บทที่ 1

ทบทวนเอกสารและวัตถุประสงค์

การพิสูจน์บุคคลหรือหลักฐานที่เกี่ยวกับบุคคล มีความสำคัญมาก ไม่ว่าจะเป็น การตรวจจับคนร้ายที่มีการทิ้งร่องรอยเป็นเพียงคราบเลือด คราบอสุจิ การหาความสัมพันธ์ทางสายเลือด เช่น การตรวจความเป็นพ่อ - แม่ - ลูก ดีเอ็นเอเป็นสารพันธุกรรมที่สามารถถ่ายทอดคุณสมบัติต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิตจาก พ่อ - แม่ ไปยังลูกหลาน จึงถูกนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจพิสูจน์ ซึ่งมีความถูกต้องและแม่นยำ สามารถตรวจ กับตัวอย่างได้หลายประเภท ไม่ว่าจะเป็น เลือด น้ำลาย กระดูก เนื้อเยื่อ เป็นต้น

สารพันธุกรรม หรือดีเอ็นเอ (Deoxy-ribonucleic acid; DNA) เป็นกรดนิวคลิอิก (Nucleic acid) ที่ทำหน้าที่เก็บข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต ดีเอ็นเอส่วนใหญ่อยู่ในรูปโครโมโซม (Chromosome) วางตัวอยู่ในส่วนนิวเคลียสภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เรียกว่า นิวคลิโอไทด์ (Nucleotide) ซึ่งเป็นสารประกอบไนโตรจีนัสเบส (Nitrogenous base) แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มพิวรีนเบส (Purine) ได้แก่ ไทมีน (Thymine;T) ไซโทซีน (Cytosine; C) และกลุ่มไพริมิดีนเบส (Pyrimidine) ได้แก่ อะดีนีน (Adenine; A) กัวนีน (Guanine; G) โดยสารประกอบไนโตรจีนัสเบสนี้จะรวมตัวกับน้ำตาลดีออกซีไรโบส (Deoxyribose sugar) และกรดฟอสฟอริก (Phosphoric acid)[อุไรวรรณและคณะ,2542]

ในจีโนมหรือดีเอ็นเอทั้งหมดของมนุษย์ ประกอบด้วยจำนวนเบส (Base sequence) ประมาณ 3 พันล้านเบส ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 2 ส่วน ดังนี้

1. ดีเอ็นเอส่วนที่เป็นยีน (Gene) มีประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ ของดีเอ็นเอทั้งหมดในมนุษย์ สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ส่วน คือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.1 ส่วนที่เป็นรหัสพันธุกรรม (Coding sequence) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่มีรหัสพันธุกรรม (Exon) ที่สามารถลอกรหัสและแปรรหัสเป็นสายโพลีเปปไทด์ได้ โดยส่วนที่เป็นรหัสพันธุกรรมจะน้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ ของส่วนที่เป็นยีน

1.2 ส่วนที่ไม่เป็นรหัส (Non-coding sequence) ซึ่งเป็นส่วนของ intron มีจำนวนมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ของส่วนที่เป็นยีน

2. ดีเอ็นเอส่วนที่ไม่ใช่ยีน (Non gene) พบว่ามีประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ ของ DNA ทั้งหมดในมนุษย์ แบ่งออกได้

2.1 ดีเอ็นเอที่มีชุดเบสซ้ำ (Repetitive DNA) มีประมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์ ของ DNA ส่วนที่ไม่ใช่ยีน ซึ่ง repetitive DNA แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ

1) ชุดเบสซ้ำต่อเนื่อง (Tandem repeat) คือ ชุดเบสซ้ำที่มีลำดับการเรียงตัวของชุดเบสซ้ำต่อกันเป็นช่วงยาว ได้แก่ satellite, minisatellite และ microsatellite ซึ่งแบ่งตามจำนวนซ้ำและความยาวของหน่วยซ้ำ ดังนี้

1.1) Satellite (Highly repetitive DNA) คือชุดเบสซ้ำขนาด 2-7 เบส หรือชุดเบสซ้ำยาวขนาดหลายร้อยเบส โดยมีจำนวนซ้ำแต่ละตำแหน่งตั้งแต่ 10^3-10^7 ครั้ง

1.2) Minisatellite (Moderately repetitive DNA หรือ Variable number of tandem repeat; VNTR) คือชุดเบสขนาด9-100 เบส ที่มีจำนวนซ้ำแต่ละตำแหน่งตั้งแต่10 - 1,000 ครั้ง

1.3) Microsatellite (Simple sequence repeats; SSR หรือ Short tandem repeats; STR) คือชุดเบสซ้ำขนาด 2-7 โดยที่มีจำนวนซ้ำในแต่ละตำแหน่งไม่เกิน 100 ครั้ง

2) ชุดเบสซ้ำกระจาย (Interspersed repeats) คือกลุ่มของชุดเบสซ้ำที่พบกระจายอยู่ที่บริเวณต่างๆ ในจีโนม ในลักษณะที่ต่างจากกลุ่มชุดเบสซ้ำแบบต่อเนื่อง คือจะไม่พบซ้ำกันเป็นช่วงต่อเนื่องแต่จะอยู่ในลักษณะเดี่ยว (Individual unit) กระจายทั่วไปหลายๆ แห่งในจีโนม ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อยตามความยาวของชุดเบสซ้ำ

2.1) Short interspersed elements (SINES) คือ ชุดเบสกระจาย มีขนาดประมาณ 130-300 เบส

2.2) Long interspersed elements (LINES) คือ ชุดเบสกระจาย มีขนาดตั้งแต่ 500 เบสขึ้นไป พบประมาณ 1-2 เปอร์เซ็นต์ ของจีโนม

2.2 ลำดับเบสจำเพาะ มีประมาณ 70-80 เปอร์เซ็นต์ ของ DNA ส่วนที่ไม่ใช่ยีน

ในทางนิติวิทยาศาสตร์ มีการใช้ไมโครแซลเทลไลท์ดีเอ็นเอ ในการตรวจพิสูจน์ บุคคล เนื่องจาก ในบุคคลหนึ่งๆ จะมีลำดับชุดเบสซ้ำต่อเนื่องแตกต่างกันทั้งขนาดและจำนวนซ้ำ ซึ่งตรงนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นี่เองที่ทำให้เกิดความแตกต่างจากบุคคลอื่น ดังนั้น จึงใช้ส่วนของ ชุดเบสซ้ำอย่างต่อเนื่องมาตรวจสอบเพื่อแยกแยะบุคคลต่างๆออกจากกัน ซึ่งทำให้สามารถพิสูจน์ความเป็นบุคคลได้อย่างชัดเจนและแม่นยำ [วิชัยและคณะ,2541]

เนื่องจากตัวอย่างมีปริมาณดีเอ็นเอน้อยหรืออาจมีสภาพที่ไม่สมบูรณ์ ดังนั้นจึงต้องนำตัวอย่างมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยอาศัยหลักการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่ (DNA replication) จากดีเอ็นเอต้นแบบในหลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้นและได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่า ค้นพบครั้งแรกโดย Kary Mullis และคณะในปี 1983 โดยใช้หลักการเลียนแบบธรรมชาติที่อาศัยดีเอ็นเอต้นแบบเป็นจุดเริ่มต้นและมีเอนไซม์พวก DNA polymerase ช่วยทำให้สายดีเอ็นเอยาวออกไปโดยเลือกจับเอานิวคลีโอไทด์ตัวใดตัวหนึ่งใน 4 ชนิดคือ dATP, dGTP, dCTP, dTTP เข้ามาต่อเป็นเบสคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบ (Template) ส่วนประกอบต่างๆในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมีดังนี้คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ(Template DNA), thermostable DNA polymerase, deoxynucleotide, triphosphate(dNTPs) ทั้ง 4 ชนิด, oligonucleotide primer อย่างน้อย 1 คู่ และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ปริมาณดีเอ็นเอจะเพิ่มมากขึ้นได้ต้องอาศัยปฏิกิริยาที่ต่อเนื่องหลายๆรอบ ซึ่งแต่ละรอบจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ

1. ขั้นตอน denaturation เป็นการแยกสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยว โดยอาศัยความร้อนที่อุณหภูมิสูง 90-95 องศาเซลเซียส
2. ขั้นตอน primer annealing เป็นขั้นตอนที่มีการลดอุณหภูมิลงมาที่ประมาณ 45-60 องศาเซลเซียส เพื่อให้ primer สามารถเกาะติดกับดีเอ็นเอต้นแบบตรงบริเวณเบสคู่สม
3. ขั้นตอน primer extension เป็นขั้นตอนการขยายสายดีเอ็นเอ โดยการต่อลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3’ ของ primer แล้วมีการขยายดีเอ็นเอสายใหม่จากทิศทาง 5’ ไป 3’ โดยอาศัยการทำงานของเอ็นไซม์ thermostable DNA polymerase เช่น taq polymerase ซึ่งปกติใช้อุณหภูมิในช่วง 70-75 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ซึ่งเทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง ในการพิสูจน์บุคคลด้วยวิธี DNA fingerprint นี้ ต้องใช้การเปรียบเทียบดีเอ็นเอในตำแหน่งต่างๆเพื่อให้ได้ค่าความถูกต้องแม่นยำเป็นที่ยอมรับของการตรวจพิสูจน์ในแต่ละกรณี

ในการตรวจพิสูจน์บางกรณีจำเป็นต้องใช้การเปรียบเทียบลักษณะดีเอ็นเอบนโครโมโซมเพศหญิงเท่านั้น เช่น การพิสูจน์ความเป็นพี่น้องหญิงร่วมบิดา โดยที่ผู้เป็นบิดาไม่สามารถร่วมตรวจได้หรือพิสูจน์การเป็นย่า-หลานสาว เป็นต้น จากการศึกษาในต่างประเทศ พบว่า บนโครโมโซมเพศหญิงมี ลักษณะของไมโครแซลเทลไลท์ดีเอ็นเอ หลายตำแหน่ง แบ่งออกได้เป็นกลุ่มๆตามตำแหน่งที่อยู่บนโครโมโซม และโอกาสที่มันจะถูกถ่ายทอดไปด้วยกันประมาณ 4 กลุ่มหลัก และอีก 2 จุด สามารถถ่ายทอดไปให้ลูกหลานได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ลักษณะของโครโมโซมเพศหญิงในพ่อจะถูกถ่ายทอดไปยังลูกผู้หญิงทุกคนทำให้เราสามารถตรวจเปรียบเทียบลักษณะดีเอ็นเอบนโครโมโซมเพศหญิงในลูกหญิงทุกคนเพื่อบ่งชี้ความเป็นพี่น้องร่วมบิดาได้ นอกจากนี้ลักษณะของดีเอ็นเอเหล่านี้ยังมีความหลากหลาย ทำให้สามารถนำมาแยกแยะบุคคลต่างๆออกจากกันได้

การศึกษาข้อมูลพื้นฐานบางส่วนของ ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อหาค่าความถี่ของอัลลีลต่างๆ ซึ่งจำเป็นอย่างยิ่งต่อการนำมาแปลผลการตรวจพิสูจน์เพื่อให้มีความน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น และเนื่องจากกลุ่มประชากรที่ต่างเชื้อชาติหรือต่างภูมิภาคกันข้อมูลพื้นฐานเหล่านั้นจะมีความแตกต่างกันไม่มากก็น้อย จึงจำเป็นต้องทำการวิจัยเพื่อให้ได้ข้อมูลสำหรับกลุ่มประชากรในภูมิภาคของตน เพื่อนำมาใช้ให้ถูกต้องที่สุด งานวิจัยในลักษณะนี้เกิดขึ้นบ้างแล้วในต่างประเทศ แต่ในกลุ่มประชากรคนไทยยังไม่มีการทำวิจัยในเรื่องนี้ ยกตัวอย่างเช่น

Jeanett E. และ Reinhard S. (2003) ได้ศึกษาการทำฐานข้อมูล population genetic และ sequence ของ X-chromosome STR 2 ตำแหน่ง คือ DXS 7130 และ DXS 6803 ในประเทศเยอรมัน โดยสกัดดีเอ็นเอจากเลือดของประชากรชาวเยอรมัน ในผู้ชายจำนวน 192 คน และผู้หญิงจำนวน 306 คน ที่ไม่มีความสัมพันธ์กันทางสายเลือด จากนั้นได้ทำการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR พบว่ามีค่ากำลังการแยกแยะ(Power of discrimination)ในตำแหน่ง DXS 6803 เท่ากับ 0.814ในผู้ชาย และเท่ากับ 0.940 ในผู้หญิง ส่วนในตำแหน่ง DXS 7130 มีค่าเท่ากับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

0.753ในผู้ชาย และเท่ากับ 0.911 ในผู้หญิง และมีค่ากำลังการคัดออก (Power of exclusion)ในตำแหน่ง DXS 6803 เท่ากับ 0.667 และในตำแหน่ง DXS 7130 มีค่าเท่ากับ 0.592 สรุปได้ว่า X-chromosome STRทั้ง 2 ตำแหน่ง สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในงานนิติวิทยาศาสตร์ได้ [Jeanett and Reinhard, 2003]

งานวิจัยของ Elzemar M. et al. (2009) ได้ศึกษาและสำรวจ X-chromosome STR ทั้ง 12 ตำแหน่ง ในประชากรชาวญี่ปุ่นที่อพยพมาอยู่ในประเทศบราซิล จำนวน 232 คน (ชายจำนวน 102 คน หญิงจำนวน 130 คน) โดยได้ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดของกลุ่มประชากร พบว่ามีค่ากำลังการแยกแยะ (Power of discrimination)ของผู้ชายและผู้หญิง เท่ากับ 0.99999992 และ 0.99999999999991 ตามลำดับ ดังนั้น X-chromosome STR 12 ตำแหน่ง จึงถูกใช้เป็นเครื่องมือที่สำคัญในการพิสูจน์บุคคล และใช้ในงานวิจัยที่เกี่ยวกับงานทางด้านมานุษยวิทยา รวมถึงใช้เป็นฐานข้อมูลด้าน genetic ของประชากรชาวญี่ปุ่นที่อพยพมาอยู่ในประเทศบราซิลได้ [Elzemar *et al*., 2009]

Zeng X. et al. (2009) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายของ X-chromosome STR ทั้ง 10 ตำแหน่ง ในกลุ่มชนเผ่า Chinese Daur ที่ไม่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือดกันโดยตรง โดยวิธีสกัดดีเอ็นเอจากเลือดของประชากรจำนวน 138 คน จากนั้นได้ทำการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR พบว่า มีค่ากำลังการแยกแยะ (Power of discrimination)ในผู้ชาย ทั้ง10 ตำแหน่ง มีค่าระหว่าง 0.6969-0.9443โดยในตำแหน่ง DXS7130 มีค่าเท่ากับ 0.7851 ขณะที่ ค่ากำลังการแยกแยะ (Power of discrimination)ในผู้หญิง ทั้ง 10 ตำแหน่ง มีค่าระหว่าง 0.6230-0.9544โดยในตำแหน่ง DXS7130 มีค่าเท่ากับ 0.8259 ดังนั้น X-chromosome STR ทั้ง10 ตำแหน่ง สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการพิสูจน์บุคคล และใช้หาความสัมพันธ์ทางบิดาได้ [Zeng *et al*., 2009]

งานวิจัยของ Gao S. et al. (2007) ได้ทำการศึกษาความถี่ของอัลลีลใน X-chromosome STR ทั้ง 10 ตำแหน่ง ใน Nu population of Yunnan China โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดของตัวอย่างจำนวน 100 คนที่ไม่มีความสัมพันธ์กันทางสายเลือด และทำการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR พบว่าค่ากำลังการแยกแยะ (Power of discrimination)ของทั้ง 10 ตำแหน่งทั้งในผู้หญิงและผู้ชาย มีค่าระหว่าง 0.5829-0.9391โดยในตำแหน่ง DXS 7130 ในผู้ชายและผู้หญิงมี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ค่าเท่ากับ 0.7312 และ 0.8641 สรุปได้ว่า X-chromosome ทั้ง 10 ตำแหน่ง สามารถใช้ประโยชน์ในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ได้หลายด้านเช่น การหาความสัมพันธ์ทางสายบิดา และยังเป็นส่วนที่น่าสนใจสำหรับกรณีการหาโอกาสความเกี่ยวข้องกันทางสายเลือด [Gao *et al*., 2007]

งานวิจัย ของ Zarrabeitia M.T. et al. (2006) ทำการวิเคราะห์ความหลากหลายของ X-chromosome STR แบบ tetranucleotide repeat รวมทั้งสิ้น 6 ตำแหน่ง ในชาวสเปนที่อาศัยอยู่ในภูมิภาคต่างกัน จำนวน 5 ภูมิภาค จำนวน 614 คน ด้วยวิธี triplex PCR 2 ปฏิกิริยา พบว่า มีค่ากำลังการแยกแยะ (Power of discrimination) ของทั้ง 6 ตำแหน่ง เท่ากับ 0.733-0.805 ในผู้ชาย ส่วนในผู้หญิงมีค่าเท่ากับ0.894-0.934 โดยในตำแหน่ง DXS 7130 ทั้งในผู้ชายและผู้หญิงมีค่าเท่ากับ 0.733 และ 0.894 นอกจากนี้พบว่ามีค่ากำลังการคัดออก (Power of exclusion:PE) ของทั้ง 6 ตำแหน่ง เท่ากับ 0.560-0.777 โดยในตำแหน่ง DXS 7130 มีค่า PE(trio)เท่ากับ 0.699 และค่า PE(motherless) เท่ากับ 0.560 จึงสรุปได้ว่า สามารถใช้ประโยชน์ในงานนิติวิทยาศาสตร์ได้[Zarrabeitia *et al*., 2006]

Elzemar M. et al. (2008) ได้ศึกษาวิธี multiplex PCR ใน X-chromosome STR ทั้ง 11 ตำแหน่ง ในกลุ่มประชากร Brazilian Amazon จำนวน 324 คน (ผู้ชายจำนวน 182 คน ผู้หญิงจำนวน 142 คน) โดยทั้งหมดไม่มีความสัมพันธ์กันทางสายเลือด ได้ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเลือด พบว่าค่ากำลังการแยกแยะ (Power of discrimination)ในผู้ชายและผู้หญิงทั้ง 11 ตำแหน่งมีค่าเท่ากับ 0.654-0.997โดยในตำแหน่ง DXS 7130 ทั้งในผู้ชายและผู้หญิงมีค่าเท่ากับ 0.834 และ 0.956 และมีค่ากำลังการคัดออก (Power of exclusion:PE) ในผู้ชายและผู้หญิงทั้ง 11 ตำแหน่งสูง โดยในตำแหน่ง DXS 7130 มีค่า PE(trio) เท่ากับ0.817 และค่า PE(motherless) เท่ากับ 0.707 สรุปได้ว่า X-chromosome STR ทั้ง 11 ตำแหน่ง สามารถนำมาใช้หาความสัมพันธ์ทางสายเลือดและใช้ในคดีที่มีความซับซ้อนได้[Elzemar *et al*., 2008]

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากงานวิจัยข้างต้นทำให้ทราบว่า ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอบนโครโมโซมเพศหญิงในตำแหน่ง DXS7130 มีความหลากหลาย และมีประสิทธิภาพในการตรวจพิสูจน์ สามารถใช้พิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดและพิสูจน์บุคคลได้ในหลายประเทศ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษา

ค่าความถี่ของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอบนโครโมโซมเพศหญิงในตำแหน่ง DXS7130 ของกลุ่มประชากรไทยภาคเหนือที่ไม่มีความสัมพันธ์กันทางสายเลือด ซึ่งจะเป็นประโยชน์สำหรับการนำไปใช้ในการตรวจพิสูจน์

ในการแปลผลการตรวจ พิสูจน์จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องทราบประสิทธิภาพของการตรวจ เพื่อชี้แจงให้ผู้อื่นเข้าใจในการตรวจ โดยทั่วไปแล้วประสิทธิภาพของการตรวจ ดีเอ็นเอจะดูได้จาก ค่ากำลังการแยกแยะ {Power of discrimination (PD) หรือ Discriminating power (DP)} และค่ากำลังการคัดออก (Power of exclusion)

ค่ากำลังการแยกแยะ (Power of discrimination: PD)

ค่ากำลังการแยกแยะ เป็นค่าที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพของการตรวจดีเอ็นเอว่าสามารถแยกแยะแต่ละบุคคลออกจากกันได้มากน้อยเพียงใด ซึ่งค่าที่สูงสามารถแยกความแตกต่างของบุคคลได้สูงและค่านี้จะเป็นประโยชน์ในแง่ของการตรวจพิสูจน์บุคคลโดยคำนวณได้จากสูตร [วสันต์และคณะ, 2540]

$$\mathbf{PD} = 1 - \sum (P_i)^2$$

เมื่อ P_i คือค่าความถี่ของแต่ละ phenotype หรือ genotype

ค่ากำลังการคัดออก (Power of exclusion: PE)

ค่ากำลังการคัดออก เป็นอีกค่าหนึ่งที่บ่งบอกประสิทธิภาพของการตรวจดีเอ็นเอได้ ค่านี้จะเป็นค่าที่สามารถคัดคนที่ไม่ใช่บุพการีออกไปได้ ซึ่งมีประโยชน์ในการพิสูจน์พ่อ-แม่-ลูก โดยมีสูตรการคำนวณที่น่าสนใจ 3 สูตรคือ [ธานินทร์, 2538]

$$\mathbf{PE\ (no\ parent)} = \sum_{i=1}^{n} P_i^2 (1 - P_i)^2 + \sum_{i,ji<j}^{n} 2P_i P_j (1 - P_i - P_j)^2$$

$$\mathbf{PE\ (one\ parent)} = \sum_{i=1}^{n} P_i (1 - P_i)^2 + \sum_{i,ji<j}^{n} (P_i P_j)^2 (3P_i + 3P_j - 4)$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

$$\mathbf{PE} = \sum P_i^3(1-P_i)^2 + \sum P_i(1-P_i)^3 + \sum_{i<j} P_iP_j(P_i+P_j)(1-P_i-P_j)^2$$

เมื่อ n คือ จำนวนอัลลีลที่มีในระบบซึ่งมีอัลลีล a,b,…i,j,…l,.n และ

$P_a,P_b…P_i,P_j…P_l,.P_n$ คือ ค่าความถี่ของอัลลีลต่างๆในระบบดังกล่าว

งานวิจัยนี้ยังได้ทำการ ประมาณค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (Estimation of genetic diversity) และ ทดสอบการกระจายตัวของลักษณะทางพันธุกรรมตามสมดุล Hardy-Weinberg เพื่อยืนยันว่าวิธีการที่ใช้ในการทดลองและการเลือกกลุ่มตัวอย่างเป็นไปอย่างถูกต้อง

การประมาณค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (Estimation of genetic diversity)

วิธีการประมาณค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรมีหลายแบบ ดังจะอธิบายต่อไปนี้

1. การประมาณค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมจากค่าสัดส่วนของเฮเทอโรไซโกตที่ตรวจพบ (Observed heterozygosity, H_o) โดยคิดสัดส่วนระหว่างจำนวนสมาชิกที่เป็นเฮเทอโรไซโกต ต่อจำนวนสมาชิกทั้งหมด ซึ่งการประมาณค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมวิธี นี้ ผลที่ได้จะขึ้นอยู่กับจำนวนตัวอย่างที่สุ่มมา ถ้าจำนวน ตัวอย่างที่สุ่มมามีน้อย อัลลีลที่ได้ก็จะน้อย สัดส่วนของเฮเทอไซโกตที่ตรวจพบอาจเบี่ยงเบนไปได้

2. การประมาณค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยการใช้ค่า gene diversity (h) ซึ่งไม่ค่อยขึ้นกับขนาดประชากรเท่ากับวิธีอื่นๆ โดยคำนวณได้จากสูตร

$$\mathbf{h} = \mathbf{1}\text{-}\sum_{i=1}^{k} p_i^2$$

โดย pi คือ ค่าความถี่ของอัลลีลที่ i และ k คือจำนวนอัลลีลที่พบที่ตำแหน่งนั้น

ค่าที่ใช้ในการคำนวณค่า h คือ ความถี่ของอัลลีลต่างๆในประชากรโดย h เป็นความน่าจะเป็นที่พบว่าอัลลีล 2 อัลลีล ที่ตำแหน่งหนึ่งของสมาชิกที่สุ่มมามีความแตกต่างกัน ซึ่งก็คือค่าเฮเทอ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โรไซโกตที่คาดหมายเมื่อประชากรอยู่ในสมดุล (Expected heterozygosity, H_e) ดังนั้นจึงมักแทนค่า gene diversity (h) ด้วย H_e ในการวิเคราะห์ประชากรมักตรวจสอบด้วยดีเอ็นเอหลายตำแหน่ง ดังนั้นจึงคำนวณค่า H_e ของแต่ละตำแหน่ง แล้วคิดเป็นค่าเฉลี่ยของทุกตำแหน่ง

สมดุลของฮาร์ดีและไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg equilibrium)

ฮาร์ดี (G.H. Hardy) เป็นนักคณิตศาสตร์ชาวอังกฤษ ส่วนไวน์เบิร์ก (W. Weinberg) เป็นแพทย์ชาวเยอรมัน ได้แสดงให้เห็นว่า ถ้าไม่มีแรงรบกวนเข้ามาในประชากรความถี่ของอัลลีลของยีนและความถี่ของจีโนไทป์ต่างๆจะคงที่ เรียกว่าเป็น สมดุลของฮาร์ดีและไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg equilibrium, HWE) ตัวอย่างเช่น ลักษณะที่ควบคุมด้วยยีน 1 คู่ที่มีรูปแบบของอัลลีล 2 แบบ ถ้าให้สัญญาลักษณ์เป็น A และ a จะมีจีโนไทป์ได้ 3 แบบ คือ AA, Aa และ aa ความถี่ของอัลลีลเด่น A ให้แทนด้วย p และความถี่ของอัลลีลด้อย a ให้แทนด้วย q เนื่องจากมีรูปแบบของอัลลีลเพียง 2 แบบ ดังนั้น ผลรวมความถี่ของอัลลีลทั้งหมดที่ตำแหน่งนี้จะเท่ากับ 1

$$p + q = 1$$

ถ้ากำหนดให้ประชากรมีขนาดใหญ่ สมาชิกในประชากรมีการผสมแบบสุ่ม คือ เพศผู้และเพศเมียทุกจีโนไทป์มีโอกาสผสมพันธุ์ได้เท่าๆกัน หรือทุกอัลลีลจากเพศผู้และเพศเมียมีโอกาสผสมพันธุ์ได้เท่าๆกัน ไม่มีการคัดเลือก (Selection) ไม่มีการอพยพย้ายถิ่น (Migration) ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน (Mutation) และมีการกระจายตัวของอัลลีลปกติตามกฎเมนเดล จะพบว่า ประชากรอยู่ในสมดุลของฮาร์ดีและไวน์เบิร์ก (HWE) ซึ่งสามารถคาดคะเนความถี่ของจีโนไทป์โฮโมไซโกตแบบเด่น AA ได้เท่ากับ p^2 ความถี่ของจีโนไทป์เฮเทอโรไซโกต Aa เท่ากับ 2pq และความถี่ของจีโนไทป์โฮโมไซโกตแบบด้อย aa = q^2 เมื่อรวมความถี่ของจีโนไทป์ทุกแบบของยีนที่ตำแหน่งนั้นจะเท่ากับ 1

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

สิ่งมีชีวิตพวกที่มีการผสมข้ามตามธรรมชาติ และอยู่ในประชากรขนาดใหญ่มักอยู่ในสมดุลของฮาร์ดีและไวน์เบิร์กอยู่แล้ว เนื่องจากประชากรมีขนาดใหญ่ ผลที่เกิดจากการกลายพันธุ์หรือการคัดเลือกจะมีน้อย แต่ก็มีประชากรจำนวนมากที่ไม่อยู่ในสมดุลฮาร์ดีและไวน์เบิร์ก เช่น สิ่งที่มีชีวิตที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สืบพันธุ์โดยไม่ใช้เพศ หรือเกิดจากสาเหตุอื่น ทั้งนี้ต้องแน่ใจก่อนว่าผลการตรวจสอบที่เบี่ยงเบนไปจากสมดุลฮาร์ดีและไวน์เบิร์ก ไม่ได้เกิดจากความบกพร่องของการสุ่มตัวอย่าง หรือจำนวนตัวอย่างที่สุ่มมาไม่เพียงพอ ทำให้คำนวณค่าความถี่อัลลีลคลาดเคลื่อน การสรุปผลตามสมดุลฮาร์ดีและไวน์เบิร์กจึงไม่น่าเชื่อถือ

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อศึกษาค่าความถี่ของอัลลีลต่างๆ ในไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอบนโครโมโซมเพศหญิงตำแหน่ง DXS7130 ในกลุ่มประชากรไทยภาคเหนือ

สมมติฐานการศึกษา

หลังจากทำการศึกษาจะได้ค่าความถี่ของแต่ละอัลลีลในตำแหน่ง DXS7130 สามารถนำมาพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดและพิสูจน์บุคคลได้ และทราบประสิทธิภาพของไมโครแซทเทลไลท์ ดีเอ็นเอในตำแหน่ง DXS7130

ขอบเขตการวิจัย

ขอบเขตประชากร

ประชากรไทยเพศหญิง ที่มีภูมิลำเนาอาศัยอยู่ในภาคเหนือ จำนวน 120 คน

ขอบเขตการทดลอง

ศึกษาค่าความถี่ของอัลลีลต่างๆ ในตำแหน่ง DXS7130 โดยการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้ม แล้วนำมาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) นำมาแยกขนาดเปรียบเทียบกับอัลลีลมาตรฐานที่สร้างขึ้นด้วยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis และแปลผลที่ได้จากการศึกษา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นิยามศัพท์เฉพาะ

Polymerase chain reaction (PCR) หมายถึง เทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่ (DNA replication) จากดีเอ็นเอต้นแบบในหลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้นและได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่า

Polyacrylamide gel electrophoresis หมายถึง เทคนิคที่ใช้แยกสาร วิเคราะห์ และเตรียมสารที่มีประจุไฟฟ้า เช่น กรดอะมิโน โปรตีน และ กรดนิวคลีอิก ให้บริสุทธิ์ โดยอาศัยหลักการที่ว่า เมื่อให้สนามไฟฟ้า สารที่มีประจุไฟฟ้าจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วที่ตรงข้ามกันด้วย อัตราเร็วในการเคลื่อนที่ ซึ่งขึ้นกับปริมาณประจุสุทธิบนโมเลกุลของสาร รูปร่างและขนาดของโมเลกุลของสารนั้น

Short tandem repeat (STR) DNA หมายถึง ดีเอ็นเอส่วนที่ไม่ใช่ยีน (Non gene) ที่มีลักษณะเป็นชุดเบสซ้ำขนาด 2-7 เบส เรียงต่อกัน โดยมีจำนวนซ้ำในแต่ละตำแหน่งไม่เกิน 100 ครั้ง

ประโยชน์ที่จะได้รับจากการศึกษา

1.ทราบค่าความถี่ของอัลลีลต่างๆใน ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอบนโครโมโซมเพศหญิงตำแหน่ง DXS7130 ในกลุ่มประชากรคนไทยภาคเหนือ และสามารถนำผลการวิจัยนี้มาใช้เป็นแนวทางในการพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดและพิสูจน์บุคคล

2. ทราบประสิทธิภาพของ ไมโครแซทเทลไลท์ ดีเอ็นเอในตำแหน่ง DXS7130 เพื่อนำมาใช้ในการประกอบการชี้แจง และแปลผล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved