Original Article

นิพนธ์ต้นฉบับ

A Study of mtDNA Hypervariable Region (HV) 1, 2 and 3 and Their Combination in Lao-Song Ethnic Subpopulation in The Lower-Northern Part of Thailand.[1]

การศึกษาข้อมูลทางพันธุศาสตร์ประชากรของ Hypervariable Region (HV) 1, 2 และ 3 จากพันธุกรรมไมโตคอนเดรีย ในประชากรลาวโซ่งทางภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย และการประยุกต์ใช้ในทางนิติวิทยาศาสตร์

Pittayarat Reongkosoom, M.Sc.*, Nitikorn Poriswanish, M.D., F.R.C.Path.T.*, Komol Luangtrakool, Ph.D., Kamonrat Phokhao, M.Sc.***, Visutr Fongsiripaibul, M.D., F.R.C.Path.T.***

**Department of Forensic Medicine, **Department of Transfusion Medicine and ***Department of Research and Development, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700, Thailand.*

พิทยรัตน์ เริงโกสุม, วท.บ.†, นิติกร โปริสวาณิชย์, พ.บ.†, โกมล หลวงตระกูล, ปร.ด.††, กมลรัตน์ โพธิ์ขาว, วท.ม.†††,วิสูตร ฟองศิริไพบูลย์, พ.บ.†

†ภาควิชานิติเวชศาสตร์, ††ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด และ†††สถานส่งเสริมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพ 10700, ประเทศไทย.

Abstract

Objective: To determine the use and obtain the population database of *HV1* (16024-16365), *HV2* (73-340) and *HV3* (438-574) sequence polymorphisms in human mtDNA and their combination for application to both forensic and anthropological sciences in Lao-song ethnic subpopulation in Pitsanulok and Nakornsawan provinces of Thailand.

Materials and Methods: 40 buccal swabs from nonmaternal-related Lao-Song individuals were extracted and subjected to PCR for mtDNA *HV1*, *HV2* and *HV3* genomes which was then sequenced and aligned to the revised version of Cambridge Reference Sequence (rCRS). Nomenclature was given according to the guideline of International Society of Forensic Genetics (ISFG).

Results: Polymorphic sites were found in a number of 38, 30 and 12 for *HV1*, *HV2* and *HV3*, respectively. The greatest number of polymorphism was detected in HV1, on the other hand, the lesser and the least ones were *HV2* and *HV3*. Discrimination Power (Dp) of each region was 0.9725, 0.9563 and 0.7713 for *HV1*, *HV2* and *HV3*, respectively. Combined haplotype of *HV1+HV2*, *HV1+HV3*,

---

[1] This article was a poster presentation and abstract publication in the proceeding book of the Joint Conference in Medical Sciences 2011 : Chula-Rama-Siriraj (JCMS 2011), held in Thailand

บทความนี้ได้รับการนำเสนอเป็นโปสเตอร์และตีพิมพ์บทคัดย่อในการประชุมวิชาการร่วมคณะแพทยศาสตร์สามสถาบัน พ.ศ. 2554 : จุฬาฯ-รามาฯ-ศิริราช

HV2+HV3 and *HV1+HV2+HV3* revealed Dp of 0.9732, 0.9750, 0.9400 and 0.9750, and showed Haplotype Diversity (h) as 0.9981, 1, 0.9641 and 1 in the same order.

Conclusion: In Lao-Song ethnic group, using the combination of mtDNA HV1, HV2 and HV3 was proved to be more useful than using each one alone. Either combination of HV1+HV3 or *HV1+HV2+HV3* was equivalently the most powerful tool for personal discrimination in maternal lineage.

Keywords: Hypervariable Region, mitochondrial DNA, *HV3*, Lao-Song

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาและเก็บข้อมูลเชิงพันธุศาสตร์ประชากรของการตรวจวิเคราะห์ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอตำแหน่ง *HV1* (16024-16365), *HV2* (73-340) and *HV3* (438-574) สำหรับประยุกต์ใช้ในงานทางนิติวิทยาศาสตร์และมานุษยวิทยา

วัสดุและวิธีการศึกษา: ประชากรลาวโซ่ง 40 คนที่ไม่มีความเกี่ยวข้องทางมารดาได้รับการเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอจากเซลล์กระพุ้งแก้มเพื่อนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสโดยเปรียบเทียบกับสายไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเออ้างอิงของเคมบริดจ์ (rCRS) แล้วเรียกชื่อรูปแบบที่พบตามหลักของ International Society of Forensic Genetics (ISFG)

ผลการศึกษา: เราพบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมทั้งหมด 40 แบบโดยมีตำแหน่งเบสที่แตกต่างจากลำดับอ้างอิงใน *HV1*, *HV2* และ *HV3* เท่ากับ 38, 30 และ 12 ตำแหน่งตามลำดับ ค่ากำลังการแยกแยะ (Dp) เท่ากับ 0.9725, 0.9563 และ 0.7713 ตามลำดับ เมื่อนำ *HV1* รวมกับ *HV2*, *HV1* รวมกับ *HV3*, *HV2* รวมกับ *HV3* และ นำทุกตำแหน่งมารวมกันแล้ว จะได้ค่ากำลังการแยกแยะรวมเท่ากับ 0.9732, 0.9750, 0.9400 และ 0.9750 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (h) เท่ากับ 0.9981, 1, 0.9640 และ 1 ตามลำดับด้วย

สรุป: การนำ *HV3* มาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ร่วมกับ *HV1* และ *HV2* ในประชากรลาวโซ่ง จะช่วยเพิ่มความแม่นยำได้มากยิ่งขึ้นสำหรับการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล

คำสำคัญ: ไมโตคอนเดียลดีเอ็นเอ, ลาวโซ่ง

บทนำ

การตรวจลำดับเบสบริเวณ Hypervariable region (*HV*) บนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอเป็นวิธีที่ใช้อย่างแพร่หลายในการตรวจพิสูจน์เชื้อสายฝ่ายมารดาในงานนิติวิทยาศาสตร์ เนื่องจากในไมโตคอนเดรียหนึ่งอันจะมีดีเอ็นเอหลายชุด ความหลากหลายทางพันธุกรรมสามารถพบได้ที่บริเวณ *HV* ซึ่งประกอบไปด้วยส่วน *HV1* (ตำแหน่งที่ 16024-16365), *HV2* (ตำแหน่งที่ 73-340) และ *HV3* (ตำแหน่งที่ 438-574) โดยทั่วไปจะนิยมตรวจวิเคราะห์เฉพาะตำแหน่ง *HV1* และ *HV2* เท่านั้น อย่างไรก็ตาม ยังมีตำแหน่ง HV3 ที่ถือเป็นส่วนย่อยของ *HV2* ซึ่งถึงแม้ว่า

จะมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ แต่ในบางครั้งก็อาจจะพบว่ามีประโยชน์ได้ เนื่องจากในบางกลุ่มประชากรอาจต้องการตัวบ่งชี้เพิ่มเติมในการตรวจพิสูจน์เชื้อสายฝ่ายมารดา เพราะว่ามีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมสูง

ในงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมบนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของประชากรลาวโซ่งซึ่งเป็นกลุ่มชนเผ่าที่อาศัยอยู่ทางภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทยซึ่งมีลักษณะเป็นชุมชนปิด ประเพณีการแต่งงานสืบเชื้อสายของคนกลุ่มนี้มักจะเกิดขึ้นภายในกลุ่มคนเดียวกันทำให้มีความใกล้ชิดทางสายเลือดสูงและมีการกระจายหรือเปลี่ยนแปลงของไมโตคอนเดียลดีเอ็นเอน้อย การศึกษาครั้งนี้มุ่งหวังให้เป็นตัวแทนหรือแบบของกลุ่มคนที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมน้อยและอาจจะใช้อนุมานไปถึงประชากรกลุ่มน้อยอื่นๆได้ โดยตั้งสมมติฐานว่า *HV1* และ *HV2* น่าจะไม่เพียงพอต่อการแยกแยะประชากรในการตรวจพิสูจน์เชื้อสายฝ่ายมารดาและต้องการใช้ตัวบ่งชี้อื่นเพิ่มเติมคือ *HV3*

วัสดุและวิธีการศึกษา

1. ประชากรและการเก็บตัวอย่าง: ศึกษาในประชากรลาวโซ่งที่ไม่มีความเกี่ยวข้องทางสายมารดานับขึ้นไปสามรุ่น จำนวน 40 คนซึ่งอาศัยอยู่ในจังหวัดพิษณุโลกและนครสวรรค์ ซึ่งชนกลุ่มดังล่าวถูกกวาดต้อนมาจากราชอาณาจักรลาวตั้งแต่สมัยรัชกาลที่ 3 แห่งรัตนโกสินทร์ และพามารวมกลุ่มกันที่จังหวัดเพชรบุรีก่อนแยกตัวขึ้นมาอาศัยในปัจจุบัน เราทำการเก็บเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มด้วยไม้พันปลายสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อนำไปสกัดเก็บไมโตคอนเดียลดีเอ็นเอ

2. การสกัดสารพันธุกรรม: ทำการสกัดโดยใช้ชุดทดสอบ QIAamp® DNA Micro Kits (QIAGEN®)

3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนที่ต้องการ: ใช้วิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ primer ดังนี้

HV1[1]	L15904	5’-CTA ATA CAC CAG TCT AAA CCG-3’
	H16540	5’-GTG GGC GGC TAT TTA GGC TTT AT-3’
HV2[1]	L29	5’-GGT CTA TCA CCC TAT TAA CCA C-3’
	H408	5’-CTG TTA AAA GTG CAT ACC GCC A-3’
HV3[2]	L128	5’-CGC ACC TAC GTT CAA TAT TAC-3’
	H619	5’-GGT GAT GTG AGC CCG TCT AA-3’

โดย *HV1* และ *HV2* มีขั้นตอนดังนี้

ขั้นที่หนึ่ง ;

Initial denaturation : 94.0 oC 4 นาที

ขั้นที่สอง ;

Denaturation	: 94.0 oC	45	วินาที
Annealing	: 55.0 oC	30	วินาที
Extension	: 72.0 oC	3	นาที

ทำขั้นที่สองซ้ำ 32 รอบ

ขั้นที่สาม ;

Final extension	: 72.0 oC	7	นาที

สำหรับ *HV3* มีขั้นตอนดังนี้

ขั้นที่หนึ่ง ;

Initial denaturation	: 94.0 oC	1	นาที

ขั้นที่สอง ;

Denaturation	: 94.0 oC	1	นาที
Annealing	: 54.0 oC	30	วินาที
Extension	: 72.0 oC	1	นาที

ทำขั้นที่สองซ้ำ 32 รอบ

ขั้นที่สาม ;

Final extension	: 72.0 oC	7	นาที

4. การตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้: ใช้วิธีการ Electrophoresis ด้วย 2% agarose gel เทียบกับ 100 bp ladder และนำไปอ่านผลด้วยโปรแกรม GeneSnap®

5. การ Purification: ใช้ชุดทดสอบของ QIAquick® PCR purification kit (QIAGEN®)

6. การเตรียมสายดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ (Cycle sequencing): ใช้ BigDye® Terminator cycle sequencing ready reaction kit V.3.1

7. การตกตะกอนสารพันธุกรรม: ใช้วิธี Ethanol/Sodium Acetate method

8. การวิเคราะผล: ด้วยเครื่อง ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer

ผลการศึกษา

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง (revised version of Cambridge Reference Sequence; rCRS) พบว่ามีจำนวนตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงหรือกลายพันธุ์ของนิวคลีโอไทด์ (Polymorphic sites) เท่ากับ 38, 30 และ 12 ตำแหน่ง ใน *HV1*, *HV2* และ *HV3* ตามลำดับ ดังแสดงไว้ตามตารางที่ 1 ซึ่งพบว่ามีการเปลี่ยนของนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่ง *HV1* มากที่สุด รองมาเป็นตำแหน่ง *HV2* และ *HV3* ตามลำดับ

ค่าความสามารถในการแยกแยะบุคคล (Discrimination Power: Dp) ของ *HV1*, *HV2* และ *HV3* เป็น 0.9725, 0.9563 และ 0.7713 ตามลำดับ เมื่อนำรูปแบบ (haplotype) ของ HV ทั้งสามตำแหน่งมาพิจารณาร่วมกันจะได้สี่รูปแบบได้แก่ *HV1+HV2*, *HV1+HV3*, *HV2+HV3* และ *HV1+HV2+HV3* สามารถคำนวณค่า Dp ได้เท่ากับ 0.9732, 0.9750, 0.9400 และ 0.9750 และมีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (Haplotype Diversity; h) เท่ากับ 0.9981, 1, 0.9641 และ 1 ตามลำดับ

บริเวณที่มีนิวคลีโอไทด์ Cytosine ติดต่อกันเป็นจำนวนมาก (homopolymeric C; C stretch) ซึ่งเป็นลักษณะของความหลากหลายที่เกิดจากความยาวไม่เท่ากัน (length polymorphism) นั้น พบได้ที่ตำแหน่ง 16184 ถึง 16193 ของ HV1, ที่ตำแหน่ง 303 ถึง 315 ของ HV2 และที่ตำแหน่ง 568 ถึง 573 ของ HV3 แสดงไว้ดังตารางที่ 2 โดยที่ตำแหน่ง 16184 ถึง 16188 ของ *HV1* จะเกิดการเปลี่ยนแปลงแทนที่ของชนิดนิวคลีโอไทด์จาก C เป็น T, ที่ตำแหน่ง 16189 เปลี่ยนจาก T เป็น C และที่ตำแหน่ง 16190-16193 เปลี่ยนจาก C เป็น T

สำหรับ *HV2* มีการแทรกเพิ่มนิวคลีโอไทด์ (insertion) ของ C ที่ตำแหน่ง 303–309 อีก 1 หรือ 2 นิวคลีโอไทด์ (+C, +2C) และที่ตำแหน่ง 311–315 อีก 1 นิวคลีโอไทด์ (+C) นอกจากนี้ยังพบการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ (deletion) ที่ตำแหน่ง 303-309 อีก 2 นิวคลีโอไทด์ (del 2C) ส่วนตำแหน่ง *HV3* นั้น พบว่ามีนิวคลีโอไทด์ C และ A ซ้ำๆกัน (CA repeat) ที่ตำแหน่ง 514–523 แต่ไม่พบลักษณะ homopolymeric C เลย

	HV1	*HV2*	*HV3*	*HV 1+2*	*HV 2+3*	*HV 1+3*	*HV 1+2+3*
Polymorphic sites (n)	38	30	12	68	42	50	80
Haplotypes (n)	38	29	9	39	33	40	40
Transition (n)	105	150	14	255	164	119	269
Transversion (n)	23	2	2	25	4	25	27
Insertion (n)	0	44	4	44	48	4	48
Deletion (n)	1	9	37	10	46	38	47
Random match probability : RMP	0.0275	0.0438	0.2288	0.0269	0.0600	0.0250	0.0250
Discrimination power : Dp	0.9725	0.9563	0.7713	0.9731	0.9400	0.9750	0.9750
Haplotype diversity : h	0.9974	0.9801	0.7910	0.9981	0.9641	1.0000	1.0000

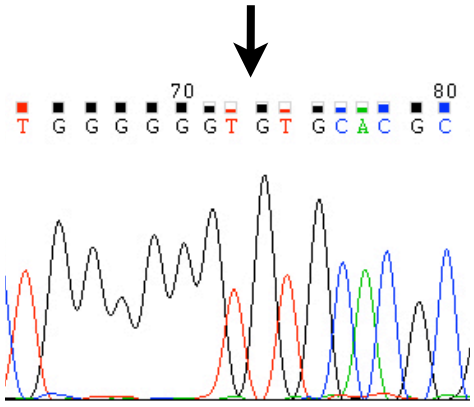
ตารางที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบค่าความหลากหลายของตัวแปรต่างๆในประชากรลาวโซ่งจำนวน 40 คน

ตำแหน่ง	Insertion	%	Deletion	%	Mutation	%
HV1						
16184-16188	-	-	-	-	C to T	12.5
16189	-	-	-	-	T to C	5
16190-16193	-	-	-	-	C to T	15
HV2						
303–309	+1C	47.5	2C	5	-	-
	+2C	2.5				
311-315	+1C	5				
HV3	-	-	-	-	-	-

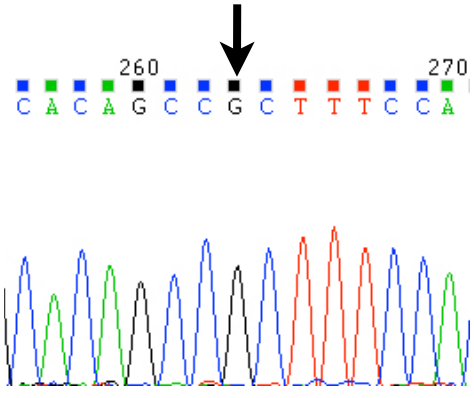
ตารางที่ 2 แสดงการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์บริเวณ C stretch

อภิปรายผลการศึกษา

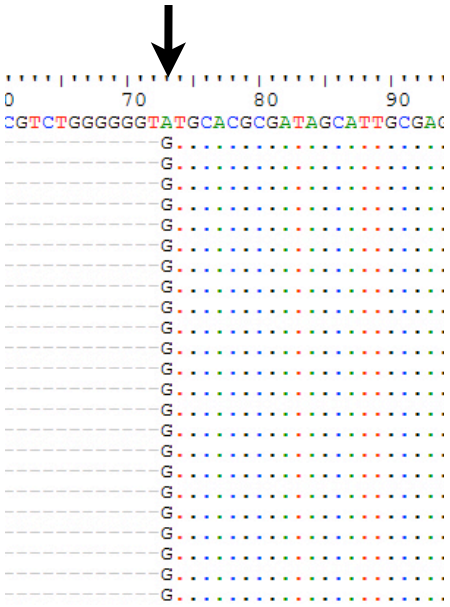
จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า *HV3* เป็นตำแหน่งที่สามารถนำมาใช้เพิ่มค่า Dp ได้มากกว่าการใช้เพียง *HV1* และ *HV2* เมื่อเทียบกับการศึกษาในประชากรอื่น พบว่าในตำแหน่งที่7 3 ในคนลาวโซ่ง ไทย[2] จีน[3] และญี่ปุ่น[4] จะมีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์จาก A เป็น G จากทุกตัวอย่าง ดังแสดงใน รูปที่ 1 และ 3 นอกจากนี้ยังพบ mutation ที่มีเฉพาะในประชากรลาวโซ่ง คือ การเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ของทุกตัวอย่างที่ตำแหน่ง 263 โดยเปลี่ยนแปลงจาก A เป็น G ดังแสดงใน รูปที่ 2 และ 4



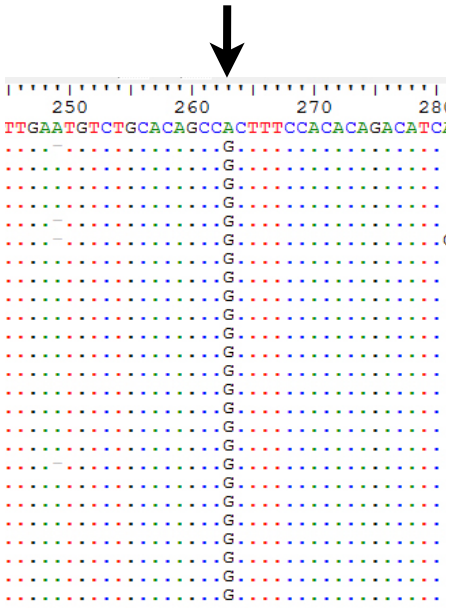
รูปที่ 1 ที่ตำแหน่ง 73 แสดงชนิดเบสเป็น G



รูปที่ 2 ที่ตำแหน่ง 263 แสดงชนิดเบสเป็น G



รูปที่ 3 ที่ตำแหน่ง 73 เปลี่ยนจาก A เป็น G



รูปที่ 4 ที่ตำแหน่ง 263 เปลี่ยนจาก A เป็น G

สรุป

เมื่อนำ *HV3* มาร่วมใช้ในงานตรวจวิเคราะห์ทางนิติวิทยาศาสตร์ในประชากรลาวโซ่งพบว่าทำให้มีความจำเพาะในการแยกแยะได้ดีขึ้นกว่าการใช้เพียง *HV1* และ *HV2* เท่านั้น และเมื่อนำ *HV1* รวมกับ *HV3* และ *HV1*, *HV2* รวมกับ *HV3* จะทำให้ได้ค่า Dp และ h ที่ดีที่สุดในการตรวจความสัมพันธ์ทางฝ่ายมารดา อีกทั้งในประชากรลาวโซ่งจะพบการเปลี่ยนแปลงของเบสจาก A เป็น G ทั้งในตำแหน่งที่ 73 และ 263 นอกจาก *HV3* จะเป็นตัวบ่งชี้ที่มีความสำคัญต่องานนิติวิทยาศาสตร์แล้ว ยังมีประโยชน์ในการศึกษาทางพันธุกรรมของประชากรกลุ่มย่อยและมานุษยวิทยาด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. Lutz S., et al. Is it possible to differentiate mtDNA by means of HVIII in samples that cannot be distinguished by sequencing the HVI and HVII regions? Forensic Sci Int. 2000; 113(1): 97-101.
2. Duangchit S. A study of HVRIII in Thai population and forensic application, Master Thesis in Forecsic Science. 2006, Mahidol university. p. 60.
3. Fai HS, Sheng G, Li SB. Mitochondrial DNA D loop in Yunnan Nu HVR II genetic polymorphism. Journal of Xi'an Jiaotong University. 2009; 30(3): 283-287.
4. Nagai A, Nakamura I, Bunai Y, Analysis of the HVI, HVII and HVIII regions of mtDNA in 400 unrelated Japanese. Int Congr. 2006; 1288(0): 139-141.