาวะอะนิวพลอยดี้(aneuploidy) เป็นการกลายพันธุ์ในระดับโครโมโซมซึ่งมีขนาดใหญ่มาก

เกิดระหว่างกระบวนการจำลองสายดีเอ็นเอ(DNA replication) โดยมีการนำเบสที่ไม่ถูกต้องเข้าไปในสายดีเอ็นเอสายใหม่ เป็นการกลายพันธุ์ระดับยีน

3.1.2 เกิดจากการถูกเหนี่ยวนำจากสิ่งแวดล้อมภายนอกที่เป็นสารก่อการกลายพันธุ์ (mutagen) ได้แก่

3.1.2.1 รังสีที่มีพลังงานสูงๆ เช่น รังสีเอ็กซ์ (x-rays) และรังสีแกมมา (gamma) ทำให้โมเลกุลของน้ำและโมเลกุลอื่นๆ แตกตัวเป็นอนุมูลอิสระ (free radical) ซึ่งสามารถทำลายสายดีเอ็นเอ และเปลี่ยนแปงชนิดเบสได้

ส่วนของรังสีอัลตราไวโอเลต (UV radiation) ทำให้เบสไธมีน(T) จับกันเองเป็นไธมีนไดเมอร์(thymine dimer) ซึ่งขัดขวางกระบวนการจำลองสายดีเอ็นเอ

3.1.2.2 เชื้อ ไวรัส ไวรัสบางชนิดสามารถทำให้เกิดมิวเตชั่นในเซลล์ได้ ตัวอย่าง เช่น ดีเอ็นเอของไวรัส hepatitis B อาจเข้าไปรวมตัวกับดีเอ็นเอในจีโนมของเซลล์มนุษย์ และก่อให้เกิดมะเร็งตับตามมา

3.2.2.3 สารเคมีหรือยาที่สามารถเข้าไปจับกับดีเอ็นเอ หรือปฏิกิริยาทำลายดีเอ็นเอได้

สารที่คล้ายเบส (base -analog) สามารถเข้าแทนเบสจริงได้ทำให้เกดกระบวนการจำลองสายดีเอ็นเอที่ผิดไป เช่น 5-โบรโมยูเรซิล (5-Bromouracil) ซึ่งสามารถแทนที่เบสไธมีน (T)

สารในกลุ่ม deamination ได้แก่ กรดไนตริก (nitrous acid) โซเดียมไบซัลไฟต์ (sodium bisulfite) ที่มีคุณสมบัติเคลื่อนย้ายหมู่กรดอะมิโนออกจากเบส G,T,C และ A ทำให้คุณสมบัติการจับคู่ผิดไป

สารที่สามารถแทรกตัวเข้าไปในระหว่างคู่เบสในสายดีเอ็นเอได้ (intercalating agent) ได้แก่ สี acridine ซึ่งมีผลให้คู่เบสที่ถูกสอดแทรกมีระยะห่างออกจากกันมากพอจนทำให้มีการเติมเบสส่วนเกินเข้าไปในสายดีเอ็นเอที่กำลังจำลองตัว

3.2 การควบคุมอัตราการเกิดมิวเตชั่นในร่างกายมนุษย์

โดยทั่วไป การที่ดีเอ็นเอมีมิวเตชั่นเกิดขึ้นจะมีผลเสียหายตามมา ไม่เฉพาะกับบุคคลเท่านั้น แต่ยังถ่ายทอดผลร้ายต่อไปชั่วลูกชั่วหลาน ร่างกายของมนุษย์จึงมีกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นกลไกอันซับซ้อนที่ใช้ป้องกันไม่ให้มีการสะสมและสืบทอดมิวเตชั่นใดๆ ต่อไปยังรุ่นลูกหลานมากเกินไป กลไกนี้มีอยู่ต่อเนื่องตลอดเวลาเพื่อรักษาเสถียรภาพของดีเอ็นเอ

อย่างไรก็ดี การทำงานของกลไกซ่อมแซมดีเอ็นเอ เหล่านี้มิได้สัมฤทธิ์ผลไปเสียทั้งหมด แต่อาจมีข้อผิดพลาดได้บ้าง จึงปรากฏว่ายัง มีมิวเตชั่นจำนวนหนึ่งซึ่งเป็นส่วนน้อยที่สามารถถ่ายทอดต่อไปยังรุ่นลูกได้ นอกจากนี้ถ้ายีนควบคุมโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอ เกิดมิวเตชั่นขึ้นเสียเอง จะเป็นเหตุให้เกิดมิวเตชั่นของยีนอื่นๆ ทุกชนิดตามมาได้

3.3 ขนาดของมิวเตชั่น

3.3.1 มิวเตชั่นขนาดใหญ่ที่ระดับโครโมโซม (large scale, chromosome mutation) ได้แก่

3.3.1.1 การย้ายสลับที่ระหว่างชิ้นส่วนโครโมโซมต่างคู่ (translocation) ส่งผลกระทบต่อหน้าที่ของยีนจำนวนหลายยีน

3.3.1.2 การกลับทิศทางของชิ้นส่วนโครโมโซม (inversion)

3.3.1.3 การมีบางส่วนของโครโมโซมขาดหายไป (deletion) หรือเกินมา (insertion or duplication)

3.3.1.4 การเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม (changes in the number of chromosome) หรือเกิดภาวะอะนิวพลอยตี้ (anueuploigy)

3.3.2 มิวเตชั่นขนาดเล็กที่ระดับยีน (small scale, gene mutation)

มิวเตชั่นที่ระดับยีนพบได้บ่อยเป็นการแทนที่เบส (nucleotide or base substitution) ซึ่งถ้าเกิดที่ตำแหน่งเดียวเรียกว่า point mutation ส่วนอีกกรณีหนึ่งอาจเป็นการที่เบสในสายดีเอ็นเอ เพิ่มขึ้นมาหรือขาดหายไป (insertion or deletion)

การแทนที่เบส แบ่งตามกลุ่มของเบสที่เปลี่ยนแปลง ดังนี้

การแทนที่ระหว่างเบสกลุ่มเดียวกัน(transition) เกิดจากการย้ายโปรตอนหรืออิเล็กตรอนของไฮโดรเจนภายในโมเลกุลของเบสเอง ทำให้ A สลับแทนที่กับ G ในกลุ่มเบสพิวรีน (purine)และ C สลับแทนที่กับ G ในกลุ่มเบสไพริมิดีน (pyrimidine)

การแทนที่ระหว่างเบสต่างกลุ่ม (transversion) มักเกิดในช่วงการซ่อมแซมตัวเองของดีเอ็นเอเป็นการแทนที่เบสในกลุ่มพิวรีน (A,G) ด้วยเบสในกลุ่มไพริมิดีน(C,T) หรือเกิดในทางกลับกัน

3.4 ชนิดของมิวเตชั่น

3.4.1 การขาดหายไป (deletion) เป็นการขาดหายของเบสมากกว่าหนึ่งเบสขึ้นไปในลำดับเบสหนึ่งๆ ส่งผลต่อการแปลรหัสพันธุ์กรรมแบ่งได้เป็น 2 แบบ ดังนี้

การขาดหายไปเป็นจำนวนเท่าของ 3 (inframe deletion) เป็นการขาดหายของเบสที่มีผลเฉพาะกับกรดอะมิโนตำแหน่งนั้นๆ การแปลรหัส (translation) ของโคดอน (codon) สำหรับกรดอะมิโนที่เหลือยังถูกต้องเหมือนเดิม

การขาดหายไปที่หารด้วย 3 ไม่ลงตัว (frameshift deletion) มักมีผลร้ายแรงเพราะทำให้เกิดการเลื่อนกรอบของการแปลรหัส (frameshift translation) ทำให้ได้เป็นโปรตีนที่มีกรดอะมิโนต่างจากเดิมโดยสิ้นเชิง นับตั้งแต่จุดที่เกิดการขาดหายไปจนถึงปลายด้านคาร์บอกซีของสายโพลีเปปไทด์ (carboxy terminus)

3.4.2 การแทรกเพิ่ม (insertion) เป็นการแทรกเพิ่มของเบสมากกว่าหนึ่งเบสขึ้นไปในลำดับดับเบสหนึ่งๆ ผลของการแทรกเพิ่มเป็นไปในทำนองเดียวกันกับการขาดหาย คือถ้าเป็นจำนวนเท่าของ 3 จะไม่ค่อยมีผลร้ายแรง เว้นแต่ว่าการแทรกเพิ่มนั้นเกิดที่ตำแหน่งสำคัญมากๆ ของโปรตีน หรือไปทำให้โครงสร้างเปลี่ยนแปลง หรือไปขัดขวางการทำหน้าที่ของยีน แต่ถ้าเป็นชนิดที่หารด้วย 3 ไม่ลงตัว จะทำให้เกิดการเลือ่นกรอบของการแปลรหัสตามมา

3.4.3 การขยายตัวของเบสชนิดซ้ำสาม (triplet repeat expansion) การที่เบสชนิดซ้ำสาม (triplet หรือ tri-nucleotide repeat) เพิ่มจำนวนขึ้นมากเกินช่วงที่พบในคนปกติจะทำให้ลำดับเบสเกิดความไม่เสถียรในช่วงการแบ่งตัวของเซลล์ (เป็นภาวะก่อนมิวเตชั่นหรือ pre-mutation) ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเบสชนิดซ้ำสามทุกครั้งที่มีการถ่ายทอดไปยังรุ่นลูก ซึ่งมักเป็นในทางเพิ่มขึ้นจนถึงภาวะมิวเตชั่นในที่สุด

3.4.4 มิวเตชั่นเฉพาะที่ (point mutation) เป็นมิวเตชั่นที่เกิดเฉพาะกับเบสตำแหน่งเดียวหรือเกิดกับเบสจำนวนไม่มาก ซึ่งเป็นมิวเตชั่นกลุ่มที่พบได้บ่อยสุด แบ่งได้เป็นหลายชนิด

3.4.4.1 Silent (synonymous) substitution พบได้ร้อยละ 20-25 ของ point mutation มักเดกับเบสตัวที่ 3 ขอวโคดอนจึงไม่มีผลให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลง

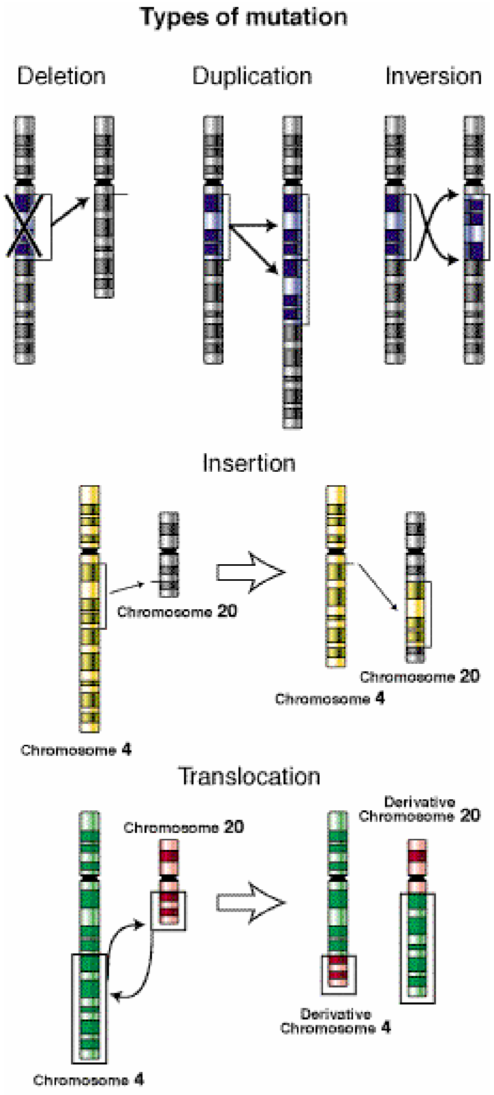
3.4.4.2 Missense (nonsynonymous) mutation พบได้ร้อยละ 70-75 ของ point mutation มีผลให้ได้กรดอะมิโนต่างจากเดิม แบ่งเป็น

Conservative substitution ทำให้ได้กรดอะมิโนชนิดใหม่ที่ยังคงทำหน้าที่ได้เกือบเหมือนเดิม

Nonconservative substitution ทำให้ได้กรดอะมิโนชนิดใหม่ที่มีคุณสมบัติต่างจากชนิดเดิม มีผลต่อโครงสร้างของโปรตีนทำให้สูญเสียฤทธิ์หรือไม่มีความเสถียร จึงทำหน้าที่เหมือนเดิมไม่ได้

3.4.4.3 Nonsense mutation พบได้ร้อยละ 2-4 ของpoint mutation ทำให้โคดอนสำหรับกรดอะมิโนตัวหนึ่งถูกแทนที่ด้วย stop codon ส่งผลให้การสร้างสายโปรตีนสิ้นสุดลงก่อนกำหนด จึงได้โปรตีนขนาดสั้นลงซึ่งทำหน้าที่ได้น้อยลงหรืออาจสูญเสียการทำงานไปทั้งหมด

3.4.4.4 Frameshift mutation การที่มีเบสเพียง 1 ตัวแทรก เพิ่มหรือขาดหายไปทำให้กรอบของการแปลรหัสพันธุกรรมนับจากตำแหน่งนั้นเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมโดยสิ้นเชิง ส่งผลให้โปรตีนที่สังเคราะห์ได้ผิดปกตินับจากตำแหน่งนั้นเป็นต้นไป


Types of mutation
Deletion
Duplication
Inversion
Insertion
Chromosome 20
Chromosome 4
Chromosome 20
Chromosome 4
Translocation
Chromosome 20
Derivative Chromosome 20
Derivative Chromosome 4
Chromosome 4

ภาพที่ 11 การกลายพันธุ์ระดับโครโมโซม

ที่มา : Available from http://www.upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/79/Types-of-of-mutation.png

4. การสกัดดีเอ็นเอและเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับดีเอ็นเอ

4.1 การเก็บและการรักษาวัตถุพยานทางชีวภาพ

สิ่งสำคัญสำหรับกระบวนการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ คือเทคนิคที่ใช้ในการเก็บและรวบรวมวัตถุพยาน ปริมาณและชนิดของวัตถุพยานที่เก็บรวบรวมได้ และวิธีการรักษาวัตถุพยาน ซึ่งจะต้องมีการบันทึกหลักฐานก่อนการจัดเก็บ มีการเก็บรวบรวมอย่างถูกวิธี มีการหีบห่อที่เหมาะสมเพื่อป้องกันการปนเปื้อน และมีการระวังรักษาอย่างถูกต้องไม่ให้เกิดการเน่าสลายหรือเสื่อมสภาพ เพื่อให้วัตถุพยานเหล่านี้เป็นที่ยอมรับเมื่อถูกนำมาใช้กล่าวอ้างในศาล

วัตถุพยานทางชีวภาพแต่ละชนิด ได้แก่ เลือด อสุจิ ปัสสาวะ น้ำลาย เนื้อเยื่อ ฟัน กระดูก และเส้นผม มีวิธีการเก็บรวบรวมและเก็บรักษาแตกต่างกันไป ดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 1 การเก็บรวบรวมวัตถุพยานเพื่อตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ

วัตถุพยาน	สภาพ	ตำแหน่ง	วิธีการเก็บ
โลหิต	ของเหลว	ตัวบุคคล	เก็บใน EDTA 2 หลอด
	ของเหลว	ที่เกิดเหตุ	1. ใช้เข็มฉีดยาเก็บใน EDTA 2. ใช้ผ้าฝ้ายชุบ ผึ่งลมให้แห้ง
โลหิต	ก้อน	ที่เกิดเหตุ	1. เก็บก้อนโลหิตในหลอดทดลอง เติมน้ำเกลือปริมาณเท่ากัน 2. ใช้ผ้าฝ้ายชุบ ผึ่งลมให้แห้ง
โลหิต	เปียก	เสื้อผ้า	ผึ่งลมให้แห้ง เก็บในถุงกระดาษ
	เปียก	วัตถุ	ผึ่งลมให้แห้ง
	เปียก	ในน้ำ	ดูดเก็บด้วยเข็มฉีดยา ใส่ภาชนะพลาสติก เก็บในช่องแช่แข็ง
คราบโลหิต	คราบ	อาวุธ	เก็บอาวุธทั้งชิ้น
	ก้อน	ร่างกาย ที่เกิดเหตุ วัตถุ	ขูดเก็บในถุงกระดาษ
	คราบ	วัตถุขนาดเล็ก	เก็บวัตถุทั้งชิ้น
	คราบ	พาหนะ ผ้าม่าน พรม กระดาษปิดผนัง ไม้	ตัดบริเวณที่มีคราบ เก็บในภาชนะแยกจากกัน

วัตถุพยาน	สภาพ	ตำแหน่ง	วิธีการเก็บ
คราบโลหิต	คราบ	พื้นผิววัตถุที่เคลื่อนที่ไม่ได้ เช่น พื้นและผนังคอนกรีต	1. ขูดเก็บในถุงกระดาษ 2. ดูดซับด้วยเส้นใยฝ้ายเปียกแล้วผึ่งลมให้แห้ง
	จุดกระเซ็น	พื้นผิววัตถุที่เคลื่อนที่ไม่ได้	ใช้เทปปิดทับแล้วจึงเก็บในภาชนะกระดาษ
อสุจิ	ของเหลว	ตัวผู้เสียหาย	เก็บด้วยชุดเก็บ หรือเก็บด้วยก้านสำลีแล้วใส่ตู้เย็น
	ของเหลว	วัตถุ ที่เกิดเหตุ	เก็บอสุจิใส่หลอด หรือใช้ผ้าฝ้ายชุบแล้วผึ่งลมให้แห้ง
	เปียก	เสื้อผ้า	ผึ่งลมให้แห้ง เก็บแยก
	คราบแห้ง	เสื้อผ้า	เก็บทั้งชิ้น แยกหีบห่อ
	คราบแห้ง	พรม ม่าน	ตัดเก็บเฉพาะรอยคราบ
	คราบแห้ง	พื้นผิวเคลื่อนที่ไม่ได้	ขูดเก็บในถุงกระดาษ
ปัสสาวะ	ของเหลว	ตัวบุคคล	บรรจุในภาชนะโดยตรง เก็บในตู้เย็น
น้ำลาย	ของเหลว	ในที่เกิดเหตุ	ใช้เข็มฉีดยาดูดเก็บในหลอด เก็บในตู้เย็น
	คราบ	ในที่เกิดเหตุ	เก็บเฉพาะบริเวณที่มีคราบ
	คราบ	เสื้อผ้า วัตถุ	เก็บทั้งชิ้น
	คราบ	ตัวบุคคล	ใช้ก้านสำลีชุบน้ำเช็ดแล้วแช่เย็น
เนื้อเยื่อ	สด	ที่เกิดเหตุ	เก็บในภาชนะ แช่เย็น
อวัยวะ กระดูก	แห้ง	ที่เกิดเหตุ	เก็บในภาชนะ
เส้นผม	มีเนื้อเยื่อติด	ที่เกิดเหตุ	เก็บในภาชนะ แช่เย็น
	มีโลหิตติด	ที่เกิดเหตุ	แยกเส้นผมออก ผึ่งลมให้แห้ง เก็บในถุงกระดาษ
	ทั้งเส้น	ที่เกิดเหตุ	ใช้ปากคีบเก็บบรรจุในถุงกระดาษ
	เส้นผมขาด	ที่เกิดเหตุ	ใช้ปากคีบเก็บบรรจุในภาชนะ
	ตัวอย่าง	ตัวบุคคล	ตัดให้ชิดโคนหลายจุด จุดละ 4-5 เส้น รวมไม่ต่ำกว่า 20 เส้น บรรจุซองกระดาษแยกแต่ละบุคคล

ที่มา : อรรถพล แช่มสุวรรณวงศ์ลัคณะ. นิติวิทยาศาสตร์เพื่อการสอบสวนสอบสวน2 .พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : บริษัท ทีซีจี พริ้นติ้ง จำกัด, 2546.

ในสภาวะปกติดีเอ็นเอสามารถคงอยู่ได้นานหลายปี วิธีการรักษาดีเอ็นเอให้คงสภาพดีที่สุดคือการทำแห้งและเย็นจัด ปัจจัยที่ทำให้ดีเอ็นเอเสื่อมสลายจนไม่สามารถตรวจหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ เช่น ระยะเวลานาน อุณหภูมิที่สูงเกินไป ความชื้นสูง แสงอาทิตย์หรือรังสี สารเคมี และเชื้อโรค เป็นต้น

การเก็บตัวอย่างส่งตรวจต้องระมัดระวังการปนเปื้อน (contamination) ซึ่งอาจเกิดจากสาเหตุ 3 กลุ่ม ดังนี้

1. การปนเปื้อนจากสิ่งไม่มีชีวิต (non - biological contamination) โดยส่วนใหญ่เป็นสารเคมี เช่น สีย้อมผม สีย้อมผ้า สบู่ หรือสารเคมีอื่นๆ ซึ่งจะมีผลทำให้ไม่สามารถตรวจหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้

2. การปนเปื้อนจากสิ่งมีชีวิตที่ไม่ใช่มนุษย์ (non - human biological contamination) คือ มีดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ที่ไม่ใช่มนุษย์ เช่น เชื้อโรค เชื้อราสัตว์ เชื้อแบคทีเรีย หรือพืช มาปนเปื้อน

3. การปนเปื้อนจากดีเอ็นเอของมนุษย์ (human source contamination) เป็นการปนเปื้อนที่อันตราย และต้องระมัดระวังที่สุด เ นื่องจากมีความสำคัญในการแปรผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาก อาจเกิดขึ้นจากการเก็บวัตถุส่งตรวจอาจมีเซลล์เนื้อเยื่อจากมือของผู้เก็บวัตถุพยาน จากการเก็บรักษาวัตถุพยาน จากการนำส่งวัตถุพยาน และจากการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ ดีเอ็นเอ ซึ่งขั้นตอนทั้งหมดต้องทำโดยมนุษย์ จึงอาจมีการปนเปื้อนได้ ดังนั้นการที่จะได้มาซึ่งผลการตรวจที่ถูกต้องและแม่นยำ ต้องใช้บุคลากรที่มีคุณภาพระมัดระวังในทุกขั้นตอน

4.2 การสกัดดีเอ็นเอ

ขั้นตอนแรกก่อนการสกัดดีเอ็นเอ คือการประเมินสิ่งที่ส่งตรวจ โดยพิจารณาว่าสิ่งส่งตรวจนั้นเป็นดีเอ็นเอของมนุษย์หรือไม่ เป็นตัวอย่างชนิดใดเพื่อเลือกวิธีการสกัดให้เหมาะสม จากนั้นตรวจคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอว่าเหมาะสมและเพียงพอต่อการทดสอบหรือไม่ ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากสิ่งส่งตรวจแต่ละชนิดจะมีปริมาณแตกต่างกันไป ดังแสดงในตารางที่ 2

การสกัด DNA หมายถึงการแยกเอาส่วนของDNA ออกจากเนื้อเยื่อหรือเซลล์ มีหลักการคือทำให้เยื่อหุ้มเซลล์แตกออก โดยใช้สารเคมีหรือเอนไซม์ย่อยเยื่อหุ้มเซลล์ จากนั้นจึงแยก DNA ออกจากองค์ประกอบอื่นๆ ที่มีอยู่ในเซลล์ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารประกอบจำพวกโปรตีน ซึ่งอาจทำลายโดยใช้เอนไซม์ proteinase และแยกออกโดยอาศัยการปั่นเหวี่ยงใน chloroform โดยโปรตีนจะอยู่ในชั้นของchloroform แยกออกจากชั้นของ DNA ที่ละลายอยู่ในน้ำ จากนั้นจึงตกตะกอน DNA ออกจากชั้นของน้ำได้โดยใช้ isopropyl หรือ ethyl alcohol

การสกัดดีเอ็นเอในระยะแรกนั้นประกอบด้วยขั้นตอนที่ซับซ้อนและสารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอทำให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพ เช่น การใช้สารละลายฟีนอลและสารละลายคลอโรฟอร์ม ซึ่งเป็นสารเคมีหลักในการตกตะกอนโปรตีนที่อยู่ในสารละลายดีเอ็นเอ ต่อมาได้มีการปรับปรุงเพื่อให้การสกัดดีเอ็นเอทำได้ง่ายขึ้นและมีอันตรายน้อยลง โดยหลีกเลี่ยงการใช้สารละลายฟีนอลและสารละลายคลอโรฟอร์ม แต่เปลี่ยนมาใช้สารละลายอิ่มตัวโซเดียมคลอไรด์เป็นตัวตกตะกอนโปรตีนแทน อย่างไรก็ตามวิธีการสกัดดีเอ็นเอทั้ง 2 วิธีข้างต้นต้องการสิ่งส่งตรวจ เช่น เลือด ตัวอสุจิ เซลล์รากผม และเซลล์ต่าง ๆ ในปริมาณมาก ใช้เวลาประมาณ 2-3 วัน นอกจากนั้นยังพบปัญหาอื่น ๆ จากการสกัดเมื่อใช้วิธีดังกล่าวคือ เกิดการยับยั้งในการทำปฏิกิริยาอันเนื่องมาจากมีการปนเปื้อนของสารที่ทำหน้าที่ตกตะกอนโปรตีน คือ สารละลายฟีนอล สารละลายคลอโรฟอร์ม และสารละลายอิ่มตัวโซเดียมคลอไรด์ ดังนั้นจุดประสงค์หลักของการสกัดดีเอ็นเอในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ คือ การได้ดีเอ็นเอที่ไม่มีการปนเปื้อนของโปรตีนและสารเคมี ที่มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญในปฏิกิริยา

ตารางที่ 2 แหล่งที่มาของดีเอ็นเอและค่าเฉลี่ยของปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากเซลล์หรือเนื้อเยื่อ

แหล่งที่มา	**ปริมาณดีเอ็นเอ**
เลือด	40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เลือด 1 ไมโครลิตรประกอบด้วย เม็ดเลือดขาวจำนวน 4000-11,000 เซลล์ เม็ดเลือดขาว 1 เซลล์มีดีเอ็นเอ 6.6 พิโคกรัม
ชิ้นเนื้อรก	8 ไมโครกรัม/มิลลิกรัม
ตัวอสุจิ	3.3 พิโคกรัม/เซลล์
เยื่อบุข้างแก้ม	0.1-1 ไมโครกรัม/หนึ่งน้ำบ้วนปาก
เนื้อเยื่อ	0.1-10 ไมโครกรัม/50 มิลลิกรัม
รากผม	250 นาโนกรัม/ราก
น้ำคร่ำ	65 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (1000 เซลล์/มิลลิลิตร เมื่อมีอายุครรภ์ 16 สัปดาห์)
ตับ	15 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ที่มา : วิชัย บุญแสงและคณะ. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จากสารพันธุกรรมสู่เทคโนโลยีพิสูจน์บุคคล. ปทุมธานี : สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2547.

4.3 การสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป QIAamp DNA Mini Kit

ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป QIAamp DNA Mini Kit เป็นวิธีการสกัดดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์อย่างง่ายและรวดเร็ว เหมาะสำหรับการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดที่ใส่สารซิเทรต (citrate) สารแฮปาริน (heparin) หรือ สาร EDTA และสามารถสกัดดีเอ็นเอได้จากพลาสมา (plasma) ซีรั่ม (serum) buffy coat ไขกระดูก (bone marrow) และสิ่งส่งตรวจทางนิติเวช ซึ่งสกัดได้ทั้งตัวอย่างสดและตัวอย่างแช่แข็ง ในขั้นตอนการสกัด ดีเอ็นเอจะจับกับเยื่อซิลิกาเจลในคอลัมน์ จากนั้นสารยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์และโปรตีนจะถูกกำจัดออกไปด้วยสารเคมีที่อยู่ในชุดสกัด เหลือเพียงดีเอ็นเอบริสุทธิ์ซึ่งจะถูกชะออกมาด้วยน้ำกลั่นหรือบัพเฟอร์ AE ที่อยู่ในชุด ผลของดีเอ็นเอที่สกัดได้จะมีความยาวประมาณ 20-30 กิโลเบส ซึ่งความยาวประมาณนี้จะทำให้ขั้นตอน denaturation ในปฏิกิริยาพีซีอาร์เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ ทำให้การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น ดังนั้นจึงเหมาะสำหรับการนำไปใช้ในการทำพีซีอาร์หรือการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์แบบอื่น ๆ และสามารถเก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้งาน ขั้นตอนในการสกัดใช้เวลาเพียง 20 นาที (เวลาในการทำให้เซลล์แตกตัวจะขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่าง) สำหรับปริมาณตัวอย่างที่เหมาะสมในการนำไปสกัด และปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ปริมาณตัวอย่างที่ใช้ และปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป QIAamp DNA Mini Kit

ตัวอย่าง		**ปริมาณ DNA ที่สกัดได้ (μg)**
เลือด	(200 μl)	4–12
Buffy coat	(200 μl)	25–50
เซลล์	(10^7)	30–40
ตับ	(25 mg)	10–30
สมอง	(25 mg)	15–30
ปอด	(25 mg)	5–10
หัวใจ	(25 mg)	5–10
ไต	(25 mg)	15–30
ม้าม	(10 mg)	5–30

ที่มา : QIAGEN. QIAamp® DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit Handbook. n.p., 2001.

4.4 ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส หรือ Polymerase Chain Reaction

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส หรือ Polymerase Chain Reaction เรียกสั้นๆ ว่า PCR เป็นเทคนิคพื้นฐานทางอณูชีววิทยา (molecular biology) ที่นำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมหรือ ดีเอ็นเอในหลอดทดลอง จากปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้เป็นแม่แบบ (DNA template) เพียงเล็กน้อย โดยอาศัยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการแยกดีเอ็นเอสายคู่ การเข้าจับของไพรเมอร์ (primer) และการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ จนได้ผลผลิตเป็นพันล้านโมเลกุล

ปฏิกริยาพีซีอาร์(PCR) คิดค้นพัฒนาขึ้นโดย Kary Mullis และคณะ ซึ่งได้รายงานครั้งแรกในงานประชุม American Society of Human Genatics Conference ในปี ค.ศ. 1985 (พ.ศ. 2528) ผลงานชิ้นนี้ทำให้เขาได้รับรางวัลโนเบล สาขาเคมี ในปี ค.ศ. 1993 (พ.ศ.2528) ตั้งแต่นั้นมาได้มีการปรับปรุงและพัฒนาวิธีการเพื่อให้เกิดประโยชน์ และการประยุกต์ใช้งานได้มากขึ้น

ปฏิกิริยา พีซีอาร์(PCR) ประกอบด้วยสารตั้งต้นที่สำคัญดังนี้

1) ดีเอ็นเอแม่แบบหรือดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (DNA template) เป็นดีเอ็นเอที่สกัดได้มาจากเซลล์ที่มีนิวเคลียสของมนุษย์ชนิดต่างๆ และเป็นดีเอ็นเอ ที่ทราบลำดับเบสแล้ว

2) ดีเอ็นเอ สายเริ่มต้นขนาดสั้นๆ เรียกว่า ไพรเมอร์ (primer) มีความยาวประมาณ 18-25 เบส จำนวน 2 สาย สายหนึ่ง เรียกว่า ไพรเมอร์เอฟ (forward primer) อีกสายหนึ่งเรียกว่า ไพรเมอร์อาร์ (reverse primer) และแต่ละสายจะมีลำดับเบสที่เข้าคู่ (complementary) กับลำดับเบสด้านปลาย 3’ ของสายดีเอ็นเอแม่แบบแต่ละสาย และสามารถจับกับสายดีเอ็นเอ แม่แบบได้ โดยจับที่ตำแหน่งอยู่ขนาบข้าง(flanking region) กับส่วนที่ต้องการเพิ่มจำนวน ดีเอ็นเอสานเริ่มต้นนี้ได้มาจากการสังเคราะห์ด้วยเครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA synthesizer)

3) นิวคลีโอไทด์หรือเบส มี 4 ชนิด ได้แก่ อะดีนีน (adenine,A) ,กัวนีน (guanine,G),ไซโตซีน(cycosine,C) และไธมีน(thymine) ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของโครงสร้างดีเอ็นเอ

4) เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ เอนไซม์นี้มีหลายชนิด ที่นิยมใช้กันทั่วไปเป็นเอนไซม์ที่สกัดได้จากแบคทีเรียชื่อ เทอร์มัส อาควิติคัส (Thermus aquaticus) จึงเรียกเอนไซม์นี้ว่า Tag DNA Polymerase แบคทีเรียชนิดนี้อาศัยอยู่ในน้ำพุร้อนมีคุณสมบัติทนต่ออุณหภูมิสูงได้ถึง 95^{o}C และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือประมาณ 72 ^{o}C

5) แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) เป็นสารเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส ความเข้มข้นของแมกนีเซียมอิออนที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR จะอยู่ในช่วง 0.5-2.5 mM แมกนีเซียมอิออนนอกจากจะเป็น cofactor ของเอนไซม์ Taq DNA polymerase แล้วความเข้มข้นของแมกนีเซียม

ยังมีผลต่ออุณหภูมิที่จะทำให้ดีเอ็นเอสายคู่จะแยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยว แมกนีเซียมอิออนจะช่วยให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยวได้ดี มีผลต่อการที่ไพร์เมอร์จะเข้าจับสายดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing) มีผลต่อการนำ dNTPs เข้ามาต่อในระหว่างการสังเคราะห์ ช่วยให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอมีความจำเพาะเจาะจง และทำให้เอนไซม์สังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่ได้ถูกต้อง หากปฏิกิริยา PCR มีความเข้มข้นของแมกนีเซียมอิออนมากเกินไปจะทำให้สาย ดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ขาดความจำเพาะ หากความเข้มข้นต่ำเกินไปปริมาณดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จะต่ำ

6) บัฟเฟอร์ (buffer) เป็นสารที่ทำให้สภาพของสารในหลอดทดลองมีมีสภาวะความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา

7) น้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ซึ่งใช้ผสมกับสารตั้งต้นดังกล่าวทั้งหมด

4.4.1 หลักการของพีซีอาร์

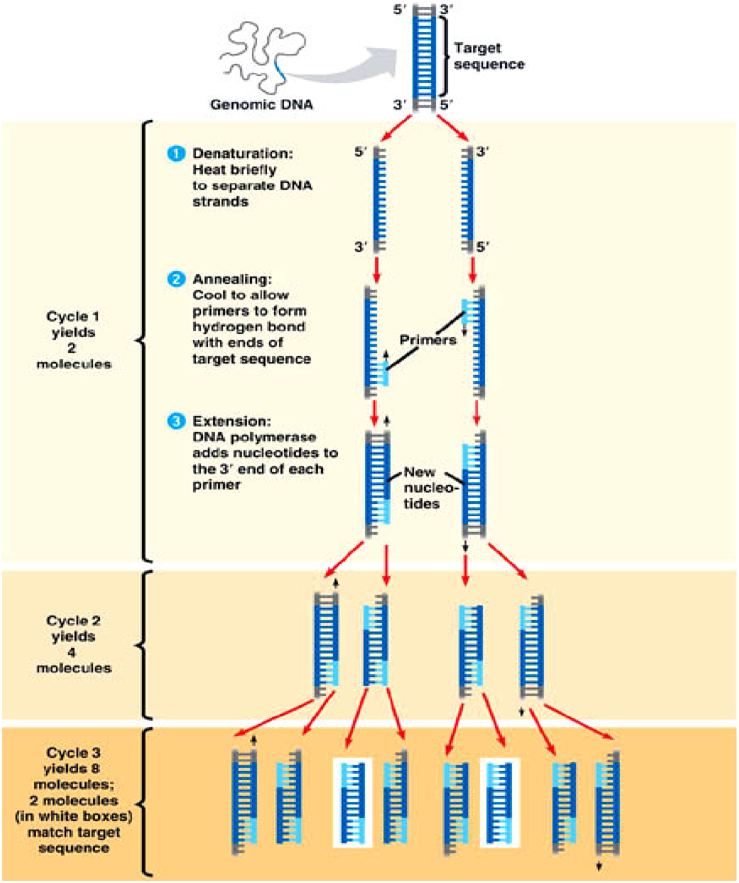
ปฏิกิริยาพีซีอาร์มี 3 ขั้นตอนหมุนเวียนต่อเนื่องกันไปภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน ดังนี้

1) การแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบ (denaturation) ใช้อุณหภูมิสูงประมาณ 92-95 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 30-60 วินาที เพื่อให้ดีเอ็นเอคลายเกลียวคู่ออกจากกันเป็นสายเดี่ยวและทำหน้าที่เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

2) การจับของสายไพรเมอร์ (annealing) โดยการลดอุณหภูมิลงประมาณ 50-65 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับค่า Tm (melting temperature) ใช้เวลาประมาณ 30-60 วินาที เพื่อให้ไพรเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบในบริเวณที่ลำดับเบสเข้าคู่กัน ไพรเมอร์จะถูกเติมให้มีความเข้มข้นสูงกว่าดีเอ็นเอต้นแบบมาก ดังนั้นการจับกันระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบจึงมีโอกาสเกิดขึ้นมากกว่าการจับคู่กลับ (renature) ของดีเอ็นเอต้นแบบซึ่งเป็นสายเดี่ยวด้วยกันเอง

3) การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยการต่อสายไพรเมอร์ (primer extension) ใช้อุณหภูมิ 70-75 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 30-120 วินาที ขึ้นอยู่กับความยาวของดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มจำนวน ขั้นตอนนี้ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสจะนำเบสทั้ง 4 ชนิดที่เข้าคู่กับดีเอ็นเอต้นแบบมาต่อเข้าที่ปลายของสายไพรเมอร์ทั้งสองเพื่อให้ได้สายดีเอ็นเอสายใหม่ที่มีไพรเมอร์เป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย

ปฏิกิริยาทั้ง 3 ขั้นตอนรวมเรียกว่า 1 รอบ (PCR cycle) (ภาพที่ 11) เกิดขึ้นโดยนำหลอดทดลองที่มีส่วนผสมดังกล่าวข้างต้นเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ ซึ่งเป็นเครื่องที่สามารถเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิสูง-ต่ำได้อย่างรวดเร็ว รวมทั้งกำหนดจำนวนรอบและเวลาสำหรับปฏิกิริยาในแต่ละขั้นตอนได้อย่างอัตโนมัติ


5'
3'
Target sequence
Genomic DNA
3'
5'
Cycle 1 yields 2 molecules
1 Denaturation: Heat briefly to separate DNA strands
5'
3'
3'
5'
2 Annealing: Cool to allow primers to form hydrogen bond with ends of target sequence
Primers
3 Extension: DNA polymerase adds nucleotides to the 3' end of each primer
New nucleotides
Cycle 2 yields 4 molecules
Cycle 3 yields 8 molecules; 2 molecules (in white boxes) match target sequence

ภาพที่ 12 ขั้นตอนของพีซีอาร์ใน 1 รอบปฏิกิริยา

ที่มา : Available from http://www.vcharkarn.com/include/vcafe/showkratoo.php?Pid=39569

ปฏิกิริยาพีซีอาร์จะเกิดขึ้นซ้ำ ๆ ประมาณ 25-40 รอบ โดยสายดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้นในแต่ละรอบจะถูกใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ในรอบต่อ ๆ ไปจนสิ้นสุดปฏิกิริยา ดังนั้นผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จึงเพิ่มขึ้นทวีคูณ เรียกการเพิ่มจำนวนแบบนี้ว่า exponential amplification ซึ่งคำนวณได้เท่ากับ 2^n (n คือจำนวนรอบที่ทำปฏิกิริยา) ตัวอย่างเช่น ถ้าทำปฏิกิริยา 35 รอบ จะมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็น 2 ยกกำลัง 35 (2^{35}) หรือประมาณ 34 พันล้านเท่าของปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้น ปฏิกิริยาทั้งหมดใช้เวลาเพียง 2-3 ชั่วโมง

จากพื้นฐานของปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้มีการปรับปรุงเทคนิคขึ้นมาใหม่ ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้สำหรับการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอทางนิติวิทยาศาสตร์ เรียกว่า multiplex PCR เป็นเทคนิคที่ดัดแปลงมาจากเทคนิคพีซีอาร์พื้นฐาน โดยให้สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายได้หลาย ๆ ตำแหน่ง (loci) โดยใช้ไพรเมอร์หลายคู่ ในปฏิกิริยาเดียวกัน ไพรเมอร์แต่ละคู่จะต้องถูก

ออกแบบให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่เป็นเบสคู่สมต่อกัน และให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีขนาดแตกต่างกัน เพื่อให้สามารถตรวจวิเคราะห์ได้โดยวิธี gel electrophoresis ข้อสำคัญสำหรับเทคนิค multiplex PCR คือต้องปรับสภาวะของปฏิกิริยาพีซีอาร์ให้สามารถเพิ่มขยายดีเอ็นเอเป้าหมายทุกตำแหน่งได้ประสิทธิภาพเท่าเทียมกัน

ข้อดีของเทคนิคพีซีอาร์คือ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการแม้มีปริมาณเพียงเล็กน้อย เช่น เซลล์เพียงเซลล์เดียว เลือดเพียงหยดเดียว หรือเส้นผมเพียงเส้นเดียว และดีเอ็นเอไม่จำเป็นต้องบริสุทธิ์มากคือ อาจเจือจางไปบางส่วน แต่ให้มีเหลือยาวประมาณ 50-2,000 เบส ก็สามารถเพิ่มปริมาณได้

ข้อจำกัดของเทคนิคพีซีอาร์คือ ต้องทราบลำดับเบสขนาบข้างของดีเอ็นเอส่วนที่จะนำมาเพิ่มปริมาณและต้องสังเคราะห์ไพรเมอร์ที่เหมาะสม

ข้อควรระวังในการทำพีซีอาร์คือ พีซีอาร์เป็นเทคนิคที่ไวมาก อาจจะมีผลบวกปลอมได้ เนื่องจากการปนเปื้อนของดีเอ็นเอจากตัวอย่างอื่น จากตัวผู้ปฏิบัติงาน หรือจากเครื่องมือ จึงต้องมีการทำ Negative Control ควบคู่ไปด้วย และต้องจัดระบบห้องปฏิบัติการให้เหมาะสม และสวมถุงมือทุกครั้งในการปฏิบัติงาน

4.4.2 หลักการเลือกไพร์เมอร์ หรือ ออกแบบไพรเมอร์

1) เลือกใช้ไพรเมอร์ในช่วงความเข้มข้นพอเหมาะ คือ ในช่วง 0.1-0.5 M หากเข้มข้นเกินไป จะทำให้การเข้าจับการสายดีเอ็นเอต้นแบบผิดพลาดได้ หรือทำให้โอกาสการเกิด primer dimer เพิ่มขึ้น และ prime dimer ที่เกิดขึ้นสามารถทำหน้าที่เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้

2) ควรเลือกไพรเมอร์ที่มี Tm ใกล้เคียงกัน และอยู่ในช่วง 55-80 ^{o} C ไพรเมอร์ควรมี Tm สูงกว่า Tm ของ template secondary structure ค่า Tm สามารถคำนวณได้จาก Tm = 2AT+4GC หรือจะเข้าไปใน web site ที่ช่วยการคำนวณค่า Tm คือ (http://www.operon.com/oligos/toolkit.php)

3) จำนวนนิวคลีโอไทด์ที่เหมาะสม หรือความยาวของไพร์เมอร์จะอยู่ในช่วง 18-28 นิวคลีโอไทด์

4) คู่ไพรเมอร์ (forward และ reverse primer) ที่ใช้ไม่ควรมีคู่สมกัน กล่าวคือจะต้องไม่มีเบสที่เป็นคู่สมกันเกิน 3 ตำแหน่ง เพื่อป้องกันการเกิดการจับกันเองของไพรเมอร์ (primer dimer formation) และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แต่ละเส้นก็ไม่ควรมีลำดับที่เป็นคู่สมกันเองในสาย เพราะอาจจะเกิดการจับคู่กันเองในสายของไพรเมอร์ (self complementary) ได้โครงสร้างเป็น hairpin loop

5) ไม่ควรเลือกใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นชนิดเดียวกันซ้ำๆ ติดต่อกัน เช่นpolypurine, polypyrimidine ไพรเมอร์ที่ดีควรมีลักษณะ random base distribution และมีปริมาณ G, C อยู่ระหว่าง 50-60% เพราะนิวคลีโอไทด์พวกนี้สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนได้ 3 พันธะ ซึ่งแข็งแรงกว่า A, T (สร้างได้ 2 พันธะ) และหลีกเลี่ยงการใช้ไพรเมอร์ที่มีการซ้ำของนิวคลีโอไทด์ G หรือ C ติดต่อกันมากกว่า 3 ตัว เช่น NNGGGGTACCCANNN

6) ควรเลือกไพรเมอร์ที่มีเบส G หรือ C อยู่ที่ปลาย 3′ ของไพรเมอร์ เพื่อช่วยให้ไพรเมอร์จับสายดีเอ็นเอได้แน่น

7) ถ้าเป็นไปได้ควรเลือกให้ไพรเมอร์ที่จับกับดีเอ็นเอต้นแบบ ณ บริเวณที่ไม่ทำให้เกิด secondary structure

8) ควรเลือก forward และ reverse primer ที่เมื่อจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายแล้วไพรเมอร์ทั้งสองจะอยู่ห่างกันในระยะ 100-600 bp

9) ปรับเปลี่ยนบริเวณที่ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอต้นแบบให้แตกต่างกันไปได้ โดยศึกษาได้จาก The basic local aligment search tool บน web site (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)

ในปัจจุบันสามารถออกแบบไพรเมอร์ ได้ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ โดยกำหนดข้อมูลต่างๆ ที่ต้องการให้กับโปรแกรม เช่น

1) ขนาดความยาวของไพรเมอร์

2) Tm

3) ปริมาณของ G และ C ในสายไพรเมอร์ (มีผลต่อความแข็งแรงของการเข้าจับของไพรเมอร์กับสายดีเอ็นเอ

4) ชนิดของนิวคลีโอไทด์ 2 ตัวสุดท้ายทางปลาย 3′

5) จำนวน G-C bond ที่ต่อเนื่องกันในไพรเมอร์ (มีผลต่อความแข็งแรงของการเข้าจับของไพรเมอร์กับสายดีเอ็นเอ)

6) ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่จะใช้ (มีผลต่อ Tm)

7) ความเข้มข้นของแคทอิออน เช่น Na^+ และ K^+

8) จำนวนพันธะที่อาจเกิดขึ้นจากการที่เบสในไพรเมอร์มีคู่สมกันแล้ว โค้งสายมาสร้างพันธะกันเป็น hairpin หรือพันธะกับไพรเมอร์ชิ้นอื่น

9) ให้มี recognition site ของเอนไซม์ตัดจำเพาะรวมอยู่ด้วย

4.4.3 การตรวจสอบผลผลิตจากพีซีอาร์โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีสิส

หลังจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์แล้วจะต้องนำผลผลิตดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ (PCR product) มาทำการวิเคราะห์ โดยทำได้ 2 วิธี คือ

วิธีเจลอิเล็คโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) คือการแยกดีเอ็นเอในวุ้น อะกาโรส (agarose gel) หรือในวุ้นอะคิลาไมด์ (acrylamide gel) ด้วยกระแสไฟฟ้า เป็นการแยก ดีเอ็นเอโดยอาศัยขนาด โครงรูป และประจุของดีเอ็นเอเมื่อเคลื่อนที่บนสนามไฟฟ้า จากนั้นนำแผ่นวุ้นนี้ไปย้อมให้เห็นแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีต่าง ๆ เช่น การติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี การย้อมดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) แล้วตรวจดูด้วยแสงอุลตราไวโอเลต การย้อมด้วย silver stain การติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนส์หรือติดฉลากด้วยระบบเอนไซม์ร่วมกับการทำให้เกิดสี เป็นต้น เพื่อประเมินขนาดและปริมาณของแถบดีเอ็นเอในวุ้นตัวกลางโดยเปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน (DNA marker)

วิธี capillary electrophoresis (CE) มักใช้ในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอทางนิติวิทยาศาสตร์ เป็นเทคนิคที่ใช้สำหรับการแยกสารประกอบ โดยการทำให้สารประกอบเหล่านั้นเคลื่อนที่ผ่านสนามไฟฟ้าที่ออกแบบให้มีท่อขนาดเล็กอยู่ตามระยะทางการเคลื่อนที่ ทำให้แยกสารประกอบออกจากกันได้ และแปลข้อมูลเป็นกราฟ เรียกว่าอิเล็กโทรฟีโรแกรม (electropherogram)

4.4.3.1 เครื่องมือที่ใช้สำหรับอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีสิส

โครงแบบของเจลที่ใช้กันอย่างแพร่หลายคือ แผ่นเจลที่อยู่ในแนวนอนซึ่งประดิษฐ์ขึ้นโดยวอล์เตอร์ แชฟฟเนอร์ (Walter Schaffner) ข้อดีคือใช้อะกาโรสความเข้มข้นต่ำได้เพราะเจลทั้งอันมีที่ค้ำจุนที่อยู่ข้างใต้ สามารถหล่อเจลให้มีขนาดต่างๆ กันได้ ง่ายต่อการใส่ตัวอย่าง การเทและการจับถือเครื่องมือราคาไม่แพงสามารถสร้างขึ้นเองหรือหาซื้อได้

ปกติจะเทเจลแผ่นหนาบนแผ่นแก้วหรือถาดพลาสติกที่จะตั้งลงไปในชานในถังอิเล็กโตรโฟรีสิส (elevtrophoresis tank) อิเล็กโตรโฟรีสิสดำเนินไป โดยมีเจลแช่อยู่ใต้ผิวบัฟเฟอร์ ความต้านทานของเจลต่อการไหลผ่านของกระแสไฟฟ้าเกือบเท่ากับความต้านทานของบัฟเฟอร์ ปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในการซือถังอิเล็กโตรโฟรีสิสคือ จะต้องง่ายในการตรวจสอบเจลด้วยแสงอัลตราไวโอเลตในระหว่างรัน เครื่องมือควรจะมีโคมบ์ (combs) ที่มีขนาดต่างๆ กันเพื่อทำให้เกิดเวลที่มีขนาดต่างๆ กัน เครื่องมือควรมีฝาปิดเพื่อเป็นโล่ป้องกันการเชื่อมต่อของกระแสไฟฟ้า เครื่องมือควรมีช่องเสียบสายไฟอยู่ด้านนอกเพื่อสามารถทำให้เทบัฟเฟอร์ออกได้อย่างง่ายและได้หมด ควรออกแบบช่องเสียบสายไฟเพื่อยอมให้บัฟเฟอร์มีการหมุนเวียนในระหว่างช่องที่เป็นขั้วบวกและขั้วลบ

4.4.3.2 การเตรียมและการตรวจสอบอะกาโรสเจล

การเตรียมอะกาโรสเจล

1) ปิดผนึกขอบแผ่นแก้วด้วยเทปเพื่อทำให้เกิดแม่พิมพ์ ตั้งแม่พิมพ์ลงบนโต๊ะในแนวราบ

2) เติมอิเล็กโตรโฟรีสิสบัฟเฟอร์ (ปกติใช้ 1 × TAE หรือ 0.5 × TBE) ให้เพียงพอเติมลงในถังอิเล็กโตรโฟรีสิสให้เต็ม และเตรียมเจล เติมเอกาโรสที่เป็นผงในปริมาณที่ถูกต้องลงในฟลาสค์ที่มีอิเล็กโตรโฟรีสิสบัฟเฟอร์ที่มีปริมาณตามที่กำหนด บัฟเฟอร์ที่ใส่ควรจะไม่มากเกิน 50% ของปริมาตรของฟลาสค์

3) ให้ความร้อนโดยแช่ในอ่างน้ำที่มีน้ำเดือดหรือใส่ในเตาไมโครเวฟจนกระทั่งเอการ์หลอมละลาย

4) ทำให้สารละลายเย็นลงที่ 60 °C เติมเอทิเดียมโบรไมด์ จากสารละลายสต๊อก 10 mg/ml ในน้ำ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5 µg/ml และสะมผัสให้เข้ากันดี ข้อควรระวังเอทิเดียมโบรไมด์เป็นสารก่อมะเร็ง ต้องใส่ถุงมือในขณะทำงานที่ใช้สารละลายนี้ และทำการลดการปนเปื้อนเมื่อใช้สารละลายนี้แล้ว

5) เทสารละลายเอกาโรสที่อุ่นลงในแม่พิมพ์ เจลควรหนาประมาณ 3-5 มม. วางโคมบ์ลงในเจล ตรวจดูไม่ให้มีฟองอากาศภายใต้หรือระหว่างซี่ของโคมบ์

6) หลังจากเจลแข็งตัวประมาณ 30-45 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ให้ดึงโคมบ์และเทปออก และวางเจลลงในถังบัฟเฟอร์

7) เติมอิเล็กโตรโฟรีสิสบัฟเฟอร์ ให้ท่วมเจล ให้สูงประมาณ 1 มม.

8) ผสมตัวอย่างดีเอ็นเอกับเจลโลดดิงบัฟเฟอร์ค่อยๆ เทสารผสมลงในสลอต (slot) ของเจลที่จุ่มอยู่โดยใช้ไมโครปิเปต

9) ปิดฝาถังเจล เชื่อมต่อสายไฟ ดีเอ็นเอเคลื่อนที่เขาหาขั้วบวก ขั้วสีแดง ถ้าต่อสายไฟถูกต้องจะเห็นฟองอากาศเกิดขึ้นที่ขั้วบวกและขั้วลบในเวลาไม่กี่นาที โบรโมฟีนอลลู (bromophenol blue) ควรจะเคลื่อนที่จากเวล เข้าไปยังตัวเจล รันเจลจนกระทั่งโบรโมฟีนอลบลู และไซลีนไซเอนอลเอฟเอฟ (xylene cyanal FF) เคลื่อนที่ผ่านเจลไปได้ระยะทางที่เหมาะสม

10) ปิดกระแสไฟฟ้า ดึงสายไฟและเปิดฝาออกจากถังเจล ตรวจดูเจลโดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตและถ่ายรูปเจล

4.4.3.3 การทำให้ดีเอ็นเอฟื้นคืนจากเอกาโรสเจลที่หลอมละลายที่อุณหภูมิต่ำ

ได้มีการนำหมู่ไฮดรอกซีเอทิล (hydroxyl ethyl) เข้าไปในสายพอลิแซ๊กคาไรด์ การแทนที่นี้ทำให้เอกาโรสเป็นเจลที่อุณหภูมิ 30 °C และหลอมละลายที่อุณหภูมิ 65 °C ซึ่งการหลอมละลายนี้ต่ำกว่าการหลอมละลายของดีเอ็นเอสายคู่ส่วนใหญ่สมบัติข้อนี้จึงถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการสร้างเทคนิคง่ายๆ ในการทำให้ดีเอ็นเอฟื้นคืนจากเจล

1) เทเจลที่มีเอกาโรสที่หลอมละลายที่อุณหภูมิต่ำ ในความเข้มข้นที่เหมาะสมลงในแม่พิมพ์ เมื่อเจลเย็นที่อุณหภูมิห้อง วางเจลลงในถังอิเล็กโตรโฟรีสิส

2) ผสมตัวอย่างดีเอ็นเอกับเจลโลดดิงบัฟเฟอร์ และใส่ลงในเวลของเจล ดำเนินการอิเล็กโตรโฟรีสิสที่ 4 °C เพื่อให้แน่ใจว่าเจลไม่หลอมในระหว่างรัน

3) กำหนดตำแหน่งแถบหรือแบนด์ที่สนใจโดยใช้หลอดไฟแสงอัลตราไวโอเลตคลื่นยาวที่ใช้มือถือ

4) ใช้ใบมีดโกนคมๆ ตัดเอกาโรสที่มีแถบหรือแบนด์ที่สนใจ และถ่ายโอนไปยังหลอดไมโครฟิวจ์

5) หลังจากตัดแถบหรือแบนด์ ให้ถ่ายรูปเจล เพื่อบันทึกว่าแถบหรือแบนด์ไหนถูกตัดไป

6) ให้เติม 20 mM Tris-Cl pH8 1 mM EDTA pH8 ลงในเอกาโรสที่ตัดออกมาที่มีแถบหรือแบนด์ดีเอ็นเอ ปิดฝาหลอดและบ่มเป็นเวลา 5 นาทีที่ 65 °C เพื่อทำให้เจลหลอมละลาย

7) ทำให้สารละลายเย็นที่อุณหภูมิห้อง และเติมฟีนอลปริมาตรที่เท่ากัน ทำให้สมดุลที่ pH 8 ด้วย 0.1 M Tris-Cl วอร์เทกซ์สารผสมเป็นเวลา 20 นาที และทำการหมุนเหวี่ยงที่ 400 g เป็นเวลา 10 นาที ที่ 20 °C เพื่อให้ได้ชั้นที่เป็นน้ำกลับคืนมาใหม่สารสีขาวที่อยู่ระหว่างชั้นคือเอกาโรสผง สกัดชั้นที่เป็นน้ำอีกครั้งด้วย ฟีนอล : คลอโรฟอร์ม และสกัดอีกครั้งด้วยคลอโรฟอร์ม

8) ถ่ายชั้นที่เป็นน้ำลงในหลอดหมุนเวี่ยงพอลิสไตริน (polystyrene) เติม 10 M แอมโมเนียแอซิเตรต ปริมาตร 0.2 เท่า และเอทานอล ปริมาตร 2 เท่าที่ 4 °C เก็บสารผสมเป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง และฟื้นคืนดีเอ็นเอโดยการหมุนเหวี่ยงที่ 5000 rpm เป็นเวลา 20 นาทีที่ 4 °C ในเครื่องหมุนเหวี่ยง ซอร์วอลอาร์ที 6000 ดีเอ็นเอที่ได้จะบริสุทธิ์พอเพียงที่จะเป็นซับสเตรตในการตัดด้วยรีสตริกชันเอนโดนิวคลีเอสและไลเกส

4.5 การแปลผลการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอมี 2 แบบคือ แบบบาร์โค้ดที่ได้จากการตรวจด้วยวิธี manual จะอ่านผลโดยการเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอ (band) ในแต่ละตำแหน่ง และแบบกราฟ (peak) ที่ได้จากการตรวจด้วยเครื่องอัตโนมัติ จะอ่านผลโดยการสังเกตหมายเลขใต้เส้นกราฟที่ละตำแหน่งของ marker จากนั้นจึงแปลผลการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ซึ่งสามารถสรุปได้ 3 แบบ ดังนี้

4.5.1 ผลการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สามารถสรุปผลได้โดยไม่มีข้อขัดแย้งตามมาตรฐานสากล เรียกว่า conclusive หมายถึงลายพิมพ์ดีเอ็นเอให้ผลตรงกันทุกตำแหน่งที่ใช้ตรวจ เช่น กรณีการพิสูจน์ความสัมพันธ์พ่อแม่ลูก พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกทั้ง 16 ตำแหน่งตรงกับของพ่อและแม่คนละครึ่ง (ตามลักษณะการถ่ายทอดของเมนเดล) หรือกรณีการตรวจหาผู้กระทำความผิด ผลการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอของผู้ต้องหากับตัวอย่างดีเอ็นเอที่เก็บได้จากวัตถุพยานตรงกันทุกตำแหน่ง

4.5.2 ผลการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีข้อขัดแย้งกัน เรียกว่า exclusive หมายถึงลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้มีผลไม่ตรงกันอย่างน้อย 1 ตำแหน่งขึ้นไป อย่างไรก็ตามหากผลการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพ่อแม่ลูกมีความแตกต่างเพียง 1 ตำแหน่ง อาจมีสาเหตุจากการกลายพันธุ์(mutation) ดังนั้นจึงควรมีการพิสูจน์เพิ่มเติมต่อไปนี้

กรณีผลตรวจของพ่อกับลูกชายไม่ตรงกันจะตรวจเพิ่มในโครโมโซม Y

กรณีผลตรวจของพ่อกับลูกสาวไม่ตรงกันจะตรวจเพิ่มในโครโมโซม X

กรณีผลตรวจของแม่กับลูกชาย หรือแม่กับลูกสาวไม่ตรงกัน จะต้องมีการตรวจเพิ่มใน mitochondrial DNA ซึ่งถ้าผลตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกัน จึงกล่าวยืนยันได้ว่าเป็นพ่อกับลูก หรือแม่กับลูกที่แท้จริง และตำแหน่งที่ไม่ตรงกันนั้นเกิดจากการกลายพันธุ์ แต่ถ้าผลการตรวจในตำแหน่งดังกล่าวไม่ตรงกัน แสดงว่าไม่ใช่พ่อกับลูก หรือแม่กับลูกที่แท้จริง

4.5.3 ผลการตรวจที่ยังไม่สามารถสรุปผลได้ เรียกว่า inconclusive หมายถึงการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ไม่สามารถทำได้ครบทุกตำแหน่ง เนื่องจากมีการเสื่อมสลายของวัตถุพยาน การปนเปื้อนของดีเอ็นเอในขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่ง หรือการตรวจมีความผิดพลาดจากเครื่องมือหรือจากผู้ทำการตรวจ เช่น น้ำยาหมดอายุ เป็นต้น

4.6 การวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอ

ปัจจุบันมีเครื่องมืออัตโนมัติที่จะวิเคราะห์ลำดับเบสของโมเลกุลดีเอ็นเอโดยการใช้วิธีการที่เหมาะสมเพื่อก่อให้เกิดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีปลายที่เบสทั้งสี่ที่เป็นสารกัมมันตรังสี แล้วจึงดำเนินการอิเล็กโตรโฟรีสิสกับชิ้นส่วนเหล่านั้นเพื่อให้โมเลกุลที่มีความยาวแตกต่างกันหนึ่งนิวคลีโอไทด์แยกออกจากกันบนเจล โดยวิธีการของอิเล็กโตรโฟรีสิสทำการแยก

เลน (lane) 4 เลนออกจากกันเลนหนึ่งเลนสำหรับชิ้นส่วนที่มีปลายเป็นเบสชนิดหนึ่งใน 4 เบสของดีเอ็นเอ คือ แอดินีน กัวนีน ไซโทซีน และไทมีน ระบุตำแหน่งของชิ้นส่วนเหล่านี้ด้วยออโตเรดิโอกราฟีและการที่รู้ว่าแต่ละเลนแสดงถึงเบสใดจึงสามารถอ่านลำดับเบสของดีเอ็นเอได้ มีวิธีการ 2 วิธีที่ใช้วิเคราะห์หาลำดับเบสของดีเอ็นเอ คือวิธีการของแมกแซมกิลเบิร์ต (Maxam Gilbert) และวิธีไดดีออกซิของแซงเกอร์ (sanger dideoxy) วิธีการของแมกแซมกิลเบิร์ต ใช้สารเคมีแยกดีเอ็นเอในแต่ละนิวคลีโอไทด์เบสทั้งสี่ภายใต้สภาวะหนึ่งรอยแยกต่อสาย ดังนั้นจึงต้องมีการเตรียมหลอดทดลองแยกกันสี่หลอด วิธีไดดีออกซิของแซงเกอร์ วิเคราะห์ลำดับเบสโดยการสร้างชุดของดีเอ็นเอสายเดี่ยว โดยเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสเอนไซม์นี้ใช้ดีออกซิไรโบนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟตเป็นซับสเตรตและมีการเติมไพรเมอร์ ในสารผสมที่ทำการเพาะบ่มเนื่องจากน้ำตาลไดดีออกซิขาดหมู่ 3’-ไฮดรอกซิล การทำให้สายยาวขึ้นอย่างต่อเนื่องจึงเกิดขึ้นไม่ได้ไดดีออกซิแอนาล็อกจึงทำหน้าที่เป็นรีเอเจนต์จำเพาะทีทำให้สายสิ้นสุดลงจึงทำให้ได้ชิ้นส่วนที่มีขนาดต่างๆกันขึ้นอยู่กับสภาวะการบ่ม ชิ้นส่วนของกรดนิวคลีอิกที่ถูกสร้างขึ้นมีสารกัมมันตรังสีเนื่องจากการใช้ไพรเมอร์ที่เป็นสารกัมมันตรังสีหรือดีออกซิไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตกัมมันตรังสีในปฏิกิริยา แล้วจึงทำการอิเล็กโตรโฟรีสิสชิ้นส่วนเหล่านี้และวิเคราะห์ตำแหน่งของแถบกัมมันตรังสีโดยออโตเรดิโอกราฟีโดยการจัดเรียงเลนของไดดีออกวิไรโบนิวคลีโอไทด์และบันทึกตำแหน่งในแนวดิ่งของแต่ละชิ้นส่วนสัมพันธ์กับชิ้นส่วนข้างคียง สามารถอ่านลำดับของดีเอ็นเอโดยตรงจากเจล วิธีไดดีออกซิของแซงเกอร์สามารถใช้หาลำดับเบสของดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอได้ การหาลำดับเบสของอาร์เอ็นเอใช้การคัดลอกดีเอ็นเอสายเดี่ยวโดยใช้อาร์เอ็นเอเป็นต้นแบบ โดยเอนไซม์รีเวิร์สแทรนสคริปเทส โดยการสร้างดีเอ็นเอสายเดี่ยวในกรณีที่มีไดดีออกซินิวคลีโอไทด์ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดต่างๆ ถูกสร้างขึ้นซึ่งเหมาะกับการหาลำดับเบสแบบของแซงเกอร์ จากลำดับเบสของดีเอ็นเอ สามารถอนุมานลำดับเบสของอาร์เอ็นเอโดยกฎการจับคู่ของเบส

การวิเคราะห์หาลำดับเบสดีเอ็นเอของโมเลกุลยาวเช่นจีนทั้งหมด แรกที่สุดต้องทำให้โมเลกุลดีเอ็นเอแตกเป็นชิ้นเล็กๆ ซ้อนกัน และวิเคราะห์หาลำดับเบสของแต่ละชิ้นส่วนจากการใช้ชิ้นส่วนที่ซ้อนกันเป็นแนวทางสามารถอนุมานลำดับเบสของโมเลกุลทั้งหมดได้ ความต้องการของโครงการที่จะหาลำดับเบสของจีโนมทั้งหมดนำไปสู่การพัฒนาระบบการหาลำดับเบสดีเอ็นเอแบบอัตโนมัติ ระบบดังกล่าวนี้ยังคงใช้วิธีการไดดีออกซี แต่ทำเครื่องหมายไพรเมอร์ด้วยสีย้อมฟลูโอเรสเซนต์ เพื่อตรวจสอบแบนด์นั้นได้ง่าย ผลผลิตถูกแยกออกโดยอิเล็กโตรโฟรีสิสอัตโนมัติและตรวจสอบแบนด์โดยฟลูโอเรสเซนต์ที่แตกต่างกัน ทำให้ปฏิกิริยาทั้งสี่ปฏิกิริยาสามารถดำเนินการไปได้บนเลนเดียวกันผลที่ได้ถูกวิเคราะห์โดยคอมพิวเตอร์และพิมพ์ลำดับเบสออกมาโดยใช้สีที่แตกต่างกันในแต่ละชนิดของเบส

5. เทคนิคทางอณูชีววิทยาเพื่อใช้ในงานทางนิติวิทยาศาสตร์

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอเพื่อใช้งานทางนิติวิทยาศาสตร์จำเป็นต้องใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาเมื่อปี ค.ศ.1985 DNA fingerprinting หรือ DNA typing เป็นที่รู้จักกันโดยนักวิทยาศาสตร์ชาวอังกฤษที่ชื่อ Alec Jeffreys ซึ่งค้นพบว่าดีเอ็นเอของมนุษย์มีส่วนที่เป็นจำนวนซ้ำที่มีความแตกต่างกันในแต่ละบุคคลจึงพัฒนาเทคนิคขึ้นมาเพื่อตรวจสอบความแตกต่างของดีเอ็นเอตำแหน่งที่เป็นจำนวนซ้ำเหล่านั้น โดยตำแหน่งที่ใช้ในการตรวจสอบในตำแหน่งที่มีลักษณะเบสซ้ำต่อเนื่อง variable number of tandem repeat หรือ VNTR คือเทคนิค RFLP (Bilter, 2005)

5.1 เทคนิค RFLP(restriction fragment length polymorphism)

เทคนิค RFLP ทำโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction endonuclease) ตัดดีเอ็นเอออกเป็นท่อนๆ สั้นยาวจำนวนมากตามแต่ละบุคคล จากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันมาแยกออกจากกันด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสและตรวจสอบด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบ(DNA probe) จะได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างในแต่ละบุคคล บริเวณที่นำมาใช้ตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ คือ ส่วน VNTR และต้องเลือกใช้ชนิดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมเพื่อไม่ให้เกิดการย่อยของลำดับนิวคลีโอไทด์แกนของ VNTRs ส่วนดีเอ็นตรวจสอบที่ใช้ขึ้นกับความต้องการ แบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ ดีเอ็นเอตรวจสอบที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาเพียง 1ตำแหน่ง เรียกว่า single-locus probe ซึ่งแต่ละตำแหน่งนั้นจะมีความหลากหลายของอัลลีลและแบบดีเอ็นเอตรวจสอบที่จำเพาะต่อตำแหน่งดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาหลายตำแหน่ง (multiloci probe) พร้อมกัน สำหรับข้อจำกัดของเทคนิค RFLF คือต้องใช้ดีเอ็นเอในปริมาณมากและเป็นดีเอ็นเอที่อยู่ในสภาพที่สมบูรณ์จึงให้ผลที่ถูกต้อง เมื่อมีเทคนิคอื่นที่ใช้ดีเอ็นเอน้อยกว่าวิธีนี้จึงเลิกใช้แล้วในปัจจุบัน(สุรางค์ และคณะ,2546)

5.2 เทคนิค PCR (polymerase chain reaction)

เทคนิคพีซีอาร์ หรือปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบวงจรซ้ำ หลายๆครั้งในหลอดทดลองและอาศัยการทำงานดีเอ็นเอพอลิเมอเรสที่ทนต่อความร้อนสูงเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการจำนวนมากเป็นล้านเท่า โดยใช้เวลาเพียง 2-3 ชั่วโมง ส่วนประกอบทั่วไปของการทำพีซีอาร์ ได้แก่ ดีเอ็นเอต้นแบบ ไพรเมอร์ เอนไซม์ ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสและสารต่างๆ ที่จำเป็นสำหรับปฏิกิริยา เช่น ดีออกซีนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟต(dNTPs)และแมกนีเซียมคลอไรด์เป็นต้น เทคนิคพีซีอาร์เป็นเทคนิคที่มีประโยชน์ในงานทางนิติวิทยาศาสตร์มากกว่าเทคนิค RFLP เนื่องจากสามารถวิเคราะห์วัตถุพยานที่อยู่อย่างจำกัด มีปริมาณน้อย อยู่ในสภาพไม่สมบูรณ์ และอาจมีดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตอื่นปนเปื้อนได้ (วิชัย และ คณะ,2547) เทคนิคพีซีอาร์สามารถใช้ศึกษากับดีเอ็นเอส่วนที่เป็นยีนและส่วนที่ไม่ใช่ยีน (nongene DNA) ได้ ซึ่งที่นำมาใช้ในงานทางนิติวิทยาศาสตร์ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันมีดังนี้

5.2.1 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอส่วนที่เป็นยีนด้วยวิธี Reverse Dot Blot

เป็นวิธีที่ใช้วิเคราะห์ความหลากหลายของดีเอ็นเอในส่วนที่เป็นยีนอาจวิเคราะห์เพียงตำแหน่งเดียว(single gene locus) ซึ่งใช้ยีนที่ตำแหน่ง HLA DQα พบได้ 7 อัลลีล ความหลากหลายของดีเอ็นเอที่ตำแหน่งนี้เกิดจากลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งหนึ่งๆ หรือมากกว่าเปลี่ยนไป การวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้จะใช้น้ำยาสำเร็จรูปที่ราคาค่อนข้างสูง เมื่อทำการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอแล้วนำไปทำ reverse dot blot hybridization โดยการนำ probe สายเดียวที่ใช้ตรวจสอบอัลลีลตรึงบนแผ่นไนล่อนเป็นจุดๆ ดีเอ็นเอตรวจสอบที่ได้จากการสังเคราะห์นี้จะมีนิวคลีโอไทด์ที่เฉพาะต่ออัลลีลเดียวเท่านั้น จากนั้นนำไป hybridize กับผลผลิตพีซีอาร์สายเดี่ยวดีเอ็นเอตรวจสอบจะจับกับดีเอ็นเอได้อย่างจำเพาะเจาะจงจะย้อมติดสีและอ่ายผลตามตำแหน่งสีที่ได้นั้น แต่การนำยีนตำแหน่งเดียวมาวิเคราะห์เพื่อพิสูจน์บุคคลในคดีอาญาพบว่ามีข้อจำกัดและมีความไม่ละเอียดพอจึงมีการวิเคราะห์ยีนหลายๆ ตำแหน่ง พร้อมกันในครั้งเดียวโดยใช้ชุดวิเคราะห์ที่เรียกว่า Polymarker ซึ่งใช้วิเคราะห์ยีนจำนวน 5 ตำแหน่ง จำนวน 12 อัลลีล สามารถนำไปเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอพร้อมกันในครั้งเดียวโดยใส่ไพรเมอร์ทั้งหมด 5 ชนิดลงในหลอดทดลอง เรียกวิธีนี้ว่า Multiple PCR เมื่อได้ PCR product แล้ว จึงนำไปวิเคราะห์อัลลีลและจีโนไทป์โดยทำ Reverse dot blot hybridization วิธีดังกล่าวจึงเป็นการเพิ่มความมั่นใจในการจำแนกบุคคล และความถูกต้องได้ มากขึ้นกว่าเดิม และได้มีการพัฒนาให้สามารถวิเคราะห์ยีนตำแหน่ง HLADQα กับ Polymarker ไปพร้อมกันเพื่อเพิ่มอำนาจการจำแนกให้สูงขึ้น ปัจจุบันยังไม่มีการใช้เทคนิคนี้ในงานตรวจพิสูจน์ทางนิติวิทยาศาสตร์เนื่องจากมีข้อจำกัดในด้านต้นทุนการตรวจพิสูจน์ ซึ่งค่อนข้างสูงและอำนาจการจำแนกพิสูจน์บุคคลยังมีค่าต่ำกว่าเทคนิค RFLP (สุรางค์ และคณะ,2546)

5.2.2 การวิเคราะห์ส่วนที่ไม่ใช่ยีน

การนำเทคนิคพีซีอาร์มาวิเคราะห์ส่วนที่ไม่ใช่ยีนของลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อการตรวจพิสูจน์บุคคล สามารถเลือกใช้ส่วนของดีเอ็นเอได้หลายบริเวณ ได้แก่

5.2.2.1 ส่วนของ minisatellite หรือ VNTRs ที่มีความยาวตั้งแต่ 500-10,000 คู่เบส เป็นช่วงการเรียงตัวของดีเอ็นเอที่มีการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์แกนซ้ำๆ ต่อกัน พบ VNTRs กระจายในเกือบทุกโครโมโซมซึ่งจะมีความหลากหลายแตกต่างกันของแต่ละบุคคลตามขนาดความยาวและจำนวนซ้ำของนิวคลีโอไทด์แกน และมีจำนวนนิวคลีโอไทด์แกนอยู่ในช่วง 15-35 คู่เบส ซึ่งเบสซ้ำ VNTR แบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ แบบที่การกระจายตัวเพียงตำแหน่งเดียวบนจีโนมหรือเรียกว่าเบสซ้ำแบบโลกัสตำแหน่งเดี่ยว (single locus) และแบบที่มีการกระจายตัวแบบหลายตำแหน่งบนจีโนมหรือเรียกว่าเบสซ้ำแบบโลกัสหลายตำแหน่ง(multilocus)VNTR ในงานทางนิติวิทยาศาสตร์นิยมใช้ตำแหน่ง D1S80 ในการศึกษาโดยใช้วิธีที่เรียกว่า Amplified fregment length polymorphism

(AmpFLP) อัลลีลของ D1S80 ประกอบด้วยแกนซ้ำจำนวนไม่เท่ากัน เมื่อเพิ่มขยายดีเอ็นเอบริเวณนี้โดยใช้ลำดับเบสด้านข้าง(Flanking region)ของหน่วยซ้ำเป็นไพร์เมอร์จะได้ดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันถ้าจำนวนซ้ำไม่เท่ากัน ดีเอ็นเอจะถูกแยกขนาดตามความยาวต่างๆ ของอัลลีลด้วย sequencing polyacrylamide gel electrophoresis เมื่อย้อมด้วย silver nitrate จะเห็นแถบอัลลีลความยาวแตกต่างกันไปแล้วนำไปเทียบกับ DNA ladder จะทราบจำนวนที่แน่นอนของตัวอย่างที่ศึกษา ขนาดของส่วนแกนซ้ำประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ 16 คู่เบส จำนวนซ้ำอยู่ระหว่าง 14-41 ครั้ง และขนาดความยาวของอัลลีลที่พบตั้งแต่ 350-1000 คู่ มีทั้งหมด 27 อัลลีล โดยวิธีนี้สามารถตรวจด้วยวิธี Manual และใช้เครื่องอัตโนมัติ โดยบางประเทศยังคงใช้การตรวจแบบนี้อยู่ การนำส่วนVNTRs มาใช้ในการตรวจพิสูจน์จำเป็นต้องใช้หลายตำแหน่งเพื่อความละเอียดในการจำแนก การวิเคราะห์ดีเอ็นเอส่วน VNTRs ที่มีขนาดคู่เบสค่อนข้างยาวให้มีความถูกต้องแม่นยำ ต้องใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอที่อยู่ในสภาพสมบูรณ์ จึงมีความยุ่งยากและประสบปัญหาในการนำเทคนิคนี้มาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในทางนิติวิทยาศาสตร์(สุรางค์ และคณะ,2546 และ อรรถพล และคณะ, 2544)

5.2.2.2 ส่วนของ microsatellites หรือ Short tandem repeats (STRs)ที่ประกอบด้วยแกนซ้ำที่มีนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ 1-6 คู่เบส พบกระจายเป็นหย่อมๆ ทั่วทั้งจีโนม ทุกๆ ระยะ 6-10 กิโลเบส จะพบตำแหน่งที่มีเป็น STRs โดยประมาณว่าจะมี STRsในจีโนมมนุษย์มากกว่า 500,000 ตำแหน่ง และแบ่ง STRsได้เป็น 3 ประเภท ได้แก่ Sinmple STRs ซึ่งประกอบด้วยแกนซ้ำหน่วยเดียวเรียงตัวกันหลายๆซ้ำ Compound STRs เป็นลักษณะที่ตำแหน่งเดียวประกอบด้วยแกนซ้ำขนาดความยาวต่างๆ กันตั้งแต่ 1-2 STRs ละขนาดของนิวคลีโอไทด์แกนซ้ำเหล่านั้นต่างกัน เมื่อขนาดของนิวคลีโอไทด์ของ STRs มีขนาดสั้นๆ จึงง่ายต่อการพเมปริมาณไดเทคนิคพีซีอาร์แม้กับตัวอย่างที่มีย่อยสลาย(degrade) ดังนั้นจึงใช้วิเคราะห์วัตถุพยานทางนิติวิทยาศาสตร์ได้เป็นอย่างดี แต่เนื่องจากคามหลากหลายของอัลลีลของ STRs เพียงตำแหน่งเดียวไม่สามรถจำแนกบุคคลได้ละเอียดเพียงพอ จึงนิยมวิเคราะห์ STRs หลายๆ ตำแหน่ง

5.3 การตรวจ Mitochondrial DNA

เป็นการตรวจดีเอ็นเอที่พบในไมโตคอนเดรีย ซึ่งใน 1 เซลล์สามารถพบได้มากกว่า 1 อันทำให้มีจำนวนดีเอ็นเอต่อเซลล์สูง(high copy number) จึงเป็นเครื่องมือที่ช่วยในการสืบสวนทางนิติวิทยาศาสตร์ได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ ไมโตคอนเดรียยังทนต่อการย่อยสลายได้มากกว่า nuclear DNA สามารถทำการวิเคราะห์ได้แม้กับวัตถุพยานที่มีการเสื่อมสภาพหรือเก็บไว้นานเช่น ฟัน เส้นผม(shed hair) กระดูก และอุจจาระ เป็นต้น รวมทั้งเหมาะสมกับวัตถุพยานที่ถูกทำลายจนไม่สามารถตรวจวิเคราะห์นิวเคลียร์ดีเอ็นเอ(nuclear DNA) ได้ บริเวณที่นำมาใช้วิเคราะห์เพื่อพิสูจน์

บุคคล คือ บริเวณ D-loop(Displacement loop) หรือ control region ที่มีความหลากหลายสูง โดยทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง HV1 (Hypervariable Region 1) และ HV2 (Hypervariable Region 2) แล้วนำมาทำลำดับเบสของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณนั้นได้โดยใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์อตโนมัติ เช่นเดียวกับ STR โดยเปรียบเทียบระหว่างลำดับเบสของดีเอ็นเอของผู้ต้องสงสัยกับดีเอ็นเอจากวัตถุพยาน นอกจากนี้นิยมใช้เพื่อหาความสัมพันธ์ทางสายเลือดฝ่ายมารดา หรือความเป็นพี่น้องที่มีแม่เดียวกัน เนื่องจากไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ จะได้รับถ่ายทอดจากแม่เท่านั้น

5.4 การตรวจ Y-Chromosome

เป็นการศึกษาลักษณะบนโครโมโซม Y ซึ่งจะถ่ายทอดจากพ่อสู่ลูกเท่านั้น และไม่ปรากฏในเพศหญิง ดังนั้นสายเลือดทางฝ่ายบิดาที่เป็นเพศชายจะมีลักษณะบนโครโมโซม Y เหมือนกัน สามารถนำลักษณะบนโครโมโซมY มาใช้ประโยชน์หลายด้าน ได้แก่ ด้านนิติวิทยาศาสตร์ ในคดีข่มขื่นกระทำชำเราจะทำการswab จากช่องคลอดของเหยื่อไปตรวจ ส่วนใหญ่จะประกอบด้วยเซลล์ของหญิงผู้เป็นเหยื่อในปริมาณมากและ sperm cell ในปริมาณน้อยกว่า ในกระบวนการเพิ่มดีเอ็นเอจะทำการเพิ่มดีเอ็นเอบนโครโมโซม Y ส่วนโครโมโซม X จะไม่ถูกเพิ่มปริมาณไปด้วยจึงไม่เกิดการรบกวน โดยวิธีนี้ยังเป็นการหลีกเลี่ยงขั้นตอนการสกัดแยก sperm และ epithelial cell ซึ่งมีความยุ่งยากอีกด้วย การทดสอบความเป็นพ่อ(paternity Testing) ในกรณีที่เป็นเด็กผู้ชายและไม่มีมารดา การค้นหาคนสูญหาย ศึกษาการอพยพย้ายถิ่นฐาน วิวัฒนาการของมนุษย์ การค้นหาบรรพบุรุษและประวัติศาสตร์ของบุคคลต่างๆ เป็นต้น

ข้อจำกัดของการใช่โครโมโซม Y ในการตรวจพิสูจน์บุคคล คือ ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง พี่ชาย น้องชาย หรือเพศชายที่มีสายพันธุ์เดียวกันได้ ลักษณะบนโครโมโซม Y ที่นำมาใช้ในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์เพื่อการพิสูจน์บุคคล ได้แก่

5.4.1 Y-STR เป็นการศึกษาลักษณะเฉพาะบริเวณที่เป็น short tandem repeat บนโครโมโซม Y ซึ่งเคยมีการศึกษาโดยใช่ส่วนของ Y-STR และ Y-SNP ของไทยเปรียบเทียบกับของชาวเยอรมันและชาวจีน โดยใช้ส่วนของ Y-STR ในตำแหน่ง DYS19 DYS389/II DYS390 DYS 391 DYS393 และ DYS385และส่วนของ Y-SNPในตำแหน่ง SRY-8299 Tat SRY-2627 92R7 SRY1532 M9 M13 M17/M19 และ M20 พบว่า Y-STR มีความถี่ของยีนแตกต่างกันไปในแต่ละกลุ่มประชากร และในส่วนของ Y-SNP พบว่า 11 diallelic SNP มีเพียง 6 ตำแหน่งเท่านั้นที่มีความหลากหลายในทั้ง 3 กลุ่มประชากร(Bender และคณะ ,2003)

5.4.2 Y-SNPs Single Nucleotide Polymophisms หรือ SNPs เป็นความแตกต่างของลำดับดีเอ็นเอซึ่งเกิดขึ้นเมื่อเบส 1 ตัว (A T C หรือ G) ในสายดีเอ็นเอมีการเปลี่ยนแปลงโดย SNPs จะเกิดขึ้นทุกๆ 100-300 bp บนจีโนมของมนุษย์ SNPs ไม่เปลี่ยนแปลงจากรุ่นหนึ่งสู่รุ่นหนึ่ง

ทำให้ง่ายต่อการศึกษาลักษณะประชากร และในจีโนมของมนุษย์ยังมีมากกว่า 7 ล้าน SNPs ดังนั้น Y-SNPs จึงมีประโยชน์กับงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ เนื่องจากมีอัตราการกลายพันธุ์ต่ำกว่า Y-STR และเป็น biallelic polymorphism รวมทั้งมีการเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอที่มีขนาดสั้นเป็น single base mutation ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะทำให้ได้ผลดีแม้ว่าดีเอ็นเอที่นำมาตรวจสอบจะเสื่อมสภาพมาก (high-degraded DNA)และใช้การตรวจสอบดีเอ็นเอในส่วนของ microsatellites ไม่ได้ผล นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถตรวจ Y-SNPs ได้จากศพที่มีสภาพเน่าเปื่อย (decomposed bodies)ซากศพ (human remains) เหยื่อที่เสียชีวิตจากภัยพิบัติต่างๆ และเหยื่อจากอุบัติเหตุทางอากาศและทางน้ำ เป็นต้น แต่ไม่เป็นที่นิยมเนื่องจากการตรวจด้วยวิธีนี้จะมีค่าใช้จ่ายสูงมาก

5.5 การใช้ Low Copy Number DNA

ในการตรวจสอบดีเอ็นเอที่มีปริมาณน้อยมาก อาจมีเพียว 2-3 เซลล์ หรือเรียกว่า Low Copy Number มีประโยชน์กับงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ เพราะวัตถุพยานที่นำมาตรวจพิสูจน์ไม่สามารถใช้เทคนิคการวิเคราะห์ดีเอ็นเออื่นๆ ได้ผลเนื่องจากมีปริมาณน้อยและไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า ตัวอย่างเช่น การสัมผัสของคนร้ายที่ด้ามอาวุธ เสื้อผ้า ผิวหนัง เหงื่อ เป็นต้น โดยนำตัวอย่างที่คาดว่าจะมีดีเอ็นเอของคนร้ายนั้นไปสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอซึ่งใช้จำนวนรอบของพีซีอาร์มากขึ้น จากข้อมูลการศึกษามีการเพิ่มจำนวนรอบจนถึง 34 รอบ แต่ทั้งนี้ผลที่ได้จะสมบูรณ์เพียงใดย่อมขึ้นอยู่กับลักษณะตัวอย่างที่เก็บได้ของแต่ละบุคคลด้วย นอกจากนี้การนำผลการตรวจพิสูจน์ด้วย Low Copy Number ไปใช้ในการตรวจพิสูจน์บุคคลยังต้องให้ความสำคัญกับแหล่งที่มาของพยานหลักฐานนั้นว่ามีข้อเท็จจริงอย่างไรอีกด้วย เพื่อนำพยานหลักฐานนั้นไปใช้ประโยชน์อย่างเต็มที่

5.6 เทคนิค Real Time PCR

ปัจจุบันเทคนิคการเพิ่มขยายดีเอ็นเอมีความก้าวหน้ามากขึ้นทำให้สามารถตรวจนับปริมาณผลผลิตของพีซีอาร์ได้ในแต่ละรอบไปพร้อมกับการเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอในระยะเวลาสั้นและได้ปริมาณมากโดยไม่จำเป็นต้องสกัดดีเอ็นเอก่อน จึงมีประโยชน์หากนำเทคนิค Real Time PCR มาใช้กับงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ในอนาคตเพราะการตรวจหาดีเอ็นเอจากพยานหลักฐานทางชีววิทยาจากจำนวนหลายสิบชิ้นในหนึ่งคดีหรือจำนวนหนึ่งชิ้นแต่มีเป็นร้อยคดี โดยไม่อาจทราบได้ว่าวัตถุพยานที่ได้นำมาตรวจดีเอ็นเออยู่จริงหรือไม่จนกว่าจะเสร็จสิ้น การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องอัตโนมัติ เป็นกระบวนการที่ล่าช้า คาดหวังผลไม่ได้ อีกทั้งเป็นการสิ้นเปลืองงบประมาณการตรวจพิสูจน์เป็นจำนวนมากอีกด้วย

6. ประโยชน์และการประยุกต์ใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

6.1 การพิสูจน์หลักฐานทางนิติวิทยาศาสตร์

การสืบสวนสอบสวนในคดีอาญานอกจากจะใช้วิธีหาผู้กระทำผิดมาลงโทษโดยสืบหาพยานหลักฐานหรือพยานบุคคลแล้วหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ได้มีส่วนช่วยในการวินิจฉัยหรือตัดสินในคดีที่เกิดขึ้นได้เป็นอย่างมาก โดยหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่พบส่วนมากเป็นคราบเลือด คราบอสุจิ เส้นผม เส้นขน ก้นบุหรี่ที่ได้จากเสื้อผ้าของผู้เสียหาย หรือผู้ต้องสงสัย รวมถึงหลักฐานที่พบได้ในที่เกิดเหตุซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ทั้งสิ้น และเทคโนโลยีที่สามารถช่วยให้ผลการตรวจพิสูจน์หลักฐานดังกล่าวมีถูกต้องแม่นยำมากที่สุดในขณะนี้ก็คือเทคโนโลยีลายพิมพ์ดีเอ็นเอมีตัวอย่างที่นำลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาใช้ประโยชน์ในการคลี่คลายคดี ได้แก่

6.1.1 คดีฆาตรกรรม น.ส.เจนจิรา พลอยองุ่นศรี ปี 2541

น.ส.เจนจิรา พลอยองุ่นศรี เป็นนักศึกษาแพทย์ชั้นปีที่ 5 คณะแพทย์ศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี ในวันที่ 28 ม.ค. 2541 พ่อของน.ส.เจนจิราได้รับแจ้งว่าบุตรสาวได้หายไปจากบ้านพักพร้อมรถยนต์ของตน ซึ่งได้สอบถามไปยังเพื่อนๆ ของน.ส.เจนจิราหลายคนแต่ไม่มีผู้ใดทราบเรื่องการหายตัวไปแต่อย่างใด แต่บุคคลที่ครอบครัวของน.ส.เจนจิราสงสัยมากที่สุดคือนายเสริม สาครราษฎร์ ผู้ที่มาหลงรักน.ส.เจนจิรา จึงได้แจ้งความและได้เชิญตัวนายเสริมมาเพื่อทำการสอบสวน พบว่าทำตัวมีพิรุธ แต่ไม่มีหลักฐานเกี่ยวกับหารหายตัวไปของน.ส.เจนจิรา ตำรวจจึงทำการค้นหาพยานหลักฐานต่างๆ ที่สำคัญเพื่อนำมาประกอบในการพิจารณาคดี จึงไปหาพยานหลักฐาน พบรถยนต์ของผู้ตายจริงและพบคราบเลือดที่กระโปรงท้ายรถซึ่งได้นำไปตรวจหาดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับบิดามารดาของผู้ตาย ผลปรากฏว่าเป็นคราบเลือดของน.ส.เจนจิรา และหลังจากนั้นเจ้าหน้าที่จึงทำการทุบบ่อเกรอะของ พี.เอส.เฮาส์ที่พักของนายเสริมพบเศษชิ้นเนื้อและเส้นผมที่ติดกับเศษหนังศรีษะจำนวนหนึ่งจึงนำส่งเจ้าหน้าที่เพื่อตรวจดีเอ็นเอ ผลการตรวจพิสูจน์เปรียบเทียบดีเอ็นเอปรากฏว่าชิ้นเนื้อทั้งหมดเป็นของน.ส.เจนจิรา รวมถึงวัตถุพยานอื่นๆ ที่เมื่อนำมาตรวจดีเอ็นเอแล้วตรงกับดีเอ็นเอของผู้ตาย ได้แก่ คราบเลือดที่อยู่ในห้องน้ำ โถส้วม ที่ปั้มยางชักโครกเวลาตัน บริเวณพื้นซีเมนต์ข้างปั้มสังกะสีที่ผู้ต้องหาใช้ทำลายหลักฐาน สำหรับวัตถุพยานอีกสิ่งหนึ่งที่สำคัญที่ทำให้ทราบว่าน.ส.เจนจิราได้เสียชีวิตแล้วคือ กะโหลกศรีษะที่พบว่าลอยติดค้างอยู่บริเวณตอม่อของเขื่อนกั้นดินริมแม่น้ำบางปะกงซึ่งเชื่อว่าถูกนำมาทิ้งและนำมาตรวจดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับพ่อและแม่ของน.ส.เจนจิรา

คดีฆาตรกรรมนี้แม้ว่าจะไม่มีประจักษ์พยานเห็นเหตุการณ์ขณะเกิดเหตุแต่มีวัตถุพยานรวมทั้งผลการตรวจพิสูจน์ทางนิติวิทยาศาสตร์ทำให้เชื่อมโยงและรับฟังได้ว่าผู้ต้องหานี้

ได้กระทำความผิดตามข้อกล่าวหาจริงอีกทั้งพยานหลักฐานจากการตรวจทางนิติวิทยาศาสตร์เป็นส่วนสำคัญที่ศาลใช้ดุลยพินิจในการพิจารณาว่าผู้ต้องหาได้กระทำความผิดจริง

6.1.2 คดีโอ เจ ซิมป์สัน ฆาตกรรมภรรยาและเพื่อน

เดือนมิถุนายน ปี 1994 นายโอ เจ ซิมป์สัน อดีตนักกีฬาอเมริกันฟุตบอลที่มีชื่อเสียง ต้องกลายเป็นผู้ต้องหาในคดีฆาตกรรมนางนิโคล ซิมป์สัน ภรรยาตนเองและนายโรนัลด์ โกลด์แมน เพื่อนชายของเธอ เหตุเกิดที่บ้านของนางนิโคล ซิมป์สัน สภาพศพนางนิโคลพบว่าถูกแทงและปาดคอ ส่วนนายโรนัลด์ถูกแทงเสียชีวิตเช่นเดียวกัน จากการสอบสวนไม่พบพยานบุคคลและพบคราบเลือดที่มีอยู่ทุกที่ ตำรวจจึงนำเลือดในบริเวณที่เกิดเหตุไปตรวจพิสูจน์ด้วยดีเอ็นเอและพบว่าเป็นเลือดของนายโอ เจ ซิมป์สัน และกล่าวหาว่ารอยแผลที่นิ้วของซิมป์สันเกิดขึ้นขณะที่เขาก่อเหตุ นอกจากนี้ยังพบรอยเลือดที่ประตูด้านหลัง ทางเดินด้านข้าง ที่บ้านของซิมป์สัน พบถุงมือที่เปื้อนเลือด รอยเลือดที่บริเวณห้องน้ำและรอยเลือดหยดที่ถุงเท้าข้างหนึ่งของซิมป์สัน จากนั้นตำรวจจึงทำการแจ้งข้อหาเพื่อทำการจับกุมนายซิมป์สัน แต่ทนายความฝ่ายนายซิมป์สันได้ต่อสู้คดีโดยอ้างประเด็นการเก็บและรักษาวัตถุพยานเพื่อนำสู่กระบวนการตรวจพิสูจน์ ว่าเจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติหน้าที่เก็บวัตถุพยานไม่สวมชุดเพื่อป้องกันการปนเปื้อนเมื่อเข้าเก็บพยานหลักฐานในที่เกิดเหตุ รูปถ่ายในที่เกิดเหตุแสดงให้เห็นว่ามีการเหยียบย่ำของเจ้าหน้าที่บนพยานวัตถุรวมถึงคราบเลือดด้วย และข้อต่อสู้ของทีมทนายสรุปว่ามีความเป็นไปได้ที่ในขณะที่เจ้าหน้าที่ส่งของกลางไปห้องทดลองอาจทำให้ตัวอย่างเลือดของนายซิมป์สันกระเด็นติดไปกับถุงมือ เพราะไม่มีการเปลี่ยนถุงมือเมื่อมีการเก็บวัตถุพยานต่างชิ้นกันในที่เกิดเหตุนั้น ไม่ว่าเหตุผลดังกล่าวจะถูกต้องหรือไม่ แต่ข้อโต้แย้งดังกล่าวทำให้เกิดข้อสงสัยในการตรวจดีเอ็นเอ ประกอบกับอ้างว่าตำรวจได้ทำการค้นบ้านของซิมป์สัน โดยไม่มีหมายค้นหรือได้รับการอนุญาตจากเจ้าของบ้าน

คณะลูกขุนรับฟังข้อพิสูจน์และเรื่องหลักฐานของดีเอ็นเอในที่สุดศาลฎีกาแห่งรัฐแคลิฟอเนียร์ ได้ตัดสินให้ซิมป์สันพ้นโทษ หลังจากพิจารณาคดีอย่างรอบคอบ ทีมทนายของซิมป์สันทำสำเร็จโดยไม่ได้โจมตีวิธีการตรวจดีเอ็นเอ แต่โจมตีหลักฐานที่เกี่ยวข้อง ได้แก่การเก็บรักษาเลือดที่เป็นวัตถุพยาน การปนเปื้อนในห้องปฏิบัติการ และในประเด็นการตรวจค้นของเจ้าหน้าที่ตำรวจที่กระทำโดยไม่มีเหตุอันควร และขัดต่อหลักเกณฑ์ในบทบัญญัติรัฐธรรมนูญ หลังจากคดีของซิมป์สันในครั้งนี้ทำให้ตำรวจลอสแองเจลีสเพิ่มความระมัดระวังในวิธีการเก็บหลักฐานให้รอบคอบมากขึ้น (อรรถพล , 2544 รุ่งระวี, 2539 และ Spencer, 2004)

6.1.3 เหตุการณ์ตึกเวิล์ดเทรดเซ็นเตอร์ถล่ม

เมื่อเดือนกันยายน พ.ศ. 2544 ได้เกิดโศกนาฏกรรมครั้งยิ่งใหญ่ของสหรัฐอเมริกาเมื่อผู้ก่อการร้ายได้ใช้เครื่องบินพุ่งชนทำลายตึก World Trade Center ในนิวยอร์ก ทำ

ให้มีผู้บาดเจ็บและเสียชีวิตมากมาย ด้วยเหตุการณ์ครั้งนี้มีความจำเป็นในการใช้สืบสวนทางนิติวิทยาศาสตร์เข้าช่วยโดยเฉพาะทางด้านลายพิมพ์ดีเอ็นเอ สถิติผู้เสียชีวิตปลายปี 2545 เกือบ 3,000 คน และเมื่อนำซากปรักหักพังจำนวนหลายล้านตันออกพบศพผู้เสียชีวิตเพิ่มอีกหลายร้อยศพ รวมทั้งเศษกระดูก และชิ้นเนื้ออีกประมาณ 20,000 ชิ้น ซึ่งบางชิ้นมีขนาดเล็กมาก กระบวนการตรวจพิสูจน์ได้จากการนำร่างกายและชิ้นส่วนของร่างกายมาตรวจหาสารพันธุกรรมโดยเก็บรักษาศพไว้ในตู้แช่แข็งนอกจากนี้ยังใช้ผู้เชี่ยวชาญทางพยาธิวิทยา ผู้เชี่ยวชาญด้านลายนิ้วมือ และทันตแพทย์ร่วมด้วย มีศพเพียง 10 รายเท่านั้นที่สามารถระบุได้ด้วยตาเปล่า การตรวจพิสูจน์ทางด้านดีเอ็นเอถูกเก็บข้อมูลโดยห้องปฏิบัติการใน Utah, Texas, Maryland และ Virginia การนำดีเอ็นเอมาเปรียบเทียบทำโดยเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอจากของใช้ภายในบ้านของเหยื่อ เช่น ใบมีดโกน หวี แปรงสีฟัน มาเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอที่เก็บจากเยื่อบุข้างแก้มจากศพผู้เสียชีวิตรวมประมาณ 7,000 ราย

เริ่มต้นการรวบรวมข้อมูลทางดีเอ็นเอสำหรับเหตุการณ์ครั้งนี้ใช้การวิเคราะห์ Short Tandem Repeat จำนวน 13 ตำแหน่ง ซึ่งใช้วิเคราะห์จากชิ้นเนื้อและกระดูกจากซากศพได้เพียงครึ่งหนึ่งของซากศพที่พบ ส่วนที่เหลือไม่สามารถใช้ STR ในการวิเคราะห์ได้ เดือนกันยายน พ.ศ. 2545 อเมริกาสามารถพิสูจน์ซากศพและระบุเจ้าของได้ครึ่งหนึ่งของจำนวนซากศพที่พบทั้งหมด และซากศพส่วนที่ถูกทับด้วยซากปรักหักพังจนร่างกายเสียหายมา และไม่สามารถวิเคราะห์ดีเอ็นเอในส่วน STR ได้จึงนำวิธีอื่นที่สามารถตรวจดีเอ็นเอที่เสื่อมสภาพมาช่วย ได้แก่การวิเคราะห์โดยใช้ mitochondrial DNA และ SNPs จากกรณีดังกล่าวจะเห็นว่าการตรวจพิสูจน์ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอมีความสำคัญอย่างยิ่งในการคลี่คลายสถานการณ์ครั้งนี้ได้เป็นอย่างดีโดยเฉพาะกับชิ้นส่วนของผู้เสียชีวิตที่แหลกละเอียดไม่สามารถตรวจพิสูจน์ด้วยวิธีอื่นได้ (Spencer, 2004)

6.1.4 เหตุการณ์ภัยพิบัติจากคลื่นสึนามิถล่มภาคใต้

เมื่อวันอาทิตย์ที่ 26 ธันวาคม พ.ศ. 2547 ได้เกิดคลื่นสึนามิถล่มภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดกระบี่ ตรัง พังงา ภูเก็ต ระนอง และสตูล และขณะเกิดธรณีพิบัตินั้น ประชาชนและนักท่องเที่ยวที่อยู่ตามชายหาดเสียชีวิตและบาดเจ็บเป็นจำนวนมาก ไฟฟ้าดับทั่วทั้งจังหวัด เครือข่ายโทรศัพท์ทุกระบบไม่สามารถใช้การได้ประชาชนต้องอพยพไปอยู่ตามบริเวณที่เป็นเนินสูง หลังจากเหตุการณ์ครั้งนี้ สิ่งที่ต้องทำเป็นอันดับแรก คือ การค้นหาผู้รอดชีวิต ผู้บาดเจ็บ ผู้เสียชีวิต และดำเนินการตามขั้นตอนโดยกระทรวงสาธารณสุขได้ตั้งคณะทำงาน เพื่อดำเนินการประสานพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล ซึ่งมีแผนการในการตรวจดีเอ็นเอจากศพ (Ante Mortem)และการตรวจดีเอ็นเอจากญาติ (Post mortem DNA) ให้เป็นไปในระบบเดียวกันทั้งหมด การพิสูจน์ยืนยันบุคคลผู้เสียชีวิตเป็นการปฏิบัติงานและความร่วมมือกันของกระทรวงยุติธรรม กระทรวงการ

ต่างประเทศ กระทรวงสาธารณสุข กระทรวงมหาดไทย กระทรวงเทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร และสำนักงานตำรวจแห่งชาติในนาม ศูนย์อำนวยการพิสูจน์ยืนยันบุคคลที่เสียชีวิตจากภัยคลื่นสึนามิ (Thai Tsunami Victims Identification : TTVI) ภายใต้มาตรฐานเดียวกันที่เป็นมาตรฐานสากลจากการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลพบว่าจำนวนศพที่พิสูจน์ได้จากฟัน ลายพิมพ์นิ้วมือ ดีเอ็นเอ และรูปพรรณ มีปริมาณลดลงตามลำดับ แต่จะพบว่าในการดำเนินงานเริ่มแรกหลายหน่วยงานให้ความสำคัญกับการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลโดยใช้ดีเอ็นเอเป็นอย่างมากเนื่องจากปัจจุบันดีเอ็นเอเป็นที่สนใจและเป็นที่รู้จักกว้างขวางในประชาชนทั่วไป การยืนยันศพผู้เสียชีวิตด้วยการตรวจดีเอ็นเอ เริ่มแรกจะต้องมีการจำแนกศพด้วยการจดบันทึกวัน เวลา สถานที่พบศพ จัดทำเลขรหัสของศพแต่ละราย บันทึกรายละเอียดของศพโดยละเอียดถ่ายภาพศพในกรณีศพไม่เน่าใช้ไม้พันสำลีแห้งเช็ดที่กระพุ้งแก้มด้านใน โดยหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนเศษสิ่งสกปรกและวัสดุอื่นๆ ติดรหัสศพตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนแห้งสนิทเก็บใส่ซองกระดาษสีขาว เขียนรหัสศพหน้าซอง ในกรณีศพเน่าให้ดึงเส้นผม 15 เส้น เก็บใส่ซองและตัดชิ้นกล้ามเนื้อบริเวณต้นแขนหรือบริเวณอื่นที่ใกล้กระดูกขนาดประมาณ 1 ซม. เก็บใส่ตู้เย็นช่องแข็ง หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส หรือใส่ลังโฟมบรรจุน้ำแข็งไม่มีน้ำ เพื่อทำการส่งตรวจดีเอ็นเอต่อไป ส่วนญาติของผู้เสียหายชาวไทยขอรับการตรวจดีเอ็นเอจากโรงพยาบาลได้ทุกจังหวัด และกรณีผู้สูญหายชาวต่างชาติให้ญาติใกล้ชิดจัดส่งผลการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอผ่านกระทรวงต่างประเทศได้ การเปรียบเทียบเพื่อยืนยันเอกลักษณ์บุคคลโดยนำข้อมูลจากดีเอ็นที่ได้จากการชันสูตรมาเปรียบเทียบกับข้อมูลดีเอ็นเอที่ได้จากญาตินี้มีความแตกต่างจากคดีที่เกิดขึ้นโดยทั่วไป เช่น ในคดีฆาตกรรมหรือคดีข่มขืนกระทำชำเรา ซึ่งมักทำการเปรียบเทียบในลักษณะ 1 ต่อ 1 แต่ในกรณีเหตุการณ์ซึนามินี้ตัวอย่างที่ทำการเปรียบเทียบมีเป็นพันตัวอย่าง ดังนั้นต้องมีระบบฐานข้อมูลกลางที่ได้รับความเชื่อถือ และเปรียบเทียบข้อมูลโดยใช้ค่าสถิติช่วยในการคำนวณโอกาสความเป็นไปได้ต่างๆ ตามที่มาตรฐานยอมรับ ซึ่งถือเป็นขั้นสุดท้ายสามารถจำหน่ายศพให้กับญาติผู้เสียชีวิตเพื่อนำไปประกอบพิธีกรรมทางศาสนาได้อย่างถูกต้องแม่นยำที่สุด (กรมศิลปากร, 2548)

6.2 การพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือด

ในปัจจุบันการตรวจหาความสัมพันธุ์ระหว่างพ่อ แม่ ลูก เป็นที่สนใจและต้องการมากขึ้นในสังคม เพื่อนำไปใช้เป็นหลักฐานสำคัญสำหรับประกอบการพิจารณาทางกฎหมายในศาล เช่น กรณีการฟ้องร้องเรียกค่าเลี้ยงดูบุตรเมื่อสตรีถูกทอดทิ้ง หรือการตรวจเพื่อรับรองความเป็นบุตรเมื่อมีการอพยพย้ายถิ่น หรอกรณีที่สงสัยว่าไม่ใช่บุตรของตัวเอง เช่น อาจเกิดการสลับกันในโรงพยาบาล หรือเด็กเกิดในประเทศไทยไม่ได้แจ้งเกิดตั้งแต่ต้น นอกจากนี้กรณีการรับมรดกบางครั้งมีการร้องเรียนให้มีการตรวจดีเอ็นเอเพื่อยืนยัน เป็นต้น

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอสามารถนำมาประยุกต์ใช้แก้ปัญหาทางสังคม เพื่อการพิสูจน์หาความสัมพันธ์ทางสายเลือด โดยบางตัวอย่างในสังคมไทยเป็นที่สนใจของสื่อมวลชนและประชาชนทั่วไป เช่น การตรวจสอบหาความเป็นพ่อ ดังในคดีของนักร้องลูกทุ่งชื่อดังได้มีความสัมพันธ์กับผู้หญิงที่ทำงานอยู่ด้วยกัน หลังจากนั้นหญิงดังกล่าวได้ให้กำเนิดลูกสาว ซึ่งทำให้นักร้องผู้นี้ถูกกล่าวหาว่าเป็นพ่อของเด็กและต้องให้ความรับผิดชอบต่อเด็ก ในขั้นต้นนักร้องลูกทุ่งได้ให้การปฏิเสธความสัมพันธ์กับหญิงสาว และปฏิเสธความเป็นพ่อ ต่อมาเมื่อมีสื่อมวลชนกลุ่มต่างๆ ให้คำแนะนำจึงทำการตรวจพิสูจน์ความเป็นพ่อโดยใช้เทคนิคลายพิมพ์ดีเอ็นเอ การพิสูจน์ครั้งนี้ใช้การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากมินิแวทเทลไลท์ 4 โลกัส คือ D1S80, D4S43, D17S30 และ APOB และไมโครแวทเทลไลท์ 6 โลกัส คือ CSF1PO, TPOX, TH01, F13A01, FESFPS และ VWF โดยแถว M เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder แถวที่ 1 คือพ่อ แถวที่ 2 คือแม่ และแถวที่ 3 คือลูก ผลปรากฏว่าแถบของดีเอ็นเอในแต่ละโลกัสตรงกับตำแหน่งแถบดีเอ็นเอของนักร้องหรือแม่ทั้ง 10 โลกัส ดังนั้น สามารถเชื่อได้ว่าเด็กมีความสัมพันธ์ทางสายเลือดกับพ่อจริงตามคำกล่าวอ้าง

7. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

งานวิจัยในประเทศไทยและต่างประเทศในด้านการตรวจวิเคราะห์ Y โครโมโซม เพื่อประยุกต์ใช้ในทางนิติวิทยาศาสตร์ มีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องดังนี้

เมธวี ศรีคำมูล (2543) ทำการวิเคราะห์โครโมโซม Y แฮโปลไทป์ในกะเหรี่ยงและม้งด้วยไมโครแซทแทลไลท์ โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากเม็ดเลือดขาวของชายชาวไทยเผ่ากะเหรี่ยง 21 คน และม้ง 29 คน แยกโปรตีนออกด้วยเกลือความเข้มข้นสูง ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยแอลกอฮอล์ และทำการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายซึ่งเป็น tetranucleotide repeat ที่ตำแหน่ง DYS19 DYS389 และ DYS393 ด้วยวิธี PCR นำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้เพิ่มปริมาณแล้วมาตรวจสอบหาขนาดอัลลีล ด้วยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis แล้วย้อมสีดีเอ็นเอด้วย silver ผลการศึกษาพบว่า ที่ตำแหน่ง DYS19 ในเผ่ากะเหรี่ยงมี 3 อัลลีล ในม้งมี 4 อัลลีล ที่ตำแหน่งDYS389ในเผ่ากะเหรี่ยงมี 4 อัลลีล ในม้งมี 2 อัลลีล ในตำแหน่งที่ DYS393 ในกระเหรี่ยงและม้งมีเท่ากัน 4 อัลลีล ส่วนแฮโปลไทป์ที่รวบรวมได้มี 11 แบบในชาวไทยภูเขาทั้งสองเผ่า แต่มีความถี่และรูปแบบต่างกัน ความถี่อัลลีลของไมโครแซทแทลไลท์ทั้งสามตำแหน่งและแฮโปลไทป์แสดงความแตกต่างระหว่างสองประชากรอย่างมีนัยสำคัญ ระยะห่างทางพันธุกรรมคำนวณจากแฮโปลไทป์ มีค่า 1.7967 แสดงว่าประชากรชาวไทยภูเขาที่ศึกษามีแบบแผนโครงสร้างทางพันธุกรรมที่ต่างกัน ซึ่งส่วนหนึ่งได้รับอิทธิพลจากวัฒนธรรมประเพณีที่ยึดถือสืบทอดกันมาอย่างเคร่งครัด และทั้งสองเผ่ายังมีต้นตอที่มาของบรรพบุรุษเป็นคนละกลุ่มกัน

สิริสุดา สุทธิสารากร(2544)ทำการวิเคราะห์โครโมโซม Y แฮโปลไทป์ในเย้าและลาฮู ด้วยไมโครแซทแทลไลท์ โดยทำการศึกษาไมโครแซทแทลไลท์ที่ตำแหน่งDYS 19 DYS 385 DYS 389 และ DYS 393 ในชาวไทยเผ่าเย้าและลาฮู วิธีการคือทำการสกัดดีเอ็นเอจากเม็ดเลือดขาวของชายชาวไทยภูเขา ที่ไม่เกี่ยวข้องเป็นเครือญาติกันทั้ง 2 เผ่า เผ่าละ 15 คน โดยวิธีออร์แกนิก แยกโปรตีนออกด้วยเกลือความเข้มข้นสูง แล้วจึงเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณไมโครแซทแทลไลท์ 4 ตำแหน่งดังกล่าวด้วยวิธี PCR นำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้เพิ่มปริมาณแล้วมาตรวจสอบหาขนาดอัลลีลด้วยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis แล้วย้อมสีดีเอ็นเอด้วย silver บันทึกการกระจายของอัลลีลด้วยความถี่อัลลีลและแฮโปลไทป์ ความหลากหลายและระยะห่างทางพันธุกรรมทั้งสอง ได้ผลการศึกษาดังนี้ ที่ตำแหน่ง DYS19 ในเย้าและลาฮูพบเหมือนกัน 4 ตำแหน่ง ที่ตำแหน่งDYS385 ซึ่งเป็น duplicated allele ในเย้าพบ 14 อัลลีล ลาฮูพบ 11 อัลลีล ที่ตำแหน่งDYS389 ในเย้าพบ 4 อัลลีล ลาฮูพบ 3 อัลลีล ส่วนแฮโปลไทป์จากทั้ง4 ตำแหน่งพบสิ้น 28 แบบ โดยมี 14 แบบในแต่ละเผ่า ความถี่ของไมโครแซทแทลไลท์อัลลีลเฉลี่ยทั้ง 4 ตำแหน่งและแฮโปลไทป์ แตกต่างกันโดยไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อคำนวณระยะห่างทางพันธุกรรมจากแฮโปลไทป์ได้ค่าเป็นอนันต์ และไม่พบแฮโปลไทป์ร่วมกันเลยระหว่างประชากรทั้งสอง

ต่อมา เมธวี ศรีคำมูล (2549) ทำการศึกษาความผันแปรของโครโมโซม X, Y และ ดีเอ็นเอไมโทคอนเดรียของชาวกะเหรี่ยง ม้ง และอิวเมี่ยนในภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย โดยสกัดจากเซลล์เม็ดเลือดขาวของอาสาสมัครที่ไม่เป็นญาติกันด้วยวิธีอินออร์แกนิกแยกโปรตีนออกด้วยเกลือเข้มข้นสูง แล้ววิเคราะห์จีโนไทป์ของไมโครแซเทลไลท์ 14 ตำแหน่งในโครโมโซม X คือ DXS1001, DXS1060, DXS1068, DXS1073, DXS1106, DXS1214, DXS1227, DXS8043, DXS8051, DXS8091, DXS987, DXS990, DXS991 และ DXS993 ในอาสาสมัครเพศชายและเพศหญิง ชาวกะเหรี่ยง ม้ง และอิวเมี่ยน จำนวน 79 และ 75, 90 และ 46, 53 และ22 คนตามลำดับ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ที่ติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ ไพรเมอร์ทั้ง 14 ตำแหน่ง คือ ABI's PRISM Mapping Sets v2.5 panel 28บริษัท Applied Biosystems และวิเคราะห์จีโนไทป์ของไมโครแซเทลไลท์ 15 ตำแหน่งในโครโมโซม Yคือ DYS19, DYS388, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS426,DYS436, DYS437, DYS439, Y-GATA-A7.1, Y-GATA-A7.2 และ Y-GATA-A10 ในชายชาวกะเหรี่ยง 83 คน ชาวม้ง 90 คน และชาวอิวเมี่ยน 52 คน โดยทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลี-เมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ที่ติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์เช่นกัน แล้วตรวจสอบขนาดของผลผลิตที่ได้ด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับเบสอัตโนมัติรุ่น ABI 377 ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ GENESCANTM และ GENOTYPERTM บริษัท Applied Biosystemsนอกจากนี้ ยังวิเคราะห์ลำดับ

เบสของดีเอ็นเอไมโทคอนเดรียบริเวณ hypervariable segment I ใน control region จากชาวกะเหรี่ยง 63 คน ม้ง 50 คน และอิวเมี่ยน 44 คน ทั้งสองเพศ โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสด้วยไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจง ติดฉลากผลผลิตที่ได้ด้วย BigDyeTM V3.0 terminator ready sequencing kit บริษัท Applied Biosystems แล้วนำไปหาลำดับเบสด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับเบสอัตโนมัติรุ่น ABI 377 โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์SEQUENCHER บริษัท Genecode

ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่า ความผันแปรทางพันธุกรรมของประชากรส่วนใหญ่เกิดจากความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในกลุ่มย่อยหรือของแต่ละบุคคล การอพยพโยกย้ายถิ่นฐานหลังแต่งงานมีผลต่อโครงสร้างพันธุกรรมของชาวเขาที่ศึกษา โดยความหลากหลายของโครโมโซม Y ในชาวกะเหรี่ยงมีมากกว่าของชาวม้ง ในขณะที่ความหลากหลายของดีเอ็นเอไมโทคอนเดรียของชาวกะเหรี่ยงจะมีน้อยกว่าของชาวม้ง อิวเมี่ยนจะมีความหลากหลายของทั้งโครโมโซม Y และดีเอ็นเอไมโทคอนเดรียสูง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการรับบุตรบุญธรรม สำหรับอัตราการอพยพที่คำนวณจากความผันแปรของโครโมโซม Y และดีเอ็นเอไมโทคอนเดรียในประชากรที่มี การโยกย้ายหลังแต่งงานต่างกันแสดงให้เห็นว่าประชากรที่เพศชายย้ายเข้าสู่ครอบครัวฝ่ายหญิงมีอัตราการเคลื่อนย้ายของโครโมโซม Yมากกว่าไมโทคอนเดรีย ในขณะที่ไมโทคอนเดรียจะมีอัตราการเคลื่อนย้ายมากกว่าในประชากรที่เพศหญิงย้ายเข้าสู่ครอบครัวฝ่ายชายชาวเขาทั้ง 3 เผ่าที่ศึกษาแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ 9 กลุ่ม ได้แก่ กะเหรี่ยงคะยา กะเหรี่ยงโปกะเหรี่ยงสะกอ กะเหรี่ยงตองสู ม้งดำ ม้งขาว และอิวเมี่ยนจากจังหวัดเชียงราย น่าน และพะเยา ผลการวิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรมจากความผันแปรของโครโมโซม X และ Y กับดีเอ็นเอไมโทคอนเดรียระหว่างประชากรทั้ง 9 กลุ่ม พบว่ากลุ่มย่อยของแต่ละเผ่ามีความสัมพันธ์กันทางเชื้อสายอย่างใกล้ชิด อิวเมี่ยนจาก 3 จังหวัดมีโครงสร้างพันธุกรรมที่เฉพาะซึ่งแตกต่างกัน อันอาจเกิดจากแต่ละกลุ่มมีเวลาและเส้นทางการอพยพเคลื่อนย้ายแตกต่างกัน ทั้งนี้ผลการศึกษาแสดงให้เห็นความสอดคล้องกับประวัติการอพยพเคลื่อนย้ายของชุมชนอิวเมี่ยน ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรมนุษย์สามารถให้ข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับชาวเขาได้ การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรมนุษย์มีความซับซ้อน จึงต้องอาศัยความรู้ในสาขาวิชาต่างๆ มาร่วมในการวิเคราะห์ เพื่อให้ได้ข้อสรุปที่สมบูรณ์

Kayser et al.(1997) ประเมิน Y ไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 13 ตำแหน่งคือDYS19, DYS388,DYS385,DYS388,DYS389I/II,DYS390,DYS391,DYS392,YACI,YACII,DXYS156 ใน 48 ประชากรที่แตกต่างกันรวม 3,825 คน แล้วสร้างแฮโปลไทป์ด้วยระบบต่างๆ เป็นกลุ่มๆ พบว่าในระบบที่ประกอบด้วย DYS19,DYS389I,DYS389II,DYS390,DYS391,DYS392 และ DYS393 มี

ประโยชน์มากในทางนิติเวช สามารถใช้ในการระบุตัวบุคคล และระบุการสืบเชื้อสายของฝ่ายชายได้เป็นอย่างดี

Bianchi et.al. (1998) วิเคราะห์ โครโมโซม Y แฮโปลไทป์ด้วย DYS199 ซึ่งเป็น C ไปเป็น T transition, alpha-h alphoid system (alpha-h I-XXVII), DYS19,DYS389I, DYS389II DYS390,DYS391,DYS392 และ DYS393 จากประชากรที่ใช้ภาษา Ameridian และภาษา Na-Dene พบว่าแฮโปลไทป์ที่พบมากที่สุดมีอายุเฉลี่ย 22,770 ปี และพบว่ามีอัตราการกลายพันธุ์ 0.0012

Horst et al. (1999) ใช้ไมโครแซทเทลไลท์ในโครโมโซม Y 7 ตำแหน่ง คือ DYS19,DYS389I/II, DYS390,DYS391,DYS392,DYS393 และ DXY156Y ศึกษาในประชากรชาวญี่ปุ่น ชาวจีน(Han-Chinese) ชาวไทย ชาวปาปวน และชาวพื้นเมืองออสเตรเลีย(Aboriginies) พบว่าบรรพบุรุษของชาวปาปวนและชาวพื้นเมืองออสเตรเลียมาจากชาวเอเชียบนผืนแผ่นดินใหญ่

Krawozak and Roewer (1999) ศึกษาไมโครแซทเทลไลท์ในโครโมโซม Y 8 ตำแหน่ง คือ DYS19,DYS389I,DYS389II,DYS390,DYS391,DYS392,DYS393 และDYS385 ในประชากรชาวคอเคเชียน 1,819 คน พบว่าแฮโปลไทป์ที่สร้างได้มีความสามารถในการแยกแยะบุคคลสูง

การศึกษา Y chromosome polymorphism ยังทำได้โดยการศึกษาลำดับเบสใน Y specific gene ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเนื่องจาก point mutation ซึ่งมักเป็นแบบ transition การขาดหายไป (deletion) หรือการเพิ่มขึ้น (insertion) ของเบสบางคู่ โดยการหาลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการ หรืออาจตัดดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะในจุดที่ศึกษา

จะเห็นได้ว่าข้อมูลที่ได้จากการศึกษาจากโครโมโซม Y โดยวิธีการต่างๆนั้นมีความเหมาะสม สามารถใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับต้นกำเนิดและความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มประชากรกลุ่มต่างๆ ได้เป็นอย่างดี และยังนำมาใช้ร่วมกับการศึกษาตัวบ่งชี้จากแหล่งอื่นได้ ทำให้ได้ข้อมูลที่น่าเชื่อถือเป็นที่ยอมรับของทุกฝ่าย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างเลือดที่นำมาทดลองได้รับจากอาสาสมัคร จากอาสาสมัครคนไทยเพศชายที่มีภูมิลำเนาแตกต่างกัน ทั้งหมด 10 ตัวอย่าง ซึ่งมีภูมิเลาเนาจากจังหวัดกรุงเทพมหานคร 3 ตัวอย่าง จังหวัดนครปฐม 3 ตัวอย่าง จังหวัดเชียงใหม่ 2 ตัวอย่าง จังหวัดนครศรีธรรมราช 2 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างทั้งหมดได้จากคนที่ไม่มีความสัมพันธ์กันทางสายเลือด โดยผู้วิจัยได้ทำการเจาะเลือดบริเวณท้องแขน (cubital vein) ปริมาณ 5-10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่มีสาร 0.5 M EDTA เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด และนำตัวอย่างมาสกัดและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

2. อุปกรณ์และสารเคมี

2.1 อุปกรณ์

2.1.1 Autoclave
2.1.2 Centrifuge
2.1.3 Microcentrifuge
2.1.4 Vortex mixer
2.1.5 Refigerator
2.1.6 Water bath
2.1.7 DNA thermal cycler
2.1.8 Electrophoresis chamber
2.1.9 Power supply
2.1.10 UV transluminator
2.1.11 Microwave oven
2.1.12 Micropipettes ขนาด 100 μl, 200 μl และ 1000 μl
2.1.13 Centrifuge tube ขนาด 15 ml

2.1.14 Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml

2.1.15 QIAamp spin columns (silica-gel membrane)

2.1.16 Collection tube

2.1.17 PCR tube

2.1.18 Glove disposable

2.1.19 Blade

2.1.20 แผ่นกระจกใส

2.1.21 Erlenmeyer flask ขนาด 5 ml ,10 ml

2.1.22 Breker ขนาด 25 ml, 50 ml

2.2 สารเคมี

2.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างเลือด ได้แก่ 0.5 M EDTA

2.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

2.2.2.1 lymphoprep

2.2.2.2 สารเคมีในชุดสกัดดีเอ็นเอ QIAamp® DNA mini kit ประกอบด้วย

1) QIAGEN Protease stock solution
2) Buffer AL
3) Buffer AW1
4) Buffer AW2
5) Buffer AE

2.2.2.3 RNase (100 mg/ml)

2.2.2.4 Ethanol

2.2.3 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธี gel electrophoresis

2.2.3.1 1% Agarose gel ใน 1xTBE

2.2.3.2 1xTBE buffer

2.2.3.3 Loading dye

2.2.3.4 Ethidium bromide

2.2.3.5 λDNA/HindIII

2.2.4 สารเคมีสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR)

2.2.4.1 10X PCR buffer(B)

2.2.4.2 10X dNTP mixed(dATP,dCTP,dTTP และ dGTP)

2.2.4.3 Taq DNA polymerase 5 unit/ µl ,store at –20 °C

2.2.4.4 primer DYS390

2.2.4.5 primer DYS391

2.2.4.6 primer DYS393

ตารางที่ 4 Primer sequence ที่ใช้ในการศึกษา

Locus	Primer	Sequence(5’-3’)
DYS390	DYS390-1 DYS390-2	TATATTTTACACTTTTGGGCC TGACAGTAAAATGAACACATTGC
DYS391	DYS391-1 DYS391-2	CTATTCATTCAATCATACACCCA GATTCTTTGTGGTGGGTCTG
DYS393	DYS393-1 DYS393-2	GTGGTCTTCTACTTGTGTCAATAC AACTCAAGTCCAAAAAATGAGG

ที่มา: Bergen, A.W. et l. An Asian-Native American paternal lineage identified by RPS4y resequencing and by microsatellite haplotyping.Ann.Hum.Genet.(1999),63,63-80.

2.2.5 สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนให้บริสุทธิ์ด้วย Gel/PCR DNA fragments extraction kit

2.2.5.1 DF Buffer

2.2.5.2 Wash Buffer

2.2.5.3 Elution Buffer

2.2.5.4 Ethanol (96-100%) เติมลงใน Wash Buffer ก่อนใช้ครั้งแรก

3. วิธีการทดลอง

3.1 การสกัด buffy coat จากเลือด (whole blood)

เติมสาร lymphoprep 5 ml ลงใน centrifuge tube ขนาด 15 ml จากนั้นค่อย ๆ เติมเลือดประมาณ 5-10 ml ลงบนชั้นผิวของ lymphoprep นำไปปั่นเหวี่ยงในเครื่องcentrifuge ด้วยความเร็ว 2,500xg เป็นเวลา 10 นาที สังเกตบริเวณรอยต่อระหว่าง lymphoprep กับพลาสมา มีลักษณะเป็นชั้นสีขาวขุ่นเรียกว่า buffy coat ซึ่งเป็นชั้นที่มีเม็ดเลือดขาวอยู่ ใช้ micropipette ดูดเก็บ

สารชั้น buffy coat นี้ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml นำไปปั่นเหวี่ยงในเครื่อง microcentrifuge ด้วยความเร็ว 2,500xg เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดสารละลายตอนบนทิ้งให้เหลือเพียง buffy coat เพื่อนำไปใช้ในการสกัดขั้นตอนต่อไป

3.2 การสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ QIAamp® DNA mini kit

3.2.1 เติม buffy coat 200 µl ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml และเติม Protinase K 20 µl ผสมให้เข้ากันโดยใช้ micropipette ดูดขึ้นลงหลาย ๆ ครั้ง

3.2.2 เติม RNase (100 mg/ml) 4 µl ผสมให้เข้ากันโดยการดูดขึ้นลงหลาย ๆ ครั้ง

3.2.3 เติม buffer AL 200 µl ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex เขย่านาน 15 วินาที เพื่อให้เซลล์เกิดการแตกตัวอย่างสมบูรณ์และให้ตัวอย่างกับ buffer AL ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน

3.2.4 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที สารละลายในหลอดจะหนืดขึ้น นำไปปั่นเหวี่ยงเล็กน้อยให้หยดน้ำที่ฝาหลอดตกลงมา

3.2.5 เติม ethanol (96-100%) 200 µl ผสมให้เข้ากันโดยการ vortex เป็นเวลา 15 วินาที

3.2.6 ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ลงใน QIAamp spin column ที่ซ้อนอยู่ใน collection tube ขนาด 2 ml ปิดฝาคอลัมน์เพื่อป้องกัน aerosol แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000xg เป็นเวลา 1 นาที

3.2.7 นำ column ใส่ลงใน collection tubeใหม่ เติม buffer AW1 500 µl ลงใน column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000xg เป็นเวลา 1 นาที

3.2.8 นำ column ใส่ลงใน collection tubeใหม่ เติม buffer AW2 500 µl ลงใน column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุด 20,000xg เป็นเวลา 3 นาที

3.2.9 นำ column ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml เติม buffer AE 200 µl บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000xg เป็นเวลา 1 นาที จะได้สารละลายดีเอ็นเอ เก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3 การตรวจวัดคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดโดยวิธี Gel Electophoresis

3.3.1 เตรียม 1% agarose โดยการชั่งผง agarose 1 g ผสมลงในบัพเฟอร์ 1X TBE 100 ml อุ่นจนผง agarose ละลายหมด แล้วเทลงใน agarose chamber ทิ้งให้เจลแข็งตัว แล้วนำไปวางลงใน electrophoresis chamber

3.3.2 เทบัพเฟอร์ 1X TBE ลงใน electrophoresis chamber จนท่วมสูงกว่าเจลเล็กน้อย นำสารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมได้ 5 µl ผสมกับ loading dye 2 µl อาจผสมกับน้ำกลั่นไร้เชื้อประมาณ 2-5 ml เพื่อเจือจาง แล้วหยอดสารลงในช่อง agarose gel

3.3.3 ใช้ λDNA/HindIII เป็น marker เพื่อประมาณขนาดของดีเอ็นเอที่ run บน agarose gel

3.3.4 Run ที่ความต่างศักย์ 100 volt เป็นเวลา 20 นาที

3.3.5 นำ agarose gel ที่ได้มาย้อมในสารละลาย ethidium bromide 20 μg /ml เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างโดยการแช่ในน้ำประมาณ 2 นาที

3.3.6 นำ agarose gel มาส่องดูด้วยเครื่อง UV transluminator

3.3.7 เปรียบเทียบความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่สกัดได้กับความเข้มของแถบ λDNA/HindIII แล้วคำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอตามสัดส่วนเมื่อเปรียบเทียบกับ marker

3.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR

3.4.1 ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ตำแหน่ง DYS390 โดยใช้ Primer ดังตารางที่ 4 มาทำการทดสอบ โดยส่วนของ reaction mixture ประกอบด้วย

DW	37.5	μl
10XPCR buffer (B)	5	μl
10xdNTP mixed	1	μl
Taq DNA polymerase 5 unit/ μl	0.5	μl
100 pmol/ μl DYS390-1	0.5	μl
100 pmol/ μl DYS390-2	0.5	μl
DNA template	5	μl

ความยาวของ PCR product ที่ได้จะอยู่ระหว่าง 202-218 bp

3.4.2 ทำการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอตำแหน่ง DYS391 โดยใช้ Primer ดังตาราง 4 มาทำการทดสอบ โดยส่วนของ reaction mixture ประกอบด้วย

DW	37.5	μl
10XPCR buffer (B)	5	μl
10xdNTP mixed	1	μl
Taq DNA polymerase 5 unit/ μl	0.5	μl
100 pmol/ μl DYS391-1	0.5	μl
100 pmol/ μl DYS391-2	0.5	μl
DNA template	5	μl

ความยาวของ PCR product ที่ได้จะ อยู่ระหว่าง 280-288 bp

3.4.3 ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ตำแหน่ง DYS393 โดยใช้ Primer ดังตาราง 4 มาทำการทดสอบ โดยส่วนของ reaction mixture ประกอบด้วย

DW	37.5	μl
10XPCR buffer (B)	5	μl
10xdNTP mixed	1	μl
Taq DNA polymerase 5 unit/ μl	0.5	μl
100 pmol/ μl DYS391-1	0.5	μl
100 pmol/ μl DYS391-2	0.5	μl
DNA template	5	μl

ความยาวของ PCR product ที่ได้ จะอยู่ระหว่าง 117-133 bp

จากนั้นนำเข้าเครื่อง DNA thermal cycler โดยตั้งค่าดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 โปรแกรมการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

Initial Incubation Step	Denature	Anneal	Extend	Final Extension	Final Step
Hold	Cycle (28 รอบ)			Hold	Hold
94 °C 5 นาที	95 °C 15 วินาที	54 °C 15 วินาที	72 °C 30 วินาที	60 °C 10 นาที	4 °C (forever)

ที่มา: Bergen, A.W. et l. An Asian-Native American paternal lineage identified by RPS4y resequencing and by microsatellite haplotyping.Ann.Hum.Genet.(1999),63,63-80.

เมื่อเสร็จสิ้นโปรแกรม นำผลิตผลจากปฏิกิริยาPCR เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15 ถึง -25 องศาเซลเซียส จะสามารถเก็บรักษาตัวอย่างได้นาน 2 สัปดาห์ขึ้นไป

3.5 การตรวจวิเคราะห์ผลผลิตดีเอ็นเอโดยวิธี Gel Electophoresis

3.5.1 เตรียม 3% agarose โดยการชั่งผง agarose 1 g ผสมลงในบัพเฟอร์ 1X TBE 100 ml อุ่นจนผง agarose ละลายหมด แล้วเทลงใน agarose chamber ทิ้งให้เจลแข็งตัว แล้วนำไปวางลงใน electrophoresis chamber

3.5.2 เทบัพเฟอร์ 1X TBE ลงใน electrophoresis chamber จนท่วมสูงกว่าเจลเล็กน้อย นำสารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมได้ 5 µl ผสมกับ loading dye 2 µl อาจผสมกับน้ำกลั่นไร้เชื้อประมาณ 2-5 ml เพื่อเจือจาง แล้วหยอดสารลงในช่อง agarose gel

3.5.3 ใช้ 100 bp DNA ladder 500 µg/100 ml เป็น marker เพื่อประมาณขนาดของดีเอ็นเอที่ run บน agarose gel

3.5.4 Run ที่ความต่างศักย์ 100 volt เป็นเวลา 20 นาที

3.5.5 นำ agarose gel ที่ได้มาย้อมในสารละลาย ethidium bromide 20 µg /ml เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างโดยการแช่ในน้ำประมาณ 2 นาที

3.5.6 นำ agarose gel มาส่องดูด้วยเครื่อง UV translluminator

3.5.7 เปรียบเทียบความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่สกัดได้กับความเข้มของแถบ marker แล้วคำนวณความเข้นข้นของดีเอ็นเอตามสัดส่วนเมื่อเปรียบเทียบกับ marker

3.6 การสกัดดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนให้บริสุทธิ์ด้วย Gel/PCR DNA fragments extraction kit

3.6.1 ขั้นตอน Gel Dissociation

3.6.1.1 ตัด agarose gel ประมาณ 300 mg. ใส่ลงใน microcentrifuge tube

3.6.1.2 นำ DF buffer 500 µl ใส่ลงในตัวอย่างที่เตรียมไว้ แล้ว mix ด้วย Vortex

3.6.1.3 นำไปอุ่นใน Incubator ที่ 55-60 ° C 10-15 นาที จนกว่าเจลจะละลายหมด ตลอดเวลาที่ Incubate ให้กลับ tube ไปมาทุก 2-3 นาที

3.6.1.4 นำตัวอย่างที่ได้ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3.6.2 ขั้นตอน DNA Binding

3.6.2.1 นำตัวอย่างที่ได้ไปใส่ใน DF column ใน collection tube จะได้ตัวอย่างประมาณ 800 µl

3.6.2.2 นำไปปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ 6,000 x g (8,000 rpm) 30 วินาที

3.6.2.3 เทน้ำส่วนที่อยู่ใน tube ทิ้งไป นำ DF column ใส่ collection tube ใหม่ ถ้าตัวอย่างที่ได้มีมากกว่า 800 µl ให้ทำขั้นตอนนี้อีกครั้ง

3.6.3 ขั้นตอน Wash

3.6.3.1 เติม Wash Buffer ที่เติม ethanol แล้ว ลงใน DF column

3.6.3.2 นำไปปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ 6,000 x g(8,000 rpm) 30 วินาที

3.6.3.3 เทน้ำส่วนที่อยู่ใน tube ทิ้งไป นำ DF column ใส่ collection tube ใหม่

3.6.3.4 นำไปปั่นอีกครั้งที่ 14,000 rpm ใช้เวลา 2 นาที จนแห้ง

3.6.4 ขั้นตอน DNA Elution

3.6.4.1 นำ DF column ส่วนที่แห้ง มาใส่ microcentrifuge tube ใหม่

3.6.4.2 เติม Elution Buffer 15-50 µl ตรงกลาง tube

3.6.4.3 ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที จนกว่า Elution Buffer หรือน้ำ จะไหลลงมาจนหมด

3.6.4.4 นำไปปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ 14,000 rpm ใช้เวลา 2 นาที จนได้ดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์

3.7 การทำ DNA sequencing ด้วยเทคนิค dye terminator cycle sequencing kit

การทำ DNA sequencing ส่งบริษัท แปซิฟิคซายด์ จำกัด โดยนำ PCR product ที่ได้ไปหาลำดับเบสด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป dye terminator cycle sequencing kit และจึงทำการวิเคราะห์หาลำดับเบส

3.8 การวิเคราะห์ลำดับเบส

การวิเคราะห์ลำดับเบสทำโดยใช้โปรแกรม ClustalW2 โดย search tool ใน web site www.ebi.ac.uk เลือกที่ sequence analysis และเลือกที่ ClustalW2 จะพบโปรแกรมการทำ multiple sequence alignment ทั้งนี้จะนำข้อมูลของชาวต่างชาติซึ่งเป็นชาว Native Amaricanใน web site www.ncbi.nlm.nih.gov มาเปรียบเทียบเพื่อทำการวิเคราะห์ และทำ Phylogenetic tree ในโปรแกรม Molecular Evolutionary Genetic Analysis(MEGA) Version 4.1

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

จากผลการศึกษาเรื่อง การวิเคราะห์ลำดับของนิวคลีโอไทด์ของไมโครแซทเทลไลท์ DYS 390 DYS 391 และ DYS 393 ในคนไทย โดยได้คัดเลือกชายไทยจำนวน 10 คน ที่ไม่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือดและมีภูมิลำเนาแตกต่างกัน ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดด้วยวิธี QIAamp® DNA mini kit แล้วทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อไมโครแซเท็ลไลท์ DYS390 DYS391 และDYS393 ทำการสกัดดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้ให้บริสุทธิ์ด้วย Gel/PCR DNA fragments extraction kit และทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค dye terminator cycle sequencing kit แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่างมาทำ Multiple sequence alignment ในแต่ละไมโครแซทเทลไลท์ได้ผลได้ภาพที่ 13-15

Multiple sequence alignment DYS 390

```
DYS390-BK3      TATATTTTACACTTTTGGGCCCTGCATTTT-GGTACCCCATAATATATTCTATCTATCTG 59
DYS390-CM1      TATATTTTACACTTTTGGGCCCTGCATTTT-GGTACCCCATAATATATTCTATCTATCTG 59
DYS390-BK1      TATATTTTACACTTTTGGGCCCTGCATTTT-GGTACCCCATAATATATTCTATCTATCTG 59
DYS390-NS1      TATATTTTACACTTTTGGGCCCTGCATTTT-GGTACCCCATAATATATTCTATCTATCTG 59
DYS390-BK2      TATATTTTACACTTTTGGGCCCTGCATTTT-GGTACCCCATAATATATTCTATCTATCTG 59
DYS390-NS2      TATATTTTACACTTTTGGGCCCTGCATTTTTGGTACCCCATAATATATTCTATCTATCTG 60
DYS390-NP1      TATATTTTACACTTTTGGGCCCTGCATTTT-GGTACCCCATAATATATTCTATCTATCTG 59
DYS390-NP2      TATATTTTACACTTTTGGGCCCTGCATTTT-GGTACCCCATAATATATTCTATCTATCTG 59
AF140636        TATATTTTACACTTTTGGGCCCTGCATTTT-GGTACCCCATAATATATTCTATCTATCTG 59
DYS390-NP3      TATATTTTACACTTTTGGGCCCTGCATTTT-GGTACCCCATAATATATTCTATCTATCTG 59
DYS390-CM2      TATATTTTACACTTTTGGGCCCTGCATTTT-GGTACCCCATAATATATTCTATCTATCTG 59
                ****************************** *****************************

DYS390-BK3      TCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCT--ATCTATCTATC 117
DYS390-CM1      TCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCT--ATCTATCTATC 117
DYS390-BK1      TCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCT--ATCTATCTATC 117
DYS390-NS1      TCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCT--ATCTATCTATC 117
DYS390-BK2      TCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCT--ATCTATCTATC 117
DYS390-NS2      TCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCT--ATCTATCTATC 118
DYS390-NP1      TCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCT--ATCTATCTATC 117
DYS390-NP2      TCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCT--ATCTATCTATC 117
AF140636        TCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCT--ATCTATCTATC 117
DYS390-NP3      TCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCTATCT--ATCTATCTATC 117
DYS390-CM2      TCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTCTATCTATCTATA 119
                *********************** *** *******************  ********** 

DYS390-BK3      TC----TATCTATATCTATCTGTCTATCTATCTATCTATCATCTATCTATCTTTCCTTGT 173
DYS390-CM1      ------TATCTAT--CTATCTGTCTATCTATCTATCTATCATCTATCTATCTTTCCTTGT 169
DYS390-BK1      ----------------TATCTGTCTATCTATCTATCTATCATCTATCTATCTTTCCTTGT 161
DYS390-NS1      ------------TATCTATCTGTCTATCTATCTATCTATCATCTATCTATCTTTCCTTGT 165
DYS390-BK2      ------------T--------GTCTATCTATCTATCTATCATCTATCTATCTTTCCTTGT 157
DYS390-NS2      ------------TATCTATCTGTCTATCTATCTATCTATCATCTATCTATCTTTCCTTGT 166
DYS390-NP1      ------------TATCT----GTCTATCTATCTATCTATCATCTATCTATCTTTCCTTGT 161
DYS390-NP2      ------------TATCTATCTGTCTATCTATCTATCTATCATCTATCTATCTTTCCTTGT 165
AF140636        ------------TATCTATCTGTCTATCTATCTATCTATCATCTATCTATCTTTCCTTGT 165
DYS390-NP3      TATCTATCTATCTATCTATCTGTCTATCTATCTATCTATCATCTATCTATCTTTCCTTGT 177
DYS390-CM2      TC----------TATCTATCTGTCTATCTATCTATCTATCATCTATCTATCTTTCCTTGT 169
                                     ***************************************

DYS390-BK3      TTCTGAGTATACACATTGCAATGTGTTCATTTTACTGTCA 213
DYS390-CM1      TTCTGAGTATACACATTGCAATGTGTTCATTTTACTGTCA 209
DYS390-BK1      TTCTGAGTATACACATTGCAATGTGTTCATTTTACTGTCA 201
DYS390-NS1      TTCTGAGTATACACATTGCAATGTGTTCATTTTACTGTCA 205
DYS390-BK2      TTCTGAGTATACACATTGCAATGTGTTCATTTTACTGTCA 197
DYS390-NS2      TTCTGAGTATACACATTGCAATGTGTTCATTTTACTGTCA 206
DYS390-NP1      TTCTGAGTATACACATTGCAATGTGTTCATTTTACTGTCA 201
DYS390-NP2      TTCTGAGTATACACATTGCAATGTGTTCATTTTACTGTCA 205
AF140636        TTCTGAGTATACACATTGCAATGTGTTCATTTTACTGTCA 205
DYS390-NP3      TTCTGAGTATACACATTGCAATGTGTTCATTTTACTGTCA 217
DYS390-CM2      TTCTGAGTATACACATTGCAATGTGTTCATTTTACTGTCA 209
                ****************************************
```

ภาพที่ 13 ผลการทำ Multiple sequence alignment ของตัวอย่างต่างๆ ของไมโครแซทเทลไลท์ DYS 390

จากผลการทำ Mutiple sequence alignment ของ DYS 390 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 217 ตำแหน่ง มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน 26 ตำแหน่ง คิดเป็น 11.98% โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 31 ของ NS2 มีการแทรกเพิ่ม (insertion) ของ T เกิดขึ้น ส่วนตำแหน่งอื่นๆ เป็น Gap(ช่องว่าง)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 84 ของ CM2 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ตรงกันจาก G เป็น A เมื่อเทียบกับ reference sequence และตำแหน่งอื่นๆ ซึ่งเป็นการมิวเตชั่นแบบการมิวเตชั่นแบบการแทนที่ระหว่างเบสกลุ่มเดียวกัน(transition)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 88 ของ NP3 และ CM2 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ตรงกันจาก G เป็น A เมื่อเทียบกับ reference sequence และตำแหน่งอื่นๆ ซึ่งเป็นการมิวเตชั่นแบบ การมิวเตชั่นแบบการแทนที่ระหว่างเบสกลุ่มเดียวกัน(transition)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 108 มีการแทรกเพิ่ม (insertion) ของ C เกิดขึ้น ส่วนตำแหน่งอื่นๆ เป็น Gap(ช่องว่าง)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 109 มีการแทรกเพิ่ม (insertion) ของ T เกิดขึ้น ส่วนตำแหน่งอื่นๆ เป็น Gap(ช่องว่าง)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 120 ของ CM2 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ตรงกันจาก C เป็น A เมื่อเทียบกับ reference sequence และตำแหน่งอื่นๆ ซึ่งเป็นการมิวเตชั่นแบบมีการแทนที่ระหว่างเบสต่างกลุ่ม (transversion) เกิดขึ้น

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 121 ของ BK3 ,NP3,CM2 มีการแทรกเพิ่ม (insertion) ของ T เกิดขึ้น ส่วนตำแหน่งอื่นๆ เป็น Gap(ช่องว่าง)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 122 ของ BK3 ,NP3,CM2 มีการแทรกเพิ่ม (insertion) ของ CและA เกิดขึ้น ส่วนตำแหน่งอื่นๆ เป็น Gap(ช่องว่าง)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 123 ของ NP3 มีการแทรกเพิ่ม (insertion) ของ T เกิดขึ้น ส่วนตำแหน่งอื่นๆ เป็น Gap(ช่องว่าง)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 124 ของ NP3 มีการแทรกเพิ่ม (insertion) ของ C เกิดขึ้น ส่วนตำแหน่งอื่นๆ เป็น Gap(ช่องว่าง)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 125 ของ NP3 มีการแทรกเพิ่ม (insertion) ของ T เกิดขึ้น ส่วนตำแหน่งอื่นๆ เป็น Gap(ช่องว่าง)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 126 ของ NP3 มีการแทรกเพิ่ม (insertion) ของ A เกิดขึ้น ส่วนตำแหน่งอื่นๆ เป็น Gap(ช่องว่าง)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 127 ของ BK3, CM1,NP3 มีการแทรกเพิ่ม (insertion) ของ T เกิดขึ้น ส่วนตำแหน่งอื่นๆ เป็น Gap(ช่องว่าง)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 128 ของ BK3, CM1,NP3 มีการแทรกเพิ่ม (insertion) ของ A และ C เกิดขึ้น ส่วนตำแหน่งอื่นๆ เป็น Gap(ช่องว่าง)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 129 ของ BK3, CM1,NP3 มีการแทรกเพิ่ม (insertion) ของ T เกิดขึ้น ส่วนตำแหน่งอื่นๆ เป็น Gap(ช่องว่าง)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 130 ของ BK3, CM1,NP3 มีการแทรกเพิ่ม (insertion) ของ C และ A เกิดขึ้น ส่วนตำแหน่งอื่นๆ เป็น Gap(ช่องว่าง)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 131 ของ BK3, CM1,NP3 มีการแทรกเพิ่ม (insertion) ของ T เกิดขึ้น ส่วนตำแหน่งอื่นๆ เป็น Gap(ช่องว่าง)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 132 ของ BK3, CM1,NP3 มีการแทรกเพิ่ม (insertion) ของ A และ C เกิดขึ้น ส่วนตำแหน่งอื่นๆ เป็น Gap(ช่องว่าง)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 133 ของ BK1 มีการขาดหายไป (deletion) ของ T เกิดขึ้น

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 134 ของ CM1,BK1,BK2 มีการขาดหายไป (deletion) ของ A เกิดขึ้น

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 135 ของ CM1,BK1,BK2 มีการขาดหายไป (deletion) ของ T เกิดขึ้น

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 136 ของ BK1,BK2 มีการขาดหายไป (deletion) ของ T เกิดขึ้น

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 137 ของ BK1 มีการขาดหายไป (deletion) ของ T เกิดขึ้น

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 138 ของ BK2,NP1 มีการขาดหายไป (deletion) ของ A เกิดขึ้น

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 139 ของ BK2,NP1 มีการขาดหายไป (deletion) ของ T เกิดขึ้น

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 140 ของ BK2,NP1 มีการขาดหายไป (deletion) ของ T เกิดขึ้น

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 141 BK2,NP1 ของ มีการขาดหายไป (deletion) ของ T เกิดขึ้น

ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำกันของไมโครแซทเทลไลท์ DYS 390 คือ ATCT โดยมีซ้ำกัน 6 ชุด หายไป 1 ชุด

Multiple sequence alignment DYS 391

```
DYS391-NP3      CTATTCATTCAATCATACACCCATATCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCTATCT 60
DYS391-NS1      CTATTCATTCAATCATACACCCATATCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCTATCT 60
DYS391-NP1      CTATTCATTCAATCATACACCCATATCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCTATCT 60
DYS391-CM2      CTATTCATTCAATCATACACCCATATCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCTATCT 60
DYS391-BK3      CTATTCATTCAATCATACACCCATATCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCTATCT 60
AF140637        CTATTCATTCAATCATACACCCATATCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCTATCT 60
DYS391-CM1      CTATTCATTCAATCATACACCCATATCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCTATCT 60
DYS391-BK2      CTATTCATTCAATCATACACCCATATCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCTATCT 60
DYS391-NP2      CTATTCATTCAATCATACACCCATATCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCTATCT 60
DYS391-BK1      CTATTCATTCAATCATACACCCATATCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCTATCT 60
DYS391-NS2      CTATTCATTCAATCATACACCCATATCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCTATCT 60
                ************************************************************

DYS391-NP3      ATCTATCTATCTATCTATCT------------GCCTATCTGCCTGCCTACCTATCCCTCT 108
DYS391-NS1      ATCTATCTATCTATCT----------------GCCTATCTGCCTGCCTACCTATCCCTCT 104
DYS391-NP1      ATCTATCTATCTATCTATCT------------GCCTATCTGCCTGCCTACCTATCCCTCT 108
DYS391-CM2      ATCTATCTATCTATCTATCT------------GCCTATCTGCCTGCCTACCTATCCCTCT 108
DYS391-BK3      ATCTATCTATCTATCTATCT------------GCCTATCTGCCTGCCTACCTATCCCTCT 108
AF140637        ATCTATCTATCTATCTATCT------------GCCTATCTGCCTGCCTACCTATCCCTCT 108
DYS391-CM1      ATCTATCTATCTATCTATCTATCT--------GCCTATCTGCCTGCCTACCTATCCCTCT 112
DYS391-BK2      ATCTATCTATCTATCTATCTATCT--------GCCTATCTGCCTGCCTACCTATCCCTCT 112
DYS391-NP2      ATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCT----GCCTATCTGCCTGCCTACCTATCCCTCT 116
DYS391-BK1      ATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTGCCTATCTGCCTGCCTACCTATCCCTCT 120
DYS391-NS2      ATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCT----GCCTATCTGCCTGCCTACCTATCCCTCT 116
                ****************                ****************************

DYS391-NP3      ATGGCAATTGCTTGCAACCAGGGAGATTTTATTCCCAGGAGATATTTGGCTATGTCTGAC 168
DYS391-NS1      ATGGCAATTGCTTGCAACCAGGGAGATTTTATTCCCAGGAGATATTTGGCTATGTCTGAC 164
DYS391-NP1      ATGGCAATTGCTTGCAACCAGGGAGATTTTATTCCCAGGAGATATTTGGCTATGTCTGAC 168
DYS391-CM2      ATGGCAATTGCTTGCAACCAGGGAGATTTTATTCCCAGGAGATATTTGGCTATGTCTGAC 168
DYS391-BK3      ATGGCAATTGCTTGCAACCAGGGAGATTTTATTCCCAGGAGATATTTGGCTATGTCTGAC 168
AF140637        ATGGCAATTGCTTGCAACCAGGGAGATTTTATTCCCAGGAGATATTTGGCTATGTCTGAC 168
DYS391-CM1      ATGGCAATTGCTTGCAACCAGGGAGATTTTATTCCCAGGAGATATTTGGCTATGTCTGAC 172
DYS391-BK2      ATGGCAATTGCTTGCAACCAGGGAGATTTTATTCCCAGGAGATATTTGGCTATGTCTGAC 172
DYS391-NP2      ATGGCAATTGCTTGCAACCAGGGAGATTTTATTCCCAGGAGATATTTGGCTATGTCTGAC 176
DYS391-BK1      ATGGCAATTGCTTGCAACCAGGGAGATTTTATTCCCAGGAGATATTTGGCTATGTCTGAC 180
DYS391-NS2      ATGGCAATTGCTTGCAACCAGGGAGATTTTATTCCCAGGAGATATTTGGCTATGTCTGAC 176
                ************************************************************

DYS391-NP3      AACAATTTTTTTGGTTGTCACAAATGGGATGAATGTTACTGGCATCTGGTGGGTGGAGCC 228
DYS391-NS1      AACAATTTTTTTGGTTGTCACAAATGGGATGAATGTTACTGGCATCTGGTGGGTGGAGCC 224
DYS391-NP1      AACAATTTTTTTGGTTGTCACAAATGGGATGAATGTTACTGGCATCTGGTGGGTGGAGCC 228
DYS391-CM2      AACAATTTTTTTGGTTGTCACAAATGGGATGAATGTTACTGGCATCTGGTGGGTGGAGCC 228
DYS391-BK3      AACAATTTTTTTGGTTGTCACAAATGGGATGAATGTTACTGGCATCTGGTGGGTGGAGCC 228
AF140637        AACAATTTTTTTGGTTGTCACAAATGGGATGAATGTTACTGGCATCTGGTGGGTGGAGCC 228
DYS391-CM1      AACAATTTTTTTGGTTGTCACAAATGGGATGAATGTTACTGGCATCTGGTGGGTGGAGCC 232
DYS391-BK2      AACAATTTTTTTGGTTGTCACAAATGGGATGAATGTTACTGGCATCTGGTGGGTGGAGCC 232
DYS391-NP2      AACAATTTTTTTGGTTGTCACAAATGGGATGAATGTTACTGGCATCTGGTGGGTGGAGCC 236
DYS391-BK1      AACAATTTTTTTGGTTGTCACAAATGGGATGAATGTTACTGGCATCTGGTGGGTGGAGCC 240
DYS391-NS2      AACAATTTTT--GGTTGTCACAAATGGGATGAATGTTACTGGCATCTGGTGGGTGGAGCC 234
                **********  ************************************************

DYS391-NP3      CAGAGATGCTGCTCAACACCCTACAGTGCACAAGACAGACCCACCACAAAGAATC 283
DYS391-NS1      CAGAGATGCTGCTCAACACCCTACAGTGCACAAGACAGACCCACCACAAAGAATC 279
DYS391-NP1      CAGAGATGCTGCTCAACACCCTACAGTGCACAAGACAGACCCACCACAAAGAATC 283
DYS391-CM2      CAGAGATGCTGCTCAACACCCTACAGTGCACAAGACAGACCCACCACAAAGAATC 283
DYS391-BK3      CAGAGATGCTGCTCAACACCCTACAGTGCACAAGACAGACCCACCACAAAGAATC 283
AF140637        CAGAGATGCTGCTCAACACCCTACAGTGCACAAGACAGACCCACCACAAAGAATC 283
DYS391-CM1      CAGAGATGCTGCTCAACACCCTACAGTGCACAAGACAGACCCACCACAAAGAATC 287
DYS391-BK2      CAGAGATGCTGCTCAACACCCTACAGTGCACAAGACAGACCCACCACAAAGAATC 287
DYS391-NP2      CAGAGATGCTGCTCAACACCCTACAGTGCACAAGACAGACCCACCACAAAGAATC 291
DYS391-BK1      CAGAGATGCTGCTCAACACCCTACAGTGCACAAGACAGACCCACCACAAAGAATC 295
DYS391-NS2      CAGAGATGCTGCTCAACACCCTACAGTGCACAAGACAGACCCACCACAAAGAATC 289
                *******************************************************
```

ภาพที่ 14 ผลการทำ Multiple sequence alignment ของตัวอย่างต่างๆ ของไมโครแซทเทลไลท์ DYS 391

จากผลการทำ Mutiple sequence alignment ของ DYS 391 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 295 ตำแหน่ง มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน 18 ตำแหน่ง คิดเป็น 6.10% โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 77 ของ NS1 มีการขาดหายไป (deletion) ของ A เกิดขึ้น

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 78 ของ NS1 มีการขาดหายไป (deletion) ของ T เกิดขึ้น

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 79 ของ NS1 มีการขาดหายไป (deletion) ของ C เกิดขึ้น

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 80 ของ NS1 มีการขาดหายไป (deletion) ของ T เกิดขึ้น

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 81 มีการขาดหายไป (deletion) ของ Aและมีการแทรกเพิ่ม (insertion) ของ A เกิดขึ้น

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 82 มีการขาดหายไป (deletion) ของ T และมีการแทรกเพิ่ม (insertion) ของ T เกิดขึ้น

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 83 มีการขาดหายไป (deletion) ของ C และมีการแทรกเพิ่ม (insertion) ของ C เกิดขึ้น

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 84 มีการขาดหายไป (deletion) ของ T และมีการแทรกเพิ่ม (insertion) ของ T เกิดขึ้น

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 85 ของ NP2,BK1,NS2 มีการแทรกเพิ่ม (insertion) ของ A เกิดขึ้น

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 86 ของ NP2,BK1,NS2 มีการแทรกเพิ่ม (insertion) ของ T เกิดขึ้น

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 87 ของ NP2,BK1,NS2 มีการแทรกเพิ่ม (insertion) ของ C เกิดขึ้น

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 88 ของ NP2,BK1,NS2 มีการแทรกเพิ่ม (insertion) ของ T เกิดขึ้น

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 89 ของมีการแทรกเพิ่ม (insertion) ของ A เกิดขึ้น ส่วนตำแหน่งอื่นๆ เป็น Gap(ช่องว่าง)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 90 ของมีการแทรกเพิ่ม (insertion) ของ T เกิดขึ้น ส่วนตำแหน่งอื่นๆ เป็น Gap(ช่องว่าง)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 91 ของมีการแทรกเพิ่ม (insertion) ของ C เกิดขึ้น ส่วนตำแหน่งอื่นๆ เป็น Gap (ช่องว่าง)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 92 ของมีการแทรกเพิ่ม (insertion) ของ T เกิดขึ้น ส่วนตำแหน่งอื่นๆ เป็น Gap(ช่องว่าง)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 191 และ 192 ของ NS2 มีช่องว่าง(Gap)หรือการขาดหายไป(deletion) ของ T เกิดขึ้น ขณะที่ตำแหน่งอื่นๆ นิวคลีโอไทด์เป็น T

ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำกันของไมโครแซทเทลไลท์ DYS 391 คือ ATCT โดยมีซ้ำกัน 9 ชุด หายไป 4 ชุด

Multiple sequence alignment DYS 393

```
DYS393-CM2      AACTCAAGTCCAAAAAATGAGGTATGTCTCATAGAAAAGACATACAT--ATCTATCTATC 58
DYS393-NS1      AACTCAAGTCCAAAAAATGAGGTATGTCTCATAGAAAAGACATACAT--ATCTATCTATC 58
DYS393-BK3      AACTCAAGTCCAAAAAATGAGGTATGTCTCATAGAAAAGACATACAT--ATCTATCTATC 58
DYS393-NP2      AACTCAAGTCCAAAAAATGAGGTATGTCTCATAGAAAAGACATACAT--ATCTATCTATC 58
DYS393-BK1      AACTCAAGTCCAAAAAATGAGGTATGTCTCATAGAAAAGACATACAT--ATCTATCTATC 58
DYS393-NS2      AACTCAAGTCCAAAAAATGAGGTATGTCTCATAGAAAAGACATACAT--ATCTATCTATC 58
DYS393-NP1      AACTCAAGTCCAAAAAATGAGGTATGTCTCATAGAAAAGACATACAT--ATCTATCTATC 58
DYS393-CM1      AACTCAAGTCCAAAAAATGAGGTATGTCTCATAGAAAAGACATACAT--ATCTATCTATC 58
AF140639        AACTCAAGTCCAAAAAATGAGGTATGTCTCATAGAAAAGACATACAT--ATCTATCTATC 58
DYS393-BK2      AACTCAAGTCCAAAAAATGAGGTATGTCTCATAGAAGACATACATATCTATCTATCTATC 60
DYS393-NP3      AACTCAAGTCCAAAAAATGAGGTATGTCTCATAGAAGACATACATATCTATCTATCTATC 60
                ************************************ * * * * **  ***********


DYS393-CM2      TATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCT----GTATTGACACAAGTA 114
DYS393-NS1      TATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCT----GTATTGACACAAGTA 114
DYS393-BK3      TATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCT----GTATTGACACAAGTA 114
DYS393-NP2      TATCTATCTATCTATCTATCTATCTA--------TCTATCT----GTATTGACACAAGTA 106
DYS393-BK1      TATCTATCTATCTATCTATCTATCTA--------TCTATCT----GTATTGACACAAGTA 106
DYS393-NS2      TATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTA----TCTATCT----GTATTGACACAAGTA 110
DYS393-NP1      TATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTA----TCTATCT----GTATTGACACAAGTA 110
DYS393-CM1      TATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTA----TCTATCT----GTATTGACACAAGTA 110
AF140639        TATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTA----TCTATCT----GTATTGACACAAGTA 110
DYS393-BK2      TATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCT----GTATTGACACAAGTA 116
DYS393-NP3      TATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTGTATTGACACAAGTA 120
                **************************        *******    ***************

DYS393-CM2      GAAGACCAC 123
DYS393-NS1      GAAGACCAC 123
DYS393-BK3      GAAGACCAC 123
DYS393-NP2      GAAGACCAC 115
DYS393-BK1      GAAGACCAC 115
DYS393-NS2      GAAGACCAC 119
DYS393-NP1      GAAGACCAC 119
DYS393-CM1      GAAGACCAC 119
AF140639        GAAGACCAC 119
DYS393-BK2      GAAGACCAC 125
DYS393-NP3      GAAGACCAC 129
                *********
```

ภาพที่ 15 ผลการทำ Multiple sequence alignment ของตัวอย่างต่างๆ ของไมโครแซทเทลไลท์ DYS 393

จากผลการทำ Mutiple sequence alignment ของ DYS 393 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 129 ตำแหน่ง มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน 19 ตำแหน่ง คิดเป็น 14.73% โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 37 ของ BK2 และ NP3 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ตรงกัน จาก A เป็น G เมื่อเทียบกับ reference sequence และตำแหน่งอื่นๆ ซึ่งเป็นการมิวเตชั่นแบบการแทนที่ระหว่างเบสกลุ่มเดียวกัน(transition)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 39 ของ BK2 และ NP3 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ตรงกัน จาก G เป็น C เมื่อเทียบกับ reference sequence และตำแหน่งอื่นๆ ซึ่งเป็นการมิวเตชั่นแบบมีการแทนที่ระหว่างเบสต่างกลุ่ม (transversion)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 41 ของ BK2 และ NP3 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ตรงกัน จาก C เป็น T เมื่อเทียบกับ reference sequence และตำแหน่งอื่นๆ ซึ่งเป็นการมิวเตชั่นแบบการแทนที่ระหว่างเบสกลุ่มเดียวกัน(transition)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 43 ของ BK2 และ NP3 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ตรงกัน จาก T เป็น C เมื่อเทียบกับ reference sequence และตำแหน่งอื่นๆ ซึ่งเป็นการมิวเตชั่นแบบการแทนที่ระหว่างเบสกลุ่มเดียวกัน(transition)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 45 ของ BK2 และ NP3 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ตรงกัน จาก T เป็น C เมื่อเทียบกับ reference sequence และตำแหน่งอื่นๆ ซึ่งเป็นการมิวเตชั่นแบบการแทนที่ระหว่างเบสกลุ่มเดียวกัน(transition)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 48 ของ BK2 และ NP3 มีการแทรกเพิ่ม (insertion) ของ C เกิดขึ้น

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 49 ของ BK2 และ NP3 มีการแทรกเพิ่ม (insertion) ของ T เกิดขึ้น

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 87 ของ NP2,BK1 มีการขาดหายไป (Deletion) ของ T เกิดขึ้น

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 88 ของ NP2,BK1 มีการขาดหายไป (Deletion) ของ C เกิดขึ้น

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 89 ของ NP2,BK1 มีการขาดหายไป (Deletion) ของ T เกิดขึ้น

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 90 ของ NP2,BK1 มีการขาดหายไป (Deletion) ของ A เกิดขึ้น

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 91 มีการขาดหายไป (deletion) ของ T และมีการแทรกเพิ่ม (insertion) ของ T เกิดขึ้น

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 92 มีการขาดหายไป (deletion) ของ C และมีการแทรกเพิ่ม (insertion) ของ C เกิดขึ้น

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 93 มีการขาดหายไป (deletion) ของ T และมีการแทรกเพิ่ม (insertion) ของ T เกิดขึ้น

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 94 มีการขาดหายไป (deletion) ของ T และมีการแทรกเพิ่ม (insertion) ของ A เกิดขึ้น

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 102 ของ NP3 มีการแทรกเพิ่ม (insertion) ของ A เกิดขึ้น

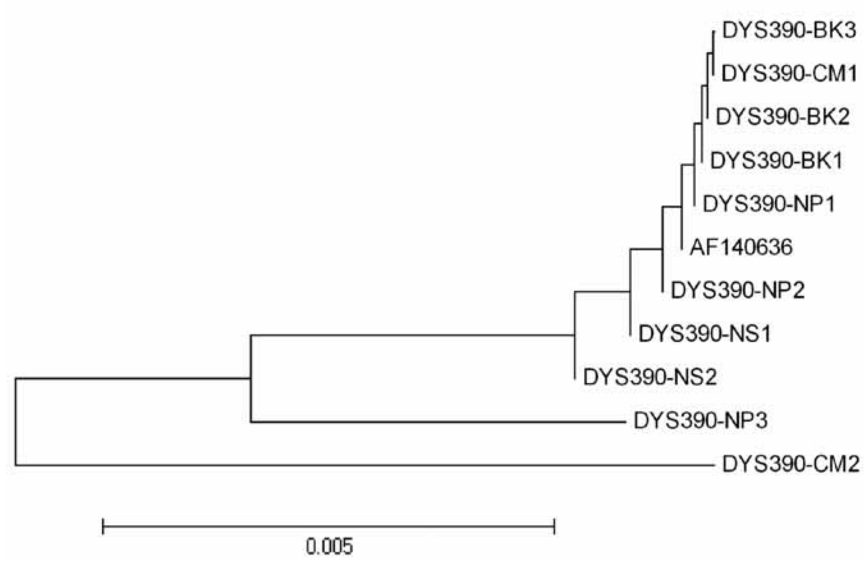
ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 103 ของ NP3 มีการแทรกเพิ่ม (insertion) ของ T เกิดขึ้น

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 104 ของ NP3 มีการแทรกเพิ่ม (insertion) ของ C เกิดขึ้น

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 105 ของ NP3 มีการแทรกเพิ่ม (insertion) ของ T เกิดขึ้น

ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำกันของไมโครแซทเทลไลท์ DYS393 คือ ATCT โดยมีซ้ำกัน 7 ชุด หายไป 5 ชุด

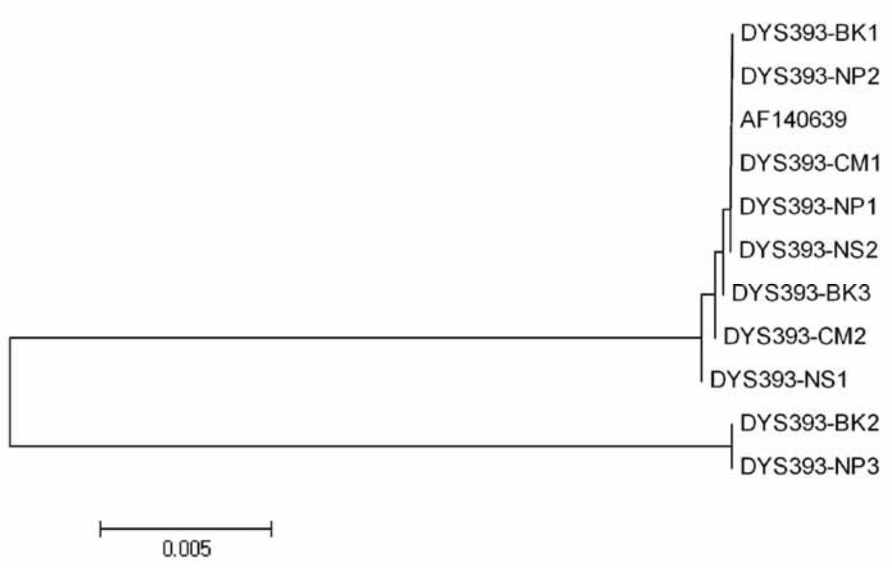
จากการเข้า Program Mege โดยการสร้าง Phylogenetic tree แบบ Neighbor-Joining(NJ) ได้ผลดังภาพที่ 16-17


DYS390-BK3
DYS390-CM1
DYS390-BK2
DYS390-BK1
DYS390-NP1
AF140636
DYS390-NP2
DYS390-NS1
DYS390-NS2
DYS390-NP3
DYS390-CM2
0.005

ภาพที่ 16 ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโครแซทเทลไลท์ DYS390 ในชายไทย

จากภาพที่ 16 แสดงค่า distance bar มีค่าเท่ากับ 0.005 หน่วย แสดงให้เห็นว่า BK3,CM1,BK2,BK1,NP1,AF140636,NS1,NS2 มีความหลากหลายใกล้เคียงกัน ส่วน NP3,CM2 มีความหลากหลายใกล้เคียงกัน ซึ่ง CM2 มีความหลากหลายแตกต่างจากกลุ่มอื่นมากที่สุด โดยไม่มีความเกี่ยวข้องกันทางภูมิภาค

ส่วนความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลท์และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโคร แซทเทลไลท์ DYS391ในชายไทย ของตัวอย่าง NP3, NS1, NP1, CM2, BK3, CM1, BK2 มีความหลากหลายไม่แตกต่างกัน ส่วน NP2, BK1, NS2 มีความหลากหลายแตกต่างกัน ส่วน NS2 มีความหลากหลายแตกต่างจากกลุ่มอื่นมากที่สุด โดยไม่มีความเกี่ยวข้องกันทางภูมิภาค


DYS393-BK1
DYS393-NP2
AF140639
DYS393-CM1
DYS393-NP1
DYS393-NS2
DYS393-BK3
DYS393-CM2
DYS393-NS1
DYS393-BK2
DYS393-NP3
0.005

ภาพที่ 17 ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโครแซทเทลไลท์ DYS393 ในชายไทย

จากแผนภูมิที่ 17 แสดงค่า distance bar มีค่าเท่ากับ 0.005 หน่วย แสดงให้เห็นว่า BK1, NP2, AF140639, CM1, NP1, NS2, BK3, CM2, NS1 มีความหลากหลายไม่แตกต่างกัน จึงอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ส่วน BK2 และ NP3 มีความหลากหลายไม่แตกต่างกัน จึงอยู่ในกลุ่มเดียวกัน

จากแผนภูมิ จะเห็นได้ว่า ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไมโครแซทเทลไลท์ของ DYS 393 มีความหลากหลายมากที่สุด โดยมีค่า maximum distance เท่ากับ 0.024 ขณะที่ DYS391 มีความหลากหลายปานกลาง โดยมีค่า maximum distance เท่ากับ 0.01169 และDYS 393 มีความหลากหลายน้อยที่สุด โดยมีค่า maximum distance เท่ากับ 0.0066

นอกจากนี้หากวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมประกอบกับการศึกษาลักษณะทางภูมิศาสตร์ที่อาศัยอยู่นั้น พบว่าการกระจายความหลากหลายทางพันธุกรรมมีความใกล้เคียงกันมาก เนื่องจากคนไทยมีการไปมาหาสู่กันได้อย่างสะดวกมากขึ้น ทำให้ไม่พบความแตกต่างกันโดยสิ้นเชิงในกลุ่มคนไทย และ กลุ่มชาว Native American

บทที่ 5

สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

1. สรุปผลการวิจัย

1.1 ผลการศึกษาและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ในการศึกษาวิจัยเรื่อง การวิเคราะห์ลำดับของนิวคลีโอไทด์ของไมโครแซทเทลไลท์ DYS390 DYS391 และ DYS393 ในคนไทย มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลท์และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโครแซทเทลไลท์ DYS390 DYS391 และ DYS393 ในชายไทย โดยได้คัดเลือกชายไทยจำนวน 10 คน ที่ไม่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือดและมีภูมิลำเนาแตกต่างกัน จากจังหวัดกรุงเทพมหานคร 3 ตัวอย่าง จังหวัดนครปฐม 3 ตัวอย่าง จังหวัดเชียงใหม่ 2 ตัวอย่าง จังหวัดนครศรีธรรมราช 2 ตัวอย่าง ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดด้วยวิธี QIAamp® DNA mini kit แล้วทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อไม โครแซเท็ลไลท์ DYS390 DYS391 และDYS393 ทำการสกัดดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้ให้บริสุทธิ์ด้วย Gel/PCR DNA fragments extraction kit และทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค dye terminator cycle sequencing kit

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโครแซทเทลไลท์ DYS390 พบว่า มีการมิวเตชั่นแบบการแทรกเพิ่ม (insertion) มากที่สุด คือ 15 นิวคลีโอไทด์ ขณะที่การมิวเตชั่นแบบการขาดหายไป (deletion) มี 9 นิวคลีโอไทด์ ส่วนการมิวเตชั่นแบบการแทนที่เบสกลุ่มเดียวกัน (transition)มี2 นิวคลีโอไทด์และการมิวเตชั่นแบบการแทนที่ระหว่างเบสต่างกลุ่มกัน (transversion) มี 1 นิวคลีโอไทด์ ขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโครแซทเทลไลท์ DYS391 พบว่า มีการมิวเตชั่นแบบการขาดหายไป (deletion) มากที่สุดคือ 10 นิวคลีโอไทด์ ส่วนการมิวเตชั่นแบบการแทรกเพิ่ม (insertion) มี 8 นิวคลีโอไทด์ โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มี มีการมิวเตชั่นแบบการขาดหายไป (deletion)และการมิวเตชั่นแบบการแทรกเพิ่ม (insertion) ร่วมกัน 4 นิวคลีโอไทด์ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโครแซทเทลไลท์ DYS393 พบว่า มีการมิวเตชั่นแบบการแทรกเพิ่ม (insertion) มากที่สุด คือ 10 นิวคลีโอไทด์ ขณะที่มีการมิวเตชั่นแบบการขาดหายไป (deletion) มี 8 นิวคลีโอไทด์ ส่วนการมิวเตชั่นแบบการแทนที่เบสกลุ่มเดียวกัน (transition)มี 4 นิวคลีโอไทด์ การมิวเตชั่นแบบการแทนที่ระหว่างเบสต่างกลุ่มกัน (transversion) มี 1 นิวคลีโอไทด์ และมีการมิว

เตชั่นแบบการขาดหายไป (deletion)และการมิวเตชั่นแบบการแทรกเพิ่ม (insertion) ร่วมกัน 4 นิวคลีโอไทด์ ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำกันของไมโครแซทเทลไลท์ DYS 390 คือ ATCT โดยมีซ้ำกัน 6 ชุด หายไป 1 ชุด ขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำกันของไมโครแซทเทลไลท์ DYS 391 คือ ATCT โดยมีซ้ำกัน 9 ชุด หายไป 4 ชุด และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำกันของไมโครแซทเทลไลท์ DYS393 คือ ATCT โดยมีซ้ำกัน 7 ชุด หายไป 5 ชุด

จากการวิจัยพบว่า DYS393 มีความหลากหลายมากที่สุด โดยมีค่า maximum distance เท่ากับ 0.024 และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ตรงกัน 14.72% ขณะที่ DYS390 มีความหลากหลายปานกลาง โดยมีค่า maximum distance เท่ากับ 0.01169 และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ตรงกัน 11.98% ส่วน DYS391 มีความหลากหลายน้อยที่สุด โดยมีค่า maximum distance เท่ากับ 0.0066 และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ตรงกัน 6.10% จากข้อมูลการศึกษาความหลากหลายของไมโครแซเท็ลไลท์และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโครแซเท็ลไลท์ DYS390 DYS391 และDYS393 ในชายไทยนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญในการคัดเลือกไมโครแซเท็ลไลท์ที่เหมาะสมสำหรับชายไทยเพื่อใช้ประกอบการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลได้

2. ข้อเสนอแนะ

2.1 ข้อเสนอแนะจากการวิจัย

2.1.1 กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัยมีจำนวนน้อย ทำให้ไม่สามารถบอกถึงความหลากหลายของประชากรไทยทั้งหมดได้

2.1.2 ข้อจำกัดบางประการที่เป็นอุปสรรคในการวิเคราะห์ลำดับของนิวคลีโอไทด์ของไมโครแซเท็ลไลท์ เช่น ขั้นตอนของการทำพีซีอาร์ ถ้า Reaction mixter ไม่ได้ปริมาณที่เหมาะสม จะทำให้ไม่เกิดแบนด์ดีเอ็นเอ หรือแบนด์ดีเอ็นเอไม่ชัดเจน

2.2 ข้อเสนอแนะในการวิจัยครั้งต่อไป

2.2.1 ควรเพิ่มกลุ่มตัวอย่างให้มีจำนวนเพิ่มมากขึ้น หรือทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในกลุ่มประชากรย่อยที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรม เช่น ประชากรชาวมอญ ชาวเขาเผ่าต่างๆ ชาวไทยมุสลิม รวมทั้งทำการเพิ่มตำแหน่ง ของ Y-STR ให้มากขึ้น ซึ่งข้อมูลเหล่านี้ในอนาคตหากสามารถรวบรวมข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้กับงานวิจัยของท่านอื่นๆ ให้เป็นฐานข้อมูลดีเอ็นเอ ก็น่าจะสามารถให้ประโยชน์และพร้อมที่จะพัฒนาไปเป็นฐานข้อมูลดีเอ็นเอระดับชาติเพื่อใช้อ้างอิงในระดับสากลต่อไป

2.2.2 ในโอกาสต่อไปควรทำ PCR เพื่อยืนยันผลการทดลองอีกครั้ง เนื่องจากการทดลองครั้งนี้อาจมีข้อจำกัดบางประการ

บรรณานุกรม

กรมศิลปากร. เหตุการณ์ธรณีพิบัติจากคลื่นสึนามิ 26 ธันวาคม 2547. ม.ป.ท. กรุงเทพฯ, 2548.

ธานินทร์ ภู่พัฒน์. วิทยาการดีเอ็นเอในงานนิติเวช. เชียงใหม่ : คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2538.

นำชัย ชีววิวรรธน์ และคณะ. ดีเอ็นเอ ปริศนาลับรหัสชีวิต. ปทุมธานี : ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, 2546.

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. พันธุศาสตร์. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.พิมพ์ครั้งที่4. กรุงเทพฯ.

พรทิพย์ โรจนสุนันท์. “ความรู้เบื้องต้น เรื่อง DNA Fingerprint.” บทบัณฑิตย์ 57 (มีนาคม 2544) : 86 – 100.

เพ็ญพรรณ เวชวิทยาขลัง. ความรู้เกี่ยวกับลายพิมพ์ดีเอนเอ. นครปฐม : หน่วยผลิตเอกสารคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร, 2548.

ไพจิตร สวัสดิสาร. “การพิสูจน์ลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ ในศาลในคดีอาญา.” เอกสารการอบรมหลักสูตรผู้บริหารกระบวนการยุติธรรมระดับสูง รุ่นที่ 7 วิทยาลัยการยุติธรรม สำนักงาน ศาลยุติธรรม, 2547.

ไพศาล เหล่าสุวรรณ. พันธุศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ : บริษัทโรงพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช จำกัด, 2535.

เมธวี ศรีคำมูล. การวิเคราะห์โครโมโซม Y แฮโปลไทป์ในกะเหรี่ยงและม้งด้วยไมโครแซทเทลไ [Online]. Accessed 27 December 2008. Available from http://library.cmu.ac.th/ digital_ collection/etheses/detail.php

วรรณา ทองนพคุณ, ชนินทร์ ลิ่มวงศ์ และเพทาย เย็นจิตโสมนัส. สาระน่ารู้อณูพันธุศาสตร์. กรุงเทพฯ : เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น, 2548.

วิชัย บุญแสงและคณะ. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จากสารพันธุกรรมสู่เทคโนโลยีพิสูจน์บุคคล. ปทุมธานี : สำนักงานพัฒนา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2547.

วิมลธรา คำศรี. “การศึกษาความถี่ของอัลลีลและค่าทางสถิติของ 15 AmpFℓSTR identifiler loci ของประชากรไทย.” วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 2548.

วิสุทธิ์ ใบไม้. พันธุศาสตร์ . พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : เอ็นพีซับพลายพริ้นติ้ง, 2536.

สถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย. บทที่ 1 หลักการทางพันธุศาสตร์ [Online]. Accessed 27 April 2007. Available from http://www.learn.in.th/sample/gmodna/chapter1.htm.

สิริสุดา สุทธิสาภร.การวิเคราะห์โครโมโซม Y แฮโปลไทป์ในเย้าและลาฮู ด้วยไมโครแซทเทลไลท์ [Online]. Accessed 27 December 2008. Available from http://library.cmu.ac.th/digital_collection/ etheses/detail.php

อมรา คัมภิรานนท์. พันธุศาสตร์มนุษย์. พิมพ์ครั้งที่ 2.บริษัท เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด. กรุงเทพฯ.2546

อรรถพล แช่มสุวรรณวงศ์และคณะ. นิติวิทยาศาสตร์เพื่อการสืบสวนสอบสวน 2 . พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : บริษัท ทีซีจี พริ้นติ้ง จำกัด, 2546.

อรรถพล แช่มสุวรรณวงศ์และคณะ. นิติวิทยาศาสตร์เพื่อการสืบสวนสอบสวน 4. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : บริษัท ทีซีจี พริ้นติ้ง จำกัด, 2546.

อัญชลี ก่องศรีสุข. “ข้อมูลพื้นฐานของตำแหน่งช็อทแทนเดมรีพีท เพื่อประยุกต์ใช้ในการพิสูจน์บุคคลและความเป็นพ่อลูก.” วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2541.

เอกดนัย กอกิมพงษ์. Thermal Cycler เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยวิธี PCR [Online]. Accessed 14 September 2006. Available from http://www.thaiscience.com/lab_vol/p22/Thermal_Cycler.asp

Bianchi,Catanessi C. “Characterization of ancestral and derived Y-chromosome haplotype of new world native population.” Am J.Hum.Genet.,63,1862-1871

Butler, John M. Aspects of Forensic DNA Typing [Online]. Accessed 10 January 2009. Available from http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/FDT2e.htm.

Chang, En Pu et al. “Genetic variation at nine STR loci in populations from the Philippines and Thailand living in Taiwan.” Forensic Science International 106 (1999) : 1- 6.

Horst,Forster P. “Traces of ancestral Australian/Pupuan Y-pool on the Asian main land.” Am J.Hum.Genet.,65(supplement)

Kayser,Caglia A. “Evaluation of Y-chromosome STR”: a multicenter study. Int. J.Legal.Med, 110,125-133

Krawozak,Roewer L. “Frequency estimation for rare Y-chromosomal haplotype.” Am J.Hum.Genet.,65(supplement)

QIAGEN. QIAamp$^{®}$ DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit Handbook. n.p., 2001.

Sueblinvong, Tada., and Unchalee Kongsrisook. “Population data of 8 short tandem repeat loci in the Thai population.” Forensic Science International 103 (1999) : 199 – 205.

Tamura K,Dudley J,Nei M &Kumar.(2007)MEGA4: Molecular Evolutionary Genetic Analysis[Online]. Accessed 26 May 2009. Available from http://www.kumarlab.net/pubication.

Tereba, Allan. “Tool for analysis of population statistics.” Profiles in DNA 2; no. 3 (1999): 14-16.

University of Illinois at Chicago. Replication [Online]. Accessed 12 January 2009. Available from http://www.uic.edu/classes/phar/phar331/lecture4.

Available from http:// www.ebi.ac.uk(Accessed 10 February, 2009)

Available from http:// www.phylip.com(Accessed 10 February, 2009)

Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov (Accessed 10 February, 2009)

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างเลือด

การเตรียม EDTA 0.5 M

ชั่งสาร EDTA-$2H_2O$ 186.1 g ละลายในน้ำกลั่น 800 ml เติมเกล็ด NaOH 15 - 20 g เมื่อเกล็ด NaOH ละลายหมด ให้ปรับ pH เป็น 8.0 ด้วยสารละลาย NaOH และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น นำเข้า autoclave จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. การเตรียมสารเคมีในชุดสกัดดีเอ็นเอ QIAamp® DNA mini kit

2.1 การเตรียม QIAGEN Protease stock solution

เมื่อจะใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป QIAamp DNA Blood Mini Kit ให้เติม protease solvent (nuclease-free water ที่ประกอบด้วย 0.04% sodium azide) ปริมาณ 1.2 ml (ขนาด 50 คอลัมน์) หรือปริมาณ 5.5 ml (ขนาด 250 คอลัมน์) ลงในหลอด QIAGEN Protease แล้วผสมให้เข้ากัน หากเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 2–8 องศาเซลเซียส จะสามารถใช้ได้นาน 2 เดือน แต่ถ้าเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส จะเก็บรักษาได้ยาวนานขึ้น

2.2 การเตรียมบัพเฟอร์ AL

ก่อนนำมาใช้ควรเขย่าให้สารผสมเป็นเนื้อเดียวกัน สามารถเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง (15–25 องศาเซลเซียส) ได้นาน 1 ปี เมื่อนำมาใช้ไม่ควรเติม QIAGEN Protease หรือ Proteinase K ลงในบัพเฟอร์ AL โดยตรง

2.3 การเตรียมบัพเฟอร์ AW1

บัพเฟอร์ AW1 ที่อยู่ในชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปเป็นบัพเฟอร์แบบเข้มข้น ก่อนนำมาใช้ในครั้งแรกจึงต้องเติม ethanol (96–100%) ลงในขวด โดยเติมปริมาณ 25 ml สำหรับขนาด 50 คอลัมน์ หรือปริมาณ 125 ml สำหรับขนาด 250 คอลัมน์ จากนั้นเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.4 การเตรียมบัพเฟอร์ AW2

บัพเฟอร์ AW2 ที่อยู่ในชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปเป็นบัพเฟอร์แบบเข้มข้น ก่อนนำมาใช้ในครั้งแรกจึงต้องเติม ethanol (96–100%) ลงในขวด โดยเติมปริมาณ 30 ml สำหรับขนาด 50 คอลัมน์ หรือปริมาณ 160 ml สำหรับขนาด 250 คอลัมน์ จากนั้นเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นาน 1 ปี

ภาคผนวก ข

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไทย จำนวน 10 ตัวอย่าง

ผลการทำ Sequencing ของไมโครแซทเทลไลท์ DYS390

>AF140636
TATATTTTACACTTTTGGGCCCTGCATTTTGGTACCCCATAATATATTCTATCTATCTGTCTGTCTGTC
TGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTGTCTATCTATCT
ATCTATCATCTATCTATCTTTCCTTGTTTCTGAGTATACACATTGCAATGTGTTCATTTTACTGTCA

>DYS390-BK1
TATATTTTACACTTTTGGGCCCTGCATTTTGGTACCCCATAATATATTCTATCTATCTGTCTGTCTGTC
TGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTGTCTATCTATCTATCT
ATCATCTATCTATCTTTCCTTGTTTCTGAGTATACACATTGCAATGTGTTCATTTTACTGTCA

>DYS390-BK2
TATATTTTACACTTTTGGGCCCTGCATTTTGGTACCCCATAATATATTCTATCTATCTGTCTGTCTGTC
TGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTGTCTATCTATCTATCTATCA
TCTATCTATCTTTCCTTGTTTCTGAGTATACACATTGCAATGTGTTCATTTTACTGTCA

>DYS390-BK3
TATATTTTACACTTTTGGGCCCTGCATTTTGGTACCCCATAATATATTCTATCTATCTGTCTGTCTGTC
TGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTCTATCTATATCTATCTGTCT
ATCTATCTATCTATCATCTATCTATCTTTCCTTGTTTCTGAGTATACACATTGCAATGTGTTCATTTTA
CTGTCA

>DYS390-CM1
TATATTTTACACTTTTGGGCCCTGCATTTTGGTACCCCATAATATATTCTATCTATCTGTCTGTCTGTC
TGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTGTCTATCT
ATCTATCTATCATCTATCTATCTTTCCTTGTTTCTGAGTATACACATTGCAATGTGTTCATTTTACTGT
CA

>DYS390-CM2
TATATTTTACACTTTTGGGCCCTGCATTTTGGTACCCCATAATATATTCTATCTATCTGTCTGTCTGTC
TGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTCTATCTATCTATATCTATCTATCTGTCTATCT
ATCTATCTATCATCTATCTATCTTTCCTTGTTTCTGAGTATACACATTGCAATGTGTTCATTTTACTGT
CA

>DYS390-NP1
TATATTTTACACTTTTGGGCCCTGCATTTTGGTACCCCATAATATATTCTATCTATCTGTCTGTCTGTC
TGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTGTCTATCTATCTATCT
ATCATCTATCTATCTTTCCTTGTTTCTGAGTATACACATTGCAATGTGTTCATTTTACTGTCA

>DYS390-NP2
TATATTTTACACTTTTGGGCCCTGCATTTTGGTACCCCATAATATATTCTATCTATCTGTCTGTCTGTC
TGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTGTCTATCTATCT
ATCTATCATCTATCTATCTTTCCTTGTTTCTGAGTATACACATTGCAATGTGTTCATTTTACTGTCA

>DYS390-NP3
TATATTTTACACTTTTGGGCCCTGCATTTTGGTACCCCATAATATATTCTATCTATCTGTCTGTCTGTC
TGTCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCT
GTCTATCTATCTATCTATCATCTATCTATCTTTCCTTGTTTCTGAGTATACACATTGCAATGTGTTCAT
TTTACTGTCA

```
>DYS390-NS1
TATATTTTACACTTTTGGGCCCTGCATTTTGGTACCCCATAATATATTCTATCTATCTGTCTGTCTGTC
TGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTGTCTATCTATCT
ATCTATCATCTATCTATCTTTCCTTGTTTCTGAGTATACACATTGCAATGTGTTCATTTTACTGTCA

>DYS390-NS2
TATATTTTACACTTTTGGGCCCTGCATTTTTGGTACCCCATAATATATTCTATCTATCTGTCTGTCTGT
CTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTGTCTATCTATC
TATCTATCATCTATCTATCTTTCCTTGTTTCTGAGTATACACATTGCAATGTGTTCATTTTACTGTCA
```

ผลการทำ Sequencing ของไมโครแซทเทลไลท์ DYS391

```
>AF140637
CTATTCATTCAATCATACACCCATATCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTA
TCTATCTATCTGCCTATCTGCCTGCCTACCTATCCCTCTATGGCAATTGCTTGCAACCAGGGAGATTT
TATTCCCAGGAGATATTTGGCTATGTCTGACAACAATTTTTTTGGTTGTCACAAATGGGATGAATGTT
ACTGGCATCTGGTGGGTGGAGCCCAGAGATGCTGCTCAACACCCTACAGTGCACAAGACAGACCCAC
CACAAAGAATC

>DYS391-BK1
CTATTCATTCAATCATACACCCATATCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTA
TCTATCTATCTATCTATCTATCTGCCTATCTGCCTGCCTACCTATCCCTCTATGGCAATTGCTTGCAAC
CAGGGAGATTTTATTCCCAGGAGATATTTGGCTATGTCTGACAACAATTTTTTTGGTTGTCACAAATG
GGATGAATGTTACTGGCATCTGGTGGGTGGAGCCCAGAGATGCTGCTCAACACCCTACAGTGCACAA
GACAGACCCACCACAAAGAATC

>DYS391-BK2
CTATTCATTCAATCATACACCCATATCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTA
TCTATCTATCTATCTGCCTATCTGCCTGCCTACCTATCCCTCTATGGCAATTGCTTGCAACCAGGGAG
ATTTTATTCCCAGGAGATATTTGGCTATGTCTGACAACAATTTTTTTGGTTGTCACAAATGGGATGAA
TGTTACTGGCATCTGGTGGGTGGAGCCCAGAGATGCTGCTCAACACCCTACAGTGCACAAGACAGAC
CCACCACAAAGAATC

>DYS391-BK3
CTATTCATTCAATCATACACCCATATCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTA
TCTATCTATCTGCCTATCTGCCTGCCTACCTATCCCTCTATGGCAATTGCTTGCAACCAGGGAGATTT
TATTCCCAGGAGATATTTGGCTATGTCTGACAACAATTTTTTTGGTTGTCACAAATGGGATGAATGTT
ACTGGCATCTGGTGGGTGGAGCCCAGAGATGCTGCTCAACACCCTACAGTGCACAAGACAGACCCAC
CACAAAGAATC

>DYS391-CM1
CTATTCATTCAATCATACACCCATATCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTA
TCTATCTATCTATCTGCCTATCTGCCTGCCTACCTATCCCTCTATGGCAATTGCTTGCAACCAGGGAG
ATTTTATTCCCAGGAGATATTTGGCTATGTCTGACAACAATTTTTTTGGTTGTCACAAATGGGATGAA
TGTTACTGGCATCTGGTGGGTGGAGCCCAGAGATGCTGCTCAACACCCTACAGTGCACAAGACAGAC
CCACCACAAAGAATC
```

>DYS391-CM2
CTATTCATTCAATCATACACCCATATCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTA
TCTATCTATCTGCCTATCTGCCTGCCTACCTATCCCTCTATGGCAATTGCTTGCAACCAGGGAGATTT
TATTCCCAGGAGATATTTGGCTATGTCTGACAACAATTTTTTTGGTTGTCACAAATGGGATGAATGTT
ACTGGCATCTGGTGGGTGGAGCCCAGAGATGCTGCTCAACACCCTACAGTGCACAAGACAGACCCAC
CACAAAGAATC

>DYS391-NP1
CTATTCATTCAATCATACACCCATATCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTA
TCTATCTATCTGCCTATCTGCCTGCCTACCTATCCCTCTATGGCAATTGCTTGCAACCAGGGAGATTT
TATTCCCAGGAGATATTTGGCTATGTCTGACAACAATTTTTTTGGTTGTCACAAATGGGATGAATGTT
ACTGGCATCTGGTGGGTGGAGCCCAGAGATGCTGCTCAACACCCTACAGTGCACAAGACAGACCCAC
CACAAAGAATC

>DYS391-NP2
CTATTCATTCAATCATACACCCATATCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTA
TCTATCTATCTATCTATCTGCCTATCTGCCTGCCTACCTATCCCTCTATGGCAATTGCTTGCAACCAG
GGAGATTTTATTCCCAGGAGATATTTGGCTATGTCTGACAACAATTTTTTTGGTTGTCACAAATGGGA
TGAATGTTACTGGCATCTGGTGGGTGGAGCCCAGAGATGCTGCTCAACACCCTACAGTGCACAAGAC
AGACCCACCACAAAGAATC

>DYS391-NP3
CTATTCATTCAATCATACACCCATATCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTA
TCTATCTATCTGCCTATCTGCCTGCCTACCTATCCCTCTATGGCAATTGCTTGCAACCAGGGAGATTT
TATTCCCAGGAGATATTTGGCTATGTCTGACAACAATTTTTTTGGTTGTCACAAATGGGATGAATGTT
ACTGGCATCTGGTGGGTGGAGCCCAGAGATGCTGCTCAACACCCTACAGTGCACAAGACAGACCCAC
CACAAAGAATC

>DYS391-NS1
CTATTCATTCAATCATACACCCATATCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTA
TCTATCTGCCTATCTGCCTGCCTACCTATCCCTCTATGGCAATTGCTTGCAACCAGGGAGATTTTATT
CCCAGGAGATATTTGGCTATGTCTGACAACAATTTTTTTGGTTGTCACAAATGGGATGAATGTTACTG
GCATCTGGTGGGTGGAGCCCAGAGATGCTGCTCAACACCCTACAGTGCACAAGACAGACCCACCACA
AAGAATC

>DYS391-NS2
CTATTCATTCAATCATACACCCATATCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTA
TCTATCTATCTATCTATCTGCCTATCTGCCTGCCTACCTATCCCTCTATGGCAATTGCTTGCAACCAG
GGAGATTTTATTCCCAGGAGATATTTGGCTATGTCTGACAACAATTTTTGGTTGTCACAAATGGGAT
GAATGTTACTGGCATCTGGTGGGTGGAGCCCAGAGATGCTGCTCAACACCCTACAGTGCACAAGACA
GACCCACCACAAAGAATC

ผลการทำ Sequencing ของไมโครแซทเทลไลท์ DYS393

```
>AF140639
AACTCAAGTCCAAAAAATGAGGTATGTCTCATAGAAAAGACATACATATCTATCTATCTA
TCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTGTATTGACACAAGTAGAAGACCAC

>DYS393-BK1
AACTCAAGTCCAAAAAATGAGGTATGTCTCATAGAAAAGACATACATATCTATCTATCTATCTATCTA
TCTATCTATCTATCTATCTATCTGTATTGACACAAGTAGAAGACCAC

>DYS393-BK2
AACTCAAGTCCAAAAAATGAGGTATGTCTCATAGAAGACATACATATCTATCTATCTATCTATCTATCT
ATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTGTATTGACACAAGTAGAAGACCAC

>DYS393-BK3
AACTCAAGTCCAAAAAATGAGGTATGTCTCATAGAAAAGACATACATATCTATCTATCTATCTATCTA
TCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTGTATTGACACAAGTAGAAGACCAC

>DYS393-CM1
AACTCAAGTCCAAAAAATGAGGTATGTCTCATAGAAAAGACATACATATCTATCTATCTATCTATCTA
TCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTGTATTGACACAAGTAGAAGACCAC

>DYS393-CM2
AACTCAAGTCCAAAAAATGAGGTATGTCTCATAGAAAAGACATACATATCTATCTATCTATCTATCTA
TCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTGTATTGACACAAGTAGAAGACCAC

>DYS393-NP1
AACTCAAGTCCAAAAAATGAGGTATGTCTCATAGAAAAGACATACATATCTATCTATCTATCTATCTA
TCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTGTATTGACACAAGTAGAAGACCAC

>DYS393-NP2
AACTCAAGTCCAAAAAATGAGGTATGTCTCATAGAAAAGACATACATATCTATCTATCTATCTATCTA
TCTATCTATCTATCTATCTATCTGTATTGACACAAGTAGAAGACCAC

>DYS393-NP3
AACTCAAGTCCAAAAAATGAGGTATGTCTCATAGAAGACATACATATCTATCTATCTATCTATCTATCT
ATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTGTATTGACACAAGTAGAAGACCAC

>DYS393-NS1
AACTCAAGTCCAAAAAATGAGGTATGTCTCATAGAAAAGACATACATATCTATCTATCTATCTATCTA
TCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTGTATTGACACAAGTAGAAGACCAC

>DYS393-NS2
AACTCAAGTCCAAAAAATGAGGTATGTCTCATAGAAAAGACATACATATCTATCTATCTATCTATCTA
TCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTGTATTGACACAAGTAGAAGACCAC
```

ผลการคำนวณระยะห่าง(distance) ของความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลท์ DYS390

```
(
(
(
(
AF140636:-0.00052,
(
DYS390-CM2:0.00564,
DYS390-NP3:-0.00086)
:0.00545)
:0.00026,
DYS390-NP2:-0.00026)
:0.00013,
(
(
DYS390-BK2:-0.00067,
DYS390-NS2:0.00067)
:0.00030,
DYS390-NP1:-0.00030)
:0.00021)
:0.00000,
(
DYS390-BK1:-0.00041,
(
DYS390-BK3:-0.00015,
DYS390-CM1:0.00015)
:0.00041)
:0.00026,
DYS390-NS1:-0.00026);
```

ผลการคำนวณระยะห่าง(distance) ของความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลท์ DYS391

```
(
(
(
(
(
AF140637:0.00000,
(
(
(
(
DYS391-BK1:-0.00314,
DYS391-NS2:0.00314)
:0.00176,
DYS391-NP2:-0.00176)
:0.00175,
DYS391-BK2:0.00000)
:0.00000,
DYS391-CM1:0.00000)
:0.00000)
:0.00000,
DYS391-BK3:0.00000)
:0.00000,
DYS391-CM2:0.00000)
:0.00000,
DYS391-NP1:0.00000)
:0.00000,
DYS391-NP3:0.00000,
DYS391-NS1:0.00000);
```

ผลการคำนวณระยะห่าง(distance) ของความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลท์ DYS393

```
(
(
(
(
(
(
(
(
AF140639:-0.00149,
(
DYS393-BK2:0.00271,
DYS393-NP3:-0.00271)
:0.01830)
:0.00085,
DYS393-CM1:-0.00085)
:0.00050,
DYS393-NP1:-0.00050)
:0.00030,
DYS393-NS2:-0.00030)
:0.00020,
DYS393-BK1:-0.00016)
:0.00011,
DYS393-NP2:-0.00011)
:0.00011,
DYS393-BK3:0.00000)
:0.00000,
DYS393-CM2:0.00000,
DYS393-NS1:0.00000);
```

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-ชื่อสกุล นางสาวตุลยาภรณ์ อัครพัฒน์

ที่อยู่ 159 หมู่ 1 ซอยโพธาราม ถนนโรจนะ ต. ไผ่ลิง
อ.พระนครศรีอยุธยา จ.พระนครศรีอยุธยา 13000

ประวัติการศึกษา

พ.ศ.2549 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพยาบาล วิทยาลัยพยาบาลบรมราชชนนี นพรัตน์วชิระ สถาบันสมทบมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการทำงาน

พ.ศ.2550 พยาบาลวิชาชีพ แผนกผู้ป่วยนอกโรคผิวหนัง โรงพยาบาลพญาไท 1

พ.ศ.2550-2551 พยาบาลวิชาชีพ ประจำห้องพยาบาล บริษัทนิเดค อิเล็กโทรนิกส์(ประเทศไทย) จำกัด

พ.ศ.2551-ปัจจุบัน พยาบาลวิชาชีพ แผนก Haelth care TRIA integrative wellness โรงพยาบาลปิยะเวท