บทที่ 1

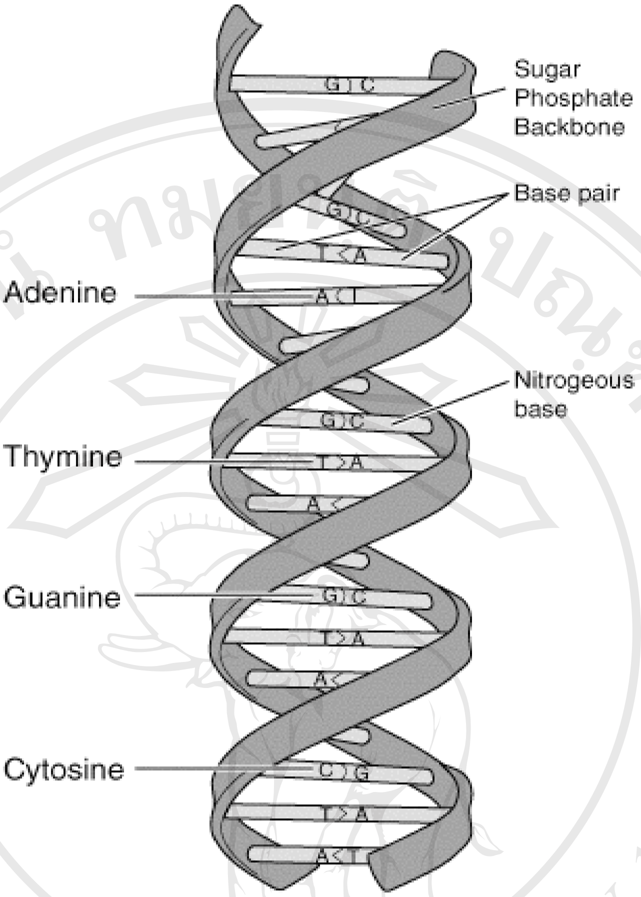
ทบทวนเอกสาร

ปัจจุบันดีเอ็นเอถูกนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการพิสูจน์ทางนิติวิทยาศาสตร์หลายด้าน เช่น การตรวจพิสูจน์เพื่อระบุยืนยันตัวบุคคล การตรวจ พิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือด เป็นต้น เพราะการตรวจเปรียบเทียบดีเอ็นเอสามารถใช้ตรวจพิสูจน์วัตถุพยานประเภทชีวภาพในคดีต่างๆที่มีปริมาณน้อยได้ เช่น เส้นผม คราบเลือด คราบอสุจิ คราบน้ำลาย เนื้อเยื่อ กระดูกและฟัน เป็นต้น ซึ่งวัตถุพยานเหล่านี้ไม่สามารถตรวจสอบได้จากหลักฐานที่ไม่เป็นวิทยาศาสตร์ (Non-scientific) เช่น บัตรประจำตัวที่ติดมากับตัว เสื้อผ้าที่สวมใส่ และเครื่องประดับ เป็นต้น รวมทั้งไม่สามารถตรวจสอบได้จากการเปรียบเทียบลายนิ้วมือ (Fingerprint) แต่สามารถตรวจสอบด้วยวิธีเปรียบเทียบดีเอ็นเอได้อย่างมีความถูกต้องและแม่นยำมากกว่า โดยที่ดีเอ็นเอเป็นเอกลักษณ์เฉพาะของแต่ละบุคคล ดังนั้นดีเอ็นเอจึงมีความสำคัญและนิยมใช้ในการตรวจพิสูจน์ทางนิติวิทยาศาสตร์อย่างกว้างขวาง

กรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิกหรือดีเอ็นเอ (Deoxyribonucleic acid : DNA) ประกอบด้วยหน่วยน้ำตาล เบส และหมู่ฟอสเฟตในสัดส่วนเท่าๆ กัน (1:1:1) ซึ่งเมื่อโมเลกุลของทั้งสามชนิดมารวมกันจะได้เป็นหน่วยเล็กที่สุดของดีเอ็นเอเรียกว่า นิวคลีโอไทด์ (Nucleotide) นิวคลีโอไทด์หลายๆอันมาเชื่อมต่อกันเป็นเส้นยาวจะเรียกว่า โพลีนิวคลีโอไทด์ (Polynucleotide) ส่วนน้ำตาลของดีเอ็นเอจะเป็นน้ำตาลดีออกซีไรโบส (Deoxyribose) ทำให้ได้ชื่อของดีเอ็นเอตามลักษณะของน้ำตาล เบสที่พบทั่วไปในดีเอ็นเอถูกจัดเป็น2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกเบสไพริมิดีน (Pyrimidine)ได้แก่ ไซโตซีน (Cytosine = C) และไธมีน (Thymine = T) กลุ่มที่สองเบสพิวรีน (Purine) ได้แก่ อะดีนีน (Adenine = A) และ กัวนีน (Guanine = G) โดยการเชื่อมต่อระหว่างนิวคลีโอไทด์จะเป็นพันธะทางเคมีระหว่างกลุ่มฟอสเฟตของนิวคลีโอไทด์อันหนึ่งกับน้ำตาลของนิวคลีโอไทด์อีกอันหนึ่งเชื่อมต่อกันเป็นสายยาวมาก โดยปลายทางด้านที่เป็นฟอสเฟตเรียกว่า 5 ’ ส่วนปลายที่เป็นน้ำตาลเรียกเป็น 3’ (ธานินทร์, 2538)

โมเลกุลของดีเอ็นเอมีลักษณะเป็นเส้นคู่บิดกันเป็นเกลียว (Double helix) โดยเส้นดีเอ็นเอทั้งคู่จะจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen bonds) ระหว่างคู่เบส โดยอะดีนีน (A) จะจับกับไทมีน (T) ด้วยสองพันธะ และกัวนีน (G) จะจับกับไซโตซีน (C) ด้วยสามพันธะ เท่านั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 1 แสดงลักษณะโครงสร้างของดีเอ็นเอ (DNA Structure)
http://www.ageds.iastate.edu/meat/topic1/sciencecontent.htm
(25 มีนาคม 2553)

ด้วยความจำเพาะเจาะจงของคู่เบสเช่นนี้ ทำให้สามารถกำหนดลำดับเบสของเส้นดีเอ็นเอสายที่จะไปจับกับอีกเส้นได้ หากรู้ลำดับเบสของเส้นดีเอ็นเอนั้น แม้ว่าพันธะไฮโดรเจนจะค่อนข้างอ่อน แต่เนื่องจากโมเลกุลของดีเอ็นเอประกอบด้วยหลายๆคู่เบส ทำให้มีพันธะเหล่านี้จำนวนมาก สามารถสร้างความเสถียรให้แก่ดีเอ็นเอได้ ในภาวะปกติแล้วสายดีเอ็นเอไม่เคยแยกจากกัน แต่ถ้าดีเอ็นเออยู่ในที่ที่มีอุณหภูมิสูงใกล้จุดเดือด เช่น 94-95 °C หรือในตัวกลางที่เป็นกรดหรือด่างรุนแรง เช่น pH<3 หรือ pH>10 จะพบว่าสายดีเอ็นเอแยกจากกันเป็นสองเส้นที่มีเบสเป็นคู่สมกัน (Complementary) เรียกขบวนการนี้ว่า denaturation และเมื่ออุณหภูมิเย็นลง เช่นที่ประมาณ 50-65 °C ดีเอ็นเอจะค่อยๆกลับเข้ามาจับกันเป็นเส้นคู่ใหม่ได้อีก ขั้นตอนนี้เรียกว่า annealing หรือ renaturation การค้นพบว่าดีเอ็นเอเป็นลักษณะเส้นคู่ ทำให้ได้ข้อสรุปของการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอ โดยดีเอ็นเอจะแยกสายออกเป็นเส้นเดี่ยวสองเส้น แล้วใช้ดีเอ็นเอแต่ละเส้นนั้นเป็นแม่แบบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

(Templates) ของการสร้างดีเอ็นเอเส้นใหม่ต่อไป ทำให้ได้ดีเอ็นเอเส้นคู่ใหม่ (Double strands) 2 คู่ ที่มีลำดับเบสเช่นเดียวกันกับดีเอ็นเอเส้นที่เป็นแม่แบบทุกประการ (ธานินทร์, 2538)

นอกจากนี้ดีเอ็นเอยังเป็นหน่วยพื้นฐานของยีน ซึ่ง เปรียบเหมือนรหัสทางพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตทั้งมวลไม่ว่าจะเป็น สัตว์ พืช แบคทีเรีย และสิ่งมีชีวิตเล็กๆอย่างอื่น และเนื่องจากในเซลล์มนุษย์ทุกเซลล์ที่มีนิวเคลียสจะมีดีเอ็นเออยู่ เช่น เม็ดเลือดขาว ตัวอสุจิ เซลล์รากผม เซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มในน้ำลาย เป็นต้น ดังนั้นเซลล์เหล่านี้จึงเป็นเซลล์ที่มีความสำคัญในการพิสูจน์สิ่งต่างๆที่เกิดกับมนุษย์ เช่น พิสูจน์โรคทางพันธุกรรม พิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือด และพิสูจน์ทางนิติเวช เป็นต้น โดยแผงยีนของมนุษย์จะอยู่ในโครโมโซมของคนมี 23 คู่ เรียกว่า diploid genome ซึ่งโครงสร้างทางเคมีของดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นเส้นยาวเรียงต่อกันของนิวคลีโอไทด์ที่มีเบสเป็นส่วนประกอบการเรียงตัวของลำดับเบสนี้เอง ที่เป็นรหัสสำหรับลักษณะของสิ่งมีชีวิตและยังสามารถถ่ายทอดไปยังลูก-หลานได้

ตามทฤษฎีแล้วถ้าไม่ใช่ฝาแฝดไข่ใบเดียวกัน (Identical twins) ดีเอ็นเอของแต่ละคนจะมีการเรียงตัวของเบสที่ต่างกัน ทำให้เกิดความแตกต่างของดีเอ็นเอหรือดีเอ็นเอโพลีมอร์ฟิซึม (DNA polymorphism) ซึ่งลักษณะนี้จะเป็นเอกลักษณ์แต่ละบุคคล ดังเหตุผลที่ว่าโครโมโซมของคนที่มีอยู่ 46 อัน โดยครึ่งหนึ่ง (23 อัน) มาจากพ่อและอีกครึ่งหนึ่ง (23 อัน) มาจากแม่ สมมติว่าการถ่ายทอดโครโมโซมแต่ละอันที่มาจากพ่อและแม่เป็นในลักษณะที่เป็นอิสระต่อกัน จะสามารถคำนวณรูปแบบต่างๆของโครโมโซมที่ถ่ายทอดไปยังลูกหลานได้ถึง 2^{23} ลักษณะ และในกรณีของลูกก็อาจมีรูปแบบของโครโมโซมที่ได้จากพ่อและแม่เป็นแบบต่างๆได้ถึง 2^{46} ลักษณะ

ดีเอ็นเอทั้งหมดในเซลล์เรียกว่า จีโนม (Genome) จีโนมของมนุษย์ประกอบด้วยสายของ ดีเอ็นเอที่มีความยาวของนิวคลีโอไทด์ประมาณ 3,000 ล้านคู่เบส ($3x10^9$ base pairs) ใน haploid cell และมียีนทั้งหมดประมาณ 33,000 ยีน ซึ่งมีขนาดต่างๆ กัน โดยจะกระจายอยู่ประมาณ 10% ในจีโนม สาย ดีเอ็นเอที่รวมอยู่กับโปรตีนจะพันขดกันอยู่ในโครโมโซมของ 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% ของดีเอ็นเอในจีโนม การเรียงตัวของเบสจะไม่ซ้ำกัน หรือถ้าซ้ำกันก็น้อยมาก

2. Repetitive DNA มีอยู่ประมาณ 25% ของดีเอ็นเอในจีโนม เป็นดีเอ็นเอที่มีการเรียงตัวของเบสซ้ำๆ กัน แบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1 Interspersed (dispersed) sequences เป็นดีเอ็นเอที่พบได้หลายชุด กระจายอยู่ทั่วไปในจีโนม และมีทิศทางใดก็ได้ ยังไม่ทราบหน้าที่ที่แน่นอนดีเอ็นเอชนิดนี้แบ่งได้เป็น

2.1.1 Short interspersed nuclear elements (SINE) มีความยาว 100-500 คู่เบส

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

2.2 Satellite DNA เป็นการเรียงตัวของเบสที่ซ้ำๆกันโดยจะพบได้ที่บริเวณ Centromere และ Telomere ในแต่ละโครโมโซม ในจีโนมจะมี satellite DNA ขนาดสั้นๆ แบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ

2.2.1 Minisatellite (มีหน่วยซ้ำของเบส 20 – 30 คู่เบส) จัดอยู่ในกลุ่มที่มีการซ้ำของเบสระดับปานกลาง ส่วนใหญ่ของมินิแซทเทลไลท์มีลำดับเบสแกน (Core sequence) เดียวกันและมักมีความหลากหลายสูง เนื่องจากความแตกต่างในจำนวนซ้ำจึงอาจเรียกว่า variable number tandem repeat (VNTR)

2.2.2 Microsatellite (มีหน่วยซ้ำของเบส 2 – 7 คู่เบส) จัดอยู่ในกลุ่มที่มีการซ้ำของลำดับเบสในลักษณะเบสซ้ำกันเรียงอยู่ต่อเนื่องที่ตำแหน่งหนึ่งๆในจีโนม แต่ละชุดซ้ำประกอบด้วยเบส 2-7 เบส โดยที่จำนวนซ้ำของชุดเบสของตำแหน่งหนึ่งในแต่ละบุคคลจะไม่เท่ากัน ยกเว้นเพียงกรณีแฝดที่เกิดจากไข่ใบเดียวกัน และ พบในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด มีวิธีเรียกแบบอื่นได้แก่ simple sequence repeat (SSR) หรือ short tandem repeat (STR) ลำดับเบสไมโครแซทเทลไลท์นี้มีการกระจายตัวทั้งจีโนม แต่การกระจายไม่สม่ำเสมอ บางบริเวณก็พบมาก บางบริเวณก็พบน้อยตามแต่ชนิดของสิ่งมีชีวิต

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การใช้ดีเอ็นเอในทางนิติวิทยาศาสตร์

การพิสูจน์บุคคล (Individual identification)

การตรวจพิสูจน์บุคคล เป็นการเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของคนที่ทราบกับตัวอย่างที่ไม่ทราบ ถ้าผลจากการตรวจสอบโดยดีเอ็นเอตำแหน่งใดไม่ตรงกัน ก็สรุปได้ทันทีว่าเป็นคนละคนกัน แต่ถ้าผลการตรวจตรงกันทุกตำแหน่ง สามารถคำนวณความเป็นไปได้ (Likelihood) ที่จะเป็นของที่มาจากคนคนเดียวกัน จากการหาความถี่ของจีโนไทป์ตามกฎของฮาร์ดีและไวน์เบิร์ก แล้วรวมความถี่ของจีโนไทป์ทุกตำแหน่ง โดยคูณเข้าด้วยกันจะได้ค่าความน่าจะเป็นที่คนคนหนึ่งที่สุ่มมา จะมีจีโนไทป์ที่เหมือนกับวัตถุพยานดังกล่าว (Random match probability)

การตรวจสอบความเป็นพ่อ (Paternity test)

การตรวจสอบความเป็นพ่อ หรือสายสัมพันธ์ทางเครือญาติ จะแตกต่างจากการตรวจพิสูจน์บุคคล โดยในการตรวจสอบความเป็นพ่อนี้ การคำนวณความน่าจะเป็นของความเป็นพ่อ คิดจากค่าดัชนีความเป็นพ่อ (Paternity index) ซึ่งมีวิธีการคำนวณที่แตกต่างออกไป โดยจะคิดจากจีโนไทป์ของชายที่สงสัยเป็นเกณฑ์

Paternity index (PI) หมายถึง โอกาสที่ชายที่ต้องสงสัยจะถ่ายทอดอัลลีลหนึ่งใด แล้วลูกจะมีลักษณะดีเอ็นเอเช่นนั้น เมื่อเปรียบเทียบกับบุคคลทั่วไปในประชากร โดยเมื่อชายที่ต้องสงสัยมีจีโนไทป์ของอัลลีลนั้นเป็นโฮโมไซโกต ความน่าจะเป็นที่จะถ่ายทอดอัลลีลนั้นไปสู่ลูกจะมีค่าเท่ากับ 1 แต่เมื่อชายที่ต้องสงสัยมีจีโนไทป์ของอัลลีลนั้นเป็นเฮเทอโรไซโกต ความน่าจะเป็นที่จะถ่ายทอดอัลลีลนั้นไปสู่ลูกจะมีค่าเท่ากับ 0.5 (1/2)

การตรวจดีเอ็นเอเพื่อพิสูจน์บุคคลในระยะแรกใช้วิธีตรวจจากดีเอ็นเอส่วนมินิแซทเทลไลท์ โดยใช้เป็นโพรบในการทำ RFLP โดยโพรบที่ใช้จะตรวจสอบดีเอ็นเอครั้งละหลายๆตำแหน่ง แล้วค่อยพัฒนามาเป็นโพรบที่ตรวจสอบตำแหน่งเดียว แต่มีรูปแบบของอัลลีลจำนวนมาก เกิดจากการที่มีจำนวนชุดซ้ำของส่วนมินิแซทเทลไลท์แตกต่างกัน การตรวจสอบจะตรวจจากหลายตำแหน่งโดยใช้โพรบชนิดต่างๆแต่ละตำแหน่งมีจำนวนอัลลีลสูง บางตำแหน่งอาจมีมากกว่า 20 อัลลีลในประชากร เมื่อตรวจดีเอ็นเอจากหลายตำแหน่งพร้อมกัน ความน่าจะเป็นที่บุคคลจะมีจีโนไทป์หนึ่งเมื่อคำนวณจากความถี่ของอัลลีลที่ตำแหน่งต่างๆจะมีค่าต่ำมาก แสดงถึงมีความจำเพาะกับแต่ละบุคคล หรือมีความเป็นเอกลักษณ์สูง แต่เนื่องจากขนาดของอัลลีลที่แตกต่างกันจากการตรวจสอบส่วนมินิแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอนี้มีขนาดใหญ่ บางอัลลีลอาจแตกต่างกันหลายพันคู่เบส อาจวิเคราะห์ผลผิดพลาดได้จึงมีความขัดแย้งในเรื่องนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากข้อโต้แย้งที่เกิดขึ้นในระหว่างการตรวจสอบดีเอ็นเอในกระบวนการยุติธรรมในอเมริกา จึงมีการจัดทำมาตรฐานของการตรวจสอบทุกขั้นตอน นอกจากนี้ในปัจจุบันการตรวจดีเอ็นเอเปลี่ยนเป็นใช้ไมโครแซทเทลไลท์ ในคนโดยมีการออกกฎหมายรองรับในอเมริกาเรียกว่า CODIS (Combined DNA index system) ตรวจสอบลำดับเบสซ้ำชนิด 4 คู่เบส บนออโตโซม 13 ตำแหน่ง คือ CSF1PO, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, FGA, THO1, TPOX และ vWA ร่วมกับ amelogenin ที่ใช้ตรวจโครโมโซมเพศอีกหนึ่งตำแหน่ง ในกรณีที่ต้องการตรวจสอบความสัมพันธ์ทางเครือญาติฝ่ายแม่ จะตรวจสอบเพิ่มจากดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย แต่ถ้าเป็นฝ่ายพ่อจะตรวจเพิ่มเติมจากดีเอ็นเอบนโครโมโซม Y

การตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอส่วนมากใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เพราะเทคนิค PCR ต้องการตัวอย่างดีเอ็นเอที่ใช้ตรวจจำนวนน้อย ใช้ระยะเวลาในการทดสอบน้อย และใช้ได้ในตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีสภาพไม่สมบูรณ์ โดยหลักการของ PCR มีดังนี้

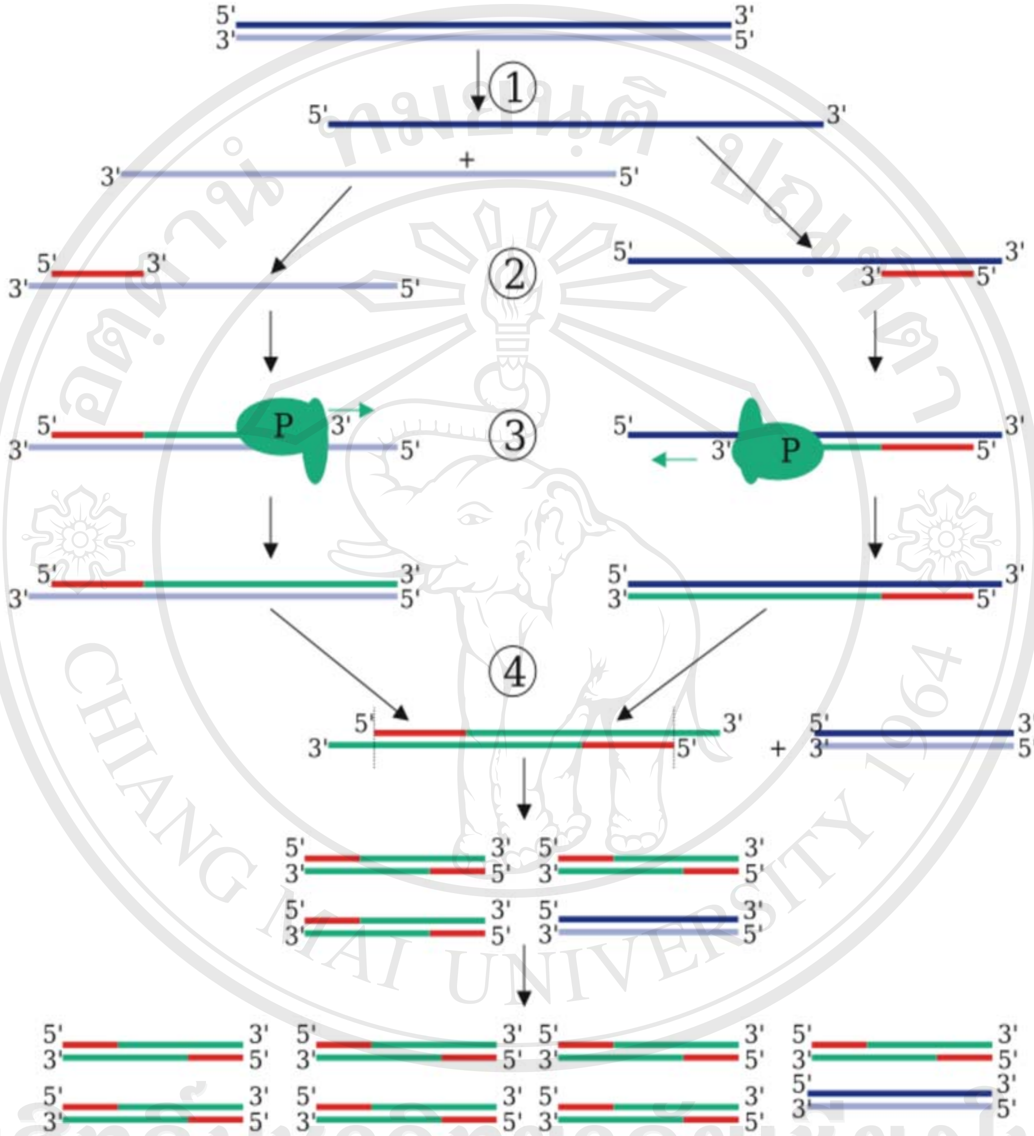
หลักการทำ PCR

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายซึ่งอยู่ในสารละลายร่วมกับดีเอ็นเออื่น โดยไม่จำเป็นต้องทำให้ชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวบริสุทธิ์ก่อน สามารถแยกส่วนของดีเอ็นเอที่สนใจได้โดยไม่ต้องนำไปขยายเพิ่มปริมาณในเซลล์หรือนำไปโคลน การทำ PCR คือ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสซ้ำกันหลายๆรอบ เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอปริมาณเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะเกิดขึ้นได้จำเป็นต้องมีไพรเมอร์ ดังนั้นจึงใช้ไพรเมอร์สองชนิดที่มีเบสคู่สมกับปลายทั้งสองด้านของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ โดยไพรเมอร์จะเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายและมีปลาย 3’ ในทิศทางเข้าหากัน

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในรอบแรกจะพบว่า ผลผลิตที่ได้ไม่ได้มีเฉพาะส่วนของดีเอ็นเอบริเวณที่เป็นเป้าหมายเท่านั้น แต่ได้โมเลกุลดีเอ็นเอที่มีสายหนึ่งยาวมากเพราะเป็นต้นแบบเดิม อีกสายหนึ่งเป็นคู่สมมีปลาย 5’ เริ่มต้นจากปลาย 5’ ของไพรเมอร์ที่ใช้ ส่วนปลาย 3’ ยาวออกไปนอกบริเวณที่ต้องการ ในรอบที่สองยังคงได้ผลผลิตที่มีสายหนึ่งยาวมาก หรือมีปลาย 3’ ที่ยาวเกินส่วนที่ต้องการ จนถึงรอบที่สามจึงเริ่มมีโมเลกุลดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากับเป้าหมายที่ต้องการ ซึ่งจะเพิ่มปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ส่วนโมเลกุลที่มีปลาย 3’ ยาว จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นรอบละสองโมเลกุลเท่านั้น โดยโมเลกุลที่มีปลาย 3’ ยาวดังกล่าวนี้สังเคราะห์มาจากดีเอนเอต้นแบบเริ่มต้นที่เป็นสายยาว เมื่อเปรียบเทียบกันจะพบว่า การสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยรวมเพิ่มขึ้นแบบทวีคูณรอบละ 2 เท่า แต่โมเลกุลที่มีปลาย 3’ ยาว เพิ่มขึ้นแบบสม่ำเสมอรอบละ 2 โมเลกุล ถ้าประสิทธิภาพของการเพิ่มดีเอ็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เอสมบูรณ์ จะสามารถคำนวณปริมาณดีเอ็นเอเมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอครบ 30 รอบ ได้ประมาณ 1 พันล้านเท่า



ภาพ 2 แสดงขั้นตอนและผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pcr.png (25 มีนาคม 2553).

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขั้นตอนการทำ PCR ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังนี้

1. Denaturation การทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบแยกเป็นสายเดี่ยว โดยใช้ความร้อนแล้วลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว

2. Annealing เป็นขั้นที่ไพรเมอร์ที่มีเบสเป็นคู่สมกับส่วนปลายของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย และมีปริมาณมากกว่าชิ้นดีเอ็นเออื่นๆมากมายเข้ามาจับคู่กับส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ

3. Primer extension เปลี่ยนอุณหภูมิให้พอเหมาะกับการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส เอนไซม์จะทำหน้าที่สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ โดยมีดีเอ็นเอเป้าหมายเดิมเป็นต้นแบบ

เนื่องจากเทคนิค PCR เป็นเทคนิคที่มีความไว (Sensitivity) สูง สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นล้านๆเท่าได้อย่างรวดเร็ว โดยใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้นเพียงเล็กน้อยก็สามารถตรวจสอบได้ ดังนั้นจึงต้องระมัดระวังการปนเปื้อนของดีเอ็นเอจากภายนอก เช่น จากอากาศ ผิวหนัง ผม เป็นต้น เพื่อป้องกันปัญหาดังกล่าวจึงควรทำ PCR ในบริเวณที่สะอาดไม่ปะปนกับการทดลองอื่น ในการทำ PCR ต้องใช้สารเคมีต่างๆดังนี้

1. บัฟเฟอร์ (10x Buffer) ใช้สำหรับทำปฏิกิริยา โดยมีความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของที่จะใช้จริง ซึ่งจะใส่ในปริมาณ 1 ใน 10 ของปริมาตรรวมของปฏิกิริยา

2. dNTP ประกอบด้วย dATP, dCTP, dGTP, dTTP ความเข้มข้นอย่างละ 2 มิลลิโมลาร์ ในปฏิกิริยาจะใส่ในปริมาณ 1 ใน 10 ของปริมาตรรวมของปฏิกิริยา เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็นชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์

3. ไพรเมอร์ ที่นิยมใช้คือโอลิโกนิวคลีโอไทด์ขนาด 20-24 นิวคลีโอไทด์ มีองค์ประกอบของเบส G และ C อยู่ระหว่าง 40-60 %

4. ดีเอ็นเอเป้าหมาย ใช้ได้ทั้งดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีและดีเอ็นเอที่มีคุณภาพไม่ดีนัก เช่น ดีเอ็นเอจากคราบเลือด เป็นต้น

5. เอนไซม์ เนื่องจากขั้นตอนในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR ต้องมีการทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพด้วยความร้อน เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสที่ใช้จึงเลือกใช้เอนไซม์ที่ทนความร้อน

เมื่อทำการเพิ่มดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR แล้ว ต้องนำมาแยกขนาดบนตัวกลางที่เหมาะสม เพื่อทำการวิเคราะห์ผลที่ได้ โดยเทคนิคที่นิยมคือ เทคนิค อิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis technique) ซึ่งมีหลักการทำดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis of DNA)

อิเล็ก โทร โฟรีซิส 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) และ เจลอะกาโรส (Agarose gel) โดยเจลพอลิอะคริลาไมด์ใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กระหว่าง 6-1000 คู่เบส ส่วนเจลอะกาโรสใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ประมาณ 100 คู่เบสจนถึงกว่า 50000 คู่เบส

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

5. บัฟเฟอร์ที่ใช้ ชนิดของบัฟเฟอร์มีผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้มี 3 ชนิดคือ TAE (Tris-acetate, EDTA), TBE (Tris-borate, EDTA) และ TPE (Tris-phosphate, EDTA) ซึ่งมีข้อดีและข้อเสียต่างกัน TBE นิยมใช้ที่ความเข้มข้น 0.5 เท่า ใช้แยกดีเอ็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เอได้ดี มีความสามารถเป็นบัฟเฟอร์ (Buffering capacity) ได้ดี แต่สามารถเกิดปฏิกิริยากับเจลอะกาโรสได้ จึงไม่เหมาะถ้าต้องการนำดีเอ็นเอกลับมาใช้อีก

เจลพอลิอะครีลาไมด์ นิยมนำมาใช้ในการแยกดีเอ็นเอมากที่สุด เนื่องจากดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ที่ใช้มีขนาดของโมเลกุลเล็ก ดังนั้นเจล พอลิอะครีลาไมด์ จึงเหมาะสมที่จะเป็นตัวกลางมากที่สุด

เจลพอลิอะครีลาไมด์ (Polyacrylamide gel)

เจลพอลิอะครีลาไมด์ เกิดจากการรวมตัวของ อะครีลาไมด์ (Acrylamide) และบิสอะครีลาไมด์ (N,N'-methylene bisacrylamide หรือเรียกสั้นๆว่า Bisacrylamide) โมเลกุลเดี่ยวมารวมตัวกัน เกิดเป็นพอลิเมอร์ซึ่งมีลักษณะเป็นร่างแห เป็นโมเลกุลที่สังเคราะห์ขึ้นทางเคมี จึงมีความสม่ำเสมอควบคุมขนาดได้ ไม่ทำปฏิกิริยากับสารเคมีใด มีความใส มีความคงตัวของ pH อุณหภูมิ และมี ionic strength กว้าง สามารถปรับขนาดของช่องพอลิเมอร์ได้ จึงเหมาะสมสำหรับเป็นตัวกลางในการแยกโมเลกุลของโปรตีนและดีเอ็นเอ

อะครีลาไมด์ และ บิสอะครีลาไมด์ โมเลกุลเดี่ยว เป็นสารที่เป็นพิษและสามารถดูดซึมผ่านทางผิวหนังได้ จึงควรสวมถุงมือขณะปฏิบัติงาน เจลพอลิอะครีลาไมด์ใช้ได้ทั้งในแบบ native gel เพื่อใช้แยกโมเลกุลของดีเอ็นเอที่เป็นเกลียวคู่ตามสภาพธรรมชาติ และใช้ในแบบ denaturing gel เพื่อแยกโมเลกุลดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ผ่านการทำให้เสียสภาพแล้ว โดยเติมยูเรียลงไปในเจล ให้มีความเข้มข้น 7-8 โมลาร์ ทั้ง native และ denaturing gel มีวิธีเตรียมเหมือนกัน ต่างกันเฉพาะการเติมหรือไม่เติมยูเรียเท่านั้น

การตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอนอกจากจะเข้าใจวิธีการตรวจอย่างชัดเจนแล้ว จำเป็นต้องรู้ว่าวิธีการตรวจที่ใช้มีประสิทธิภาพมากน้อยเพียงใด โดยทั่วไปประสิทธิภาพของการตรวจดีเอ็นเอนั้นสังเกตได้จากหลายๆปัจจัยรวมกัน ไม่ว่าจะเป็น ค่า กำลังการแยกแยะ ค่ากำลังการคัดออก และ ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity) เป็นต้น ซึ่งจะได้อธิบายดังต่อไปนี้

ดีเอ็นเอในการวิเคราะห์ประชากร

ประชากร (Population) หมายถึงกลุ่มของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งที่อาศัยอยู่ในบริเวณหนึ่งในช่วงเวลาหนึ่ง ในประชากรจะมีการผสมพันธุ์กันระหว่างสมาชิกในประชากร ดังนั้นประชากรจึงมีลักษณะเป็นแหล่งรวมยีน (Gene pool) ที่ควบคุมลักษณะต่างๆของสิ่งมีชีวิต โดยยีนที่ควบคุมลักษณะหนึ่งๆอาจมีได้หลายรูปแบบ (Allelic form) และความถี่ของยีนแต่ละอัลลีลอาจจะเปลี่ยนแปลงได้ตลอดเวลา ขอบเขตของประชากร บางครั้งอาจไม่ได้แบ่งแยกอย่างชัดเจน อาจเกิดการถ่ายเทยีน (Gene flow) ระหว่างประชากรที่อยู่ต่างพื้นที่ โดยเฉพาะในสัตว์ที่มีการเคลื่อนย้าย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ถิ่นฐานได้ ไม่ว่าจะเป็นสัตว์บกหรือสัตว์น้ำก็ตาม ทำให้มีการถ่ายเทยีนถึงกันและกันได้ การศึกษาทางพันธุศาสตร์ประชากร อาศัยการตรวจวัดลักษณะของสมาชิกในประชากรจำนวนมาก โดยอาจตรวจสอบจากลักษณะที่ปรากฏเป็นฟีโนไทป์ หรือตรวจสอบจากจีโนไทป์ในรูปของความถี่ของจีโนไทป์ หรือความถี่ของอัลลีลต่างๆของยีนที่ตำแหน่งหนึ่งๆในประชากร การมีรูปแบบของอัลลีลที่แตกต่างกันเป็นพื้นฐานของความหลากหลายทางพันธุกรรม ซึ่งมีความสำคัญในการวิวัฒนาการ เพราะถ้าไม่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม ความสามารถในการอยู่รอดที่สภาวะต่างๆก็จะลดน้อยลง อาจเกิดการสูญพันธุ์ได้ การประมาณค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม จะใช้วิธีวัดจากความถี่ของอัลลีลหรือความถี่ของจีโนไทป์

สมดุลของฮาร์ดีและไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg equilibrium : HWE)

ฮาร์ดี (G.H. Hardy) เป็นนักคณิตศาสตร์ชาวอังกฤษ ส่วนไวน์เบิร์ก (W. Weinberg) เป็นแพทย์ชาวเยอรมัน ได้แสดงให้เห็นว่า ถ้าไม่มีแรงรบกวนเข้ามาในประชากรความถี่ของอัลลีลของยีนและความถี่ของจีโนไทป์ต่างๆจะคงที่ เรียกว่าเป็น สมดุลของฮาร์ดีและไวน์เบิร์ก 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 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 สิ่งที่มีชีวิตที่สืบพันธุ์โดยไม่ใช้เพศ หรือเกิดจากสาเหตุอื่น ทั้งนี้ต้องแน่ใจก่อนว่าผลการตรวจสอบที่เบี่ยงเบนไปจากสมดุลฮาร์ดีและไวน์เบิร์ก ไม่ได้เกิดจากความบกพร่องของการสุ่มตัวอย่าง หรือจำนวนตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ที่สุ่มมาไม่เพียงพอ ทำให้คำนวณค่าความถี่อัลลีลคลาดเคลื่อน การสรุปผลตามสมดุลฮาร์ดีและไวน์เบิร์กจึงไม่น่าเชื่อถือ

การประมาณค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (Estimation of genetic diversity)

วิธีการประมาณค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรมีหลายแบบ ดังจะอธิบายต่อไปนี้

1. การประมาณค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมจากค่าสัดส่วนของเฮเทอโรไซโกตที่ตรวจพบ (Observed heterozygosity, H_o) โดยคิดสัดส่วนระหว่างจำนวนสมาชิกที่เป็นเฮเทอโรไซโกต ต่อจำนวนสมาชิกทั้งหมด ซึ่ง การประมาณค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมวิธีนี้ ผลที่ได้จะขึ้นกับอยู่จำนวนตัวอย่างที่สุ่มมา ถ้าจำนวน ตัวอย่างที่สุ่มมามีน้อย อัลลีลที่ได้ก็จะน้อย สัดส่วนของเฮเทอไซโกตที่ตรวจพบอาจเบี่ยงเบนไปได้

2. การประมาณค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยการใช้ค่า gene diversity (h) ซึ่งไม่ค่อยขึ้นกับขนาดประชากรเท่ากับวิธีอื่นๆ โดยคำนวณได้จากสูตร

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

โดย pi คือ ค่าความถี่ของอัลลีลที่ i และ k คือจำนวนอัลลีลที่พบที่ตำแหน่งนั้น

ค่าที่ใช้ในการคำนวณค่า h คือ ความถี่ของอัลลีลต่างๆในประชากรโดย h เป็นความน่าจะเป็นที่พบว่าอัลลีล 2 อัลลีล ที่ตำแหน่งหนึ่งของสมาชิกที่สุ่มมามีความแตกต่างกัน ซึ่งก็คือค่าเฮเทอโรไซโกตที่คาดหมายเมื่อประชากรอยู่ในสมดุล (Expected heterozygosity, H_e) ดังนั้นจึงมักแทนค่า gene diversity ด้วย H_e ในการวิเคราะห์ประชากรมักตรวจสอบด้วยดีเอ็นเอหลายตำแหน่ง ดังนั้นจึงคำนวณค่า H_e ของแต่ละตำแหน่ง แล้วคิดเป็นค่าเฉลี่ยของทุกตำแหน่ง

ค่ากำลังการแยกแยะ (Power of discrimination: PD)

ค่ากำลังการแยกแยะ เป็นค่าที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพของการตรวจดีเอ็นเอว่าสามารถแยกแยะแต่ละบุคคลออกจากกันได้มากน้อยเพียงใดซึ่งค่ากำลังการแยกแยะที่สูงสามารถแยกความแตกต่างของบุคคลได้สูง และค่านี้จะเป็นประโยชน์ในแง่ของการตรวจพิสูจน์บุคคล โดยคำนวณได้จากสูตร (วสันต์ และคณะ, 2540)

$$\textbf{Power of discrimination} = 1-\sum (P_i)^2$$

เมื่อ P_i คือค่าความถี่ของแต่ละ Phenotype หรือ Genotype

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ค่ากำลังการคัดออก (Power of exclusion: PE)

ค่ากำลังการคัดออก เป็นอีกค่าหนึ่งที่บ่งบอกประสิทธิภาพของการตรวจดีเอ็นเอได้ ค่านี้จะเป็นค่าที่สามารถคัดคนที่ไม่ใช่บุพการีออกไปได้ ซึ่งมีประโยชน์ในการพิสูจน์พ่อ-แม่-ลูก โดยมีสูตรการคำนวณที่น่าสนใจ 3 สูตรคือ (ธานินทร์, 2538)

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

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

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

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

$P_a, P_b \ldots P_i, P_j \ldots P_l, . P_n$ คือ ค่าความถี่ของอัลลีลต่างๆในระบบดังกล่าว

จากที่กล่าวมาข้างต้นว่าปัจจุบัน Microsatellite DNA เป็นดีเอ็นเอที่นิยมมาใช้ในการตรวจพิสูจน์ ดังนั้น Chantratita *et al.* (2001) จึงได้ทำการศึกษา microsatellite DNA ทั้ง 9 ตำแหน่ง คือ D3S1358, vWA, FGA, TH01, TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317 และ D7S820 ในกลุ่มประชากรไทยจำนวน 100 คน ที่ไม่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือด โดยใช้ชุดสำเร็จรูป (AmpFlSTR Profiler kit) ในการตรวจสอบดีเอ็นเอ ต่อจากนั้นยังได้ศึกษาmicrosatellite DNA ในกลุ่มประชากรไทย อีก 9 ตำแหน่ง คือ D3S1358, vWA, FGA, D8S1179, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317 และ D7S820 ในกลุ่มคนไทยที่ไม่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือด จำนวน 300 คน (Rerkamnuaychoke *et al.*, 2001) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Rerkamnuaychoke *et al.* (2006) ที่ได้ทำการศึกษา microsatellite DNA ทั้ง 15 ตำแหน่ง คือ D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D5S818 และ FGA ในกลุ่มประชากรไทย เพื่อให้ได้ข้อมูลและนำไปใช้ประโยชน์ในการตรวจพิสูจน์บุคคลของประชากรไทย และในปีเดียวกันนี้ยังได้มีการศึกษา microsatellite DNA อีก 9 ตำแหน่ง คือ D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, TH01, vWA, TPOX และ LPL โดยได้ทำการศึกษาในกลุ่มคนไทยที่ไม่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือดเดียวกันจำนวน 545 คน และพบว่าสามารถนำมาใช้ในการตรวจพิสูจน์บุคคลได้ (Bhoopat *et al.*, 2006)

การตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์บางกรณีที่มีความซับซ้อน เช่น การตรวจพิสูจน์ความเป็นพี่น้องเพศหญิงร่วมบิดาเดียวกัน โดยผู้ที่เป็นบิดาไม่สามารถร่วมตรวจได้ เช่น บิดา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ได้เสียชีวิตไปแล้ว หรือกรณีพี่น้องผู้หญิงร่วมบิดาแต่ต่างมารดา ต้องการพิสูจน์ว่าทั้งคู่เป็นพี่น้องกันจริงหรือไม่ กรณีดังกล่าวเหล่านี้ต้องใช้ความจำเพาะของการตรวจพิสูจน์โดยต้องอาศัยการตรวจดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์บนโครโมโซมเพศหญิงของบุคคลเหล่านั้นเปรียบเทียบกันเท่านั้นดังนั้น โครโมโซมเพศหญิงจึงมีประโยชน์สำหรับการพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดและการพิสูจน์บุคคลในทางนิติวิทยาศาสตร์ อย่างไรก็ตามก่อนจะนำมาใช้จริงจำเป็นต้องทราบข้อมูลค่าความถี่ของอัลลีลต่างๆที่ปรากฏในตำแหน่งของดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์เหล่านั้นในกลุ่มประชากรที่สนใจ

จากการศึกษาในต่างประเทศพบว่าบนโครโมโซมเพศหญิงมีลักษณะของ short tandem repeat DNA หลายตำแหน่ง โดยได้แบ่งออกเป็น กลุ่มๆตามตำแหน่งที่อยู่บนโครโมโซม และ มีโอกาสที่จะถูกถ่ายถอดไป ยังบุคคลที่มีสายเลือด เดียวกันได้ ลักษณะของดีเอ็นเอเหล่านี้จะมีความหลากหลาย ทำให้สามารถใช้แยกแยะบุคคลต่างๆออกจากกันและยังสามารถตรวจสอบความสัมพันธ์ทางสายเลือดได้ การถ่ายทอดทางพันธุกรรมนั้นเป็นที่ทราบกันดีแล้วว่าลูกจะได้รับการถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมจากพ่อและแม่คนละครึ่ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งลักษณะของโครโมโซมเพศหญิง (X-chromosome) ตัวหนึ่งในพ่อจะถูกถ่าย ทอดไปยังลูกผู้หญิงทุกคนทำให้เราสามารถตรวจเปรียบเทียบลักษณะดีเอ็นเอบนโครโมโซมเพศหญิงในลูกหญิงทุกคนเพื่อบ่งชี้ความเป็นพี่น้องร่วมบิดาได้ นอกจากนี้ยังช่วยพิสูจน์ความสัมพันธ์แบบพ่อกับลูกสาวได้ โดยเริ่มมีการศึกษากันอย่างกว้างขวางในต่างประเทศ เช่น Turrina and De Leo (2004) ศึกษาเปรียบเทียบ X-chromosome 3 ตำแหน่งคือ DXS7132, DXS7133 และ GATA172D05 ในกลุ่มประชากรทางเหนือและใต้ของประเทศอิตาลี โดย สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดของประชากร 295 คน (หญิง 160 คน ชาย 135 คน) และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย การทำ PCR พบว่าประชากรทั้งสองกลุ่มมี ค่าความหลากหลาย (Polymorphism Information Content : PIC) ที่ใกล้เคียงกันในทั้ง 3 ตำแหน่ง (DXS7132 : North = 0.712, South = 0.725 ; DXS7133 : North = 0.646, South = 0.634 ; GATA172D05 : North = 0.774, South = 0.773) และสรุปได้ว่า X-chromosome ทั้ง 3 ตำแหน่ง สามารถใช้ประโยชน์ในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ได้หลายด้านเช่น การหาความสัมพันธ์ทางสายบิดาของลูกสาว

Barbaro *et al.* (2006) ได้ศึกษารูปแบบของ X-STRs เพื่อการตรวจพิสูจน์ประวัติของการตามหาบิดา โดยการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดของแม่และลูกสาว แล้วนำมาเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR จากนั้นนำมาเปรียบเทียบกัน พบว่า X-STRs สามารถใช้ในกรณีของการตรวจสอบหาบิดาและสามารถใช้ในงานพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เนื่องจากกลุ่มประชากรที่ต่างเชื้อชาติหรือต่างภูมิภาคกันข้อมูลพื้นฐานเหล่านั้นจะมีความแตกต่างกันได้ไม่มากก็น้อย ดังนั้นจำเป็นต้องทำการวิจัยเพื่อให้ได้ข้อมูลสำหรับกลุ่มประชากรในภูมิภาคของตนเพื่อนำมาใช้ให้ถูกต้อง และแม่นยำที่สุด จึงมีการศึกษาเพิ่มมากขึ้นในหลายๆประเทศ ดังนี้ Gomes *et al.* (2007) ได้วิเคราะห์ X-STRs 10 ตำแหน่ง (DXS8378, DXS9898, DXS8377, HPRTB, GATA172D05, DXS7423, DXS6809, DXS7132, DXS101 และ DXS6789) ในประชากรแอฟริกัน 3 กลุ่ม โดยวิธีการตรวจดีเอ็นเอจากประชากรทั้ง 3 กลุ่มที่ไม่มีความเกี่ยวข้องทางสายเลือดจำนวน 237 คน เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR คาดว่าสามารถใช้ X-STRs ทั้ง 10 ตำแหน่ง ในงานด้านการพิสูจน์บุคคล และการพิสูจน์ความสัมพันธ์ ทางเครือญาติ (Kinship analysis) ได้

Martins *et al.* (2008) ทำการสร้างฐานข้อมูลด้านพันธุกรรมของ X-chromosome ในประชากรชาวเปรูจำนวน 5 ตำแหน่งคือ DXS6854, DXS7424, DXS101, DXS6808 และ DXS7132 โดยการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดหรือเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มของประชากรชาวเปรู 90 คนที่ไม่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือดกันโดยตรง แล้วเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR และนำมาวิเคราะห์ผลผลิตด้วย electrophoresis แล้วหาค่าความถี่ และคำนวณค่ากำลังการแยกแยะของเพศชายและเพศหญิง จากนั้นเปรียบเทียบค่ากำลังการแยกแยะระหว่างกลุ่มประชากรเพศหญิงและเพศชาย พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มประชากรชาวเปรูเพศหญิงและเพศชาย แต่ทั้ง 5 ตำแหน่งก็สามารถใช้เป็นเครื่องมือสำหรับงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ได้จริงในกลุ่มประชากรของเปรูได้

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Hashiyada *et al.* (2008) ที่ศึกษาความหลากหลายของ X-chromosome STR ทั้ง 8 ตำแหน่งคือ DXS7132, DXS7423, DXS8378, DXS10074, DXS10101, DXS10134, DXS10135 และ HPRTB ในประชากรญี่ปุ่นจำนวน 258 คนที่ไม่มีความเกี่ยวข้องกันทางสายเลือดโดยตรง โด ยทำการสกัด ดีเอ็นเอด้วย ระบบอัตโนมัติ (Automatic DNA extraction system) จากนั้นนำมาเพิ่มจำนวนด้วย PCR เปรียบเทียบกันพบว่า X-chromosome STR ทั้ง 8 ตำแหน่ง สามารถใช้ประโยชน์ในงานนิติวิทยาศาสตร์ได้

เป็นที่ทราบกันดีแล้วว่า การแปลผลการตรวจเพื่อบ่งชี้ความน่าเชื่อถือในการพิสูจน์จะมากหรือ น้อยนั้น ต้องอาศัยข้อมูลค่าความถี่ของอัลลีลต่างๆที่พบในดีเอ็นเอแซทเทลไลท์เหล่านั้น เนื่องจากในกลุ่มประชากรคนไทยยังไม่มีการทำวิจัยในเรื่องนี้แต่งานวิจัยในลักษณะนี้ได้มีการศึกษากันในหลายประเทศอย่างกว้างขวาง ยกตัวอย่างเช่น การศึกษาการวิเคราะห์ไมโครแซทเทลไลท์บนโครโมโซมเพศหญิง (X-chromosome STR) 18 ตำแหน่งคือ DXS6807, DXS8378, DXS9895, DXS9902, DXS6810, DXS7132, DXS981, DXS6800, DXS9898, DXS6789, DXS101, DXS6797, GATA172D05, GATA165B12, HPRTB, GATA31E08,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

DXS8377, และ DXS7423 ในประชากรชาวเกาหลี ที่ไม่มีความเกี่ยวข้องกันทางสายเลือดโดยตรงจำนวน 401 คน โดยสกัดดีเอ็นเอจากเลือดและเยื่อบุกระพุ้งแก้ม ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR พบว่า ค่ากำลังการแยกแยะของ 18 ตำแหน่งมีค่าอยู่ระหว่าง 0.294 (DXS6800) ถึง 0.980 (DXS8377) และมีค่าความหลากหลายอยู่ระหว่าง 0.248 (DXS6800) ถึง 0.902 (DXS8377) ดังนั้นจึงสรุปว่าสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์ได้ (Shin *et al*., 2005)

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ ไมโครแซทเทลไลท์บนโครโมโซมเพศหญิงในประชากรชาวญี่ปุ่น ทั้ง 8 ตำแหน่ง คือ DXS10135, DXS8378, DXS7132, DXS10074, HPRTB, DXS10101, DXS10134 และ DXS7423 โดยทำการสกัดและทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูปจากตัวอย่างเลือดในประชากรญี่ปุ่นจำนวน 492 คนที่ไม่มีความเกี่ยวข้องกันทางสายเลือดโดยตรง พบว่า ค่ากำลังการแยกแยะในผู้ชายและผู้หญิงของทั้ง 8 ตำแหน่งมีค่าสูงถึง 0.999995 และ 0.9999999999988 ตามลำดับ (Jian *et al*., 2009)

จากทฤษฎีดังกล่าว ไว้ข้างต้นทำให้ทราบว่าค่า ความถี่ของอัลลีลต่างๆที่พบในดีเอ็นเอ มีความสำคัญในหลายๆด้าน ดังนั้นจึงทำการศึกษา หาความถี่ของอัลลีลต่างๆที่พบในดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์บนโครโมโซมเพศหญิ งในกลุ่มประชากรไทยภาคเหนือที่คาดว่าจะมีการถ่ายทอดลักษณะในแต่ละคนเป็นอิสระต่อกัน เพื่อนำมาใช้ในการคำนวณหาโอกาสความสัมพันธ์ทางสายเลือด และสามารถนำผลการวิจัยมาใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงในการพิสูจน์บุคคลในภาคเหนือได้

โดยงานวิจัยนี้เป็นการหาข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับค่าความถี่ของอัลลีลต่างๆ ในดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์บนโครโมโซมเพศหญิงในตำแหน่ง DXS7132 เนื่องจากดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ในตำแหน่งนี้มีความหลากหลายสูง มีประสิทธิภาพในการพิสูจน์ และถูกคัดเลือกมาทำการศึกษาในการพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดและพิสูจน์บุคคลในหลายประเทศ

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อหาความถี่ของอัลลีลในดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์บนโครโมโซมเพศหญิงตำแหน่ง DXS7132 ในกลุ่มประชากรคนไทยภาคเหนือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved