บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ดีเอ็นเอประกอบด้วยโมเลกุลที่เป็นสายโซ่ยาว 2 เส้นยึดพันกันเป็นเกลียว (Double helix) ทำให้ดีเอ็นเอมีความคงทนและเสถียรภาพอย่างยิ่งนอกจากนั้นสายเกลียวนี้ยังจับกับโปรตีนที่เรียกว่าฮีสโตน (Histones) ซึ่งเปรียบได้กับเบาะหุ้มดีเอ็นเอ ยิ่งเพิ่มความคงทนขึ้นอีกมากมาย หากดูในส่วนประกอบของดีเอ็นเอแล้วจะพบว่าดีเอ็นเอประกอบด้วยสิ่งสำคัญ 3 อย่าง คือ กลุ่มฟอสเฟต (Phosphate group) น้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม และเบสซึ่งจะเป็นเพียวรีน (Purines) ได้แก่ adenine (A) และ guanine (G) ซึ่งมีวงแหวน 2 วง (6 และ5 อะตอม) หรือไพริมีดีน (Pyrimidines) ได้แก่ cytosine (C), thymine (T) และ uracil (U) ซึ่งมีวงแหวนวงเดียว (6 อะตอม) สำหรับ uracil นั้นพบใน ribonucleic acid (RNA) ซึ่งใช้แทน thymine ในดีเอ็นเอ ซึ่งเบสทั้งสองชนิดมีลักษณะเป็นวงแหวนแบนที่ประกอบด้วยอะตอมคาร์บอนและไนโตรเจน

เมื่อโมเลกุลทั้งสามชนิดมารวมกันจะได้เป็นหน่วยที่เล็กที่สุดของดีเอ็นเอเรียกว่า นิวคลีโอไทด์ (Nucleotide) ซึ่งนิวคลีโอไทด์หลายๆอันมาเชื่อมต่อกันเป็นสายเส้นยาวจะเรียกว่า โพลีนิวคลีโอไทด์ (Polynucleotides) ส่วนน้ำตาลของดีเอ็นเอจะเป็นน้ำตาลดีออกซีไรโบส (Deoxyribose) ทำให้ได้ชื่อของดีเอ็นตามลักษณะของน้ำตาล (DNA ย่อมาจาก deoxyribonucleic acid) การเชื่อมต่อระหว่างนิวคลีโอไทด์จะเป็นพันธะทางเคมีระหว่างกลุ่มฟอสเฟตของนิวคลีโอไทด์อันหนึ่งกับน้ำตาลของนิวคลีโอไทด์อีกอันหนึ่งเชื่อมต่อกันเป็นสายยาวมาก โดยปลายทางด้านที่เป็นฟอสเฟตเรียกเป็น 5' ส่วนปลายที่เป็นน้ำตาลเรียกเป็น 3'

ในปี พ.ศ.2496 James Watson และ Francis Crick สรุปว่าโมเลกุลของดีเอ็นเอมีลักษณะเป็นเส้นคู่บิดกันเป็นเกลียว (Double helix) เส้นดีเอ็นเอทั้งคู่จับกันโดยพันธะไฮโดรเจน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(Hydrogen bonds) ระหว่างคู่เบส โดยอะดีนีน (A) จะจับกับไธมีน (T) และกัวนีน (G) จะจับกับไซโตซีน (C) เท่านั้น A จับกับ T ด้วย 2 พันธะ (Bonds) ส่วน G จับกับ C ด้วย 3 พันธะ (Bonds) ด้วยความจำเพาะเจาะจงของคู่เบสเช่นนี้จึงทำให้สามารถกำหนดลำดับเบสของเส้นดีเอ็นเอสายที่จะไปจับกันได้ หากรู้ลำดับเบสของเส้นดีเอ็นเอที่จะศึกษาอยู่ก่อนแล้ว แม้ว่าพันธะไฮโดรเจนจะค่อนข้างอ่อน แต่เนื่องจากโมเลกุลของดีเอ็นเอประกอบด้วยหลายๆคู่เบส ทำให้มีพันธะเหล่านี้จำนวนมากสามารถสร้างความเสถียรให้แก่ดีเอ็นเออย่างยิ่ง ในภาวะปกติสายดีเอ็นเอไม่เคยแยกจากกัน แต่ถ้าดีเอ็นเออยู่ในที่ที่อุณหภูมิสูงใกล้จุดเดือด จะพบว่าสายดีเอ็นเอแยกจากกันเป็น 2 เส้นที่มีเบสเป็นคู่สมกัน (Complementary) เรียกขบวนการนี้ว่า denaturation การค้นพบว่าดีเอ็นเอมีลักษณะเป็นเส้นคู่ ทำให้ได้ข้อสรุปของการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอ โดยดีเอ็นเอจะแยกสายดีเอ็นเอเส้นคู่ออกเป็นเส้นเดี่ยวสองเส้น แล้วใช้ดีเอ็นเอแต่ละเส้นนั้นเป็นแม่แบบ (Templates) ของการสร้างดีเอ็นเอเส้นใหม่ต่อไป ทำให้ได้ดีเอ็นเอเส้นคู่ใหม่ (Double strands) 2 คู่ ที่มีลำดับเบสเช่นเดียวกับดีเอ็นเอแม่แบบทุกประการ

ในภาวะปกติดีเอ็นเอเส้นคู่จะไม่แยกจากกัน แต่เมื่ออุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมสูงขึ้นใกล้จุดเดือด เช่น 94-95 องศาเซลเซียส หรือในตัวกลางที่เป็นกรด หรือด่างอย่างรุนแรง เช่น $pH < 3$ หรือ $pH > 10$ ดีเอ็นเอจะแยกออกจากกันเป็นเส้นเดี่ยวอย่างรวดเร็ว และเมื่ออุณหภูมิเย็นลงที่ 65 องศาเซลเซียสดีเอ็นเอจะค่อยๆกลับเข้ามาจับกันเป็นเส้นคู่ใหม่ได้อีก ขั้นตอนนี้เรียกว่า annealing หรือ renaturation ในอุณหภูมิขนาดนี้เฉพาะดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเหมาะสมกันพอดีเท่านั้นจึงกลับมาจับกันเป็นเส้นเกลียวที่สมบูรณ์ (Perfect double helices) ได้อย่างเดิม ถ้าดีเอ็นเอ 2 เส้นมีลำดับเบสไม่เหมาะกันทั้งหมด แต่อุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมลดต่ำลงมากๆดีเอ็นเอก็อาจจะมาจับกันเป็นเกลียวเส้นคู่ได้แต่อาจผิดรูป หรือบิดเบี้ยวไปบ้าง (Imperfect double helices)

ความเหนียวแน่นของพันธะระหว่าง G กับ C จะมากกว่า A กับ T ดังนั้นการแยกกันเป็นสองเส้นของดีเอ็นเอจะยากง่ายเท่าใดขึ้นอยู่กับสัดส่วนของเบส G-C ในโมเลกุลของดีเอ็นเอนั้น ถ้ามีเบส G-C มากเส้นดีเอ็นเอจะแยกกันได้ยาก คือถ้าจะแยกดีเอ็นเอที่มีเบส G-C มากด้วยความร้อนก็ต้องใช้อุณหภูมิสูงขึ้นนั่นเอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โดยสรุปแล้วดีเอ็นเอเป็นโมเลกุลที่ประกอบด้วยส่วนสำคัญ 3 ส่วน คือ น้ำตาลไรโบส กลุ่มฟอสเฟต และกลุ่มเบส เรียงต่อกันเป็นเส้นยาวโดยมีน้ำตาลฟอสเฟตเป็นแกนยาว แล้วยื่นส่วนเบสเข้าไปจับคู่กันด้วยพันธะไฮโดรเจนจากเบสที่มีความเหมาะสมกัน พันกันเป็นเส้นเกลียวซึ่งสามารถแยกออกจากกันเป็นเส้นเดี่ยวแล้วกลับคืนสู่สภาวะเส้นคู่ได้ ดีเอ็นเอสามารถเป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเส้นใหม่ต่อไป นอกจากนั้นดีเอ็นเอมีความเสถียรมากเนื่องจากมีโครงสร้างที่เป็นคู่สมประคองตัวซึ่งกันและกัน

ดีเอ็นเอเป็นโมเลกุลพื้นฐานของสิ่งมีชีวิต ที่ใช้เป็นรหัสสำหรับสร้างโปรตีนที่จำเป็นสำหรับการดำรงชีวิต ลักษณะต่างๆของสิ่งมีชีวิตที่แสดงออกมาก็มาจากการถอดรหัสของดีเอ็นเอในตำแหน่งต่างๆของแผงยีน (Genome) ของสิ่งมีชีวิตนั้น หน่วยพื้นฐานทางพันธุกรรมที่ถูกถอดรหัสสำหรับการสร้างโปรตีนเรียกว่า ยีน (Gene) ซึ่งแผงยีนของมนุษย์มีลำดับเบสทั้งหมดประมาณ 3,000 ล้านเบส ดีเอ็นเอเป็นหน่วยพื้นฐานของยีนเปรียบเหมือนรหัสทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตทั้งมวลไม่ว่าจะเป็น สัตว์ พืช แบคทีเรีย และสิ่งมีชีวิตเล็กๆอย่างอื่น ในมนุษย์เซลล์ทุกเซลล์ที่มีนิวเคลียส ได้แก่ เม็ดเลือดขาว ตัวอสุจิ เซลล์รากผม เซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มในน้ำลาย เซลล์เหล่านี้ล้วนเป็นเซลล์ที่มีความสำคัญในทางนิติเวชทั้งสิ้น แผงยีนของมนุษย์จะอยู่ในโครโมโซมของมนุษย์ซึ่งมี 23 คู่ เรียกว่า diploid genome โครงสร้างทางเคมีของดีเอ็นเอมีลักษณะเป็นเส้นยาวเรียงต่อกันของนิวคลีโอไทด์ซึ่งมีเบสเป็นส่วนประกอบการเรียงตัวของลำดับเบสนี้เองที่เป็นรหัสสำหรับลักษณะของสิ่งมีชีวิตและยังสามารถถ่ายทอดไปยังลูกหลานรหัสทางพันธุกรรมอาจเขียนเป็นลำดับของเบส 4 ชนิดที่เขียนแทนด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษ A, C, G และ T ซึ่งย่อมาจากชื่อเต็ม adenine, cytosine, guanine และ thymine เบสทั้งสี่จะเรียงสลับไปมาเป็นสูตรสาม (เบส 3 ตัว) แล้วถูกถอดรหัสออกมาเป็นกรดอะมิโนหนึ่งตัว กรดอะมิโนซึ่งเป็นหน่วยพื้นฐานของโปรตีนจะมาเรียงตัวประกอบกันเป็นโปรตีน หากนำโครโมโซมอันที่ 1-23 มาคลี่สายดีเอ็นเอออกเป็นเส้น และเรียงต่อกันจะได้ haploid genome ซึ่งมีประมาณ 3,000 ล้านคู่เบส 90-95% ของลำดับเบสเหล่านี้จะไม่ถูกถอดรหัส แต่จะเป็นเพียงเส้นดีเอ็นเอที่วางอยู่ระหว่างส่วนที่เป็นยีนแยกยีนต่างๆออกจากกัน ยีนหนึ่งๆของคนอาจมีลำดับเบสที่เหมือนกัน แต่เมื่อเกิดการผ่าเหล่าขึ้นลำดับเบสก็จะแตกต่างกันไปบ้าง สิ่งเหล่านี้สะท้อนออกมาเป็นโปรตีนที่ผิดปกติออกไป ซึ่งบางครั้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทำให้เกิดโรคทางพันธุกรรมชนิดต่างๆ ความแตกต่างระหว่างบุคคลของดีเอ็นเอในบริเวณที่ไม่ได้ถูกถอดรหัส ไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่สิ่งมีชีวิตสร้างขึ้น จึงไม่ยุ่งเกี่ยวกับโรคทางพันธุกรรมต่างๆ แต่กลับมีประโยชน์มากมายในทางนิติเวช (ธานินทร์ ภู่พัฒน์, 2538)

ดีเอ็นเอทั้งหมดในเซลล์เรียกว่า จีโนม (Genome) จีโนมของมนุษย์ประกอบด้วยสายของดีเอ็นเอที่มีความยาวของนิวคลีโอไทด์ประมาณ 3,000 ล้านคู่เบส ($3x10^9$ base pairs) ใน haploid cell และมียีนทั้งหมดประมาณ 33,000 ยีน ซึ่งมีขนาดต่างๆ กัน โดยจะกระจายอยู่ประมาณ 10% ในจีโนม สายดีเอ็นเอที่รวมอยู่กับโปรตีนจะพันขดกันอยู่ในโครโมโซมของ diploid somatic cells (46 อัน) และของ germ cells (23 อัน)

ดีเอ็นเอในคนจะแบ่งได้เป็น 2 ชนิดใหญ่ๆ ตามการเรียงตัวของเบส และจำนวนชุด (Copy) ใน haploid genome

1. nonrepetitive DNA (Unique DNA: single-copy DNA) มีอยู่ประมาณ 75% ของ DNA ในจีโนม การเรียงตัวของเบสจะไม่ซ้ำกัน หรือถ้าซ้ำกันก็น้อยมาก

2. repetitive DNA มีอยู่ประมาณ 25% ของ DNA ในจีโนม เป็น DNA ที่มีการ เรียงตัวของเบสซ้ำๆ กัน แบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ

2.1 interspersed (Dispersed) sequences เป็น DNA ที่พบได้หลายชุดกระจายอยู่ทั่วไปในจีโนม และมีทิศทางใดก็ได้ ยังไม่ทราบหน้าที่ที่แน่นอน DNA ชนิดนี้แบ่งได้เป็น

2.1.1 short interspersed nuclear elements (SINE) มีความยาวของชุดเบส 100-500 คู่เบส

2.1.2 long interspersed nuclear elements (LINE) มีความยาวตั้งแต่ 500 คู่เบส ขึ้นไปจนถึงหลายพันคู่เบส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 satellite DNA เป็นการเรียงตัวของชุดเบสที่ซ้ำๆ กัน satellite DNA พบได้ที่บริเวณ centromere และ telomere ในแต่ละโครโมโซม ในจีโนมจะมี satellite DNA ขนาดสั้นๆ แบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ

2.2.1 minisatellite (มีจำนวนเบสในชุดเบส 20 – 30 คู่เบส) จัดอยู่ในกลุ่มที่มีการซ้ำของเบสระดับปานกลาง ส่วนใหญ่ของมินิแซทเทลไลท์มีลำดับเบสแกน (Core sequence) เดียวกัน และมักมีความหลากหลายสูง เนื่องจากความแตกต่างในจำนวนซ้ำจึงอาจเรียกว่า variable number tandem repeat (VNTR)

2.2.2 microsatellite หรือ short tandem repeat หรือ STR (มีหน่วยซ้ำของเบส 2 – 7 คู่เบส) จัดอยู่ในกลุ่มที่มีการซ้ำของลำดับเบสในลักษณะ ชุดเบสซ้ำกันเรียงอยู่ต่อเนื่องที่ตำแหน่งหนึ่งๆในจีโนม แต่ละชุดเบสซ้ำประกอบด้วยเบส 2-7 เบส โดยที่จำนวนซ้ำของชุดเบสของตำแหน่งหนึ่งในแต่ละบุคคลจะไม่เท่ากัน ยกเว้นเพียงกรณีแฝดที่เกิดจากไข่ใบเดียวกัน และพบในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด มีวิธีเรียกแบบอื่นได้แก่ simple sequence repeat (SSR) หรือ short tandem repeat (STR) ลำดับเบสไมโครแซทเทลไลท์นี้มีการกระจายตัวทั้งจีโนม แต่การกระจายไม่สม่ำเสมอ บางบริเวณก็พบมาก บางบริเวณก็พบน้อย ตามแต่ชนิดของสิ่งมีชีวิต

หน้าที่ของลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลท์ยังไม่ทราบแน่ชัด มีไมโครแซทเทลไลท์บางส่วนที่มีการอนุรักษ์ (Conserved) โดยพบอยู่ที่ตำแหน่งเดียวกันในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด บางส่วนทำหน้าที่ได้เนื่องจากอยู่ในส่วนนำรหัสของยีน นอกจากนี้ยังพบว่าไมโครแซทเทลไลท์บางชนิดจะจับกับโปรตีนที่จำเพาะได้ และทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นการแสดงออกของยีน (Enhancer) โดยความแปรปรวนของจำนวนซ้ำมีผลต่อการควบคุมการทำงานของยีนความยาวของ STR จะแตกต่างกันในแต่ละบุคคลและมีความหลากหลาย (Polymorphism) มาก จึงนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอได้ และพบกระจายอยู่ทั่วไปในโครโมโซม จึงมีการนำมาใช้ในการทำแผนที่จีโนม (Genome mapping)

การเริ่มตรวจดีเอ็นเอเพื่อประโยชน์ทางด้านนิติเวชเริ่มมีครั้งแรกในปี ค.ศ. 1985 โดย professor Alec Jeffreys นักพันธุศาสตร์แห่งมหาวิทยาลัย Leicester ประเทศอังกฤษ ได้นำมาใช้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในการตรวจพิสูจน์ความเป็นพ่อ-แม่-ลูก และตรวจหลักฐานในคดีต่างๆ คำว่า DNA fingerprint จึงเริ่มขึ้นตั้งแต่นั้นเป็นต้นมาแต่การตรวจดังกล่าวยังมีข้อจำกัดในกรณีที่วัตถุพยานมีปริมาณน้อย หรือค่อนข้างเก่า ต่อมาได้เกิดเทคนิค PCR (Polymerase chain reaction) จึงเกิดขึ้นในระยะเวลาใกล้เคียงกันคือ ในปี ค.ศ. 1986 โดย Kary Mullis ได้ค้นพบปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอนเอในหลอดทดลองซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบัน (อรรถพล แช่มสุวรรณวงศ์ , 2544)

การตรวจดีเอ็นเอโดยอาศัยเทคนิค PCR

หลักการทำ PCR (Polymerase chain reaction)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction) หรือ PCR เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายซึ่งอยู่ในสารละลายร่วมกับดีเอ็นเออื่น โดยไม่จำเป็นต้องทำให้ชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวบริสุทธิ์ก่อน สามารถแยกส่วนของดีเอ็นเอที่สนใจได้โดยไม่ต้องนำไปขยายเพิ่มปริมาณในเซลล์หรือนำไปโคลน การทำ PCR คือ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสซ้ำกันหลายๆรอบ เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอปริมาณเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะเกิดขึ้นได้จำเป็นต้องมีไพรเมอร์ ดังนั้นจึงใช้ไพรเมอร์สองชนิดที่มีเบสคู่สมกับปลายทั้งสองด้านของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ โดยไพรเมอร์จะเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายและมีปลาย 3’ ในทิศทางเข้าหากัน

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในรอบแรกจะพบว่า ผลผลิตที่ได้ไม่ได้มีเฉพาะส่วนของดีเอ็นเอบริเวณที่เป็นเป้าหมายเท่านั้น แต่ได้โมเลกุลดีเอ็นเอที่มีสายหนึ่งยาวมากเพราะเป็นต้นแบบเดิมอีกสายหนึ่งเป็นคู่สมมีปลาย 5’ เริ่มต้นจากปลาย 5’ ของไพรเมอร์ที่ใช้ ส่วนปลาย 3’ ยาวออกไปนอกบริเวณที่ต้องการ ในรอบที่สองยังคงได้ผลผลิตที่มีสายหนึ่งยาวมาก หรือมีปลาย 3’ ที่ยาวเกินส่วนที่ต้องการ จนถึงรอบที่สามจึงเริ่มมีโมเลกุลดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากับเป้าหมายที่ต้องการ ซึ่งจะเพิ่มปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ส่วนโมเลกุลที่มีปลาย 3’ ยาว จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นรอบละสองโมเลกุลเท่านั้น โดยโมเลกุลที่มีปลาย 3’ ยาวดังกล่าวนี้สังเคราะห์มาจากดีเอ็นเอต้นแบบเริ่มต้นที่เป็นสายยาว เมื่อเปรียบเทียบกันจะพบว่า การสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยรวมเพิ่มขึ้นแบบทวีคูณรอบละ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2 เท่า แต่โมเลกุลที่มีปลาย 3’ ยาว เพิ่มขึ้นแบบสม่ำเสมอรอบละ 2 โมเลกุล ถ้าประสิทธิภาพของการเพิ่มดีเอ็นเอสมบูรณ์ จะสามารถคำนวณปริมาณดีเอ็นเอเมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอครบ 30 รอบ ได้ประมาณ 1 พันล้านเท่า

ข้อกำหนดในการทำ PCR คือต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ ซึ่งอาจทราบลำดับเบสทั้งหมดหรือทราบเฉพาะส่วนปลายก็ได้ เพื่อการออกแบบสังเคราะห์ไพรเมอร์มาใช้ในปฏิกิริยาต่อไป บริเวณหรือส่วนดีเอ็นเอที่เกิดการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณขึ้น จะมีขนาดความยาวเท่ากับชิ้นดีเอ็นเอจากปลาย 5’ ของไพรเมอร์หนึ่งถึงปลาย 5’ ของไพรเมอร์อีกชนิดหนึ่งนั่นเอง

ขั้นตอนการทำ PCR ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังนี้

1. denaturation การทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบแยกเป็นสายเดี่ยว โดยใช้ความร้อนแล้วลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว

2. annealing เป็นขั้นที่ไพรเมอร์ที่มีเบสเป็นคู่สมกับส่วนปลายของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายและมีปริมาณมากกว่าชิ้นดีเอ็นเออื่นๆมากมายเข้ามาจับคู่กับส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ

3. primer extension เปลี่ยนอุณหภูมิให้พอเหมาะกับการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส เอนไซม์จะทำหน้าที่สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ โดยมีดีเอ็นเอเป้าหมายเดิมเป็นต้นแบบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เนื่องจากเทคนิค PCR เป็นเทคนิคที่มีความไว (Sensitivity) สูงสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นล้านๆเท่าได้อย่างรวดเร็ว โดยใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้นเพียงเล็กน้อยก็สามารถตรวจสอบได้ แต่ถ้ามีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอเพียงเล็กน้อย ดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนดังกล่าวก็จะเพิ่มปริมาณด้วย ดังนั้นจึงต้องระมัดระวังการปนเปื้อนของดีเอ็นเอจากภายนอก เช่น จากอากาศ ผิวหนัง ผม เป็นต้น เพื่อป้องกันปัญหาดังกล่าวจึงควรทำ PCR ในบริเวณที่สะอาดไม่ปะปนกับการทดลองอื่น ซึ่งทำให้ผลผิดพลาดได้ดังนั้นจึงต้องมีการทำ negative control ควบคู่ไปด้วย

การแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis of DNA)

อิเล็กโทรโฟรีซิส เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโมเลกุลของสารที่มีประจุออกจากกันโดยใช้กระแสไฟฟ้า โดยให้สารที่มีประจุนั้นเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางชนิดหนึ่งในสารละลาย สารที่มีประจุต่างกันจะเคลื่อนที่ไปในทิศทางตรงกันข้าม นอกจากประจุแล้วอัตราการเคลื่อนที่ยังขึ้นอยู่กับขนาดรูปร่างโมเลกุล แรงเคลื่อนไฟฟ้า และตัวกลางที่ใช้ด้วย

โมเลกุลของดีเอ็นเอประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟตจำนวนมาก สารละลายของดีเอ็นเอจึงมีประจุเป็นลบเมื่อ pH เป็นกลาง เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าโมเลกุลของดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก เนื่องจากหมู่ฟอสเฟตเป็นส่วนประกอบของนิวคลีโอไทด์ทุกชนิด ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะมีหมู่ฟอสเฟตอยู่น้อยกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ ดังนั้นจะพบว่าประจุต่อมวลโมเลกุลของดีเอ็นเอทุกขนาดมีค่าเท่ากัน ความเร็วในการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอจึงขึ้นอยู่กับขนาดเป็นส่วนใหญ่ อย่างไรก็ตามมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอด้วย ดังนี้

1. ขนาดของโมเลกุล ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ ดังนั้นถ้าต้องการทราบขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอ สามารถทำได้โดยนำมาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดโมเลกุลแล้ว ทั้งนี้จะต้องเปรียบเทียบในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสครั้งเดียวกันเท่านั้น

2. โครงแบบของดีเอ็นเอ (Configuration) กรณีที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากัน ดีเอ็นเอที่มีโครงแบบเป็นวงแหวนที่พันเกลียวซ้อนจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอปลายเปิดแบบเส้นตรง และดีเอ็นเอแบบเส้นตรงจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอแบบวงแหวนที่มีช่องเปิด

3. เปอร์เซ็นต์และชนิดของเจล ถ้าเพิ่มความเข้มข้นหรือเปอร์เซ็นต์เจล โมเลกุลของดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ได้ช้าลง โดยเจลที่นิยมใช้กับกรดนิวคลีอิก คือเจลพอลิอะคริลาไมด์ (Polyacrylamide gel) และเจลอะกาโรส (Agarose gel) โดยเจลพอลิอะคริลาไมด์ใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กระหว่าง 6-1000 คู่เบส ส่วนเจลอะกาโรสใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ประมาณ 100 คู่เบสจนถึงกว่า 50000 คู่เบส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. แรงเคลื่อนไฟฟ้า (Voltage) ถ้าเพิ่มแรงเคลื่อนไฟฟ้าดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ได้เร็วขึ้น ในการแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ต้องใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าที่เหมาะสม ถ้าใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าสูงเกินไป ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ได้เร็วแต่การแยกตัวจะไม่ดี ถ้าใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าต่ำเกินไป ดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ช้าแยกตัวได้ดี แต่แถบดีเอ็นเอจะไม่คมชัด เพราะเกิดการแพร่ของดีเอ็นเอ

5. บัฟเฟอร์ที่ใช้ ชนิดของบัฟเฟอร์มีผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้มี 3 ชนิด คือ TAE (Tris-acetate, EDTA), TBE (Tris-borate, EDTA) และ TPE (Tris-phosphate, EDTA) ซึ่งมีข้อดี และข้อเสียต่างกัน TBE นิยมใช้ที่ความเข้มข้น 0.5 เท่า ใช้แยกดีเอ็นเอได้ดี มีความสามารถเป็นบัฟเฟอร์ (Buffering capacity) ได้ดี แต่สามารถเกิดปฏิกิริยากับเจลอะกาโรสได้ จึงไม่เหมาะถ้าต้องการนำดีเอ็นเอกลับมาใช้อีก

เจลพอลิอะครีลาไมด์นิยมนำมาใช้ในการแยกดีเอ็นเอมากที่สุด เนื่องจากดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ที่ใช้มีขนาดของโมเลกุลเล็ก ดังนั้นเจลพอลิอะครีลาไมด์จึงเหมาะสมที่จะเป็นตัวกลางมากที่สุด

เจลพอลิอะครีลาไมด์ (Polyacrylamide gel)

เจลพอลิอะครีลาไมด์ เกิดจากการรวมตัวของ อะครีลาไมด์ (Acrylamide) และ บิสอะครีลาไมด์ (N,N'-methylene bisacrylamide หรือเรียกสั้นๆว่า bisacrylamide) โมเลกุลเดี่ยวมารวมตัวกัน เกิดเป็นพอลิเมอร์ซึ่งมีลักษณะเป็นร่างแห เป็นโมเลกุลที่สังเคราะห์ขึ้นทางเคมีจึงมีความสม่ำเสมอควบคุมขนาดได้ ไม่ทำปฏิกิริยากับสารเคมีใด มีความใส มีความคงตัวของ pH อุณหภูมิ และมี ionic strength กว้างสามารถปรับขนาดของช่องพอลิเมอร์ได้ จึงเหมาะสมสำหรับเป็นตัวกลางในการแยกโมเลกุลของโปรตีนและดีเอ็นเอ

อะครีลาไมด์ (Acrylamide) และบิสอะครีลาไมด์ (Bisacrylamide) โมเลกุลเดี่ยวเป็นสารที่เป็นพิษและสามารถดูดซึมผ่านทางผิวหนังได้ จึงควรสวมถุงมือขณะปฏิบัติงาน เจลพอลิอะครีลาไมด์ใช้ได้ทั้งในแบบ native gel เพื่อใช้แยกโมเลกุลของดีเอ็นเอที่เป็นเกลียวคู่ตามสภาพธรรมชาติ และใช้ในแบบ denaturing gel เพื่อแยกโมเลกุลดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ผ่านการทำให้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เสียสภาพแล้ว โดยเติมยูเรียลงไปในเจล ให้มีความเข้มข้น 7-8 โมลาร์ ทั้ง native gel และ denaturing gel มีวิธีเตรียมเหมือนกัน ต่างกันเฉพาะการเติม หรือไม่เติมยูเรียเท่านั้น

การตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอนอกจากจะเข้าใจวิธีการตรวจอย่างชัดเจนแล้ว จำเป็นต้องรู้ว่าวิธีการตรวจที่ใช้มีประสิทธิภาพมากน้อยเพียงใด โดยทั่วไปประสิทธิภาพของการตรวจดีเอ็นเอนั้นสังเกตได้จากหลายๆปัจจัยรวมกัน ไม่ว่าจะเป็น ค่ากำลังการแยกแยะ (Power of discrimination : PD) ค่ากำลังการคัดออก (Power of exclusion : PE) และค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity) เป็นต้น (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับดีเอ็นเอจากการสัมผัส

นันทนี พันธุ์เอี่ยม, ธีราพร เสรีพงศ์, ณัฐดนัย พิทยากิต. (2551) ได้ทำการศึกษา การวิเคราะห์ลักษณะ ดีเอ็นเอเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลโดยใช้วัตถุพยานที่มักพบในสถานที่เกิดเหตุ โดยมุ่งศึกษาไปที่การก่ออาชญากรรมในรูปแบบการก่อความไม่สงบในเขตสามจังหวัดภาคใต้ ซึ่งเกี่ยวกับการตรวจดีเอ็นเอเพื่อพิสูจน์บุคคลจาก การจับหรือสัมผัสบนเทปพันสายไฟ และกระดาษ ผลที่ได้เมื่อแยกตามวัสดุที่ใช้วิเคราะห์พบว่า การตรวจดีเอ็นเอจากการสัมผัสเทปพันสายไฟ คิดเป็นผลเฉลี่ยรวม 62.5% ที่สามารถตรวจออก แต่เมื่อพิจารณาเฉพาะผลที่ถูกต้อง ผลรวมเฉลี่ยจึงอยู่ในค่า 47.5% ส่วนการตรวจดีเอ็นเอจากการสัมผัสกระดาษเปล่า คิดเป็นผลเฉลี่ยรวมซึ่งสามารถตรวจออกได้เป็น 47.5% และพิจารณาเฉพาะผลที่ถูกต้อง ผลรวมเฉลี่ยจะได้ 40%

Oorschot Van.et al. 1997 ได้รายงานว่าสามารถตรวจพบดีเอ็นเอได้จากฝ่ามือและวัตถุที่ถูกจับหรือสัมผัส

A Lowe.et al. 2002 ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับแนวโน้มของการเป็น shedder ซึ่งได้แบ่งประเภทเป็น 2 ประเภท คือ good shedder และ poor shedder ซึ่งการแยกประเภทของการเป็น shedder ขึ้นอยู่กับผลของการตรวจดีเอ็นเอ และไม่มีลักษณะความเอนเอียง (Bias) ระหว่างเพศชายและเพศหญิง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การลดการปนเปื้อนของดีเอ็นเอ

ได้ทำการประยุกต์ใช้วิธีของ Kemp Brain.et al. 2005 จุ่มด้ามมีดพลาสติกใน 6.0% sodium hypochlorite เป็นเวลา 15 นาที

วิธีการเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างด้วย double swab technique ตามวิธีของ Pang B.C.M.et al. 2007 คือ ทำการเก็บตัวอย่างตรวจด้วยสวอบเปียก (Wet swab) บนพื้นผิวที่ต้องการ โดยทำการเช็ดบริเวณดังกล่าวเป็นวงกลมจนทั่วบริเวณที่ต้องการเก็บตัวอย่าง หลังจากนั้นก็ใช้สวอบแห้ง (Dry swab) เช็ดซ้ำบริเวณดังกล่าว ซึ่งสวอบแห้งจะดูดซับบริเวณที่เปียก โดยเช็ดบริเวณดังกล่าวเป็นวงกลมเช่นเดียวกัน และทำการเช็ดจนบริเวณดังกล่าวจนแห้ง หลังจากนั้นก็นำทั้งสองไปสู่ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved