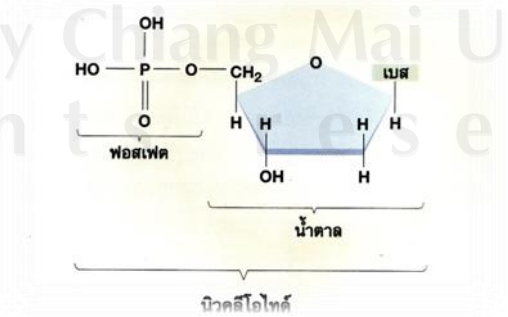
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ตามกฎหมายของประเทศไทย วัตถุพยานเป็นพยานหลักฐานประเภทหนึ่งที่ปัจจุบันมีความสำคัญที่สุดที่ช่วยในการคลี่คลายคดี ตั้งแต่ชั้นตรวจสถานที่เกิดเหตุจนถึงชั้นศาล แบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ วัตถุพยานทั่วไป (physical evidences) เป็นวัตถุพยานที่ได้จากสิ่งไม่มีชีวิต เช่น อาวุธที่ใช้ทำร้าย เขม่าดินปืน สารพิษ เครื่องงัดแงะ ปากกา รถยนต์ เป็นต้น และวัตถุพยานทางชีววิทยา (biological evidences) เป็นวัตถุพยานที่ได้มาจากสิ่งที่มีชีวิตหรือเป็นส่วนของสิ่งมีชีวิตมาก่อน เช่น คราบเลือด คราบอสุจิ เส้นผม ฟัน น้ำลาย ปัสสาวะ อุจจาระ เป็นต้น ในการสืบสวนคดีอาญา ถือว่าวัตถุพยานทางชีววิทยา เป็นวัตถุพยานเพียงประเภทเดียวที่สามารถแสดงความสัมพันธ์โดยตรงระหว่างเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นกับตัวผู้ต้องหาหรือผู้เสียหายได้ การเก็บและการส่งวัตถุพยานไปตรวจอย่างถูกวิธี ประกอบกับการตรวจโดยละเอียดและถูกต้อง จะเป็นประโยชน์ในการสืบสวนหาตัวผู้กระทำผิด หรือการพิสูจน์ความผิดของผู้ต้องหาเป็นอย่างมาก

สิ่งสำคัญขั้นพื้นฐานที่พบในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ไม่ว่าจะเป็น มนุษย์ สัตว์ พืช เชื้อรา แบคทีเรีย หรือไวรัส เป็นต้น ก็คือ ดีเอ็นเอ (DNA) ซึ่งเป็นเสมือนสิ่งที่บอกให้รู้ว่า มนุษย์เป็นใครมาจากไหน และแตกต่างจากสิ่งมีชีวิตอื่นอย่างไร เป็นรหัสชีวิตหรือสารพันธุกรรมที่ทำหน้าควบคุมลักษณะต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต รวมทั้งเก็บและถ่ายทอดข้อมูลพันธุกรรมไปสู่ลูกหลาน โดยองค์ประกอบทางเคมีของกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (deoxyribonucleic acid) หรือดีเอ็นเอ เป็นพอลิเมอร์ของนิวคลีโอไทด์ ซึ่งแต่ละหน่วยย่อยนิวคลีโอไทด์ประกอบไปด้วยหน่วยน้ำตาล เบส และหมู่ฟอสเฟต ดังรูป

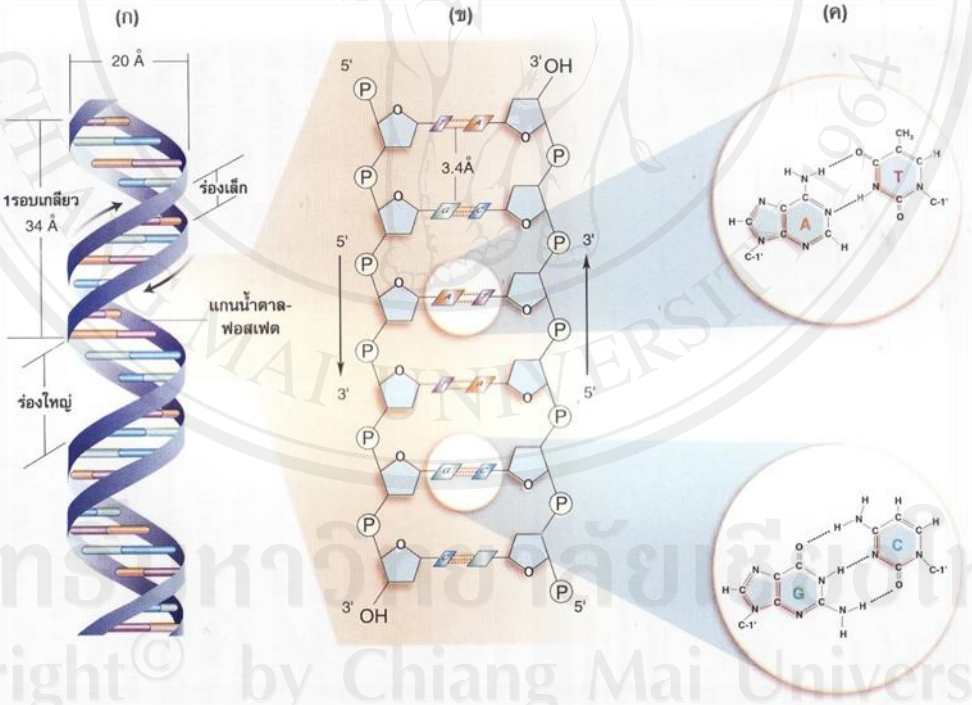


รูปที่ 1 โครงสร้างของนิวคลีโอไทด์ ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาล เบส และหมู่ฟอสเฟต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ความแตกต่างของดีเอ็นเอเกิดจากการเรียงตัวของเบส 4 ชนิด บนสายดีเอ็นเอนั้นๆ มีความแตกต่างกัน ซึ่งเบสที่พบทั่วไปในดีเอ็นเอ มี 4 ชนิด แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ เบสพิริมิดีน ได้แก่ เบสไซโทซีน (Cytosine : C) และ เบสไธมีน (Thymine : T) อีกกลุ่มคือ เบสพิวริน ได้แก่ เบสอะดีนีน (Adenine : A) และ เบสกัวนีน (Guanine : G)

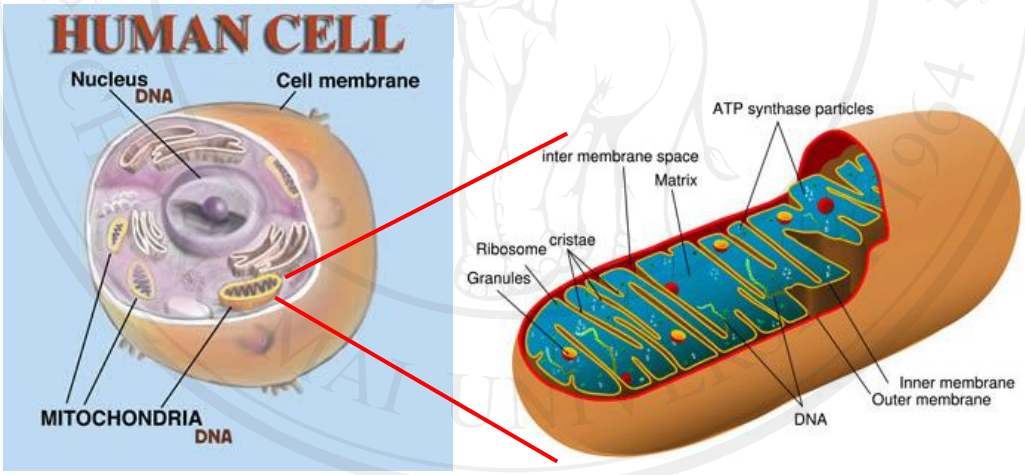
ดีเอ็นเอ มีโครงสร้างเป็นเกลียวคู่เวียนขวาคล้ายขดลวดสปริง (right-handed double helix) ซึ่งเกลียวคู่ก็คือ สายพอลินิวคลิโอไทด์ที่เกิดจากการเชื่อมต่อกันของนิวคลิโอไทด์หลายๆ หน่วย ด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ จำนวน 2 สาย เรียงตัวขนานกันในทิศทางตรงกันข้าม โดยมีน้ำตาลและหมู่ฟอสเฟตเป็นแกนของเกลียว (DNA backbone) และมีเบสอยู่ภายในเกลียว การเข้าคู่หรือเข้าจับกันของสายพอลินิวคลิโอไทด์ทั้ง 2 สาย เกิดจากการจับคู่กันระหว่างเบสพิวรีนและเบสพิริมิดีน ด้วยพันธะไฮโดรเจน โดย A สร้าง 2 พันธะ เข้าจับกับ T และ G สร้าง 3 พันธะ เข้าจับกับ C นอกจากนี้ยังมีแรงไฮโดรโฟบิค (hydrophobic interaction) ที่เกิดขึ้นระหว่างเบสที่ซ้อนอยู่ในสายเดียวกัน (stacking bases) ช่วยยึดโครงสร้างเกลียวคู่ให้มีความเสถียร (วิชัย บุญแสง, 2547) ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 (ก) โครงสร้างเกลียวคู่ของดีเอ็นเอ
(ข) มีน้ำตาลและหมู่ฟอสเฟตเป็นแกน
(ค) มีเบสภายในทำหน้าที่ยึดสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ด้วยพันธะไฮโดรเจน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไมโตคอนเดรีย (mitochondria) เป็นออร์แกเนลล์ที่ทำหน้าที่ในการหายใจ และเป็นแหล่งพลังงานของเซลล์ พบในเซลล์ของยูคาริโอตทั้งพืชและสัตว์ มีดีเอ็นเอของตัวเอง มีการจำลองโมเลกุลดีเอ็นเอและสังเคราะห์โปรตีนเอง ได้รับการถ่ายทอดจากทางแม่เท่านั้น จำนวนไมโตคอนเดรียในเซลล์มีปริมาณแตกต่างกัน ขึ้นกับชนิดและกิจกรรมของเซลล์ โดยแต่ละเซลล์อาจมีจำนวนไมโตคอนเดรียในเซลล์ตั้งแต่หลายร้อยจนถึงจำนวนเป็นหลักพัน และในไมโตคอนเดรียแต่ละอันจะมีดีเอ็นเอ 5-10 โมเลกุล รวมแล้วอาจมีหลายพันโมเลกุลต่อเซลล์ สำหรับดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรียของมนุษย์ มีลักษณะเป็นเกลียวคู่แบบวงแหวน (double-stranded circular DNA) ขนาดเล็ก มีความยาว 16,569 คู่เบส ทุกเบสมีความหมายทั้งหมด ประกอบด้วยยีน 37 ยีน โดยมี 13 ยีนที่เป็นรหัสของโปนตีน ที่เหลือเป็นยีนของ tRNA 22 ชนิด และ rRNA 2 ชนิด มีส่วนที่ไม่เป็นรหัสของยีนขนาด 1,200 คู่เบส บริเวณนี้เรียกว่า บริเวณควบคุม (control region) ซึ่งมีความหลากหลายสูงและมีการสะสมของการกลายพันธุ์ (mutation) มากกว่าดีเอ็นเอในนิวเคลียสถึง 10 เท่า บางทีจึงเรียกบริเวณนี้ว่า บริเวณหลากหลายสูง (hypervariable region) (ตรีทิพย์ รัตนวรชัย, 2552)



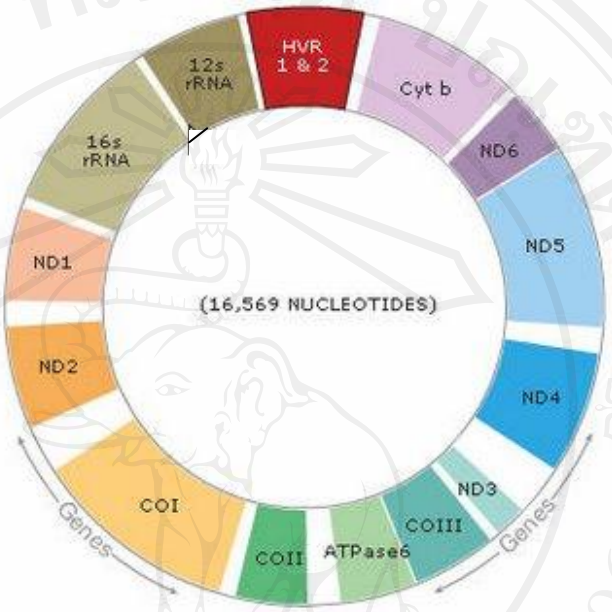
(ก) (ข)

รูปที่ 3 (ก) เซลล์ที่มีดีเอ็นเอในนิวเคลียส และภายในเซลล์มีไมโตคอนเดรียจำนวนมาก
(ข) โครงสร้างภายในของไมโตคอนเดรีย

(http://lozsmedicaljourney.blogspot.com/2008/07/multiple-mitochondrial-dna-deletions.html)
(http://home.telfort.nl/lucienbal/phylogeny2.html)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ยีนไซโตโครม บี (cytochrome b gene) เป็น 1 ใน 37 ยีนที่อยู่บนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ เป็นยีนที่มีการแปลรหัสไปเป็นโปรตีนซึ่งเป็นหน่วยย่อยของเอนไซม์ ที่ทำหน้าที่สำคัญในระบบขนส่งอิเล็กตรอน คือ ตัวรับและถ่ายทอดอิเล็กตรอน ของกระบวนการหายใจระดับเซลล์แบบใช้ออกซิเจน



รูปที่ 4 แผนที่ตำแหน่งยีนในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของมนุษย์

(http://treethinkers.blogspot.com/2009/11/from-best-to-worst-reevaluation-of.html. 16 ต.ค. 2554*)*

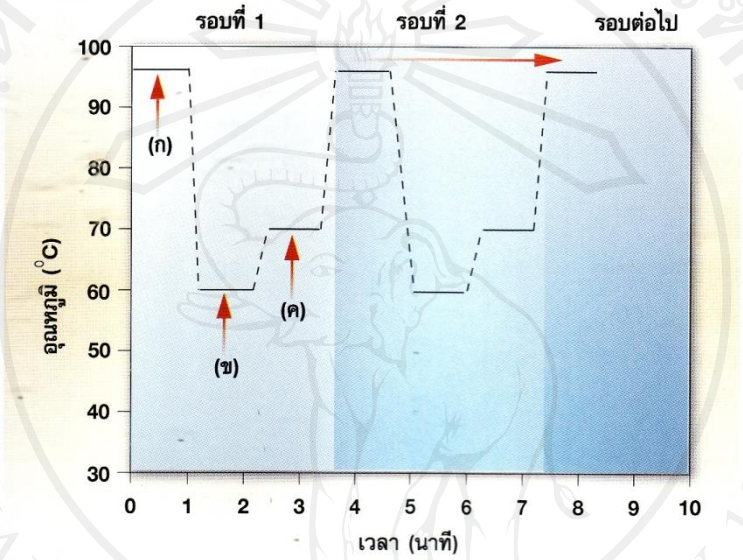
เทคนิคทางอณูชีววิทยาเทคนิคหนึ่ง ที่สามารถนำมาประยุกต์เพื่อการศึกษา ตรวจสอบทางด้านดีเอ็นเอ ได้แก่ เทคนิคพีซีอาร์ (polymerases chain reaction: PCR) หรือปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายซึ่งอยู่ในสารละลายรวมกับดีเอ็นเออื่น โดยไม่จำเป็นต้องทำให้ชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวบริสุทธิ์ก่อน สามารถแยกส่วนของดีเอ็นเอที่สนใจโดยไม่ต้องนำไปขยายเพิ่มปริมาณในเซลล์หรือนำไปโคลน ในปฏิกิริยาประกอบด้วยองค์ประกอบดังนี้ คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ ไพรเมอร์ (เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ ความยาวประมาณ 20-35 เบส ซึ่งเป็นเบสคู่สมกับปลายทั้ง 2 ด้านของดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณ) เอนไซม์ดีเอ็นเอพอริเมอเรส และสารต่างๆ ที่จำเป็นสำหรับปฏิกิริยา เช่น ดีออกซีนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) และแมกนีเซียมคลอไรด์ เป็นต้น การทำงานของปฏิกิริยาในแต่ละรอบ ประกอบด้วยขั้นตอน 3 ขั้นตอน ซึ่งควบคุมโดยอุณหภูมิต่างๆ กัน คือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1. Denaturation ช่วงอุณหภูมิ 90-95 °C ดีเอ็นเอต้นแบบที่เป็นดีเอ็นเอเส้นคู่ถูกแยกเป็นดีเอ็นเส้นเดี่ยว

2. Annealing ช่วงอุณหภูมิ 50-60 °C ไพรเมอร์เข้าจับคู่กับดีเอ็นเอเส้นเดี่ยวในส่วนที่ต้องการ

3. Extension ช่วงอุณหภูมิ 70-72 °C เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเติมเบสที่ปลาย 3′ ของไพรเมอร์ (วิชัย บุญแสง, 2547)



รูปที่ 5 ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

(ก) ช่วงอุณหภูมิ 90-95 °C : ในการแยกสายดีเอ็นเอจากเส้นคู่เป็นเส้นเดี่ยว

(ข) ช่วงอุณหภูมิ 50-60 °C : ในการจับคู่กันระหว่างดีเอ็นเอเส้นเดี่ยวกับไพรเมอร์

(ค) ช่วงอุณหภูมิ 70-72 °C : ในการเติมเบสทางปลาย 3′ ของดีเอ็นเอเส้นใหม่

ดังนั้นถ้าเริ่มต้นจากดีเอ็นเอต้นแบบ 1 คู่ และปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินไปจนสิ้นสุดในรอบแรก จะพบว่า ผลผลิตที่ได้ไม่ได้มีเฉพาะส่วนของดีเอ็นเอบริเวณที่เป็นเป้าหมายเท่านั้น แต่ได้โมเลกุลดีเอ็นเอที่มีสายหนึ่งยาวมากเพราะเป็นต้นแบบเดิม อีกสายหนึ่งที่เป็นคู่สมมีปลาย 5′ เริ่มต้นจากปลาย 5′ ของไพรเมอร์ที่ใช้ ส่วนปลาย 3′ ยาวออกไปนอกบริเวณที่ต้องการ ในรอบที่ 2 ยังคงได้ผลผลิตที่มีสายหนึ่งยาวมาก หรือมีปลาย 3′ ที่ยาวเกินส่วนที่ต้องการ จนถึงรอบที่ 3 จึงเริ่มมีโมเลกุลดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากับเป้าหมายที่ต้องการ โดยเมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดในแต่ละรอบจะได้จำนวนของดีเอ็นเอต้นแบบเข้าสู่ปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น ทำให้ได้ดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน ลักษณะการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของปฏิกิริยาเป็นการเพิ่มแบบทวีคูณ คือ 2^n เมื่อ n เป็นจำนวนรอบของปฏิกิริยา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูปที่ 6 ปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นในลักษณะ 2^n โดยเทคนิคพีซีอาร์

การตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR มีด้วยกันหลายวิธี ที่นิยมใช้กันทั่วไป คือ เจล อิเล็กโทร-โฟรีซิส (gel electrophoresis) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้แยกโมเลกุลของสารออกจากกันโดยใช้กระแสไฟฟ้า โดยให้สารที่มีประจุนั้นเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางชนิดหนึ่งในสารละลาย สารที่มีประจุต่างกันจะเคลื่อนที่ไปในทิศทางตรงกันข้าม นอกจากประจุแล้วอัตราการเคลื่อนที่ยังขึ้นอยู่กับขนาดรูปร่างโมเลกุล แรงเคลื่อนไฟฟ้า และตัวกลางที่ใช้ด้วย (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552)

ในการแยกผลผลิต PCR สามารถทำได้โดยการใช้ตัวกลางชนิดวุ้นอะกาโรส (agarose gel) ที่ความเข้มข้น 2-3 เปอร์เซ็นต์ ผ่านกระแสไฟฟ้าลงในตัวกลางวุ้นที่แช่อยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ ชิ้นดีเอ็นเอซึ่งมีประจุเป็นลบเนื่องจากประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟตจำนวนมาก จะเคลื่อนที่ไปทางขั้วบวก โดยชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ สำหรับเวลาที่ใช้ในการแยกผลผลิตนั้นจะแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับช่วงขนาดของลำดับเบส เมื่อชิ้นดีเอ็นเอแยกโดยสมบูรณ์แล้วจึงนำตัวกลางวุ้นนั้นมาย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบไมด์ (ethidium bromide) และนำไปบันทึกผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตเพื่อดูลักษณะของผลผลิตที่เกิดขึ้น

ปัจจุบันพบว่ามีการนำความรู้ทางด้านชีวโมเลกุลเกี่ยวกับดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรีย มาประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลาย เช่น การพิสูจน์บุคคลด้วยดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรีย ในกรณีที่ตัวอย่างที่ได้ในที่เกิดเหตุมีน้อยมาก เช่น ตัวอย่างจากเศษผงกระดูก คราบเลือด เส้นผม หรือในตัวอย่างที่มีอายุยาวนาน (วัตถุโบราณ) หรือในตัวอย่างที่เน่าสลาย และดีเอ็นเอส่วนใหญ่ถูกย่อยไปเกือบหมดจนไม่สามารถใช้ดีเอ็นเอจากนิวเคลียสได้ เพราะใน 1 เซลล์ จะมีไมโตคอนเดรียที่มีดีเอ็นเออยู่มากมายหลายพันชุด ขณะที่ในนิวเคลียสของเซลล์จะมีดีเอ็นเออยู่เพียง 2 ชุด นอกจากนี้ดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรียจะได้รับการถ่ายทอดจากทางมารดาเท่านั้น รหัสพันธุกรรมของดีเอ็นเอในไมโต-คอนเดรีย จึงแสดงถึงความสัมพันธ์ทางแม่โดยไม่มีการปะปนกับพ่อและญาติทางพ่อ ดังนั้นจึงเหมาะที่จะใช้ในการตรวจพิสูจน์บุคคลที่เสียชีวิตหรือหายสาบสูญไปนานแล้วและไม่สามารถหา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

พ่อแม่มาพิสูจน์ได้โดยตรง การใช้ญาติทางฝ่ายมารดาที่เหลืออยู่มาตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอจากไมโต-คอนเดรียจะทำให้การตรวจเปรียบเทียบผลการตรวจง่ายกว่า เนื่องจากลูกจะมีดีเอ็นเอเหมือนแม่และญาติทางแม่ที่มีการสืบสายเลือดกันต่อมา (วิชัย บุญแสง, 2547)

การตรวจสอบเพื่อระบุชนิด (species identification) การตรวจสอบเพื่อระบุชนิดในสัตว์นิยมตรวจจากส่วนของยีนไซโตโครม บี ที่อยู่ในไมโตคอนเดรีย ลำดับเบสของยีนไซโตโครม บี ของสัตว์จะค่อนข้างอนุรักษ์ จึงสามารถออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณส่วนดังกล่าวโดยวิธี PCR เช่น ในการศึกษาของ Bataille และคณะ (1999) ได้พัฒนาใช้ยีนในส่วนของ cytochrome b และ hypervariable D-loop ใน mitochondrial DNA ในการระบุแยกมนุษย์ออกจากสัตว์อื่น 4 ชนิด ได้แก่ หมู ไก่ ม้า และ วัวเนื้อ เนื่องด้วยในการตรวจสอบชนิดสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตด้วยวิธีเดิมมักพบปัญหา เมื่อตัวอย่างที่ส่งตรวจมีสภาพเก่า ถูกทิ้งไว้นาน และเสื่อมสภาพ มีปริมาณดีเอ็นเอในนิวเคลียสไม่เพียงพอจะทำการตรวจ โดยภายหลังจากทำการสกัดตัวอย่างดีเอ็นเอของมนุษย์จากเซลล์ในน้ำลาย ดีเอ็นเอของสัตว์จากชิ้นเนื้อ และนำไปทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างด้วยเทคนิคพีซีอาร์แล้ว พบว่าสามารถที่จะแยกดีเอ็นเอของมนุษย์ออกจากดีเอ็นเอของสัตว์ได้อย่างชัดเจน โดยในมนุษย์จะเกิดแถบดีเอ็นเอสองแถบทั้งในตำแหน่งของยีน cytochrome b และ hypervariable D-loop นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพิสูจน์ได้แม้มีปริมาณดีเอ็นเอเพียง 0.4 ng ส่วนในสัตว์ทุกชนิดพบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวเท่านั้น ทำให้วิธีการที่ใช้ดีเอ็นเอในไมโตคอน-เดรียมาตรวจเพื่อระบุชนิดสายพันธุ์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ เป็นวิธีการหนึ่งที่เชื่อถือได้ ขั้นตอนการตรวจง่ายและรวดเร็ว สามารถตรวจได้แม้ในตัวอย่างที่ค่อนข้างเสื่อมสภาพ

Parson W. และคณะ (2000) ได้ศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วนของยีน cytochrome b เพื่อใช้ระบุแยกชนิดสายพันธุ์ที่แน่นอนของตัวอย่างทางชีววิทยา ที่มาจากสัตว์มีกระดูกสันหลังทั้งหมด 44 ชนิดตัวอย่าง ครอบคลุม 5 กลุ่มสำคัญของสัตว์มีกระดูกสันหลัง ได้แก่ กลุ่มสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม 15 ชนิด กลุ่มสัตว์ปีก 22 ชนิด กลุ่มสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ 1 ชนิด กลุ่มสัตว์เลื้อยคลาน 2 ชนิด และกลุ่มปลาอีก 7 ชนิด เนื่องจากลำดับเบสของตำแหน่งยีน cytochrome b ค่อนข้างจะอนุรักษ์ และมีความแตกต่างกันไปตามชนิดของสิ่งมีชีวิต โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างทางชีววิทยา ไม่ว่าจะเป็นเลือด เนื้อเยื่อ อัณฑะ รังไข่ เส้นผมเส้นขน กระดูก กระดูกอ่อน และตับ ของสัตว์ทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ จากนั้นทำการออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนยีน cytochrome b ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งทำให้ได้ข้อมูลลำดับเบสของส่วนยีน cytochrome b ที่มีความยาว 358 bp จากนั้นใช้โปรแกรม BLAST นำข้อมูลลำดับเบสของสัตว์ที่วิเคราะห์ได้ทั้งหมดเข้าไปเปรียบเทียบจับคู่กับระบบฐานข้อมูลลำดับเบสที่มีการระบุชนิดสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตไว้แน่นอนแล้วใน GenBank/EMBL/DDJB ของ National Center of Biotechnology Information (NCBI) และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ได้แสดงผลออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกัน หรือ ค่า MSP (maximum-scoring segment pair) พบว่าสามารถที่จะระบุชนิดของสัตว์ได้ทั้งหมด ซึ่งการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสามารถนำไปประยุกต์ใช้ทางนิติวิทยาศาสตร์เมื่อเกิดกรณีการตรวจสอบตัวอย่างที่มีสัตว์มาเกี่ยวข้อง เช่น อุบัติเหตุทางจราจรกับสัตว์ การลักลอบจับสัตว์ การละเมิดและการค้าขายสัตว์สงวน เป็นต้น

ในการศึกษาของ Matsuda H. และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการตรวจเพื่อระบุดีเอ็นเอมนุษย์ที่มีความจำเพาะต่อส่วนยีน cytochrome b ในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของมนุษย์เท่านั้น โดยทำการออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ที่มีช่วงขนาดความยาว 157 bp ในเฉพาะส่วนยีน cytochrome b ของคนเท่านั้น ซึ่งลำดับเบสทั้งใน forward และ reverse ของไพรเมอร์ที่ออกแบบนี้ยังมีลำดับเบสที่ต่างจากลำดับเบสในช่วงความยาวและตำแหน่งเดียวกันของสัตว์ที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงมนุษย์อย่างลิงชิมแพนซี (chimpanzee) ถึง 26% จากนั้นได้นำไพรเมอร์ที่ออกแบบไปตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์กับตัวอย่างดีเอ็นเอของมนุษย์ ที่สกัดจากเลือดของอาสาสมัครชาย 30 คน และหญิง 18 คน ผลพบว่าสามารถตรวจสอบพบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ขนาดความยาว 157 bp ได้ชัดเจนหมดทั้ง 48 ตัวอย่าง และการตรวจสอบหลังทำการเจือจางความเข้มข้นของตัวอย่างดีเอ็นเอ ยังพบว่าสามารถใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบนี้ตรวจดีเอ็นเอได้ในปริมาณอย่างน้อยสุด 1 pg อีกด้วย เมื่อนำไปตรวจสอบกับตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดของสัตว์ชนิดต่างๆ ได้แก่ ลิงชิมแพนซี ลิงกอลิล่า ลิงญี่ปุ่น ลิงแสม วัว หมู สุนัข แพะ หนู ไก่ และปลาทูน่า ด้วยวิธีการเดียวกัน ผลคือไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอให้เห็นในทุกตัวอย่างของสัตว์เลย นอกจากนั้นยังทำการตรวจสอบด้วยเทคนิควิธีการเดียวกันกับตัวอย่างดีเอ็นเอมนุษย์ที่มาจากแหล่งอื่น ได้แก่ คราบเลือดและเส้นผมเส้นขน ที่ถูกเก็บไว้นาน 20 ปี ชิ้นส่วนของกระดูกที่ไม่สามารถระบุเอกลักษณ์บุคคลได้ซึ่งถูกเก็บไว้นาน 25-30 ปี โดยผลการตรวจสอบที่ได้ให้ผลไม่ต่างกันกับการตรวจสอบจากเลือดสด จากผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ ในงานนิติวิทยาศาสตร์สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจพิสูจน์ชีววัตถุพยานที่เก่า มีอายุนาน เสื่อมสภาพ ปริมาณดีเอ็นเอที่อยู่ในนิวเคลียสไม่เพียงพอที่จะตรวจสอบว่าเป็นดีเอ็นเอของมนุษย์หรือไม่ ซึ่งกรณีการประยุกต์ในงานคดีจริง ถูกรายงานโดย Cainè L. และคณะ (2006) ได้ศึกษาและดำเนินการตรวจระบุชนิดของตัวอย่างส่งตรวจในคดีการหายตัวไปของเด็กหญิงวัย 8 ปี ที่ถูกสันนิษฐานว่าอาจถูกฆาตกรรมแล้วโยนศพให้หมูกินในเล้า เนื่องจากตัวอย่างชีววัตุพยานที่พบมีปริมาณของแคลเซียมและฟอสฟอรัสซึ่งอาจจะเป็นส่วนของกระดูกมนุษย์ได้ โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่าง หลังพบความล้มเหลวจากการตรวจสอบจาก STR loci และเพื่อให้เกิดความกระจ่าง หมดความสงสัยเกี่ยวกับแหล่งที่มาของตัวอย่าง จึงทำการตรวจวิเคราะห์ดูลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ ในส่วนยีน cytochrome b ที่ขนาดความยาว 358 bp และนำข้อมูลลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank ของ NCBI ผ่านระบบออนไลน์โปรแกรม BLAST

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลปรากฏว่าลำดับของตัวอย่างนั้นตรงกับลำดับเบสของสัตว์ในสปีชีย์ (species) *Sus scofa* หรือหมู 100% ทำให้ข้อสันนิษฐานว่าศพอาจถูกโยนลงในเล้าหมูถูกตัดออกไป และเช่นเดียวกับการตรวจในคดีที่พบชิ้นส่วนของลำไส้ที่ต้องสงสัยว่าอาจเป็นของมนุษย์ในป่า ซึ่งภายหลังการวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วนยีน cytochrome b เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล แล้วพบว่าตัวอย่างนั้นมาจากสัตว์ในสปีชีย์ (species) *Sus scofa* หรือหมู 100% เช่นกัน จากการศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่าการตรวจระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตด้วยลำดับเบสในส่วนของยีน cytochrome b นอกจากจะมีความสำคัญต่องานนิติวิทยาสาสตร์ ในการช่วยในสามารถระบุชนิดสายพันธุ์ของเจ้าของดีเอ็นเอแล้ว ยังมีประโยชน์อย่างยิ่งในกรณีของการตัดสิ่งที่ไม่ใช่ออกจากคดีได้อย่างมั่นใจอีกด้วย

ในประเทศไทย ศรัณย์ และคณะ (2550) ได้ทำการตรวจดีเอ็นเอที่เป็นส่วนของยีนไซโต-โครม บี ในไมโตคอนเดรีย เพื่อแยกชนิดระหว่างจระเข้น้ำเค็ม (*Crocodylus porosus*) กับจระเข้ไทย (*C. siamensis*) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับจระเข้แต่ละชนิดได้ นอกจากนี้ Verma และ Singh (2003) มีรายงานการเพิ่มปริมาณส่วนของยีนไซโตโครม บี ในสัตว์ได้ถึง 221 ชนิด นำส่วนที่เพิ่มปริมาณได้มาหาลำดับเบส จะมีลำดับเบสที่ต่างกันไปตามชนิด (species specific) และการตรวจสอบของ Wan และ Fang (2003) ในตัวอย่างเช่นตัวยาที่ใช้ในการแพทย์แผนจีน (traditional chinese medicine) ที่มีส่วนผสมของกระดูกเสือ ซึ่งเป็นสัตว์ที่อยู่ในภาวะใกล้สูญพันธุ์ มีการพัฒนาไพรเมอร์ที่เพิ่มปริมาณส่วนของยีนไซโตโครม บี เฉพาะเสือ (Panthera tigris) ซึ่งสามารถตรวจสอบเนื้อ หนังแห้ง หรือแม้แต่ในส่วนผสมที่มีกระดูกเสือเป็นส่วนประกอบเพียง 0.5% (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved