บทที่ 1

ส่วนนำ

1. ผู้ร่วมโครงการ

1.1 ร้อยโทหญิง สายศิริ มีระเสน หัวหน้าโครงการ

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

E-mail: saisirim@gmail.com, saisirim@nu.ac.th

1.2 นางสาวอุรศรี สูยะศุนานนท์ ผู้ร่วมโครงการ

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

2. หน่วยงานที่รับผิดชอบ

2.1 หน่วยงานหลัก

คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก

2.2 หน่วยงานสนับสนุน

2.2.1 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก

2.2.2. สถาบันนิติวิทยาศาสตร์ กระทรวงยุติธรรม กรุงเทพมหานคร

2.2.3 สำนักงานวิทยาการตำรวจ สำนักงานตำรวจแห่งชาติ กรุงเทพมหานคร

3. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

กลุ่มจังหวัดภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย ประกอบไปด้วย 9 จังหวัดคือ ตาก พิษณุโลก สุโขทัย เพชรบูรณ์ พิจิตร กำแพงเพชร นครสวรรค์ และอุทัยธานี เป็นพื้นที่ศูนย์กลางการคมนาคมของภาคเหนือ มีส้นทางเชื่อมต่อกับหลายจังหวัดทั้งภาคเหนือและภาคกลาง นอกจากนี้ยังมีเขตเชื่อมต่อกับประเทศเพื่อนบ้านคือพม่า และลาว ทำให้พื้นที่จังหวัดภาคเหนือตอนล่าง เป็นพื้นที่ที่มีความหลากหลายของประชากร ทั้งที่อยู่อาศัยอย่างถาวร

และอพยพโยกย้ายไปมาระหว่างพื้นที่ ทำให้พื้นที่นี้เป็นพื้นที่ที่น่าสนใจในการศึกษาพันธุศาสตร์ของประชากร โดยในปัจจุบันดีเอ็นเอเครื่องหมายที่นิยมใช้ในการศึกษาพันธุศาสตร์ของประชากรมีเป็นจำนวนมาก แต่การศึกษาในประชากรของประเทศไทยยังมีไม่มากนัก ในงานวิจัยฉบับนี้ให้ความสนใจกับดีเอ็นเอเครื่องหมาย 2 ชนิด คือดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียและดีเอ็นจากโครโมโซมวาย ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรดังกล่าว นอกจากจะใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่ใช้เปรียบเทียบและอ้างอิงกับงานวิจัยเชิงพันธุศาสตร์ประชากรในประชากรอื่นๆ ในภูมิภาคแล้ว ยังสามารถใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงในงานทางนิติวิทยาศาสตร์ได้อีกด้วย

4. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

4.1 เพื่อศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรม (genetic structure) ของประชากรในเขตภาคเหนือตอนล่างและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetics) ของประชากรกลุ่มต่างๆ

4.2 เพื่อใช้จำแนกความแตกต่างระหว่างประชากรไทยกับผู้ลักลอบเข้าเมือง แรงงานต่างด้าว และแรงงานต่างถิ่นที่เข้ามาในประเทศอย่างผิดกฎหมาย ซึ่งอาจก่อความไม่สงบภายในประเทศไทย และเป็นประโยชน์ต่อกระบวนการยุติธรรม

4.3 เพื่อใช้เป็นข้อมูลทางพันธุกรรมที่ช่วยให้เข้าใจวิวัฒนาการ พยาธิสภาพของโรคทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับไมโตคอนเดรีย และโครโมโซมวายในประชากรภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย

5. คำสำคัญ (keywords) ของโครงการวิจัย

Phylogenetic relationship, DNA polymorphisms, mitochondrial DNA, Y-chromosome, Thai populations

ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ, ดีเอ็นเอโพลิมอร์ฟิสม, ดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรีย, โครโมโซมวาย, ประชากรไทย

6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

6.1 มีฐานข้อมูลความแปรผันของลำดับเบสของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ และโครโมโซมวาย รูปแบบความชี้จำเพาะของลำดับเบส (haplotype) ในประชากรภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย

6.2 สามารถเผยแพร่ผลงานวิจัยในวารสารต่างประเทศ เพื่อเป็นข้อมูลในการนำไปตรวจพิสูจน์บุคคลและความสัมพันธ์ทางเครือญาติของคนไทยภาคเหนือตอนล่าง และแรงงานต่างด้าว

6.3 สถาบันนิติวิทยาศาสตร์ กระทรวงยุติธรรม. สำนักงานวิทยาการตำรวจ สำนักงานตำรวจแห่งชาติ มีฐานข้อมูลของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่สามารถนำใช้ตรวจพิสูจน์บุคคล และความสัมพันธ์ทางเครือญาติร่วมกัน

6.4 สำนักบริหารแรงงานต่างด้าว กรมการจัดหางาน กระทรวงแรงงานมีข้อมูลที่ช่วยในการพิสูจน์เชื้อชาติแรงงานต่างด้าวได้

บทที่ 2

การตรวจสอบเอกสารที่เกี่ยวข้อง

1. ประชากรในพื้นที่ภาคเหนือตอนล่างและการศึกษาพันธุศาสตร์ของประชากร

กลุ่มจังหวัดภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย ประกอบไปด้วย 9 จังหวัดคือ ตาก พิษณุโลก สุโขทัย เพชรบูรณ์ พิจิตร กำแพงเพชร นครสวรรค์ และอุทัยธานี (จำแนกตามคณะกรรมการพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ) โดยมีจังหวัดพิษณุโลกเป็นศูนย์กลางคมนาคมที่มีเส้นทางติดต่อระหว่างภาคเหนือและภาคกลาง นอกจากนี้ยังมีมีเขตติดต่อกับประเทศเพื่อบ้านคือพม่าและลาว จึงทำให้ในพื้นที่ภาคเหนือตอนล่าง เป็นพื้นที่ที่มีความหลากหลายของประชากร โดยมีทั้งประชากรที่มีความหลากหลายทางวัฒนธรรม เช่น กลุ่มวัฒนธรรมสยามที่อาศัยในเขตอำเภอเมือง กลุ่มวัฒนธรรมลาวที่อาศัยในเขตอำเภอนครไทย อำเภอชาติตระการ อำเภอวังทอง และอำเภอบางระกำ ชาวเขาที่อาศัยอยู่ในเขตเขตอำเภอนครไทย และอำเภอชาติตระการ รวมทั้งชาวจีนและชาวอินเดียที่อาศัยอยู่ในอำเภอเมือง เป็นต้น (จิราภรณ์ สถาปนะวรรธนะ และคณะ, 2554) นอกจากนี้ยังมีประชากรอีกจำนวนหนึ่งที่อพยพ โยกย้ายครัวเรือนมาจากจังหวัดใกล้เคียงในเขตภาคเหนือตอนล่าง รวมทั้งแรงงานต่างด้าวที่เข้ามาทำงานในประเทศไทย เช่น ชาวพม่า เป็นต้น ด้วยเหตุนี้จึงทำให้จังหวัดพิษณุโลกเป็นพื้นที่ที่เหมาะจะใช้เป็นแหล่งในการศึกษาเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของประชากร เพื่อเป็นข้อมูลที่จะนำไปใช้ในการจำแนกประชากรเชื้อชาติต่างๆ รวมทั้งการพิสูจน์สัญชาติของแรงงานต่างด้าวต่อไป นอกจากนั้นการศึกษา DNA polymorphisms ยังสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาโรคทางพันธุกรรมที่มีความจำเพาะในแต่ละประชากรและหาวิธีการรักษาที่เหมาะสมได้อีกด้วย (Collins et al., 2011)

การศึกษาความหลากหลายและโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากร โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล เป็นเครื่องมืออีกอันหนึ่งที่สามารถนำไปใช้ในการศึกษาประวัติศาสตร์ประชากร ในด้านต่างๆ เช่น ความสัมพันธ์ทางเชื้อชาติ การอพยพย้ายถิ่นฐาน และวัฒนธรรมการใช้ภาษา เป็นต้น ซึ่งปกตินักวิจัยอาจใช้ภาษาและวัฒนธรรมเป็นเครื่องมือในการสร้างรูปแบบความสัมพันธ์กันระหว่างประชากร แต่อย่างไรก็ตามภาษาและวัฒนธรรมก็อาจเปลี่ยนแปลงไปได้ตามการเคลื่อนย้ายและปฏิสัมพันธ์ระหว่างประชากร แต่สิ่งที่สามารถใช้เป็นเครื่องบ่งชี้

เอกลักษณ์ที่ถาวรของประชากรได้ก็คือดีเอ็นเอ เนื่องจากเป็นโมเลกุลที่คงที่ แต่อาจเกิดการกลายพันธุ์ได้บ้าง จึงทำให้สามารถคำนวนระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) หรือช่วงเวลาของการแยกกันทางภูมิศาสตร์ (geological isolation) ของประชากรได้ (Kampuansai et al., 2007)

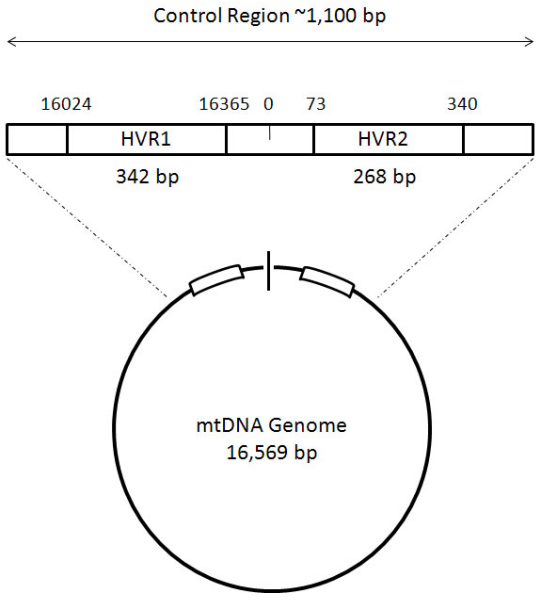
2. ดีเอ็นเอเครื่องหมาย

ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่นิยมใช้ในการศึกษาพันธุศาสตร์ของประชากรนั้นมีอยู่หลายชนิด ทั้งจากออโตโซม (autosomal chromosome) ดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรีย (mitochondrial DNA; mtDNA) และโครโมโซมวาย (Y-chromosome) ข้อมูลที่ได้จะถูกเก็บรวบรวมไว้ในฐานข้อมูลต่างๆ เพื่อใช้ในการอ้างอิงและเปรียบเทียบกับประชากรอื่นๆ ในปัจจุบันการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรโดยใช้ดีเอ็นเอจากออโตโซมไม่ค่อยได้รับความนิยมมากนัก เนื่องจากดีเอ็นเอจากออโตโซมของแต่ละบุคคลเป็นส่วนผสมของพ่อและแม่ที่เกิดจากกลไก gene recombination ระหว่างการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ทำให้เกิดความซับซ้อนในการแปรผล การศึกษาโดยใช้ออโตโซมจึงถูกใช้ในงานทางนิติพันธุศาสตร์หรือการตรวจสอบความสัมพันธ์ของพ่อแม่ลูกเท่านั้น ส่วนดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรีย และดีเอ็นเอจากโครโมโซมวาย จะไม่เกิดกลไก gene recombination และทำให้การแปรผลทำได้สะดวกกว่า โดยดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียจะมีการถ่ายทอดจากแม่ไปสู่ลูก และดีเอ็นเอจากโครโมโซมวายจะมีการถ่ายทอดจากพ่อไปสู่ลูกชายโดยตรง จึงทำให้ดีเอ็นเอทั้งสองชนิดมักจะถูกใช้ในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรที่เกี่ยวข้องกับการสืบเชื้อสายประชากร ประวัติการอพยพย้ายถิ่น และความสัมพันธ์ระหว่างประชากรแต่และท้องที่ โดยในปัจจุบันได้มีการสร้างฐานข้อมูลดีเอ็นเอไว้แล้วจำนวนหนึ่งเพื่อใช้เป็นแหล่งข้อมูลอ้างอิงและเปรียบเทียบข้อมูลจากแต่ละประชากร

3. ดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรีย (mitochondrial DNA; mtDNA)

ดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียเป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่มีรูปร่างเป็นวงกลม มีขนาด 16,569 คู่เบส (bp) (Anderson, et al., 1981) ประกอบด้วยข้อมูลทางพันธุกรรมที่สามารถสังเคราะห์โปรตีน 13 ชนิด tRNA 22 ชนิด และ rRNA 2 ชนิด เรียกดีเอ็นเอที่มีปริมาณเบสพิวรีนสูงกว่าว่าสาย H (heavy strand) และสายที่มีปริมาณเบสพิวรีนน้อยกว่าว่าสาย L (light strand) การอ้างอิงตำแหน่งนิวคลิโอไทด์บนสายดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียจะอ้างอิง

โดยใช้สาย L เป็นหลัก ข้อดีของการใช้ไมโตคอนเดรียในการศึกษาพันธุศาสตร์ของประชากร คือ ดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียมีอัตราวิวัฒนาการเร็วกว่าดีเอ็นเอจากออโตโซมประมาณ 5-10 เท่า (Ferris, Brown, Davidson, & Wilson, 1981) นอกจากนี้ยังพบว่าในบริเวณส่วนควบคุม (D-loop control region) ซึ่งมีความยาวประมาณ 1,100 bp มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายสูงอยู่ 2 ช่วงที่เรียกว่า hypervariable region I (HVR1) อยู่บริเวณตำแหน่งนิวคลิโอไทด์ที่ 16,024-16365 และ hypervariable region II (HVR2) อยู่บริเวณตำแหน่งนิวคลิโอไทด์ที่ 73-340 ทั้งสองบริเวณเป็นบริเวณที่มีอัตราการเกิด base substitution ได้สูงกว่าบริเวณอื่น (Meyer, Weiss, & Haeseler, 1999) ทำให้สามารถติดตามอายุทางวิวัฒนาการของประชากรได้ จึงทำให้ดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ทั้งการศึกษาทางนิติวิทยาศาสตร์ วิวัฒนาการ และบรรพชีวินวิทยา และในเซลล์หนึ่งเซลล์มีไมโตคอนเดรียอยู่จำนวนมาก อาจมีมากถึง 100-1000 ชุดในหนึ่งเซลล์ (Bogenhagen & Clayton, 1974) ทำให้โอกาสของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นอมีมากขึ้นในกรณีของตัวเก่าหรือตัวอย่างที่เสียหาย ทำให้สามารถนำไปใช้ในการศึกษาความหลากหลายของประชากรได้ การจำแนกบุคคล เพื่อการนำไปใช้ทางนิติวิทยาศาสตร์ และมนุษย์พันธุศาสตร์ได้อีกด้วย โดยข้อมูลที่ทำการศึกษาในประชากรทั่วไปในประเทศไทย พบว่าการใช้ดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียบริเวณ HVR I ร่วมกับ HVR II สามารถนำไปใช้ในการจำแนกบุคคลได้เป็นอย่างดี (สุทัศน์ ดวงจิตร และสายศิริ มีระเสน, 2554)



ภาพ 1 บริเวณ control region บนดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรีย

การวิเคราะห์ความหลากหลายของดีเอ็นจากไมโตคอนเดรีย จะใช้ลำดับเบสที่เรียกว่า Revised Cambridge Reference Sequence (rCRS) (Andrews, et al., 1999) เป็นลำดับเบสของไมโตคอนเดรียของมนุษย์ที่ได้ยังการยอมรับว่ามีความสมบูรณ์ และใช้เป็นลำดับเบสอ้างอิงที่ใช้ในการเปรียบเทียบ และวิเคราะห์ความเหมือนและความต่างกันของลำดับเบสที่รวบรวมไว้ในฐานข้อมูล

4. ดีเอ็นเอจากโครโมโซมวาย (Y-Chromosome)

โครโมโซมวายเป็นโครโมโซมที่เล็กที่สุดเป็นอันดับที่ 2 (รองจากโครโมโซมแท่งที่ 21) มีความยาวประมาณ $6x10^{7}$ นิวคลิโอไทด์ ส่วนปลายของโครโมโซมมีส่วนที่เรียกว่า pseudoautosomal regions เป็นบริเวณที่สามารถเกิด gene recombination กับโครโมโซมเอ็กซ์ได้ แต่ส่วนที่เหลืออีกประมาณ 95% ของโครโมโซมเป็นบริเวณที่เรียกว่า non-recombination potion of the Y-chromosome (NRY) สารพันธุกรรมในบริเวณนี้จะถูกถ่ายทอดจากพ่อไปยังลูกชายโดยไม่เกิด gene recombination และบริเวณ NRY นี้เป็นบริเวณที่พบการเกิด DNA polymorphism ที่สามารถนำไปใช้เป็นยีนเครื่องหมายในการติดตามความสัมพันธ์ทางเชื้อสายทางฝ่ายชายได้ จึงทำให้ในปัจจุบันโครโมโซมวายเป็นยีนเครื่องหมายที่นิยมใช้ในการตรวจสอบทางนิติวิทยาศาสตร์ การศึกษาทางชาติพันธุ์วิทยา และการศึกษาเกี่ยวกับการอพยพโยกย้ายของประชากร

ในบริเวณ NRY พบลักษณะที่เป็น polymorphism 2 ลักษณะคือการเรียงตัวของเบสที่เป็นเบสซ้ำ (short tandem repeat; STR) เรียกดีเอ็นเอลำดับเบสซ้ำบนโครโมโซมวายว่า Y-STR และนอกจากนี้ยังพบลำดับเบสที่มีลักษณะเป็น single nucleotide polymorphism แต่เนื่องจาก Y-STR มีอัตราการกลายพันธุ์ที่เร็วกว่า ประมาณ 10^{-3} mutation/nucleotide/generation (Heyer, Puymirat, Dieltjes, Bakker, & Knijff, 1997) เมื่อเทียบกับ Y-SNP ที่มีอัตราการกลายพันธุ์ประมาณ 10^{-8} mutation/nucleotide/generation (Xue, et al., 2009)

จากการศึกษาแผนที่ลำดับเบสบนโครโมโซมวายพบว่ามี Y-STR มากกว่า 400 ตำแหน่ง แต่มี Y-STR เพียงไม่กี่ชุดเท่านั้นที่ถูกนำมาใช้งานเป็นยีนเครื่องหมาย โดยตำแหน่งหลักแนะนำให้ใช้ในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรคือ DYS19, DYS389I/II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393 และ DYS385 a/b ซึ่งถูกเรียกรวมว่า minimal haplotype (ตาราง 1) และในบางครั้งก็อาจเพิ่มตำแหน่ง DYS438 และ DYS439 เข้าไปในการศึกษาด้วย (Willuweit & Roewer, 2007)

ตาราง 1 ตำแหน่งและคุณสมบัติของ Y-STR ที่ถูกใช้บ่อย (Fundamentals of forensic DNA typing, p.370)

STR marker	Position (MB)	Repeat Motif	Allele Range	Mutation rate
DYS393	3.19	AGAT	8-17	0.08%
DYS456	4.33	AGAT	13-18	0.72%
DYS458	7.93	GAAA	14-20	1.1%
DYS19	10.13	TAGA	10-19	0.24%
DYS391	12.61	TCTA	6-14	0.29%
DYS635	12.89	TSTA	17-27	0.42%
DYS437	12.98	TATR	13-17	0.15%
DYS439	13.03	AGAT	8-15	0.54%
DYS389 I/II	13.12	TCTR	9-17/24-34	0.19%/0.30%
DYS438	13.38	TTTTC	6-14	0.05%
DYS390	15.78	TCTR	17-28	0.24%
GATA-H4	17.25	TAGA	8-13	0.25%
DYS385 a/b	19.26	GAAA	7-28	0.22%
DYS392	21.04	TAT	6-20	0.06%
DYS448	22.78	AGAGAT	17-24	0.18%

การเก็บข้อมูล Y-STR จะทำการเก็บไว้ในรูปแบบของฐานข้อมูล ซึ่งฐานข้อมูลที่ใหญ่ที่สุดในขณะนี้คือฐานข้อมูล Y Chromosome Haplotype Reference Database (YHDR) ซึ่งเป็นฐานข้อมูลที่เก็บรวบรวม Y-chromosome haplotypes จากประชากรต่างๆ ทั้งยุโรป สหรัฐอเมริกา และเอเชีย อย่างไรก็ตามจากการสืบค้นในปี ค.ศ. 2014 พบว่ามีข้อมูลที่รวบรวมไว้ทั้งหมด 879 ประชากร 126,833 ตัวอย่าง (http://www.YHDR.org เป็นประชากรไทยอยู่เพียง 1 ประชากรเท่านั้นที่ใช้อ้างอิงได้ โดยเป็นประชากรจากภาคกลาง จำนวน 757 ตัวอย่าง (Siriboonpiputtana, et al, 2010)

บทที่ 3

การดำเนินการ

1. การเก็บตัวอย่างประชากร

ทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากประชากรที่มีถิ่นอาศัยอยู่ในพื้นที่ภาคเหนือตอนล่างจำนวน 400 ตัวอย่าง (ชาย 281 ตัวอย่าง หญิง 119 ตัวอย่าง) อาสาสมัครจะต้องเป็นผู้มีภูมิลำเนาอยู่ในจังหวัดพิษณุโลกหรือจังหวัดในพื้นที่ภาคเหนือตอนล่าง เมื่ออาสาสมัครได้ทำความเข้าใจกับ information sheet (ECNU04) ของโครงการนี้แล้ว อาสาสมัครจะต้องลงลายมือชื่อในเอกสาร inform consent form (ECNU05) และจะถูกเจาะเลือดปริมาตร 3 ml. โดยพยาบาลวิชาชีพ และเก็บรักษาเลือดในหลอดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด EDTA

โครงการนี้ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร HE54-Ep1-0030 (version 1.0)

2. การสกัดดีเอ็นเอ

2.1 สกัดดีเอ็นเอ ทั้งหมด 400 ตัวอย่าง โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ PureLink™ Genomic DNA Kits (Invitrogen) ตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดได้ใน 1% agarose gel electrophoresis

3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบนโครโมโซมวาย

3.1 สังเคราะห์ไพรเมอร์เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวน DNA จำนวน 7 คู่ (Bio Basic Canada inc.) เป็นไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มจำนวน ยีน SRY 1 ตำแหน่ง และ Y-chromosome STR 6 ตำแหน่ง (ตาราง 2)

ตาราง 2 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ

	Loci	Primer Sequences (5'-to-3')
1	SRY-L	GAA TAT TCC CGC TCT CCG GAG
	SRY-R	ACC TGT TGT CCA GTT GCA CT
2	DYS19-L	CTA CTG AGT TTC TGT TAT AGT
	DYS19-R	ATG GCA TGT AGT GAG GAC A
3	DYS390-L	TAT ATT TTA CAC ATT TTT GGG CC
	DYS390-R	TGA CAG TAA AAT GAA CAC ATT GC
4	DYS391-L	CTA TTC ATT CAA TCA TAC ACC CAT AT
	DYS391-R	ACA TAG CCA AAT ATC TCC TGG G
5	DYS392-L	AAA AGC CAA GAA GGA AAA CAA A
	DYS392-R	CAG TCA AAG TGG AAA GTA GTC TGG
6	DYS393-L	GTG GTC TTC TAC TTG TGT CAA TAC
	DYS393-R	AAC TCA AGT CCA AAA AAT GAG G

3.2 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบนโครโมโซมวาย

ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ถูกสกัดมาได้จะถูกนำไปเพิ่มจำนวนยีน SRY และ Y-STR โดยใช้สภาวะและอุณหภูมิดังต่อไปนี้

ยีน SRY เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยาคือ 0.2 μg DNA, 1x PCR buffer, 3.0 mM $MgCl_2$, 1 mM dNTP, 0.5 mM primer (each) และ 0.05 Unit/μl *Taq* polymerase (Invitrogen®) ใช้

อุณหภูมิของปฏิกิริยาคือ Pre-denature 95°C 5 นาที ตามด้วย Denature 95°C 1 นาที, Annealing 57°C 1 นาที และ Extension 72°C 1 นาที จำนวน 30 รอบ และ Final extension 72°C 5 นาที

ตำแหน่ง DYS19, DYS388, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393 เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยาคือ 0.2 μg DNA, 1x PCR buffer, 2.2 mM $MgCl_2$, 2 mM dNTP, 0.3 mM primer (each) และ 0.13 Unit/μl *Taq* polymerase (Invitrogen®) ใช้อุณหภูมิของปฏิกิริยาคือ Pre-denature 95°C 5 นาที ตามด้วย Denature 95°C 1 นาที, Annealing 57°C 1 นาที และ Extension 72°C 1 นาที จำนวน 38 รอบ และ Final extension 72°C 5 นาที

3.3 การตรวจสอบดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จะถูกนำไปตรวจสอบใน 2% agarose gel electrophoresis ใน 0.5X TBE buffer โดยใช้สนามไฟฟ้าที่มีค่าความต่างศักย์ 90 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที ย้อมสีด้วย 0.5 μg/ml ethidium bromide และถ่ายภาพใต้แสง UV ด้วยกล้อง Cannon PowerShot G10

4 การสร้างดีเอ็นเอมาตรฐาน (allelic ladder) ของ Y-STR

การศึกษารูปแบบของ Y-STR แต่ละตำแหน่งตัวอย่างดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จะถูกสุ่มเพื่อนำไปหาลำดับเบสของจำนวนซ้ำ (Pacific Science Co., Ltd.) และนำมารวมกับดีเอ็นเอตัวอย่างมีจำนวนซ้ำแตกต่างกัน เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานของแต่ละตำแหน่ง

5 การตรวจสอบรูปแบบของ Y-STR

Y-STR แต่ละตัวอย่างที่เพิ่มจำนวนได้จะถูกนำไปตรวจสอบรูปแบบของ Y-STR แต่ละตำแหน่ง โดยใช้ 8.5% Polyacrylamide gel ใน 0.5X TBE buffer จำแนกชิ้นส่วนดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้าที่มีค่าความต่างศักดิ์ 90 โวลต์ เป็นเวลา 18-22 ชั่วโมง หลังจากนั้นย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย silver staining (Benbouza, Jacquemin, Baudoin, & Mergeai, 2006) เปรียบเทียบกับดีเอ็นเออัลลีลมาตรฐาน

6. ค่าทางสถิติที่ให้ในการศึกษา Y-STR

ค่าความถี่อัลลีลของ Y-STR แต่ละตำแหน่งคำนวณได้จากสูตร

$$allele\ frquency = \frac{no.of\ alleles}{total\ alleles}$$

ค่าความหลากหลายของอัลลีล (h)

$$gene\ diversity = \frac{n(1 - \sum x^2)}{(n-1)}$$

n = จำนวนตัวอย่างในประชากร x = ความถี่อัลลีลที่พบในประชากรตัวอย่าง

7. การเพิ่มจำนวน ดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรีย

สังเคราะห์ไพรเมอร์เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวน ดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรีย จำนวน 2 คู่ (Bio Basic Canada inc.) (ตาราง 2)

ตาราง 2 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน ดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรีย

	Loci	Primer Sequences (5'-to-3')
1	HVR I L	CAC CAT TAG CAC CCA AAG CT
	HVR I H	TGA TTT CAG GGA GGA TGG TG
2	HVR II L	GGT CTA TCA CCC TAT TAA CCA C
	HVR II H	CTG TTA AAA GTC ATA CCG CCA

เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยาคือ 0.2 μg DNA, 1x PCR buffer, 2.5 mM $MgCl_2$, 2 mM dNTP, 0.4 μM primer (each) และ 0.05 Unit/μl Pfx platinum *Taq* polymerase (Invitrogen®) ใช้อุณหภูมิของปฏิกิริยาคือ Pre-denature 94°C 4 นาที ตามด้วย Denature 94°C 45 วินาที, Annealing 55°C 30 วินาที และ Extension 72°C 3 นาที จำนวน 30 รอบ และ Final extension 72°C 7 นาที

8. การวิเคราะห์ลำดับเบสของ mt-DNA

ดีเอ็นเอตัวอย่างที่ถูกเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ HVR I และ HVR II จะถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย HiYield™ Gel/PCR DNA fragment Extraction Kit (RBC Real Genomics) และทำการหาลำดับเบสด้วยวิธี BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit (1st BASE DNA Sequencing Services)

ลำดับเบสที่ได้จะถูกนำมา align โดยเปรียบเทียบกับลำดับเบสอ้างอิง revise Cambridge Reference sequence (rCRS) Andrews, et al. (1999) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป BioEdit ver 7.2.3 and MEGA ver. 5.2.2 เพื่อหาตำแหน่งที่มี nucleotide polymorphism บนชิ้นดีเอ็นเอที่ศึกษา

บทที่ 4

ผลการดำเนินการ

1. ประชากร

ตัวอย่างเลือดของอาสาสมัครที่มีถิ่นอาศัยอยู่ในพื้นที่ภาคเหนือตอนล่างที่มาบริจาคโลหิต ณ โรงพยาบาลค่ายสมเด็จพระนเรศวร จำนวน 400 ตัวอย่าง (ชาย 281 ตัวอย่าง หญิง 119 ตัวอย่าง) โดยอาสาสมัครทั้งหมดมีที่อยู่อาศัยอยู่ในจังหวัดภาคเหนือตอนล่าง ทั้งนี้อาสาสมัครได้เซ็นยินยอมใน inform consent form ก่อนทำการเก็บตัวอย่าง และผลจากงานวิจัยจะไม่สามารถเชื่อมโยงกับข้อมูลของอาสาสมัครได้

2. การศึกษา Y-STR

2.1 การเพิ่มจำนวน SRY gene

จากตัวอย่างดีเอ็นเอของอาสาสมัครชายทั้งหมด 281 ตัวอย่าง ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณตำแหน่งยีน SRY ด้วยไพรเมอร์ SRY-L และ SRY-R ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 418 คู่เบส พบว่าดีเอ็นเอของอาสาสมัครชายทั้งหมดมีผลเป็นบวกซึ่งจะถูกนำไปวิเคราะห์รูปแบบของ Y-STR ต่อไป

2.2 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบนตำแหน่ง Y-STR

ผลการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ Y-STR ตำแหน่ง DYS19 DYS388 DYS390 DYS391 DYS392 DYS393 ได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ ตั้งแต่ 100-300 bp

2.3 การหาลำดับเบสของ Y-STR

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จำนวน 7 ตำแหน่ง คือ DYS19 DYS388 DYS390 DYS391 DYS436 DYS437 และ DYS439 นำไปหาลำดับเบสเพื่อตรวจสอบจำนวนซ้ำของ Y-STR ได้ผลดังตัวอย่างแสดงต่อไปนี้

ตำแหน่ง DYS19 ได้ลำดับเบสที่มีจำนวน 14 ซ้ำ 248 bp (TAGA)3 tagg (TAGA)11

ACTACTGAGTTTCTGTTATAGTGTTTTTTAATATATATATAGTATTATATATATAGTGTTATATATATATAGTG

TTT/**TAGA/TAGA/TAGA/**TAGG/**TAGA/TAGA/TAGA/TAGA/TAGA/TAGA/TAGA/TAGA/TA**

GA/TAGA/TATAGTGACACTCTCCTTAACCCAGATGGACTCCTTGTCCTCACTACATGGCCATGGCCCGAAG

TATTACTCCTGGTGCCCCAGCCACTATTTCCAGGTGCAGAGATTGAC

ตำแหน่ง DYS390 ได้ลำดับเบสที่มีจำนวน 22 ซ้ำ $[(TGTC)_8(TCTA)_{12}(TCTG)_1(TCTA)_4]$

TATATTTTACACATTTTTGGGCCCTGCATTTTGGTACCCCATAATATATTCTATCTA/**TCTG**

/TCTG/TCTG/TCTG/TCTG/TCTG/TCTG/TCTG/TCTA/TCTA/TCTA/TCTA/TCTA/TCTA/TCTA/TC

TA/TCTA/TCTA/TCTA/TCTA/TCTG/TCTA/TCTA/TCTA/TCTA/TCATCTATCTATCTTTCCTTGTTTC

TGAGTATACACATTGCAATGTTTTCATTTTACTGTCAC

ตำแหน่ง DYS391 ได้ลำดับเบสที่มีจำนวน 12 ซ้ำ $(TCTA)_{12}$

TAGAGGCAGTCATCGCAGTGGCCCAAGTGATCTTGCAACATCTCCATCCATGTTGCTCCAAAGG

ACCCAATTTTACTGTAAATGGTTGTATAGTATTTTATGGTCTACATAGACCATATTTACCATATGTTCATCCA

TATTTTCTTCATTAATCTAGCTTTTAAAAACAACTAATTTGATTTCAAGTGTTTGTTATTTAAAAGCCAAGAAG

GAAAACAAATTTTTTTCTTGTATCACCATTTATT/**TAT/TAT/TAT/TAT/TAT/TAT/TAT/TAT/TAT/TAT**

/TAT/TAT/TTACTAAGGAATGGGATTGGTAGGTC

ตำแหน่ง DYS39 ได้ลำดับเบสที่มีจำนวน 15 ซ้ำ $(AGAT)_{15}$

GTGGTCTTCTACTTGTGTCAATAC/**AGAT/AGAT/AGAT/AGAT/AGAT/AGAT/AGAT/AGAT/AGAT/AG**

AT/AGAT/AGAT/AGAT/AGAT/AGAT/ATGTATGTCTTTTCTATGAGACATACCTCATTTTTTGGACTTGAG

TTC

2.4 การศึกษารูปแบบของ Y-STR

การจำแนกรูปแบบของ Y-STR โดยใช้ 8.5% polyacrylamide gel เปรียบเทียบกับดีเอ็นเออัลลีลมาตรฐาน ที่ตำแหน่ง DYS19 , DYS390, DYS391, DYS392 และ DYS393 พบว่าในประชากรตัวอย่างมีอัลลีลขอแต่ละตำแหน่ง จำนวน 5, 7, 4, 6 และ 6 รูปแบบ ตามลำดับ (ตาราง 3) โดยที่ตำแหน่ง DYS19 , DYS390, ฆ, DYS392 และ DYS393 มีความหลากหลายของยีนเท่ากับ 0.7116, 0.7475, 0.3458, 0.6537 และ 0.6441ซึ่งถือว่าอยู่ใน

เกณฑ์ค่อนข้างสูง (>0.5) ส่วนที่ตำแหน่ง DYS391 มีความหลากหลายค่อนข้างต่ำ เท่ากับ 0.3458 ซึ่งเนื่องจากจำนวนอัลลีลที่พบมีเพียง 4 อัลลีลเท่านั้น

ตาราง 3 ความถี่ และค่าความหลากหลาย (h)ของ Y-STR ตำแหน่ง DYS19, DYS390, DYS391, DYS392 และ DYS393

allele	DYS19	DYS390	DYS391	DYS392	DYS393
7			0.0071		
8			0.0000		
9			0.0463		
10			0.7936	0.0071	0.0036
11			0.1530	0.1388	0
12	0.0249			0	0.3416
13	0			0.5018	0.4733
14	0.2135			0.2527	0.1103
15	0.4270			0.0819	0.0605
16	0.2242			0.0178	0.0107
17	0.1103				
18					
19					
20		0.0356			
21		0.0249			
22		0.1281			
23		0.1851			
24		0.3701			
25		0.2562			
n.	281	281	281	281	281
h	0.7146	0.7507	0.3473	0.6632	0.6484

การศึกษา haplotype พบทั้งหมด 165 haplotype โดย พบรูปแบบ 14 24 10 13 13 สูงที่สุดมีความถี่ 0.0427 (ตาราง 4) ค่าความหลากหลายของรูปแบบในประชากร (h) เท่ากับ 0.9928

ตาราง 4 ความถี่ haplotype ของ Y-STR ในประชากรภาคเหนือตอนล่าง ตำแหน่ง DYS19 DYS390 DYS391 DYS392 และ DYS393 ตามลำดับ

ที่	Haplotype					จำนวน	ความถี่
	DYS19	DYS390	DYS391	DYS392	DYS393		
1	14	24	10	13	13	12	0.042705
2	14	25	10	13	13	9	0.032028
3	16	24	10	13	12	8	0.02847
4	16	25	10	13	13	6	0.021352
5	15	23	10	13	12	5	0.017794
6	15	23	10	14	13	5	0.017794
7	15	25	10	14	12	5	0.017794

9.3 การศึกษา mitochondria DNA

ผลจากการศึกษาลำดับเบสของ ดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรีย จากตัวอย่างประชากร 84 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับลำดับเบสอ้างอิง revise Cambridge Reference sequence (rCRS) Andrews, et al. (1999) ทำการวิเคราะห์ HVR-I ที่ตำแหน่งนิวคลิโอไทด์ที่ 16042-16365 จำนวน 342 bp พบตำแหน่งที่เป็น polymorphism จำนวน 99 ตำแหน่ง คิดเป็น 28.95% ของจำนวนนิวคลิโอไทด์ทั้งหมด และบริเวณ HVR-II ทำการวิเคราะห์นิวคลิโอไทด์ที่ 73-340 จำนวน 268 bp พบตำแหน่งที่เป็น polymorphism จำนวน 40 ตำแหน่ง คิดเป็น 14.93% ของจำนวนนิวคลิโอไทด์ทั้งหมด เมื่อรวม HVR-I และ HVR-II เข้าด้วยกัน จะค่า

polymorphism เท่ากับ 22.78 (ตาราง 5) ในจำนวนนี้พบดีเอ็นเอทั้งหมด 58 รูปแบบ เป็น common haplotype จำนวน 2 รูปแบบ คือ (16108 C->T, 16129 G->A, 16162 A->G, 16172 T->C, 16034 T->C, 16519 T->C, 143 C->T, 187 C->T) พบจำนวน 9 ตัวอย่าง และ (16129 G->A, 16223 C->T, 16256 C->T, 16271 T->C, 16362 T->C, 127 T->A, 228 A->T, 316 A->T) พบ 7 ตัวอย่าง นอกจากนี้ยังพบว่ามีดีเอ็นเอ จำนวน 52 ตัวอย่างที่เป็น unique haplotypes คิดเป็น 64.20%

ตาราง 5 ตำแหน่ง polymorphism ที่พบจากการศึกษาลำดับเบสบน m-tDNA บริเวณ HVR-I และ HVR-II

Locus	position	Nucleotide polymorphisms positions
HVR-I	16042-16365	16041 16042 16051 16075 16085 16086 16092 16093 16099
	(342 bp)	16100 16104 16108 16111 16118 16124 16126 16127 16129
		16134 16140 161145 16147 16148 16149 16150 16153 16156
		16157 16162 16164 16166 16167 16168 16172 16174 16184
		16185 16186 16187 16188 16189 16190 16191 16192 16193
		16203 16207 16219 16213 16214 16217 16219 16223 16225
		16228 16234 16235 16239 16240 16243 16249 16256 16257
		16260 16261 16263 16264 16266 16270 16271 16272 16274
		16278 16287 16288 16290 16291 16292 16293 16294 16295
		16297 16298 16302 160304 16309 16311 16316 16317 16318
		16319 16325 16327 16354 16355 16356 16357 16358 16362
HVR-II	73-340	073 091 093 114 125 127 128 131 143 146 150 151 152
	(268 pb)	153 184 185 187 189 194 195 199 200 204 205 207 210
		228 229 246 249 263 298 309 315 316 318 324 326 329 332

บทที่ 5

วิจารณ์ผล

จากการศึกษา Y-STR จำนวน 5 ตำแหน่ง คือ DYS19 DYS390 DYS391 DYS392 และ DYS393 ในประชากรตัวอย่างจำนวน 281 ตัวอย่าง พบว่า Y-STR 4 ตำแหน่ง คือ DYS19 DYS390 DYS392 และ DYS393 มีความหลากหลายของยีนค่อนข้างสูง (มากกว่า 0.5) มีเพียงตำแหน่ง DYS391 เท่านั้นที่มีค่าความหลากหลายต่ำ (0.3473) โดยพบอัลลีลที่ 10 มีความถี่สูงถึง 0.7936 เมื่อนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกันประชากรอื่นที่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้แล้ว พบว่าอัลลีลที่มีความถี่สูงที่สุดในแต่ละตำแหน่ง เป็นอัลลีลที่พบได้มากเช่นเดียวกับประชากรอื่นๆ ในภูมิภาคเอเชีย เช่น สิงคโปร์ (Yong, Lee, & Yap, 2006) เกาหลี (Park, et al., 2005) จีนฮั่น (Hu, 2006) และบังกาลาเทศ (Alam, Ali, Ferdous, Hossain, & Hasan, 2010) มีพียงบางอัลลีลที่มีแนวโน้มต่างจากประชากรในประเทศญี่ปุ่น (Hashiyada, et al., 2008) เช่น ตำแหน่ง DYS392 ในประชากรญี่ปุ่นพบอัลลีลที่ 11 สูงกว่าอัลลีลอื่น

จากการศึกษา Y-STR haplotype ในประชากรตัวอย่างนี้ ทำให้สามารถรวบรวม Y-STR haplotype ได้ทั้งหมด 165 haplotype ในจำนวนนี้มี 112 haplotype ที่มีลักษณะเป็น unique haplotype (พบเพียง 1 ตัวอย่าง) คิดเป็น 39.86% และจากการคำนวณค่าความหลากหลายของ haplotype พบว่าสูงถึง 0.9928 ใกล้เคียงกับผลการศึกษาในประชากรไทยภาคกลาง (Siriboonpiputtana, et al., 2010) โดยข้อมูล Y-STR haplotype ที่รวบรวมได้จะถูกนำเข้าไปเก็บไว้ในฐานข้อมูลเพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิง และเปรียบเทียบกับประชากรอื่นๆ ต่อไป

การศึกษาความหลากหลายดีเอ็นเอบนไมโตคอนเดรียพบว่า common haplotype ที่พบในการศึกษาครั้งนี้เป็น common haplotype รูปแบบเดียวกันกับที่มีในรายงานในการศึกษาในประเทศไทย (Fuchroen, Fucharoen, & Horai, 2001) โดยเฉพาะรายงานในประชากรภาคเหนือ (Zimmermann, et al., 2009) และประเทศลาว (Bodner, et al., 2011) อย่างไรก็ตามด้วยสภาพพื้นฐานของประชากรที่มีองค์ประกอบมาจากหลายพื้นที่ในภาคเหนือตอนล่างจึงทำให้พบรูปแบบที่เป็น unique haplotype อยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งแสดงให้เห็นถึง

ความหลากหลายของประชากรในพื้นที่ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากประชากรในพื้นที่ภาคเหนือตอนล่าง ไม่มีมีเฉพาะประชากรที่อาศัยอยู่ในเขตตัวเมือง แต่ยังมีประชากรที่อาศัยอยู่ในพื้นที่จำกัด ซึ่งยังรักษาลักษณะเฉพาะของชาติพันธุ์ของตนเองไว้ ทำให้ประชากรดังกล่าว อาจมีลักษณะโครงสร้างทางพันธุกรรมและรูปแบบดีเอ็นเอที่พบในประชากรแตกต่างจากประชากรที่ทำการศึกษาไว้แล้ว ดังนั้นข้อมูลพันธุกรรมที่รวบรวมไว้แล้ว จะเป็นพื้นฐานสำหรับการศึกษาวิวัฒนาการของประชากร และลักษณะพันธุกรรมทางชาติพันธุ์วิทยาต่อไป

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาครั้งนี้เป็นครั้งแรกของการศึกษาความหลากหลายของยีนเครื่องหมายบนโครโมโซมวายและลำดับเบสของดีเอ็นเอบนไมโตคอนเดรีย โดยที่ประชากรตัวอย่าง เป็นประชากรทั่วไปที่มีที่อยู่อาศัยในพื้นที่จังหวัดพิษณุโลก และจังหวัดในภาคเหนือตอนล่าง จากข้อมูลที่ได้จะเห็นว่ายีนเครื่องหมายทั้งสองกลุ่มมีความหลากหลายสูงมากพอสมควร ซึ่งข้อมูลดังกล่าวสามารถจัดเก็บไว้ในฐานข้อมูลเพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงในกรณีที่ต้องการสำรวจความแตกต่างของประชากรที่มีถิ่นอาศัยอยู่ในพื้นที่ภาคเหนือตอนล่าง และประชากรอื่นๆ ในประเทศไทย รวมถึงประชากรที่อาจเคลื่อนย้ายมาจากประเทศเพื่อนบ้าน อย่างไรก็ตามในการนำข้อมูลไปใช้งาน ยังมีความจำเป็นต้องใช้ข้อมูลจากประชากรในพื้นที่ใกล้เคียง เช่น ประชากรที่โยกย้ายถิ่นฐานมาจากประเทศเพื่อนบ้าน และประชากรที่มีลักษณะจำเพาะ กลุ่ม เช่น ประชากรเชื้อสายลาว ชาวเขา และชาวจีน มาใช้ในการอ้างอิง จะทำให้มีข้อมูลที่หลากหลายมากขึ้น และข้อมูลดังกล่าวยังสามารถนำไปใช้ในการศึกษาทางวิวัฒนาการของประชากร การศึกษาทางชาติพันธุ์วิทยาและการหาความเกี่ยวโยงกับโรคทางพันธุกรรมที่มีในประชากรต่อไป ทั้งนี้ยังเป็นการเตรียมตัวเพื่อการเปลี่ยนแปลงของประชากรที่อาจเกิดขึ้นจากกิจกรรมของประชาคมอาเซียน (AEC) อีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

Alam, S., Ali, M. E., Ferdous, A., Hossain, T., & Hasan, M. M. (2010). Haplotype diversity of 17 Y-chromosomal STR loci in the Bangladeshi population. *Forensic Science International: Genetics, 4*, e59–e60.

Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H., Coulson, A. R., Drouin, J., . . . Staden, R. &. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrail genome. *Nature, 290*, 475-465.

Andrews, R., I., K., Chinnery, P., Lightowlers, R., Turnbull, D., & Howell, N. (1999). Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature Genetics, 23*, 147.

Ayub, Q., Mohyuddin, A. Q., Mazhar, K., Zerjal, T. Q., & Tyler-Smith, C. (2000). Identification and characterisztion of novel human Y-chromosomeal microsatellite from sequence database information. *Nuclic Acid Research, 28*(2), e8.

Benbouza, H., Jacquemin, J.-M., Baudoin, J.-P., & Mergeai, G. (2006). Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ, 10*(2), 77 – 81.

Bhoopat, T., Sriduangkaew, S., & Steger, H. F. (2006). STR loci D10S2325, D16S539 and D19S253: Northern Thai. *Legal Medicine, 8*, 306–307.

Bodner, M., Zimmermann, B., Röck, A., Kloss-Brandstätter, A., Horst, D., & Horst, B. (2011). Southeast Asian diversity: first insights into the complex mtDNA structure of Laos. *BMC Evolutionary Biology*, 11-49.

Bogenhagen, D., & Clayton, D. A. (1974). The Number of Mitochondrial Deoxyribonucleic Acid Genomes in Mouse L and Human HeLa Cells. *The journal of Biological Chemistry, 249*, 7991-7995.

Butler, J. M. (2009). *Foundamentals of Forensic DNA typing.* Californis: Elsevier.

Erdal, M. E., & Barlas, I. O. (2000). Detection of the SRY Gene in a 46,XY Phenotypic. *Turk J Med Sci, 30*, 501-503.

Ferris, S. D., Brown, W. M., Davidson, W. S., & Wilson, A. C. (1981). Extensive polymorphism in the mitochondrial DNA of apes. *Proc. NatL Acad. Sci. USA, 78*(10), 6319-6323.

Fuchroen, G., Fucharoen, S., & Horai, S. (2001). Mitochondrial DNA polymorphism in Thailand. *Journal of Human Genetics, 46*, 115-125.

Hashiyada, M., Umetsu, K. Y., Tamura, A., Matsusue, A., Suzauki, K., Kashimura, S., & Funayama, M. (2008). Population genetics of 17 Y-chromosomal STR loci in Japanese. *Forensic Science International: Genetics, 2*, e69-e70.

Heyer, E., Puymirat, J., Dieltjes, P., Bakker, E., & Knijff, P. (1997). Estimating Y chromosome specific microsatellite mutation frequencies using deep rooting pedigrees. *Human Molecular Genetics, 6*(5), 799–803.

Hu, S. P. (2006). Polymorphism of Y-chromosomal STR haplotypes in the. *Forensic Science International, 158*, 80-85.

Meyer, S., Weiss, G., & Haeseler, A. V. (1999). Pattern of Nucleotide Substitution and Rate Heterogeneity in the Hypervariable Regions I and II of Human mtDNA. *Genetics, 152*, 1103-1110.

Park, M. J., Lee, H. Y., Yoo, J.-E., Chung, U., Lee, S. Y., & Shin, K.-J. (2005). Forensic evaluation and haplotypes of 19 Y-chromosomal. *Forensic Science International, 152*, 133-147.

Richard M. Andrews1, I. K. (1999). Reanalysis and revision of the Cambridge reference for human mitochomdrial DNA. *Nature Genetics, 23*, 147. doi:10.1038/13779

Siriboonpiputtana, T., Jomsawat, U., Rinthachai, T., Thanakitgosate, J., Shotivaranon, J., Limsuwanachot, N., . . . Rerkamnuaychoke, B. (2010). Y-chromosomal STR haplotypes in Central Thai population. *Forensic Science International: Genetics, 4*, e71-e72.

Thomas, M. G., Bradman, N., & Flinn, H. M. (1999). High throughput analysis of 10 microsatellite. *Hum Genet, 105*, 577-581.

White, P., Tatum, O., Deaven, L., & Longmire, J. (1999). New, Male-Specific Microsatellite Markers. *Genomics, 57*, 433-437.

Willuweit, S., & Roewer, L. (2007). Y chromosome haplotype reference database (YHRD): Update. *Forensic Science International: Genetics, 1*, 83–87.

Xue, Y., Wang, Q., Long, Q., Ng, B., Swerdlow, H. B., Skuce, C., . . . Tyler-Smith, C. (2009). Human Y Chromosome Base-Substitution Mutation Rate Measured by Direct Sequencing in a Deep-Rooting Pedigree. *Current Biology, 19*, 1453–1457.

Yong, R., Lee, L., & Yap, E. (2006). Y-chromosome STR haplotype diversity in three ethnic. *Forensic Science International , 159*, 244–257.

Zimmermann, B., Bodner, M., Amory, S., Fendt, L., Röck, A., Horst, D., . . . Brandstätter, A. (2009). Forensic and phylogeographic characterization of mtDNA lineages from northern Thailand (Chiang Mai). *Int J Legal Med, 123*, 495-501.