บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ดีเอ็นเอเป็นสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตที่มีความพิเศษมหัศจรรย์ในตัวของมันเอง นับตั้งแต่รูปร่างโมเลกุลที่มีความสมบูรณ์พร้อมพอเหมาะพอดี สามารถที่จะเก็บข้อมูลสำคัญของสิ่งมีชีวิตให้อยู่ในอาณาเขตที่จำกัด มีการทำงานที่เป็นระเบียบ ทำให้สิ่งมีชีวิตนั้นสามารถสืบทอดข้อมูลทางพันธุกรรมจากรุ่นพ่อแม่ต่อไปยังลูกหลานได้โดยไม่ถูกเปลี่ยนโครงสร้างหรือหน้าที่ มีกระบวนการควบคุมการทำงานทุกขั้นตอน เพื่อรักษาความถูกต้องแม่นยำในการถ่ายทอดข้อมูล นอกจากนั้นยังสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงและปรับตัว เพื่อดำรงชีวิตอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนไป เนื่องจากถ้าไม่มีการเปลี่ยนแปลงก็จะไม่สามารถมีวิวัฒนาการเกิดขึ้น

การศึกษาดีเอ็นเอตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันและแนวโน้มในอนาคต มีอิทธิพลอย่างสูงต่อการดำรงชีพและพัฒนาการของสิ่งมีชีวิตทั้งหลาย ประวัติการศึกษาในอดีต มีลำดับย่อๆ ดังนี้

ปี ค.ศ. 1859 C. Darwin นักธรรมชาติวิทยา ชาวอังกฤษ ได้แต่งหนังสือเรื่อง The species of life ซึ่งกล่าวถึงการกำเนิดของสิ่งมีชีวิตและพัฒนาการที่เปลี่ยนแปลงเนื่องจากการคัดเลือกโดยธรรมชาติ (Natural selection)

ปี ค.ศ. 1860 G. Mendel นักบวช ชาวออสเตรีย บิดาแห่งพันธุศาสตร์ได้พิสูจน์ถึงแหล่งที่มาของยีน (Gene) และได้รายงานการค้นพบกฎการถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมแต่รายงานเหล่านั้นถูกละเลย จนกระทั่งปี ค.ศ. 1900 จึงเป็นปีเริ่มต้นของพันธุศาสตร์อย่างแท้จริง (ตรีทิพย์ รัตนวรชัย, 2552)

ปี ค.ศ. 1868 J. Friedrich Miescher นักศึกษาแพทย์ ชาวสวิสเซอร์แลนด์ สามารถแยกสารเคมีตัวหนึ่งได้จากเซลล์ที่เรียกว่า “นิวคลีอิน” (Nuclein) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นกรด (ต่อมาเรียกว่ากรดนิวคลีอิก) มีไนโตรเจนและฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบในปริมาณสูง (หัทยา กาวีวงศ์, 2548)

ปี ค.ศ. 1943 O. Avery ชาวอเมริกัน พิสูจน์ว่ายีนที่เป็นแหล่งข้อมูลทางพันธุกรรมอยู่บนดีเอ็นเอ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปี ค.ศ. 1947 E. Chargaff ได้วิเคราะห์ดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ และพบว่าปริมาณของเบสอะดีนีนจะเท่ากับปริมาณเบสไทมีนและปริมาณของเบสกัวนีนจะเท่ากับปริมาณเบสไซโทซีน

ปี ค.ศ. 1952 A. Hershey และ Martha Chase พิสูจน์ได้ว่าดีเอ็นเอเป็นสารพันธุกรรม

ปี ค.ศ. 1953 J. Watson และ F. Crick ค้นพบโครงสร้างดีเอ็นเอ โดยลักษณะของดีเอ็นเอเป็นเกลียวคู่ ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์สองสายเรียงตัวไปในทิศทางตรงข้าม โดยมีพันธะไฮโดรเจนเชื่อมระหว่างนิวคลีโอไทด์สองสายนั้น (DNA double helex)

ปี ค.ศ. 1955 J. H. Tjio พบว่ามนุษย์ประกอบด้วยโครโมโซม 46 แท่งในเซลล์และ Arthur Kornberg ค้นพบการทำหน้าที่ของ DNA polymerase

ปี ค.ศ. 1959 M. Nirenberg, H. Khorana และ S. Ochoa พิสูจน์ได้ว่า Genetic code ประกอบด้วยรหัส 3 ตัวของเบสนิวคลีโอไทด์ ที่มี 4 ตัวอักษร สามารถแปลความหมายได้เป็นกรดอะมิโน 1 ชนิด

ปี ค.ศ. 1968 กลุ่มของ Meselson แห่งมหาวิทยาลัยฮาร์วาร์ด, H.O. Smith, K.W. Wilcox และ T.J. Kelley แห่งมหาวิทยาลัยจอห์นฮอปกินส์ สหรัฐอเมริกา ค้นพบการทำงานของ Restriction enzymes

ปี ค.ศ. 1975 คณะของ F. Sanger, กลุ่มของ A. Maxam และ W. Gilbert ค้นพบวิธีการตรวจสอบลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอ (DNA sequencing)

ปี ค.ศ. 1986 K. Mullis ค้นพบวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เลส (Polymerase chain reaction)

ปี ค.ศ. 1987 ศาลประเทศอังกฤษ ได้มีการตัดสินความผิดเกี่ยวกับคดีข่มขืน โดยอาศัยการพิสูจน์หลักฐานทางดีเอ็นเอเป็นครั้งแรก

ปี ค.ศ. 1990 เริ่มโครงการ Human Genome Project เพื่อหาลำดับเบสของมนุษย์ทั้งหมดบนโครโมโซม รวมทั้งจัดทำ Genetic map และ Physical map ตลอดจนศึกษาบทบาทหน้าที่ของยีน

ปี ค.ศ. 2002 National Human Genome Research Institute (NHGRI) และองค์กรทั่วโลกได้รับความสำเร็จในโครงการ Human Genome Project ซึ่งคาดหวังว่าจะสามารถเอาชนะโรคทางพันธุกรรมทั้งหมด ตลอดจนความผิดปกติต่างๆ ในมนุษย์ได้ในอนาคตได้ (ตรีทิพย์ รัตนวรชัย, 2552)

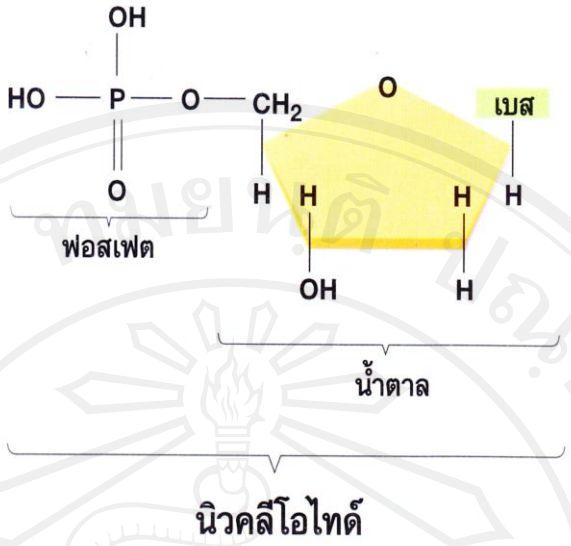
พัฒนาการของความรู้ และงานวิจัยทางด้านพันธุศาสตร์มีความเป็นไปอย่างต่อเนื่อง โดยเริ่มจากลักษณะพันธุกรรมที่ถูกควบคุมโดยยีน ซึ่งจะแยกตัวถ่ายทอดไปยังรุ่นต่อไปผ่านทางเซลล์สืบพันธุ์ ต่อมาพบว่ายีนเป็นสารเคมีพวกดีเอ็นเอ ซึ่งถือได้ว่าเป็นยุคของการเริ่มต้นทางพันธุศาสตร์ที่มีการศึกษาค้นคว้าจาก Classical genetics มาเป็น Molecular genetics

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ดีเอ็นเอเป็นสารประกอบประเภทหนึ่งของกรดนิวคลีอิก (Nucleic acid) มีชื่อย่อมาจากคำว่า ดีออกซีไรโบนิวคลีอิก แอสิด (Deoxyribonucleic acid ; DNA) ประกอบด้วยพอลิเมอร์ของนิวคลีโอไทด์สองสาย (Double-strand) มาพันกันเป็นเกลียวฮีลิกซ์ ซึ่งในหนึ่งนิวคลีโอไทด์จะประกอบด้วยองค์ประกอบสามส่วน คือ น้ำตาลเพนโทส (Pentose sugar) ชนิดดีออกซีไรโบส (Deoxyribose), กลุ่มฟอสเฟต (Phosphate group) และไนโตรจีนัสเบส (Nitrogenous base) (ตรีทิพย์ รัตนวรชัย, 2552) (ภาพ 1) โดยทั่วไปเบสที่พบในดีเอ็นเอจะมี 4 ชนิด สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม แต่ละกลุ่มจะมีความแตกต่างกันในองค์ประกอบและโครงสร้าง คือ กลุ่มเบสไพริมิดีน (Pyrimidine) มีโครงสร้างหลักประกอบด้วยวงแหวน 1 วง เบสในกลุ่มนี้ ได้แก่ เบสไซโทซีน (Cytosine; C) และเบสไธมีน (Thymine ; T) กลุ่มเบสเพียวรีน (Purine) มีโครงสร้างหลักประกอบด้วยวงแหวน 2 วง คือ วงแหวนของเบสไพริมิดีนเชื่อมกับวงแหวนอิมิดาโซล (Imidazole) เบสในกลุ่มนี้ ได้แก่ เบสอะดีนีน (Adenine ; A) และเบสกัวนีน (Guanine ; G) (วิชัย บุญแสง และคณะ, 2541) (ภาพ 2) ซึ่งเบสทั้ง 4 ชนิดจะต่ออยู่กับน้ำตาลดีออกซีไรโบสซึ่งมีคาร์บอน 5 อะตอม ที่ตำแหน่ง C-1' โดยมีหมู่ฟอสเฟตเป็นตัวเชื่อมระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 3' ของน้ำตาลโมเลกุลหนึ่งกับคาร์บอนตำแหน่งที่ 5' ของน้ำตาลโมเลกุลถัดไปด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ (Phosphodiester bond) ทำให้สายโพลีนิวคลีโอไทด์ที่เกิดขึ้น มีปลายด้านหนึ่งเริ่มต้นด้วย 3'-OH (เรียกปลาย 3') และปลายอีกด้านหนึ่งสิ้นสุดด้วย 5'-phosphate (เรียกปลาย 5') (หัทยา กาวีวงศ์, 2548) (ภาพ 3)

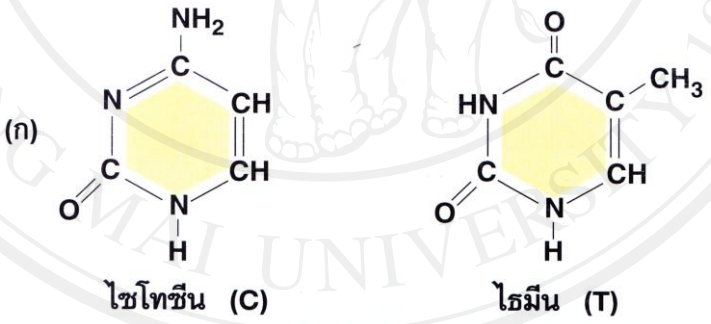
โครงสร้างของดีเอ็นเอจะมีลักษณะที่พันกันเป็นเกลียวคล้ายขดลวดสปริง เรียกว่า ฮีลิกซ์ (Helix) โดยทั่วไปจะเป็นเกลียวคู่เวียนขวา (Right-handed double helix) การพันเกลียวของดีเอ็นเอทำให้เกิดเป็นร่องขึ้น 2 ขนาด คือ ร่องขนาดใหญ่ (Major groove) และร่องขนาดเล็ก (Minor groove) (ภาพ 4 (ก)) เกลียวคู่นี้จะทำให้สายพอลีนิวคลีโอไทด์สองสายเรียงตัวในทิศทางตรงข้ามกัน คือ สายหนึ่งจะเรียงตัวจาก 5'-phoshate ไปยัง 3'-OH อีกสายหนึ่งเรียงจาก 3'-OH ไปยัง5'-phoshate แกนของทั้งสองสายเป็นส่วนของน้ำตาลดีออกซีไรโบสต่อกับหมู่ฟอสเฟตและมีเบสอยู่ภายในเกลียว (ภาพ 4 (ข)) โดยมีระนาบของเบสตั้งฉากกับแกนของเกลียวในลักษณะเหมือนราวบันไดวนกับขั้นบันได เส้นผ่านศูนย์กลางของเกลียวมีขนาด 20 Å แต่ละรอบเกลียวจะประกอบด้วยเบส 10 คู่ ยาว 34 Å (ระยะห่างระหว่าง 1 คู่เบสเท่ากับ 3.4 Å) เกลียวคู่ของดีเอ็นเอจะถูกยึดด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบสที่อยู่บนสายตรงข้ามกัน โดยมีเบสอะดีนีนจับคู่กับเบสไธมีนด้วยพันธะไฮโดรเจน 2 พันธะและเบสไซโทซีนจับคู่กับเบสกัวนีน ด้วยพันธะไฮโดรเจน 3 พันธะ (ภาพ 4 (ค)) นอกจากนี้ยังมีแรงไฮโดรโฟบิค (Hydrophobic interaction) ที่เกิดขึ้นระหว่างเบสที่ซ้อนอยู่ในสายนิวคลีโอไทด์แต่ละสาย ดังนั้นพันธะไฮโดรเจนและพันธะไฮโดรโฟบิคจึงเป็นพันธะหลักที่ช่วยให้เกลียวฮีลิกซ์ของดีเอ็นเอเสถียรคงรูปอยู่ได้ (วิชัย บุญแสง และคณะ, 2541)

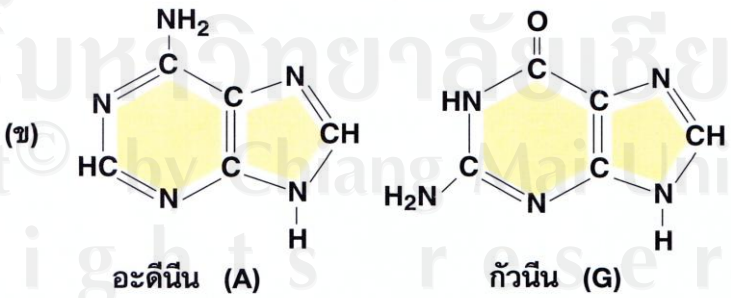
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 1 โครงสร้างของนิวคลีโอไทด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาล กลุ่มฟอสเฟต และเบส

(ที่มา: วิชัย บุญแสง และคณะ, 2541)

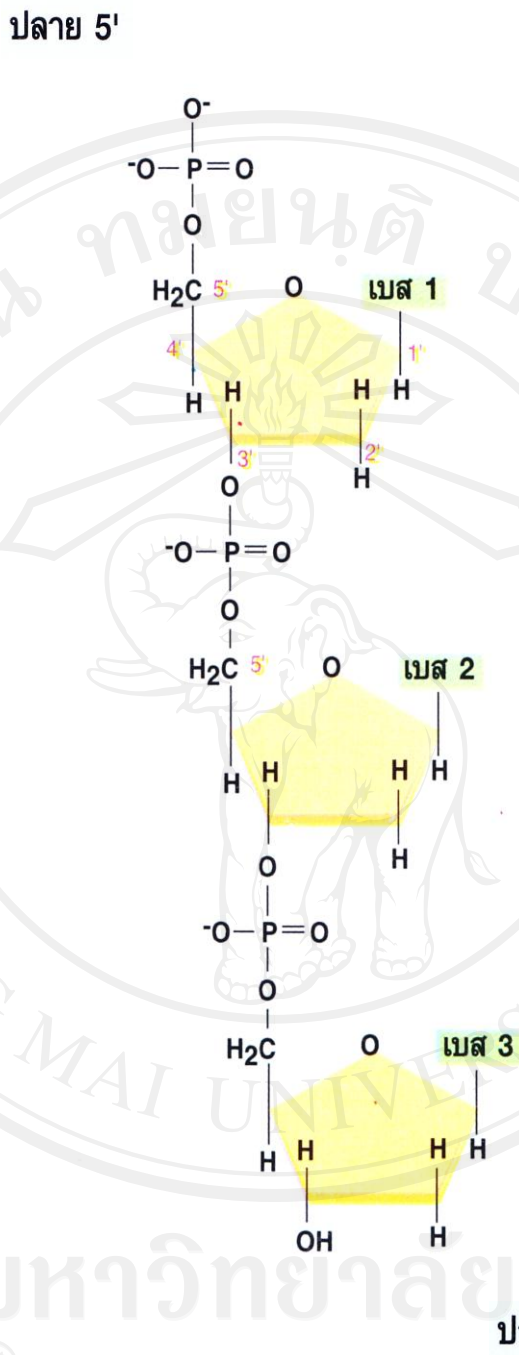




ภาพ 2 โครงสร้างเบสที่พบบนสายดีเอ็นเอ (ก) เบสไพริมิดีน (ข) เบสเพียวรีน

(ที่มา: วิชัย บุญแสง และคณะ, 2541)

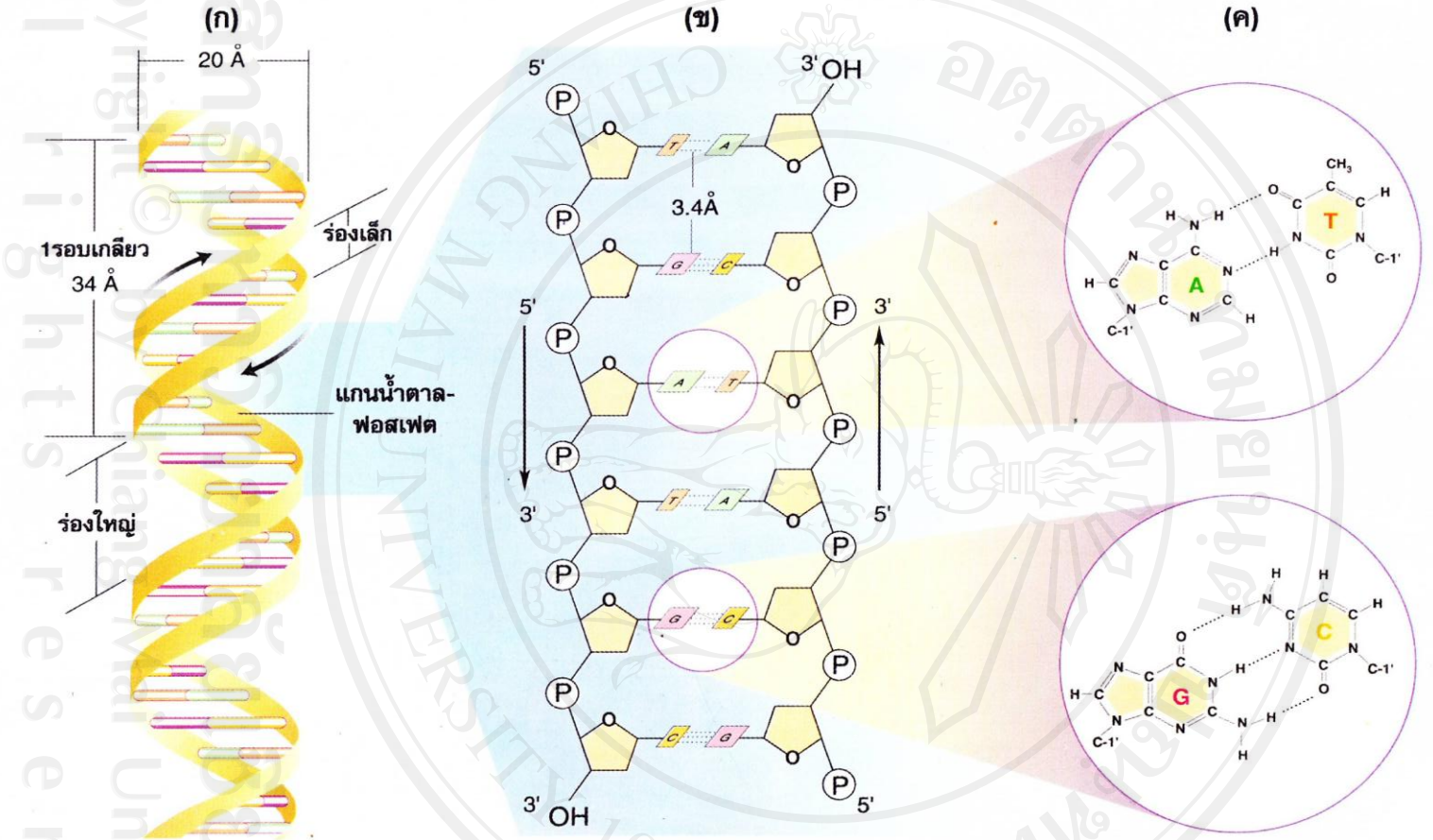
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 3 สายพอลีนิวคลีโอไทด์ที่เชื่อมกันด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์แสดงทิศทางจากปลาย 5' ไป 3'

(ที่มา: วิชัย บุญแสง และคณะ, 2541)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 4 (ก) โครงสร้างเกลียวฮีลิกซ์ของดีเอ็นเอ (ข) น้ำตาล และหมู่ฟอสเฟตเป็นแกน (ค) เบสที่อยู่ภายในบนสายตรงข้ามกันถูกยึดด้วยพันธะไฮโดรเจน

(ที่มา: วิชัย บุญแสง และคณะ, 2541)

โดยทั่วไปดีเอ็นเอเป็นแหล่งเก็บข้อมูลทางพันธุกรรม สามารถพบได้ในเซลล์เกือบทุกชนิดของสิ่งมีชีวิตและมีการถ่ายทอดข้อมูลออกไปให้อยู่ในรูปของอาร์เอ็นเอ ด้วยกระบวนการถอดรหัส (Transcription) จะมีกระบวนการแปลรหัส (Translation) จากอาร์เอ็นเอเป็นโปรตีนสำหรับทำหน้าที่ต่างๆ อีกทีหนึ่ง (ตรีทิพย์ รัตนวรชัย, 2552) ซึ่งในเซลล์แต่ละเซลล์จะมีดีเอ็นเอประมาณ 3 พันล้านเบส การเรียงตัวของเบสแต่ละคนจะแตกต่างกัน ทำให้ดีเอ็นเอของแต่ละคนไม่เหมือนกัน ยกเว้นในฝาแฝดไข่ใบเดียวกัน รวมทั้งดีเอ็นเอยังมีความจำเพาะในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดส่งผลทำให้ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอเกิดความหลากหลายขึ้น (อรรถพลแช่มสุวรรณวงศ์, 2544)

ประเภทของดีเอ็นเอสามารถแบ่งตามแหล่งที่มาได้2แหล่ง คือ ดีเอ็นเอที่พบในนิวเคลียส (Nuclear DNA) และดีเอ็นเอที่พบในไมโตคอนเดรีย (Mitochondrial DNA ; mtDNA) การศึกษาดีเอ็นเอที่พบในนิวเคลียสจะทำให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาระบบวิทยาเชิงโมเลกุลและวิวัฒนาการ ส่วนข้อมูลการเรียงลำดับเบสของดีเอ็นเอที่พบในไมโตคอนเดรียมีความเหมาะสมในการนำมาใช้หาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตที่มีสายเลือดใกล้ชิดกันและยังเหมาะที่จะนำไปใช้ในการศึกษาเพื่อใช้ในการจำแนกชนิดและสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ เป็นผลทำให้นักวิจัยส่วนใหญ่จึงกำหนดยีนเป้าหมายที่ดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรีย

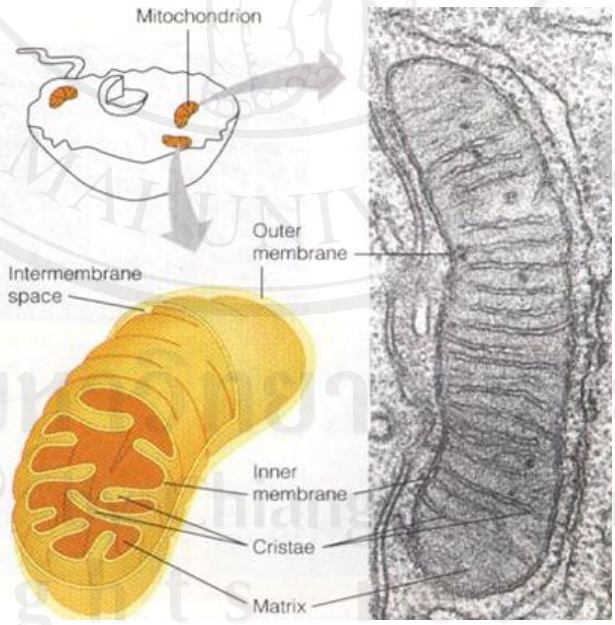
ไมโตคอนเดรีย (Mitochondria) เป็นออแกเนลล์ของเซลล์อยู่ภายในไซโตพลาสซึม ทำหน้าที่สำคัญ คือ เป็นแหล่งผลิตสารที่ให้พลังงานสูง (Adenosine triphosphate; ATP) พบเฉพาะในเซลล์ของยูแคริโอต (Eukaryotic cell) ที่ใช้ออกซิเจนในการหายใจ ค้นพบครั้งแรกโดย Kollicker ระยะแรกที่พบออแกเนลล์นี้มีหลายชื่อ เช่น คอนดริโอโซม (Chondriosome) ไบโอบลาสต์ (Bioblast) เป็นต้น จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1897 Benda ได้เรียกว่า ไมโตคอนเดรีย รูปร่างจะมีลักษณะเป็นก้อนกลม หรือก้อนรีๆ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 0.2 - 1.0 ไมครอน ความยาวประมาณ 5 - 7 ไมครอน (วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี, 2554) มีเยื่อหุ้ม 2 ชั้น (double unit membrane) โดยเยื่อหุ้มชั้นนอกเรียบความหนาประมาณ 60 - 80 Å ทำหน้าที่ควบคุมการผ่านเข้าออกของสาร เยื่อหุ้มชั้นในมีลักษณะเป็นท่อหรือพับทบกันอยู่ เรียกว่า คริสตี (Cristae) ภายในบรรจุของเหลวที่ประกอบด้วยสารหลายชนิด เรียกว่า เมทริกซ์ (Matrix) (ธนาวลัย อรัญญิก, 2552) (ภาพ 5)

ภายในไมโตคอนเดรีย มีสารพันธุกรรมที่เรียกว่า ดีเอ็นเอไมโตคอนเดรีย (Mitochondrial DNA ; mtDNA) ซึ่งมีขนาดเล็กมากเมื่อเทียบกับดีเอ็นเอที่อยู่ในนิวเคลียส สำหรับรหัสบนดีเอ็นเอของไมโตคอนเดรียนั้น ทุกเบสมีความหมายทั้งหมดและเท่าที่พบในขณะนี้มี 37 ยีน โดยหลังจากกระบวนการถอดรหัสและแปลรหัสแล้วผลผลิตที่ได้เป็น ribosomal RNA (rRNA) 2 ชนิด transfer RNA (tRNA) 22 ชนิด และโปรตีนอีก 13 ชนิด ซึ่งโปรตีนทั้งหมดจะเป็นหน่วยย่อยของเอนไซม์ที่สำคัญของกระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริเลชั่น คือ หน่วยย่อยของเอนไซม์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

NADH dehydrogenase 7 หน่วยย่อย คิดเป็น 60% ของทั้งหมด หน่วยย่อยของเอนไซม์ Cytochrome C oxidase 3 หน่วยย่อย หน่วยย่อยของเอนไซม์ ATP synthase 2 หน่วยย่อย และหน่วยย่อยของเอนไซม์ Cytochrome b 1 หน่วยย่อย (ภาพ 6)

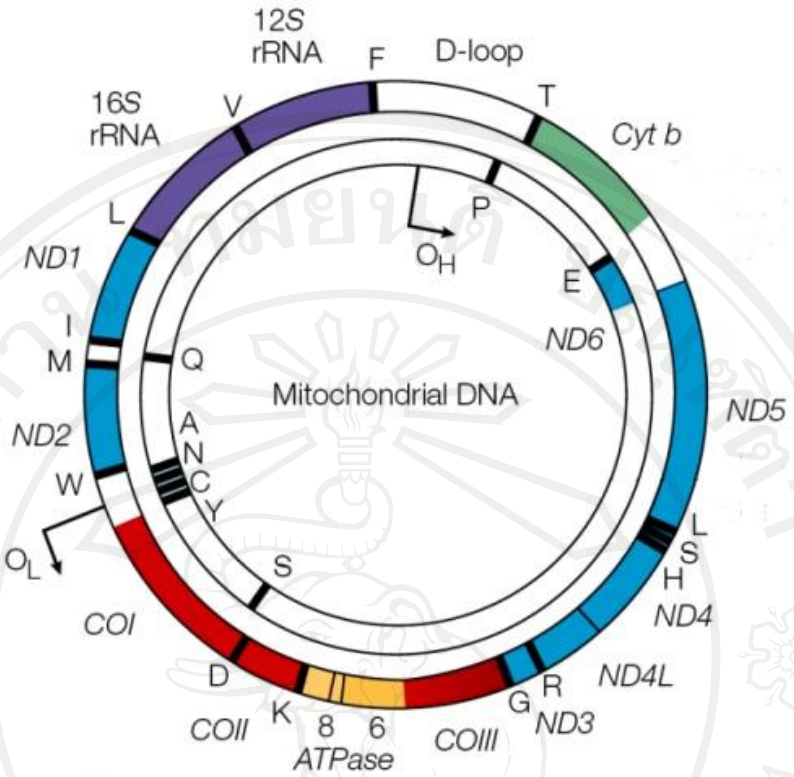
กลไกในการทำงานของดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรียจะแตกต่างจากดีเอ็นเอที่อยู่ในนิวเคลียสและมีกลไกการจำลองตัวเองที่เป็นอิสระต่อดีเอ็นเอในนิวเคลียส กล่าวคือการจำลองตัวของดีเอ็นเอไมโตคอนเดรียสามารถเกิดขึ้นได้โดยไม่จำเป็นต้องเกิดขึ้นพร้อมกับการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอในนิวเคลียส นอกจากนั้นดีเอ็นเอไมโตคอนเดรียยังเป็นดีเอ็นเอชนิดเดียวที่พบในไซโทพลาสซึม ที่มาของมันนั้นไม่ได้มาจากการเกิดขึ้นใหม่เอง (de-novo) แต่ต้องได้รับการถ่ายทอดมาจากบรรพบุรุษที่ปกติจะอาศัยกฎของเมนเดล (มาจากพ่อและแม่) แต่เนื่องจากการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของดีเอ็นเอไมโตคอนเดรียจะเกิดจำเพาะกับฝ่ายมารดาเท่านั้น ทำให้การถ่ายทอดพันธุกรรมไม่เป็นไปตามกฎของเมนเดล (ตรีทิพย์ รัตนวรชัย, 2552) ซึ่งความผิดปกติของดีเอ็นเอไมโตคอนเดรียที่เกิดขึ้นดังกล่าว สามารถใช้เป็นประโยชน์ในการติดตามเชื้อสายทางมารดา และสามารถนำไปใช้ในการตรวจพิสูจน์เพื่อระบุชนิดของเจ้าของดีเอ็นเอในงานทางนิติวิทยาศาสตร์ได้ (สำนักงานตำรวจแห่งชาติ, 2553)



ภาพ 5 ไมโตคอนเดรีย (Mitochondria)

(ที่มา: http://www.sci.nu.ac.th/biology/elearning/elearning/lesson1.asp/20 มิถุนายน 2554)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



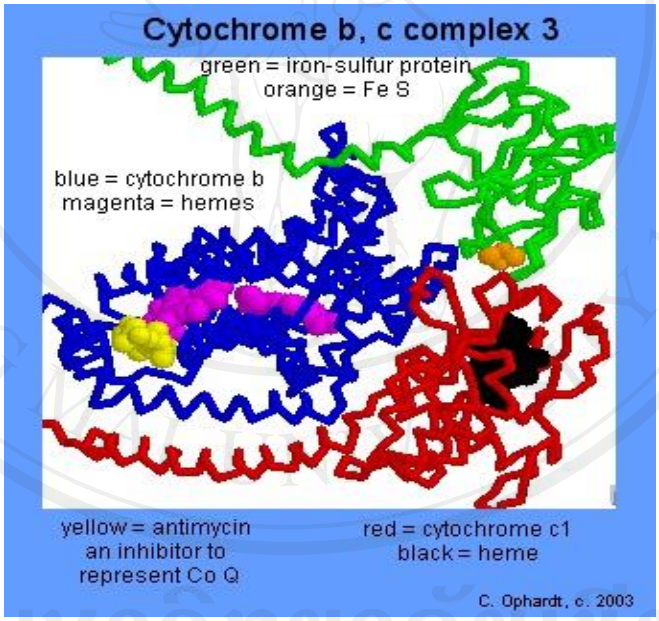
ภาพ 6 แผนผังของยีนต่างๆ ในจีโนมของไมโตคอนเดรีย

(ที่มา: http://www.nature.com/nrg/journal/v6/n5/fig_tab/nrg1606_F1.html/20 มิถุนายน 2554)

ไซโตโครม (Cytochrome) (ภาพ 7) คือ รงควัตถุที่อยู่ในรูปของโปรตีนที่มีเยื่อมาหุ้ม มีธาตุเหล็ก (Fe) เป็นองค์ประกอบ สามารถพบได้ในเนื้อเยื่อไมโตคอนเดรียชั้นใน การเรียกชื่อจะใช้ตัวอักษรแทนชนิดของไซโตโครมนั้นๆ เช่น ไซโตโครม a ไซโตโครม b และไซโตโครม c โดยไซโตโครมจะมีหน้าที่รับและส่งอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจจากไซโตโครมหนึ่งไปยังอีกไซโตโครมหนึ่ง (Cytochrome b → Cytochrome c → Cytochrome a) จนถึงออกซิเจนที่ซึ่งเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย โดยจะไม่มีการส่งต่ออิเล็กตรอนให้แก่สารตัวใดอีก ออกซิเจนตัวที่ได้รับอิเล็กตรอนจะรวมกับโปรตอนที่มีอยู่ในสารละลายภายในไมโตคอนเดรียแล้วกลายเป็นน้ำ (ธนาวลัย อรัญญิก, 2552) (ภาพ 8)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

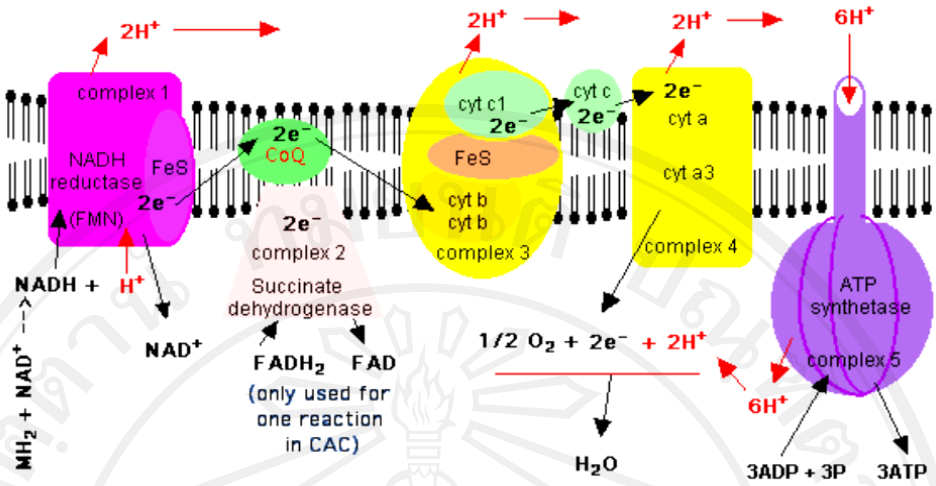
ยีนไซโตโครม บี (Cytochrome b gene) เป็นยีนที่อยู่ในโครงสร้างของจีโนมของไมโตคอนเดรีย มีรหัสในการสร้างรงควัตถุที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจ จะเป็นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กและมีลำดับเบสที่แตกต่างกันไปทำให้ในสัตว์แต่ละชนิดมีลำดับเบสที่หลากหลาย กล่าวได้อีกนัยหนึ่ง คือ จะมีการสร้างโปรตีนที่มีความจำเพาะกับสัตว์แต่ละชนิดเท่านั้น จากคุณสมบัติดังกล่าว ทำให้มีการนำยีนไซโตโครม บี มาใช้ในการตรวจวิเคราะห์เพื่อแยกชนิดของสัตว์ออกจากกัน แต่เนื่องด้วยปริมาณดีเอ็นเอที่ได้อาจจะมีปริมาณเพียงเล็กน้อย หรืออาจมีสภาพที่ไม่สมบูรณ์ ไม่สามารถนำมาทำการตรวจสอบได้ จึงต้องใช้กระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction ; PCR) ซึ่งเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการโคลนดีเอ็นเอแม่แบบโดยสามารถเพิ่มปริมาณเฉพาะส่วนที่เป็นดีเอ็นเอที่ต้องการให้มีจำนวนที่มากขึ้นในระยะเวลาอันสั้น



ภาพ 7 รูปร่างของไซโตโครม

(ที่มา: http://www.pw.ac.th/main/website/sci/5_data.htm/28 พฤษภาคม 2554)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 8 ไซโตโครมที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจ

(ที่มา: http://www.elmhurst.edu/~chm/vchembook/596electransport.html/28 พฤษภาคม 2554)

เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ได้มีการคิดค้นในปี ค.ศ. 1986 โดย K. Mullis หลักการของกระบวนการ PCR คือ การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอสายคู่ที่ปฏิกิริยาเร่ง โดยอาศัยสมบัติของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (DNA polymerase) ชนิดที่มีความสามารถในการต่อสายของดีเอ็นเอให้ยาวขึ้นจากการอาศัยดีเอ็นเอแม่แบบสายสั้นๆ ที่เรียกว่า ไพรเมอร์ (Primer) ซึ่งมีลำดับเบสคู่สมกับดีเอ็นเอแม่แบบที่ปลาย 5' และปลาย 3' สมบัติพิเศษของเอนไซม์ที่ทนความร้อนได้กว่า 90 °C ทำให้สามารถปรับอุณหภูมิของกระบวนการ PCR ให้สูงหรือต่ำตามความต้องการโดยที่ไม่ทำให้เอนไซม์นี้เสียความสามารถในการทำงานไป (ตรีทิพย์ รัตนวรชัย, 2552) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยสำคัญอื่นๆ ที่ต้องคำนึงถึงในกระบวนการ PCR ได้แก่ น้ำสะอาดผ่านการฆ่าเชื้อ (Sterile water) บัฟเฟอร์ (Buffer) ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ ไตรฟอสเฟต (Deoxyribonucleotide triphosphates; dNTPs) 4 ชนิด ได้แก่ dATP, dTTP, dGTP และ dCTP และดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ปริมาณของดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มจะมากขึ้นได้ต้องอาศัยปฏิกิริยาต่อเนื่องหลายๆ รอบ โดยแต่ละรอบจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลักๆ (ภาพ 9) คือ

1. Denaturation จะเป็นการแยกดีเอ็นเอสายคู่ออกจากกันเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวซึ่งปฏิกิริยาจะเกิดที่อุณหภูมิประมาณ 90 - 95 °C

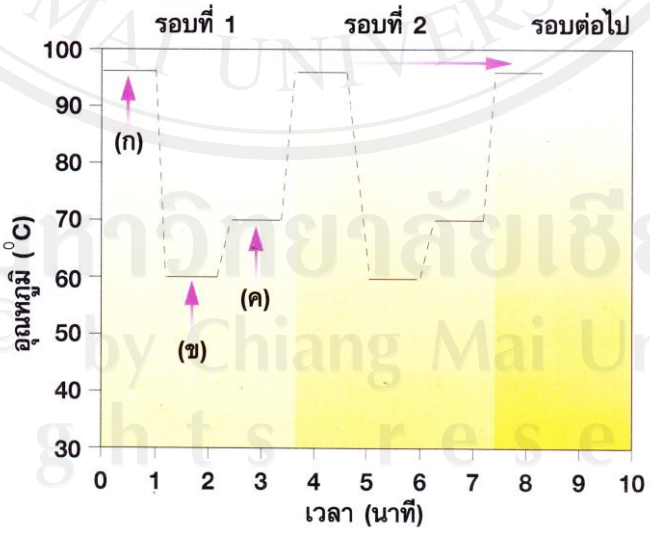
2. Annealing เมื่อลดอุณหภูมิลงอยู่ที่ประมาณ 50 - 55 °C ไพรเมอร์สองสายที่อยู่ในส่วนผสมของสารเคมีจะเข้าไปจับคู่กับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นแม่แบบตรงบริเวณที่มีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. Extension จะเป็นการต่อลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลายของไพรเมอร์ โดยอาศัยเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส และดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ ไตรฟอสเฟต ครบทั้ง 4 ชนิด ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จะอยู่ที่ 70 - 75 °C

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในรอบแรก ผลผลิตที่ได้จะไม่มีเฉพาะส่วนของดีเอ็นเอบริเวณที่เป็นเป้าหมายเท่านั้น แต่ได้โมเลกุลดีเอ็นเอที่มีสายหนึ่งยาวมากเพราะเป็นต้นแบบเดิม ดีเอ็นเออีกสายหนึ่งที่เป็นคู่สม จะเริ่มต้นจากปลาย 5' ของไพรเมอร์ที่ใช้ ส่วนปลาย 3' จะยาวออกนอกบริเวณที่ต้องการ ในรอบที่ 2 ยังคงได้ผลผลิตที่มีสายหนึ่งยาวมาก หรือมีปลาย 3' ที่ยาวเกินส่วนที่ต้องการ จนถึงรอบที่ 3 จึงเริ่มมีโมเลกุลของดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากับดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการและจะมีการเพิ่มปริมาณมากขึ้นอย่างรวดเร็วในรอบต่อๆ ไป ซึ่งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยรวมจะเพิ่มขึ้นในอัตราทวีคูณ คือ 2^n (n = จำนวนรอบ) โดยส่วนใหญ่จะใช้เพิ่มประมาณ 30 รอบ ถึงจะได้ดีเอ็นเอประมาณ 1 - 10 ล้านเบส ซึ่งเพียงพอที่จะนำมาตรวจหาชนิดได้ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552)

การตรวจสอบผลของตัวอย่างที่ได้จากกระบวนการ PCR จะนิยมตรวจสอบโดยการการวิเคราะห์แถบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย agarose gel electrophoresis (ภาคผนวก ข) เนื่องจากว่าเป็นวิธีการที่ง่ายและรวดเร็ว สามารถคำนวณหาปริมาณความเข้มข้นและตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอได้จากการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดแน่นอน จากนั้นย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) แล้วนำไปส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet) ผลผลิตจากกระบวนการ PCR ที่ดีควรมีแถบชัดเจนและตรงตามขนาดที่ต้องการ



ภาพ 9 ขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR (ก) Denaturation (ข) Annealing (ค) Extension

(ที่มา: วิชัย บุญแสง และคณะ, 2541)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ดีเอ็นเอ เป็นโมเลกุลที่มีขนาดเล็กมากในระดับนาโนเมตร ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า แต่สามารถมีอิทธิพลต่อระบบต่างๆ ของร่างกายของสิ่งมีชีวิตแทบทุกชนิด ความจำเพาะเจาะจงของลำดับเบสตลอดจนการทำงานอย่างเป็นระเบียบตั้งแต่ที่อยู่ การจัดเรียงตัว การแก้ไขซ่อมแซมความผิดพลาดและความสำคัญอื่นๆ เหล่านี้ ล้วนได้มาจากการศึกษา ค้นคว้าและพิสูจน์ข้อมูลต่างๆ ของนักวิจัย ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ผู้ศึกษาได้รวบรวมเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเนื้อหาในส่วนของ การศึกษาเปรียบเทียบเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอไมโตคอนเดรียในช่วงยีนไซโตโครม บี เพื่อใช้สำหรับจำแนกชนิดสัตว์ต่างๆ ออกจากกัน

Matsunaga, *et al.* (1999) ได้ประยุกต์ใช้เทคนิค Multiplex PCR ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายโดยการใช้ไพรเมอร์หลายคู่พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียวกันมาตรวจสอบชนิดเนื้อสัตว์ 6 ชนิด ได้แก่ แพะ ไก่ วัว แกะ หมู และม้า ซึ่งไพรเมอร์ที่ใช้จะมีการออกแบบมาจากยีนในส่วนของยีนไซโตโครม บี โดย forward primer จะเป็นการนำลำดับเบสของสัตว์ 6 ชนิดดังกล่าวมารวมกันด้วยอัตราส่วนที่เหมาะสม คือ 1: 0.2: 3: 0.6: 3: 0.6: 2 ส่วน reverse primer จะใช้ลำดับเบสตามความจำเพาะของสัตว์แต่ละชนิด เมื่อมีการวิเคราะห์แถบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย agarose gel electrophoresis พบว่าขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากสัตว์แต่ละชนิด (แพะ ไก่ วัว แกะ หมู และม้า) มีขนาดแตกต่างกัน คือ จะปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ขนาดความยาว 157, 227, 274, 331, 398 และ 439 bp ตามลำดับ นอกจากนี้ผู้ทำการวิจัยยังได้มีการศึกษาในส่วนของปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบที่จะสามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบ ซึ่งพบว่าขอบเขตของปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบที่จะสามารถนำมาตรวจสอบได้นั้นอยู่ที่ 0.25 นาโนกรัม และในปี 2007 Jain, *et al.* ได้ทำการศึกษาการตรวจสอบชนิดเนื้อสัตว์ ด้วยวิธีการเช่นเดียวกับ Matsunaga, *et al.* (1999) แต่มีบางส่วนที่มีความแตกต่างกัน คือ ได้เพิ่มชนิดของเนื้อสัตว์ที่มีการนำมาตรวจสอบอีก 1 ชนิด คือ กระบือ และเมื่อวิเคราะห์แถบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย agarose gel electrophoresis พบว่าขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR มีความยาว 274 bp ซึ่งตรงกับขนาดผลิตภัณฑ์ PCR ของวัว อันเนื่องมาจากมีการใช้ reverse primer ชนิดเดียวกันในการตรวจสอบและลำดับเบสของกระบือในช่วงที่นำมาทดสอบนั้นมีลำดับเบสที่เหมือนกันกับของวัว จากการศึกษานี้ สรุปได้ว่าไพรเมอร์ที่มีการออกแบบมาจากยีนไซโตโครม บี มีความจำเพาะกับดีเอ็นเอของสัตว์แต่ละชนิด ทำให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการระบุชนิดของสัตว์ต่างๆ ออกจากกันได้ถึงแม้ว่าปริมาณของดีเอ็นเอที่ใช้จะมีปริมาณเพียงเล็กน้อย

Matsuda, *et al.* (2005) ได้ทำการออกแบบชุดของไพรเมอร์ที่สามารถใช้ตรวจกับช่วงดีเอ็นเอไมโตคอนเดรียในส่วนของยีนไซโตโครม บี ของมนุษย์ได้อย่างจำเพาะและมีความไวในการตรวจสูง เนื่องจากว่าลำดับเบสที่ทำการออกแบบมีความแตกต่างกับสัตว์ที่นำมาเปรียบเทียบได้แก่ สัตว์ที่มีลำดับชั้นสูง คือ ลิง 4 ชนิด ได้แก่ ลิงชิมแพนซี ลิงกอลิล่า ลิงญี่ปุ่นและลิงแสม รวมทั้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สัตว์ที่มีลำดับชั้นต่ำลงมา ได้แก่ วัว หมู สุนัข แกะ หนู ไก่ และปลาทูน่า โดยตัวอย่างที่ใช้ในการสกัดจะได้มาจากตัวอย่างเลือดของมนุษย์จำนวน 48 คน แบ่งเป็นเพศชาย 30 คน เพศหญิง 18 คน และตัวอย่างเลือดของสัตว์ดังกล่าวทั้งหมด ผลที่เกิดขึ้นหลังจากมีการตรวจสอบลำดับเบสของ forward primer และ reverse primer ของมนุษย์และลิงชิมแพนซี มีความแตกต่างกันที่ 26% (7 bp/27bp) และ 26% (6 bp/23bp) ตามลำดับ จากนั้นเมื่อทำการตรวจสอบโดยการใช้เทคนิค PCR ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและวิเคราะห์แถบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย agarose gel electrophoresis พบว่า ขนาดความยาวของผลิตภัณฑ์ PCR ของมนุษย์ทั้ง 48 คน ปรากฏแถบที่ 157 bp แต่เมื่อทดสอบเปรียบเทียบกับสัตว์ชนิดอื่น ไม่ว่าจะเป็นลิงทั้ง 4 ชนิด หรือวัว หมู สุนัข แกะ หนู ไก่ และปลาทูน่า ไม่ปรากฏแถบดังกล่าวขึ้นเลย รวมทั้งเมื่อมีการตรวจสอบลำดับเบสของไพรเมอร์ของสัตว์แต่ละชนิด พบว่ามีความแตกต่างกันทั้ง forward primer และ reverse primer นอกจากนี้ผู้ทำการวิจัยยังได้มีการศึกษาในส่วนของการนำไพรเมอร์ของมนุษย์ที่มีการออกแบบไว้นั้นไปใช้ตรวจสอบตัวอย่างวัตถุพยานที่มีการเก็บไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน ได้แก่ คราบเลือด และรากผม (เก็บ 20 ปี) กระดูก (เก็บ 25 - 30 ปี) ผลที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ดังกล่าวในการตรวจสอบ คือ สามารถระบุตัวอย่างต่างๆ ได้ว่าเป็นของมนุษย์ได้อย่างแม่นยำที่ขนาดความยาว 157 bp จากการศึกษานี้ สรุปได้ว่าไพรเมอร์ที่มีการออกแบบมาจากยีนไซโตโครม บี มีความจำเพาะกับดีเอ็นเอของมนุษย์ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ ในส่วนของการคัดแยกหรือตรวจพิสูจน์ตัวอย่างคราบเลือด เส้นผม เส้นขน หรือกระดูก ของมนุษย์ออกจากสัตว์ได้

Ilhak, *et al.* (2007) ได้ใช้เทคนิค PCR ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสัตว์ร่วมกับการใช้ไพรเมอร์ในส่วนของดีเอ็นเอไมโตคอนเดรียที่มีความจำเพาะกับดีเอ็นเอของสัตว์แต่ละชนิดมาใช้เพื่อทำการตรวจสอบเนื้อสัตว์ 7 ชนิด ได้แก่ ม้า สุนัข แมว วัว แกะ หมู และแพะ โดยตัวอย่างที่นำมาศึกษาจะแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ ตัวอย่างเนื้อสัตว์แต่ละชนิดและตัวอย่างเนื้อสัตว์ที่มีการบดผสมกันในปริมาณ 5%, 2.5%, 1%, 0.5% และ 0.1% ซึ่งผลการตรวจสอบหลังจากการทำ PCR จำนวน 30 รอบและทำการวิเคราะห์แถบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย agarose gel electrophoresis พบว่าผลที่ได้เหมือนกันในเนื้อสัตว์ทั้งสองประเภท กล่าวคือขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ของสัตว์แต่ละชนิด (ม้า สุนัข แมว วัว แกะ หมู และแพะ) มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ขนาดความยาว 439, 322, 274, 271, 225, 212 และ 157 bp ตามลำดับ ยกเว้นแต่เนื้อสัตว์ที่มีการบดผสมกันในปริมาณ 0.1 % ไม่สามารถปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ดังกล่าวได้ ผู้ทำการตรวจสอบจึงต้องมีการเพิ่มจำนวนรอบในการทำ PCR จากจำนวน 30 รอบเป็น 35 รอบ จึงจะสามารถปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีความจำเพาะกับสัตว์แต่ละชนิดได้ จากการศึกษานี้สรุปได้ว่าไพรเมอร์ในส่วนของดีเอ็นเอไมโตคอนเดรียมีความจำเพาะกับดีเอ็นเอของสัตว์แต่ละชนิด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทำให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบหรือระบุชนิดของเนื้อสัตว์ที่มีการปนเปื้อนในอาหารได้

Li-Chin, *et al.* (2007) ได้เข้าร่วมในการตรวจสอบวัตถุพยานจำนวน 5 ชิ้น ที่ได้จากคดีการกระทำความผิดเกี่ยวกับสัตว์ป่าสงวน ประจำปี 2006 ถึง 2007 ของกระทรวงการเกษตร วัตถุพยานจำนวน 5 ชิ้น ประกอบด้วย ขนสัตว์จำนวน 2 ชิ้น อวัยวะเพศของสัตว์เพศผู้ อัณฑะและชิ้นเนื้อของสัตว์ อย่างละ 1 ชิ้น การตรวจสอบครั้งนี้ผู้ตรวจสอบได้ใช้เทคนิค Nested PCR ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ รวมทั้งใช้ไพรเมอร์ในส่วนของยีนไซโตโครม บี ที่สามารถใช้ระบุชนิดสัตว์ การตรวจสอบจะอาศัยการทำ PCR 2 ขั้นตอนด้วยไพรเมอร์ 2 คู่ โดยไพรเมอร์คู่แรกจะสามารถให้ขนาดความยาวของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ 486 bp และไพรเมอร์คู่ที่สองจะสามารถให้ขนาดความยาวของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ 251 bp ซึ่งจากการสรุปผลการตรวจสอบวัตถุพยานแล้วพบว่า ขนสัตว์ทั้ง 2 ชิ้น เป็นขนของแมวและอวัยวะเพศของสัตว์เพศผู้ อัณฑะและชิ้นเนื้อของสัตว์ อย่างละ 1 ชิ้นนั้นเป็นของวัว โดยการตรวจสอบวัตถุพยานด้วยเทคนิค Nested PCR ในครั้งนี้มีความแม่นยำไม่ต่ำกว่า 99.7% จากผลดังกล่าวสามารถใช้เป็นหลักฐานที่ยืนยันการกระทำความผิดและช่วยให้สามารถใช้เป็นหลักฐานดำเนินคดีกับผู้กระทำความผิดในคดีเกี่ยวกับการลักลอบล่าสัตว์ป่าหรือค้าสัตว์ผิดกฎหมายได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved