

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



250627

การระบุดีเอ็นเอของสุกรด้วยการวิเคราะห์
ยีนไซโตโครมบีในไมโทคอนเดรีย

ศิวพร อินทะหล่อ

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
มีนาคม 2555



250627

การระบุดีเอ็นเอของสุกรด้วยการวิเคราะห์
ยีนไซโครมบีในไมโทคอนเดรีย

ศิวพร อินทะหล่อ

การค้นคว้าแบบอิสระนี้เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัยเพื่อเป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
มีนาคม 2555

การระบุดีเอ็นเอของสุกรด้วยการวิเคราะห์ยีนไซโตโครมบีในไมโทคอนเดรีย

ศิวพร อินตะหล่อ

การค้นคว้าแบบอิสระนี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

คณะกรรมการสอบการค้นคว้าแบบอิสระ

อาจารย์ที่ปรึกษาการค้นคว้าแบบอิสระ

.....ประธานกรรมการ

.....

ศ.นพ.ชานินทร์ ภูพัฒน์

ศ.พญ.เลิศลักษณ์ ภูพัฒน์

.....กรรมการ

ศ.พญ.เลิศลักษณ์ ภูพัฒน์

.....กรรมการ

พ.ต.อ.วันชัย จันทชล

6 มีนาคม 2555

© ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กิตติกรรมประกาศ

การค้นคว้าแบบอิสระนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก ศาสตราจารย์แพทย์หญิง เลิศลักษณ์ ภูพัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาการค้นคว้าแบบอิสระและศาสตราจารย์นายแพทย์ธานีทร ภูพัฒน์ ผู้ซึ่งกรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษา และตรวจแก้ไขจนการค้นคว้าแบบอิสระเสร็จสมบูรณ์ ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์นายแพทย์ธานีทร ภูพัฒน์ ศาสตราจารย์แพทย์หญิง เลิศลักษณ์ ภูพัฒน์ และ พ.ศ.อ.วันชัย ฉันทชล ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบการค้นคว้าแบบอิสระ และขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่กรุณาให้คำแนะนำเป็นอย่างดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์แพทย์หญิงเลิศลักษณ์ ภูพัฒน์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่สำหรับการศึกษาค้นคว้า ให้คำแนะนำ และตรวจแก้ไขการค้นคว้าแบบอิสระ คุณพัชรินทร์ มหาวงศ์ คุณสุทัศน์ ศรีดวงแก้ว เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการนิติพันธุศาสตร์ ที่ช่วยให้คำปรึกษาแนะนำเกี่ยวกับการทำงาน และขอขอบคุณคุณอัญญรัตน์ บุญชูวิทย์ เจ้าหน้าที่ประสานงานสาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ที่คอยช่วยประสานงานกับทางมหาวิทยาลัย

ขอขอบความภาคภูมิใจทั้งหมดนี้ให้แก่สมาชิกในครอบครัวทุกคน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง คุณพ่อ คุณแม่ และน้องสาว ที่เป็นทั้งชีวิต จิตวิญญาณและแรงบันดาลใจให้แก่ผู้เขียน รวมทั้ง โอ นายมานะชัย ชัชวาลกิจกุล ที่ช่วยให้คำปรึกษาเกี่ยวกับความรู้ทางสถิติเพื่อการค้นคว้าแบบอิสระในครั้งนี้ตลอดจนความรักและกำลังใจที่มีให้กันเสมอมา

ขอบคุณเพื่อนๆนิติวิทยาศาสตร์ทุกคนที่ได้ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำค้นคว้าแบบอิสระครั้งนี้รวมทั้งน้องๆที่ได้มาร่วมทุกข์ร่วมสุขกัน น้องดัน น้องแหม่ม รุ่น3 ขอขอบคุณสำหรับความรู้ด้านวิทยาศาสตร์ทั้งหลายที่ช่วยสอนพี่คนนี้ และมีรูปภาพที่แสนดี

ท้ายที่สุดนี้ หากมีสิ่งขาดตกบกพร่องหรือผิดพลาดประการใด ผู้เขียนขออภัยเป็นอย่างสูงในข้อบกพร่องและความผิดพลาดนั้น และผู้เขียนหวังว่าการค้นคว้าแบบอิสระนี้จะมีประโยชน์สำหรับหน่วยงานที่เกี่ยวข้องบ้างไม่มากก็น้อย

ชื่อเรื่องการค้นคว้าแบบอิสระ

การระบุดีเอ็นเอของสุกรด้วยการวิเคราะห์ยีน
ไซโตโครมบีในไมโทคอนเดรีย

ผู้เขียน

นางสาวศิวพร อินตะหล่อ

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (นิติวิทยาศาสตร์)

อาจารย์ที่ปรึกษาการค้นคว้าแบบอิสระ

ศาสตราจารย์แพทย์หญิง เลิศลักษณ์ ภูพัฒน์

บทคัดย่อ

250627

การตรวจพิสูจน์หลักฐานทางชีวภาพด้วยการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอเพื่อระบุว่าเป็นสัตว์ชนิดใดนั้นมีบทบาทสำคัญไม่น้อยในงานนิติวิทยาศาสตร์ ดังเช่น ในคดีที่มีสัตว์เข้าไปเกี่ยวข้อง หรือคดีเกี่ยวกับกฎหมายคุ้มครองผู้บริโภคที่มีการปลอมปน และแสดงฉลากไม่ถูกต้อง ซึ่งโดยทั่วไปแล้วนิยมตรวจวิเคราะห์จากดีเอ็นเอในนิวเคลียส ทั้งนี้นอกจากดีเอ็นเอในนิวเคลียสแล้วยังสามารถพบดีเอ็นเอบนยีนไซโตโครมบีในไมโทคอนเดรีย ซึ่งรหัสของดีเอ็นเอบริเวณนี้มีความจำเพาะสำหรับสัตว์ในแต่ละชนิดและสามารถใช้ได้ดีในกรณีของตัวอย่างที่มีอายุยาวนานซึ่งมักจะไม่มีดีเอ็นเอในนิวเคลียสเหลือเพียงพอที่จะตรวจสอบได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและทดสอบวิธีการที่มีความจำเพาะเจาะจงในการระบุสารพันธุกรรมของสุกรด้วยการวิเคราะห์จากยีนไซโตโครมบีในไมโทคอนเดรีย โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ที่มีประสิทธิภาพต่อลำดับดีเอ็นเอบนยีนไซโตโครมบีในไมโทคอนเดรียของสุกร โดยเฉพาะและทำการเก็บตัวอย่างเนื้อสุกรจากตลาดในเขตภาคเหนือตอนบนของประเทศไทยจำนวน 70 ตัวอย่างมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Chelex Method จากนั้นจึงทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยเทคนิค PCR และตรวจสอบผลด้วย agarose gel electrophoresis แล้วจึงทำการทดสอบกับมนุษย์ ปลา ไก่ และวัว อย่างละ 18 ตัวอย่างในวิธีการเดียวกัน ผลคือสามารถตรวจพบดีเอ็นเอของสุกรทั้งหมดจำนวน 70 ตัวอย่าง บนตำแหน่งซึ่งตรงกับที่กำหนดไว้คือขนาดประมาณ 135 bp ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าไพรเมอร์และวิธีการที่ใช้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการระบุสารพันธุกรรมของสุกรได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีความจำเพาะเจาะจงกับสุกรได้เป็นอย่างดี

Independent Study Title	Identification of <i>Sus domestica</i> 's DNA by Analysis of the Mitochondrial Cytochrome b Gene
Author	Miss. Sivaporn Intalaw
Degree	Master of Science (Forensic Science)
Independent Study Advisor	Prof. Lertlakana Bhoopat, M.D.

Abstract

250627

The identification of biological evidences using DNA analysis to determine of animal species has become an important role in forensic science. The condition against the consumer protection laws such as the meat products may be adulterated by other animals which were not shown in the label need to be proved by identifying species of meat contents. In general, most of forensic DNA analysis was emphasized on nuclear DNA. However, mitochondrial DNA can also be another source for forensic analysis especially cytochrome b gene of which the DNA sequence shows a specific order for animal species. Since the target DNA sequence is on mitochondria so it can be used for analysis even in the old aged or degraded samples. This research aims to develop the test which specifically identify of *Sus domestica* DNA in mitochondrial cytochrome b gene. The newly designed primers were used to effectively anneal to the DNA sequence in cytochrome b gene of pig particularly. 70 pork meat samples collected from markets in the upper north of Thailand were extracted for DNA using Chelex Method. Then, the DNA samples were amplified by PCR technique and the amplicons were analysed by agarose gel electrophoresis. After electrophoresis, we expected a DNA band of 135 base pairs in size for the positive result. 18

DNA samples from each species including human, fish, chicken and cow were tested for specificity of the technique. The result showed that only pig DNA could give a positive reaction, therefore, we concluded that the PCR technique using our newly designed primers can be applied for identification of *Sus domestica* DNA effectively and specifically.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญภาพ	ฌ
อักษรย่อและสัญลักษณ์	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร	7
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	28
บทที่ 4 ผลการวิจัย	35
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง	45
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง	47
บรรณานุกรม	48
ภาคผนวก	50
ภาคผนวก ก	51
ภาคผนวก ข	53
ภาคผนวก ค	57
ภาคผนวก ง	59
ประวัติผู้เขียน	62

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	แสดงผลการตรวจดีเอ็นเอของสุกรด้วยยีนไซโตโครมบีในไมโทคอนเดรีย	37
2	แสดงผลการตรวจสอบกับตัวอย่างของมนุษย์และสัตว์อื่นๆ	40
3	แสดงความจำเพาะของวิธีการที่ใช้ในการระบุดีเอ็นเอของสุกรด้วยการวิเคราะห์ยีนไซโตโครมบี (Cyt b Sus Domestica)	44
4	ช่วงขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอที่แยกได้โดยเจลอะกาโรส	55

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
1 โครงสร้างทางเคมีของน้ำตาลเพนโทสที่เป็นองค์ประกอบในดีเอ็นเอคือ ดีออกซีไรโบส (Deoxyribose) และในอาร์เอ็นเอคือไรโบส (Ribose)	8
2 โครงสร้างทางเคมีของไนโตรจีนัสเบสชนิดเบสพิวรีนและไพริมิดีน	9
3 ลักษณะพอลินิวคลีโอไทด์สายเดี่ยวของ RNA และพอลินิวคลีโอไทด์สายคู่ของ DNA	10
4 โครงสร้างเกลียวฮีลิกซ์ของดีเอ็นเอแสดงพันธะไฮโดรเจนระหว่างคู่เบส (AT หรือ GC)	10
5 การจัดตัวของสายพอลินิวคลีโอไทด์สองสายของดีเอ็นเอไปในทิศทางตรงกันข้าม	11
6 องค์ประกอบภายในเซลล์ยูแคริโอต	13
7 โครงสร้างภายในของไมโทคอนเดรีย	14
8 แสดงลักษณะดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย	15
9 ผังของยีนต่างๆ ในยีนอมของไมโทคอนเดรีย	17
10 รูปร่างของไซโตโครม	18
11 ไซโตโครมบนเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย	18
12 แสดงผลผลิต PCR จากการตรวจกับตัวอย่างดีเอ็นเอของสุกรเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp	35
13 แสดงลักษณะแถบดีเอ็นเอใน Agarose gel ที่ตรวจพบของตัวอย่างสุกรเทียบกับตัวอย่างซึ่งเป็นมนุษย์และสัตว์ชนิดอื่น	36
14 สูตรโครงสร้างของ Agarose	53

อักษรย่อและสัญลักษณ์

°C	=	องศาเซลเซียส
g	=	กรัม
μl	=	ไมโครลิตร
%	=	เปอร์เซ็นต์
ml	=	มิลลิลิตร
mg	=	มิลลิกรัม
mM	=	มิลลิโมลาร์
DNA	=	Deoxyribonucleic Acid
mtDNA	=	Mitochondrial DNA
Cyt b	=	Cytochrome b
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
bp	=	Base Pair