

**Allele frequencies of microsatellite DNA on X-chromosome locus DXS7132
in a population from northern Thailand**

ค่าความถี่อัลลีลของดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์บนโครโมโซมเพศหญิง

ตำแหน่ง DXS7132 ในกลุ่มประชากรคนไทยภาคเหนือ

Jantira Sanit*, Tanin Bhoopat MD., Lertlakana Bhoopat MD.*****

**Forensic Science, Graduate School, Chiang Mai University, ** Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Chiang Mai University,*

****Department of Pathology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50002, Thailand*

จันทิรา สนิท*, ธานินทร์ ภูพัฒน์ พ.บ., เลิศลักษณ์ ภูพัฒน์ พ.บ.*****

†สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, †† ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่,

††† ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50002, ประเทศไทย.

Abstract

The X-Chromosomal microsatellite DNA is very useful for some complex kinship testing e.g. female sibling testing when the father is not available, but also for conventional mother and child testing.

On this study the X-Chromosomal DXS7132 locus was investigated. Buccal cells from 120 unrelated Northern Thai females were collected and DNA amplified using the polymerase chain reaction. Allele typing was performed by polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining. Seven DXS7132 alleles from 11 to 17 were found, allele frequencies ranged from 0.0042 (allele 11, 17) to 0.3708 (allele 14). The average power of exclusion (in no parent and one parent cases) and the power of discrimination (PD) were calculated as 0.3477, 0.5265 and 0.8939 respectively.

Keywords: STR, X-Chromosome, PCR, DXS7132, Northern Thai population

บทคัดย่อ

ดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์บนโครโมโซมเพศหญิง เป็นประโยชน์ในการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์บางกรณีที่มีความซับซ้อน เช่น การตรวจพิสูจน์ความเป็นพี่น้องร่วมบิดาของบุตรสาว ในกรณีที่ผู้เป็นบิดาไม่สามารถร่วมตรวจได้ หรือการพิสูจน์ความเป็นย่า-หลานสาว เป็นต้น นอกจากนี้ดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์บนโครโมโซมเพศหญิงยังสามารถนำมาใช้พิสูจน์บุคคลหรือพิสูจน์ความสัมพันธ์แม่-ลูก ธรรมชาติ โดยการแปลผลการตรวจพิสูจน์ จำเป็นต้องอาศัยสถิติและข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับค่าความถี่ของอัลลีลที่ปรากฏร่วมกันในผู้รับการตรวจ

การศึกษานี้เป็นการหาข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับค่าความถี่ของอัลลีลในดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์บนโครโมโซมเพศหญิงในตำแหน่ง DXS7132 จากกลุ่มประชากรไทยภาคเหนือที่เป็นเพศหญิง และไม่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือดเดียวกันจำนวน 120 คน โดยเก็บตัวอย่างเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มมาสกัดดีเอ็นเอเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) จากนั้นนำมาวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยวิธี Polyacrylamide gel electrophoresis ย้อมด้วย silver staining และได้ตรวจอัลลีลมาตรฐานโดยการหาลำดับเบสเพื่อกำหนดลักษณะของอัลลีลเหล่านั้นแบบสากล

จากการศึกษาพบว่าที่ตำแหน่ง DXS7132 ในกลุ่มประชากรหญิงภาคเหนือมี 7 อัลลีล เริ่มจากอัลลีล 11-17 ซึ่งมีความถี่อยู่ระหว่าง 0.0042-0.3708 โดยอัลลีล 14 มีความถี่มากที่สุด นอกจากนี้กำลังการคัดออกสำหรับกรณีของ no parent และ one parent มีค่าเท่ากับ 0.3477 และ 0.5265 ตามลำดับ และค่ากำลังการแยกแยะมีค่าเท่ากับ 0.8939

คำสำคัญ: STR, X-Chromosome, PCR, DXS7132, ประชากรคนไทยภาคเหนือ

บทนำ

ปัจจุบันดีเอ็นเอ (DNA) ถูกนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจพิสูจน์เพื่อระบุยืนยันตัวบุคคลและใช้พิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดได้ เนื่องจากการตรวจเปรียบเทียบดีเอ็นเอสามารถใช้ตรวจพิสูจน์วัตถุพยานประเภทชีวภาพในคดีต่างๆที่มีปริมาณน้อยได้ เช่น เส้นผม คราบเลือด เนื้อเยื่อ กระดูกและฟัน เป็นต้น

ตามทฤษฎีดีเอ็นเอของแต่ละบุคคลจะมีการเรียงตัวของเบสที่แตกต่างกัน ทำให้เกิดความแตกต่างในดีเอ็นเอหรือเรียกว่าดีเอ็นเอโพลิมอร์ฟิซึม (DNA polymorphism) ลักษณะนี้จะเป็นเอกลักษณ์เฉพาะของแต่ละบุคคล ปัจจุบัน Microsatellite DNA เป็นส่วนที่นิยมนำมาใช้มากที่สุด เพราะเป็นดีเอ็นเอที่มีลักษณะของ Short Tandem Repeats (STR) ที่มีหน่วยซ้ำเป็นชุดๆของจำนวนคู่เบสน้อย (2 – 7 คู่เบส) และจำนวนซ้ำของชุดเบส

ของตำแหน่งหนึ่งในแต่ละบุคคลจะไม่เท่ากัน ยกเว้นเพียงกรณีแฝดที่เกิดจากไข่ใบเดียวกัน ดังนั้นจึงสามารถใช้พิสูจน์บุคคลได้อย่างน่าเชื่อถือมากที่สุดในปัจจุบัน^[1]

การตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอส่วนมากใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) สำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม เพราะเทคนิค PCR ต้องการตัวอย่างดีเอ็นเอที่ใช้ตรวจจำนวนน้อย ใช้ระยะเวลาในการทดสอบน้อย มีความไว (sensitivity) สูง และใช้ได้กับตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีสภาพไม่สมบูรณ์^[2]

เนื่องจากการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์บางกรณีที่มีความซับซ้อน เช่น การตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ระหว่างพี่น้องเพศหญิงร่วมบิดาเดียวกัน โดยผู้ที่เป็นบิดาไม่สามารถร่วมตรวจได้ การตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ระหว่างย่ากับหลานสาว เป็นต้น กรณีดังกล่าวเหล่านี้ต้องใช้ความจำเพาะของการตรวจพิสูจน์โดยต้องอาศัยการตรวจดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์บนโครโมโซมเพศหญิงของบุคคลเหล่านั้นเปรียบเทียบกันเท่านั้นเพราะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมนั้นเป็นที่ทราบกันดีแล้วว่าลูกจะได้รับการถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมจากพ่อและแม่คนละครึ่ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งลักษณะของโครโมโซมเพศหญิง (X-chromosome) ตัวหนึ่งในพ่อจะถูกถ่ายทอดไปยังลูกผู้หญิงทุกคนทำให้เราสามารถตรวจเปรียบเทียบลักษณะดีเอ็นเอบนโครโมโซมเพศหญิง (X-chromosome) ในลูกหญิงทุกคนเพื่อบ่งชี้ความเป็นพี่น้องร่วมบิดาได้ อย่างไรก็ตามก่อนจะนำมาใช้จริงจำเป็นต้องทราบข้อมูลค่าความถี่ของอัลลีลต่างๆที่ปรากฏในตำแหน่งของดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์เหล่านั้นในกลุ่มประชากรที่สนใจ เพราะฉะนั้นข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับค่าความถี่ของอัลลีลในดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์บนโครโมโซมเพศหญิงจากกลุ่มประชากรที่สนใจจึงเป็นสิ่งที่สำคัญ เพื่อนำมาใช้ในการคำนวณหาโอกาสความสัมพันธ์ทางสายเลือด และสามารถนำผลการวิจัยมาใช้เป็นหลักฐานอ้างอิงในการพิสูจน์บุคคลได้อย่างถูกต้องและแม่นยำมากที่สุด

วัสดุและวิธีการศึกษา

1. ตัวอย่างและการเก็บตัวอย่าง

1.1 กลุ่มตัวอย่าง

ประชากรเพศหญิงทางภาคเหนือของประเทศไทย ที่ไม่มีความเกี่ยวข้องกันทางสายเลือดจำนวน 120 คน

1.2 วิธีเก็บตัวอย่าง

ใช้ไม้จิ้มฟันเขี่ยเอาบริเวณกระพุ้งแก้มภายในปากของกลุ่มตัวอย่าง แซ้ไว้ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ที่มีน้ำกลั่นอยู่ 1 ml

2. การสร้างอัลลีลมาตรฐาน (Allelic ladders)

สกัดดีเอ็นเอจากเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้ม (Buccal cell) ของกลุ่มตัวอย่างด้วย Chelex^[3] จากนั้นนำมาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ในปริมาตร 15 μ l ในสารละลาย

ปฏิกิริยาประกอบด้วย Sterile water 7.5 μ l, 10X taq buffer 1.5 μ l, 1 mM dNTPs 1.5 μ l, 0.25 U/ μ l Taq DNA polymerase 1.5 μ l, 2.5 μ M primer mix 1.5 μ l และ template 1.5 μ l หลอดปฏิกิริยาถูกนำเข้าสู่เครื่องปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ โดยตั้งค่าอุณหภูมิ ดังนี้ 94 °C นาน 2 นาที 1 รอบ จากนั้นปรับไปที่อุณหภูมิ 94 °C นาน 30 วินาที, 55 °C นาน 10 วินาที และ 72 °C นาน 1 นาที รวมทั้งสิ้น 35 รอบ

สำหรับลำดับเบสของตำแหน่ง DXS7132 ที่ใช้เป็น primers mix มีรายละเอียดดังนี้

Primer F : 5'-TATACTGTGGAAGTTCTTAGCCTCC-3'

Primer R : 5'TGGTGCCAAACTCTATTAGTCAACG-3'

นำมาตรวจสอบผลที่ได้ด้วยการทำ Polyacrylamide gel electrophoresis ในชุดแยกสารในวุ้น โดยขนาดของวุ้นกว้าง 16 ซม. ยาว 20 ซม. และหนา 0.1 ซม. ความเข้มข้นของ acrylamide โดยรวม = 8.5% และ 4.8 % ของ bis-acrylamide ^[3] 10X Gel buffer ประกอบด้วย Tris 8 g และน้ำกลั่น 200 ml แล้วปรับ pH ด้วย Sulfuric acid ให้ได้ pH = 4.5 electrophoresis buffer = 1x TBE เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (20 bp ladder) และย้อมสีเจลด้วย silver staining ^[4] เมื่อเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจนทำการตัดแถบดีเอ็นเอในเจลมาสกัดด้วย chelex และนำมาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer และสภาวะในการเพิ่มปริมาณดังที่กล่าวมาแล้วในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมครั้งแรก จากนั้นตกตะกอนด้วยวิธี Isopropanol precipitation แล้วนำมาตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis นำมาทำ Sequencing Reaction ในปริมาตร 20 μ l ในสารละลายปฏิกิริยาประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ 1.0 μ l, Sterile water 13.0 μ l, Dilution buffer 3.0 μ l, Big Dye Kit 2.0 μ l และ 3.2 μ M Primer 1.0 μ l หลอดปฏิกิริยาถูกนำเข้าสู่เครื่องปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ โดยตั้งค่าอุณหภูมิ ดังนี้ 96 °C นาน 1 นาที 1 รอบ จากนั้นปรับไปที่อุณหภูมิ 96 °C นาน 10 วินาที, 50 °C นาน 5 วินาที และ 60 °C นาน 4 นาที รวมทั้งสิ้น 25 รอบ

สำหรับลำดับเบสของตำแหน่ง DXS7132 ที่ใช้เป็น primers มีรายละเอียดดังนี้

Primer F : 5'-TATACTGTGGAAGTTCTTAGCCTCC-3'

เมื่อได้ Sequencing product นำมาตกตะกอนด้วย 100% Ethanol จากนั้นทำ Denature DNA ที่อุณหภูมิ 95 °C นาน 2 นาที แล้ว Load Sequencing product ปริมาณ 16 μ l ลงใน well Sequencing เข้าเครื่องทำ DNA Sequencing เพื่อหาจำนวนชุดเบสซ้ำ (tandem repeat) สำหรับการกำหนดชนิดของอัลลีลตามมาตรฐานสากล

3. การหาความถี่ของอัลลีลและการประเมินประสิทธิภาพของดีเอ็นเอตำแหน่ง DXS7132 ในงานทางนิติวิทยาศาสตร์

นำน้ำสกัดดีเอ็นเอที่เหลือของกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดมาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR จากนั้นนำมาตรวจผล PCR ด้วยการทำ Polyacrylamide gel electrophoresis เปรียบเทียบกับอัลลีลมาตรฐาน (Allelic ladder) ในตำแหน่ง DXS7132 ที่สร้างไว้ ย้อมสีเจลด้วย silver staining เพื่อให้เห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจน นับจำนวนแถบดีเอ็นเอจากลักษณะพันธุกรรมที่พบในอัลลีลต่างๆ และหาความถี่ของแต่ละอัลลีล นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์และคำนวณค่ากำลังการแยกแยะ^[5] ค่ากำลังการคัดออกของดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์บนโครโมโซมเพศหญิงในตำแหน่ง DXS7132 เพื่อประเมินประสิทธิภาพ^{[6], [7]}

ผลการศึกษา

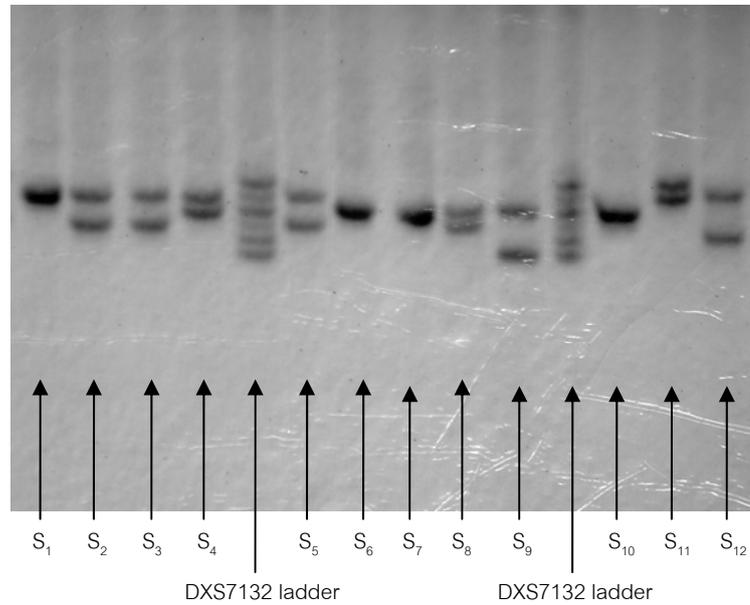
ผลการสร้างอัลลีลมาตรฐาน (Allelic ladders) พบว่าดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง DXS7132 มี 7 อัลลีล เมื่อหาลำดับเบสพบว่าแต่ละอัลลีลมีชุดเบสซ้ำที่มีการซ้ำของชุดเบส TCTA อยู่ในจำนวนซ้ำที่ไม่เท่ากัน ดังแสดงในตารางที่ 1

แถบที่	Sequence composition	Allele
1	P _F -N ₅₂ -(TCTA) ₁₁ -N ₂₈ -P _R	11
2	P _F -N ₅₂ -(TCTA) ₁₂ -N ₂₈ -P _R	12
3	P _F -N ₅₂ -(TCTA) ₁₃ -N ₂₈ -P _R	13
4	P _F -N ₅₂ -(TCTA) ₁₄ -N ₂₈ -P _R	14
5	P _F -N ₅₂ -(TCTA) ₁₅ -N ₂₈ -P _R	15
6	P _F -N ₅₂ -(TCTA) ₁₆ -N ₂₈ -P _R	16
7	P _F -N ₅₂ -(TCTA) ₁₇ -N ₂₈ -P _R	17

เมื่อ P_F : TATACTGTGGAAGCTTCTTAGCCTCC
P_R : TGGTGCCAACTCTATTAGTCAACG
N₅₂ : TTAATAGTGTGAGCCCATTTTCATAATAAATC
CCCTCTCATCTATCTGACTG
N₂₈ : TCCTATTGGTTCTGTTTCTCTGGAGAAC

ตาราง 1 แสดงช่วงการซ้ำของชุดเบสที่พบในแต่ละแถบของดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์บนตำแหน่ง DXS7132 ที่ตรวจสอบด้วยเครื่องอัตโนมัติ

ผลการตรวจลักษณะดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์จากกลุ่มตัวอย่าง 120 ราย พบว่าสามารถเก็บข้อมูลลักษณะดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง DXS7132 ดังแสดงในภาพที่ 1 และนับค่าความถี่ของอัลลีลต่างๆ ที่พบ ปรากฏดังแสดงในตารางที่ 2 และภาพที่ 2



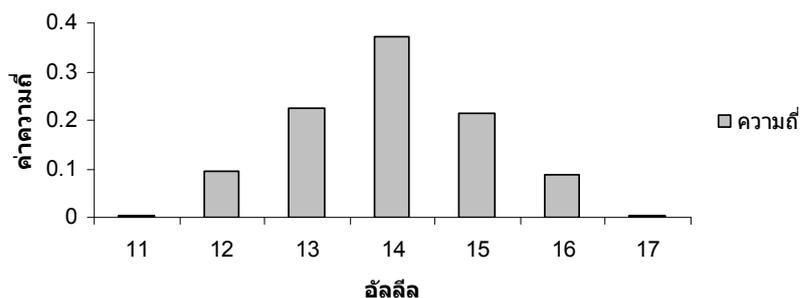
หมายเหตุ S = ตัวอย่าง

ภาพ 1 แสดงลักษณะแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างเมื่อเทียบกับอัลลีลมาตรฐานในดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ ตำแหน่ง DXS7132 ที่สร้างไว้

อัลลีลที่	จำนวน	ค่าความถี่
11	1	0.0042
12	23	0.0958
13	54	0.2250
14	89	0.3708
15	51	0.2125
16	21	0.0875
17	1	0.0042
รวม	240	1.0000

ตาราง 2 แสดงจำนวนและค่าความถี่ของแต่ละอัลลีลในดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์บนโครโมโซมเพศหญิงตำแหน่ง DXS7132

กราฟแสดงค่าความถี่ของอัลลีลบนดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง DXS7132



ภาพ 2 แสดงค่าความถี่ของแต่ละอัลลีลในดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์บนโครโมโซมเพศหญิงตำแหน่ง DXS7132

สำหรับประสิทธิภาพของดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง DXS7132 ในการตรวจพิสูจน์บุคคลและพิสูจน์บุตร พบว่า ค่ากำลังการแยกแยะ (power of discrimination) และค่ากำลังการคัดออก (power of exclusion) ปรากฏในตารางที่ 3

	microsatellite DNA on X-chromosome locus DXS7132
Observed heterozygosity	0.7583
Expected heterozygosity	0.7530 ± 0.0394
Power of discrimination (PD)	0.8939
Power of exclusion (no-parent)	0.3477
Power of exclusion (one-parent)	0.5265

ตาราง 3 แสดงค่ากำลังการแยกแยะและค่ากำลังการคัดออกของดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง DXS7132

อภิปรายผลการศึกษา

จากการวิเคราะห์ดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ ตำแหน่ง DXS7132 ในตัวอย่างประชากรไทยภาคเหนือ เพศหญิงที่ไม่มีความเกี่ยวข้องทางสายเลือดเดียวกันจำนวน 120 คน ด้วยการใช้เทคนิค PCR ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม แล้วตรวจสอบขนาดผลผลิตที่ได้ด้วยวิธี Polyacrylamide gel electrophoresis พบว่าดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ ตำแหน่ง DXS7132 มีอัลลีลทั้งหมด 7 อัลลีล เริ่มจากอัลลีลที่ 11 ถึงอัลลีลที่ 17 โดยอัลลีลที่ 14 พบว่ามีความถี่มากที่สุดคือ 0.3708 และอัลลีลที่ 11 กับ 17 มีความถี่น้อยที่สุดคือ 0.0042 ทั้งนี้ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาสอดคล้องกับกลุ่มประชากรของประเทศญี่ปุ่น^[8] และสอดคล้องกับการศึกษาในประชากรเอเชียจากมาเก๊า^[9] ในขณะเดียวกันสอดคล้องกับกลุ่มประชากรในประเทศอิตาลี^[10]

เมื่อคำนวณค่ากำลังการแยกแยะ (power of discrimination) จากข้อมูลลักษณะทางพันธุกรรมที่แสดงออก (Genotype) ในดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ ตำแหน่ง DXS7132 ของกลุ่มประชากรเพศหญิงภาคเหนือที่ได้จากการศึกษา พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.8939 โดยค่านี้นับถึงโอกาสที่เมื่อเลือกคนสองคนอย่างสุ่ม

แล้วจะได้ genotype ของดีเอ็นเอตำแหน่งดังกล่าวต่างกัน 89.39% หรือจะกล่าวอีกทางหนึ่งว่า โอกาสที่จะพบว่าคนสองคนมี genotype ของดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง DXS7132 เหมือนกันเท่ากับ 10.61% ซึ่งค่าที่ได้ใกล้เคียงกับรายงานในกลุ่มประชากรเอเชียจากมาเก๊า^[9] และกลุ่มประชากรจากญี่ปุ่น^[8] ที่รายงานไว้ว่ามีค่าเท่ากับ 0.8860 และ 0.8920 ตามลำดับ จากนั้นคำนวณค่ากำลังการคัดออก (power of exclusion) สำหรับกรณีของ no parent (กรณีที่พิสูจน์ความสัมพันธ์ระหว่างแม่-ลูก โดยมีเด็กกับผู้ถูกกล่าวหาเพียงคนเดียวเท่านั้น) มีค่าเท่ากับ 0.3477 และสำหรับกรณีของ one parent (กรณีที่เด็กมาอยู่กับบุพการีแท้ๆแล้วอ้างว่าผู้ถูกกล่าวหาเป็นบุพการีอีกคน) จะมีค่าเท่ากับ 0.5265 โดยเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ^[9] และการศึกษาของ Shin^[11] พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน

นอกจากนี้เมื่อหาค่า Heterozygosity (H_{observe}) ที่ได้จากการสังเกต พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.7583 หรือ 75.83% ซึ่งจะมีความใกล้เคียงกับค่า Heterozygosity (H_{expect}) คาดหวังที่คำนวณตามสูตรของ Bhoopat^[5] แล้วได้ค่าเท่ากับ 0.7530 ± 0.0394 หรือ $75.30 \pm 3.94\%$ และเมื่อนำมาทดสอบ Hardy-Weinberg Equilibrium โดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติ (χ^2 : Chi-Square)^[12] พบว่าจำนวนลักษณะจีโนไทป์ที่ได้จากการสังเกต (n_{observe}) และจำนวนลักษณะจีโนไทป์ที่คาดหวัง (n_{expect}) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.999$) หรือกล่าวได้ว่าจำนวนลักษณะจีโนไทป์ที่สังเกต (n_{observe}) มีการกระจายตัวเป็นไปตามกฎความสมดุลของ Hardy-Weinberg จึงเชื่อได้ว่าวิธีการหรือเทคนิคที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ และการเลือกกลุ่มตัวอย่างในการวิจัยนี้เป็นไปอย่างถูกต้องและเหมาะสม

การนำไปประยุกต์ใช้ในการแปลผลการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือด จำเป็นต้องใช้สูตรในการคำนวณตามลักษณะความสัมพันธ์ของผู้ที่มาตรวจ ดังนี้ การคำนวณในลักษณะการถ่ายทอดแบบ Single Allele เช่น การตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ในกรณีพ่อกับลูกสาว โดยที่พ่อจะถ่ายทอดโครโมโซม X (X-Chromosome) ที่มีเพียงตัวเดียวไปให้ลูกสาวทุกคน ส่วนโครโมโซม X (X-Chromosome) อีกตัวจะได้รับการถ่ายทอดมาจากแม่ และการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ในกรณีแม่กับลูกชาย ซึ่งลูกชายจะได้รับการถ่ายทอดโครโมโซม X (X-Chromosome) มาจากแม่ ส่วนโครโมโซม Y (Y-Chromosome) จะได้มาจากพ่อ เป็นต้น ส่วนการแปลผลการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์แบบแม่กับลูกสาว โดยแม่จะมีการถ่ายทอดโครโมโซม X (X-Chromosome) ไปยังลูกสาว ในกรณีนี้จะใช้การคำนวณค่าสัดส่วนความน่าจะเป็นเช่นเดียวกับการตรวจพิสูจน์ในกรณีการใช้โครโมโซมปกติ (Autosome Chromosome) นอกจากนี้ยังมีการตรวจพิสูจน์โครโมโซมเพศหญิงที่มีประโยชน์จำเพาะกับการพิสูจน์ Female Sibling ที่มีความซับซ้อน เช่น การหาความสัมพันธ์ระหว่างย่าและหลานสาว โดยที่บิดาไม่สามารถร่วมการตรวจได้ นั่นคือ ย่าจะถ่ายทอด โครโมโซม X (X-

Chromosome) ไปยังรุ่นพ่อ และพ่อจะถ่ายทอดโครโมโซม X (X- Chromosome) ไปยังลูกสาวทุกคน รวมทั้งกรณีการหาความสัมพันธ์ระหว่างพี่น้องผู้หญิงร่วมบิดา เมื่อบิดาไม่สามารถมาร่วมการตรวจได้ นั่นคือ พ่อจะถ่ายทอดโครโมโซม X (X- Chromosome) ไปยังลูกสาวทุกคน ทำให้พี่น้องผู้หญิงทุกคนมีโครโมโซม X ตัวหนึ่งที่เหมือนกัน ในกรณีที่ผู้รับการตรวจแสดงความสัมพันธ์ของลักษณะ DNA (คัดไม่ออก) สามารถคำนวณค่าสัดส่วนความน่าจะเป็น (Likelihood Ratio: LR) ในกรณีต่างๆได้จากสูตรตามตารางที่ 4 และตารางที่ 5

ลักษณะความสัมพันธ์	ลักษณะของดีเอ็นเอที่ปรากฏ	สูตรการคำนวณค่าสัดส่วนความน่าจะเป็น
พ่อ-ลูกสาว	กรณีลูกสาวมีลักษณะดีเอ็นเอในตำแหน่งนั้นเป็น Heterozygous	$1/2f_A$
	กรณีลูกสาวมีลักษณะดีเอ็นเอในตำแหน่งนั้นเป็น Homozygous	$1/f_A$
แม่-ลูกชาย	กรณีแม่มีลักษณะดีเอ็นเอในตำแหน่งนั้นเป็น Heterozygous	$1/2 f_A$
	กรณีแม่มีลักษณะดีเอ็นเอในตำแหน่งนั้นเป็น Homozygous	$1/f_A$

โดยที่ f_A คือ ค่าความถี่ของอัลลีลที่แสดงความสัมพันธ์กันระหว่างผู้รับการตรวจ

ตาราง 4 แสดงสูตรการคำนวณค่าสัดส่วนความน่าจะเป็นในการตรวจความสัมพันธ์แบบ Single Allele

ลักษณะความสัมพันธ์	ลักษณะของดีเอ็นเอที่ปรากฏ	สูตรการคำนวณค่าสัดส่วนความน่าจะเป็น
แม่-ลูกสาว	คนทั้งคู่มีลักษณะดีเอ็นเอในตำแหน่งนั้นเป็น Heterozygous โดยมีลักษณะ Phenotype ที่ต่างกัน	$1/4f_A$
ย่า-หลานสาว	คนทั้งคู่มีลักษณะดีเอ็นเอในตำแหน่งนั้นเป็น Heterozygous โดยมีลักษณะ Phenotype ที่เหมือนกัน	$f_A + f_B/4(f_A f_B)$
พี่น้องผู้หญิงร่วมบิดา	คนทั้งคู่มีลักษณะดีเอ็นเอในตำแหน่งนั้นเป็น Homozygous	$1/f_A$
	คนหนึ่งมีลักษณะดีเอ็นเอในตำแหน่งนั้นเป็น Homozygous และอีกคนหนึ่งมีลักษณะดีเอ็นเอในตำแหน่งนั้น Heterozygous	$1/2f_A$

โดยที่ f_A และ f_B คือ ค่าความถี่ของอัลลีลที่แสดงความสัมพันธ์กันระหว่างผู้รับการตรวจ

ตาราง 5 แสดงสูตรการคำนวณค่าสัดส่วนความน่าจะเป็นในการตรวจความสัมพันธ์แบบ Female Sibling

สรุป

จากค่ากำลังการแยกแยะ (PD) ค่ากำลังการคัดออก (PE) ค่า Heterozygosity รวมทั้งรูปแบบการกระจายตัวของความถี่อัลลีลและโครงสร้างการกระจายตัวของลักษณะทางพันธุกรรม (Genotype) ที่เป็นไปตามกฎความสมดุล Hardy-Weinberg ในดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์บนโครโมโซมเพศหญิงตำแหน่ง DXS7132 ของกลุ่มประชากรไทยภาคเหนือที่ได้จากการศึกษา แสดงให้เห็นว่าสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือด พร้อมกันนี้ยังสามารถนำไปใช้ในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลได้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบขอบคุณห้องปฏิบัติการอณูพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์ ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่กรุณาให้ยืมใช้สถานที่และเครื่องมือสำหรับทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. ธาณินทร์ ภูพัฒน์. วิทยาการดีเอ็นเอในงานนิติเวช. พิมพ์ครั้งที่ 1. เชียงใหม่ : ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2538.
2. สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. เครื่องหมายดีเอ็นเอ : จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2552.
3. วิฑูรย์ ทะสุยะ, และธานินทร์ ภูพัฒน์. SOP DNA Analysis for Forensic Medicine. เชียงใหม่ : ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2005.
4. Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC. Analysis of the VNTR locus D1S80 by PCR followed by high-resolution PAGE. Am J Hum Genet48, (1991):137-144
5. Bhoopat T, Steger H.F. Frequency distribution of D1S80 alleles in the Northern Thai population analyzed by amplified fragment length polymorphism technique. Forensic Sci Int. 81 (1996): 149-155
6. Jamieson A. The genetics of transferrin in cattle. Heredity 20, (1965): 419-41.
7. Graber R.A. & Morris J.W. General equation for the average power of exclusion for genetic systems of n co-dominant alleles in one-parent and in no-parent cases of disputed parentage. In: Inclusion Probabilities in Parentage Testing (Ed. by R.H. Walker), American Association of Blood Banks, Arlington, WV., (1983):pp. 277-280.
8. Akiyoshi T, Hirofumi T, Masaaki H, et al. Genetic studies of eight X-STRs in a Japanese Population. Legal Med. 11, (2009): S451-452
9. Gomes I, Amorim A, Pereira R, Carracedo A, Gusmão L. Genetic patterns of 10 X chromosome short tandem repeats in an Asian population from Macau. Forensic Sci Int. Genetics Supplement Series, (2009)
10. Robino C, Giolitti A, Gino S, Torre C. Analysis of 12 X-chromosomal short tandem repeats in the North-West Italian population by means of two multiplex PCRs. International Congress Series 1288, (2006): 316-318

11. Shin S, Yu J, Park S, Min G, Chung K. Genetic analysis of 18 X-linked short tandem repeat markers in Korean population. *Forensic Sci Int.* 147, (2005) 35–41
12. ชูศรี วงศ์รัตน์. เทคนิคการใช้สถิติเพื่อการวิจัย. พิมพ์ครั้งที่ 10. หน้า 194-215,358. นนทบุรี : บริษัท ไทเนรมิตกิจ อินเทอร์เน็ต โปรแกรสซิป, 2550.