มร-51-01-006

อภินันทนาการ

รายงานการวิจัย

ความผันแปรของไมโตรคอนเดรียดีเอ็นเอตำแหน่ง Control region ในประชากรภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย

Mitochondrial DNA variation at control region in lower northern part of Thailand

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยมหิดล
วันลงทะเบียน - 1 SEP 2011
เลขทะเบียน 15661961
เลขเรียกหนังสือ ...
QP
ว44
ส.1158
สงวนธ
2551

นายสุทัศน์ ดวงจิตร

ภาควิชาสรีระวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์

ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่

คำนำ

รายงานการวิจัยฉบับนี้ ได้มุ่งเน้นศึกษาขีดความสามารถในการพัฒนาใช้ไมโตคอนเรียลดีเอ็นเอในงานนิติวิทยาศาสตร์ซึ่งมีการพัฒนาหาตำแหน่งการตรวจพิสูจน์บุคคลโดยใช้ไมโตคอนเรียลดีเอ็นเอในการพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือด โดยมุ่งเน้นการศึกษาในกลุ่มประชากรภาคเหนือตอนล่างเป็นสำคัญ เพราะให้ได้ข้อมูลของบุคคลในเขตพื้นที่ที่ตั้งของหน่วยงานเพื่อการปฏิบัติงานต่อไป

ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่างานวิจัยเรื่องนี้จะเป็นประโยชน์ต่องานการตรวจพิสูจน์บุคคลโดยการใช้ไมโตคอนเรียลดีเอ็นเอเป็นอย่างยิ่งแม้ในกลุ่มประชากรที่ต่างกัน แต่เชื่อว่าหลักการและวิธีการยังสามารถประยุกต์ใช้ในกลุ่มประชากรอื่นๆได้

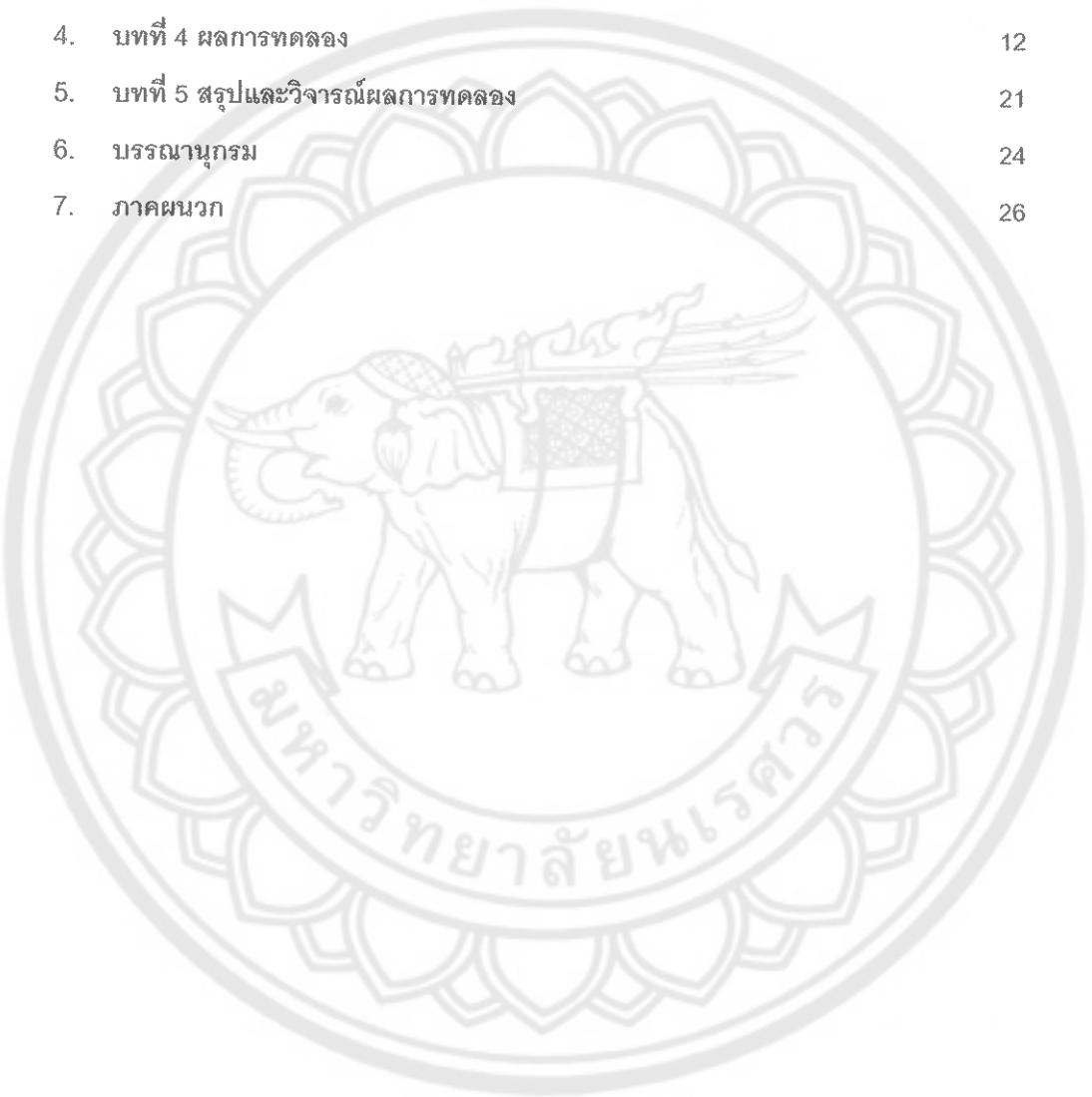
สุทัศน์ ดวงจิตร

ผู้วิจัย

มหาวิทยาลัยนเรศวร

สารบัญ

หัวข้อ		หน้า
1.	บทที่ 1 บทนำ	1
2.	บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร	3
3.	บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา	6
4.	บทที่ 4 ผลการทดลอง	12
5.	บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	21
6.	บรรณานุกรม	24
7.	ภาคผนวก	26



กิตติกรรมประกาศ

รายงานงานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลือเงินทุนสนับสนุนจากทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ภายใต้คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และขอขอบพระคุณผู้ทรงคุณวุฒิอย่างยิ่งต่อการให้คำแนะนำในการทำวิจัยอันได้แก่ รศ.ดร. สุขกิจ ยะโวสธรศรีกุล และ ผศ. นพ. วรวีร์ ไวยวุฒิ

ผู้วิจัยมีความซาบซึ้งในความกรุณาอันดียิ่งจากทุกท่านที่ได้กล่าวนามมา และขอกราบขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

สุทัศน์ ดวงจิตร

3 กุมภาพันธ์ 2553

ผู้วิจัย

บทที่ 1

บทนำ

เป็นเวลากว่า 2 ทศวรรษที่ผ่านมาเทคโนโลยีการตรวจพิสูจน์บุคคลด้วยดีเอ็นเอในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์มีการพัฒนาและประสบความสำเร็จเรื่อยมา และถูกนำมาใช้งานอย่างแพร่หลาย ซึ่งมีส่วนช่วยในการแก้ไขปัญหาในงานคดีหรืออาชญากรรมต่างๆ มากมาย อาทิเช่น การแก้ปัญหาด้านอาชญากรรมเพื่อพิสูจน์หาตัวผู้กระทำผิด การพิสูจน์บุคคลสูญหาย หรือกรณีภัยพิบัติหมู่ดังที่เกิดในประเทศไทยเช่น ซึนามิ เมื่อปี 2548 หรือเหตุการณ์เครื่องบินตก เป็นต้น ซึ่งวิทยาการเหล่านี้เป็นการรวบรวมการพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจดีเอ็นเอหลายๆ ส่วนเข้ามาช่วยกันไม่ว่าจะเป็นการพัฒนาด้าน Variable Number Tandem Repeat (VNTR) การพัฒนาด้านเทคนิคการเพิ่มจำนวนปริมาณดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจที่เสื่อมสภาพและมีปริมาณน้อยด้วยเทคนิค PCR การพัฒนาด้าน Short Tandem Repeat (STR) รวมทั้งการพัฒนาวิธีการตรวจพิสูจน์ด้านไมโตรคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mtDNA) อาจกล่าวได้ว่าการพัฒนาด้านต่างๆ เหล่านี้มีส่วนช่วยให้งานตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลทางนิติวิทยาศาสตร์นั้นเข้าใกล้ถึงจุดที่ประสบความสำเร็จเกือบจะสูงสุดแล้ว (1, 3)

การพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลในทางนิติวิทยาศาสตร์ส่วนใหญ่นั้นเกิดจากการพัฒนาและการประยุกต์ใช้งานของลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ แต่ในบางกรณีก็ไม่สามารถปฏิเสธได้ว่า การตรวจพิสูจน์ทางไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอก็เป็นสิ่งที่ช่วยให้งานการตรวจพิสูจน์เป็นไปอย่างประสิทธิภาพ เช่น กรณีการตรวจพิสูจน์พระศพของพระเจ้าซาร์ นิโคลัส ที่ 2(5) การตรวจพิสูจน์โครงกระดูกของทหารที่ตายในสงครามเวียดนามหรือสงครามเกาหลี หรือในงานการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธุ์ทางเครือญาติเป็นต้น แม้ว่าความสามารถของการแยกแยะในการชี้จำเพาะบุคคลของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอนั้นมีข้อกำจัด แต่ความสำคัญของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอนั้นอยู่ที่การเสริมข้อด้อยของการตรวจพิสูจน์ทางนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ คือ ความสามารถตรวจพิสูจน์ในตัวอย่างที่มีการเน่าเปื่อย หรือในกรณีที่จำนวนหรือปริมาตรของตัวอย่างสิ่งส่งตรวจที่มีน้อยเช่น เส้นผม คราบสารคัดหลั่ง(17,18) เป็นต้น หรือแม้กระทั่งในตัวอย่างที่มีความเก่าแก่เช่น โครงกระดูกโบราณ โดยทั่วไปแล้วลักษณะตัวอย่างดังกล่าว จะไม่สามารถตรวจพิสูจน์ทางนิวเคลียร์ดีเอ็นเอได้อย่างสมบูรณ์นัก ซึ่งความพิเศษเหล่านี้เป็นผลมาจากการที่ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอนั้นมีคุณลักษณะพิเศษที่สำคัญคือ มีจำนวนมากในเซลล์หรือที่เรียกว่า high copy number อีกประการหนึ่งการตรวจพิสูจน์ทางด้านไมโตรคอนเดรียลดีเอ็นเอนั้นมีประโยชน์ในการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ของบุคคลทางสายโลหิตฝ่ายแม่ในกรณีที่ไม่ใช่ญาติสายตรงเช่นกรณีการตรวจพิสูจน์ความเป็นญาติกันระหว่างป้าฝ่ายแม่กับหลาน หรือลูกพี่ลูกน้องที่มียายคนเดียวกัน ในกรณีที่พ่อและแม่ซึ่งเป็นญาติสายตรงได้เสียชีวิตไปแล้วซึ่งในลักษณะ

เช่นนี้การตรวจพิสูจน์ทางนิวเคลียดีเอ็นเอค่อนข้างทำได้ยากในเรื่องของการแปรผลทางสถิติ เช่นกรณีซึนามิที่ผ่านมา ในครอบครัวที่พ่อแม่เสียชีวิตไปก่อนหน้านี้แล้วโอกาสที่ลูกจะได้รับการพิสูจน์บุคคลและระบุตัวว่าเป็นใครจากดีเอ็นเอของพ่อและแม่เป็นไปไม่ได้เลย แต่หากต้องการเปรียบเทียบความเหมือนของพันธุกรรมกับญาติสายตรงเช่น ยายหรือตา โอกาสที่ลายพิมพ์นิวเคลียร์ดีเอ็นเอจะเหมือนกันมีเพียง 25 % เท่านั้น ซึ่งเป็นค่าทางสถิติในงานนิติวิทยาศาสตร์ที่น้อยมากหากจะระบุตัวบุคคล เพราะค่าทางสถิติในการตรวจพิสูจน์บุคคลในเหตุการณ์ซึนามิที่ผ่านมาหากเป็นประชากรไทยและใช้การตรวจนิวเคลียร์ดีเอ็นเอเพียงอย่างเดียว ความเป็นไปได้ที่ศพจะเป็นบุคคลต้องสงสัยต้องมีความเป็นไปได้ที่ระดับตั้งแต่ 99.99 (probability) ขึ้นไป ฉะนั้นแล้วหากว่ามีการยืนยันด้วยไมโตรคอนเดรียลดีเอ็นเอก็จะทำให้สามารถตรวจพิสูจน์บุคคลในกรณีที่ไม่ใช่ญาติสายตรงได้

การถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรมของไมโตคอนเดรียเป็นการถ่ายทอดจากแม่สู่ลูก จึงทำให้บุคคลที่มีความสัมพันธ์ทางสายโลหิตฝ่ายแม่เดียวกันจะมีรหัสพันธุกรรมทางไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่เหมือนกัน แต่ในบุคคลที่ไม่มีความสัมพันธ์กันนั้น จะมีความแปรผันในลำดับเบสที่แตกต่างกันไป ซึ่งความแตกต่างเหล่านี้อาจนำมาใช้แบ่งแยกลักษณะเชื้อชาติได้ ตามทฤษฎี Mitochondrial Eve อย่างไรก็ตามแม้คนที่อยู่ในกลุ่มประชากรเดียวกันก็ยังมีความแปรผันของลำดับเบสอยู่ (geographic distribution) ผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นศึกษาหาส่วนที่มีการแปรผันของลำดับเบสในส่วนที่ไม่มีการถอดรหัสลำดับเบส ที่เรียกว่าส่วน non coding region หรือ control region ซึ่งเป็นส่วนที่มีความแปรผันของลำดับเบสสูงในประชากรที่อาศัยในเขตพื้นที่ภาคเหนือตอนล่าง และจัดทำฐานข้อมูลด้านพันธุกรรมของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ เพื่อหาอัตราความแปรผัน (mutation rate) และความเฉพาะเจาะจงทางพันธุกรรม เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้เอกลักษณ์ที่จำเพาะ (Haplotype) ของประชากรที่อาศัยในพื้นที่ดังกล่าว และนำมาใช้ในการตรวจพิสูจน์บุคคล ความสัมพันธ์ทางเครือญาติในงานนิติวิทยาศาสตร์ของศูนย์นิติวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร รวมทั้งเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาชาติพันธุวิทยา (Geneaology) และมานุษยวิทยา (Anthropology) ของประชากรในพื้นที่ที่ศึกษา นอกจากนี้ยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ศึกษา single nucleotide polymorphisms (SNPs) ที่มีความสัมพันธ์กับโรคทางระบบประสาท (neuroscience degenerative diseases) เช่น Alzheimer's disease, Parkinson's disease ในพื้นที่ดังกล่าว ซึ่งอาจนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้เอกลักษณ์ที่จำเพาะ (biomarker) ของโรคต่างๆ ในเขตภาคเหนือตอนล่างต่อไปในอนาคต

บทที่ 2

ทบทวนเอกสาร

งานด้านการพิสูจน์บุคคลในงานนิติวิทยาศาสตร์นั้นมีหลายสาขา แต่งานการพิสูจน์ดีเอ็นเอเป็นสาขาหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการพิสูจน์บุคคล การพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลด้านดีเอ็นเอนั้นได้รวบรวมเทคนิคการพัฒนาทางโมเลกุลาร์ต่างๆ เข้ามาช่วยมากมายไม่ว่าจะเป็นการพัฒนาด้านการสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจที่เสื่อมสภาพหรือมีปริมาณน้อย เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดในการนำมาใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์ แหล่งของดีเอ็นเอที่นำมาใช้ตรวจสามารถแบ่งได้เป็นสองแหล่งคือ การตรวจพิสูจน์นิวเคลียร์ดีเอ็นเอ (nuclear DNA) และไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ(mitochondrial DNA) ซึ่งทั้งสองวิธีนั้นมีข้อดีและข้อด้อยแตกต่างกันคือ นิวเคลียร์ดีเอ็นเอสามารถใช้ตรวจเอกลักษณ์บุคคล (individual) ได้ แต่มีข้อเสียคือ ปริมาณของดีเอ็นเอต้องมีคุณภาพค่อนข้างดีและมีจำนวนดีเอ็นเอที่มากพอ ซึ่งในงานนิติวิทยาศาสตร์ตัวอย่างที่ได้มามักจะทำให้เกิดปัญหาเหล่านี้เสมอ ดังนั้นจึงมีการพัฒนาการตรวจเอกลักษณ์บุคคล จากไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอมาช่วยเพื่อลดปัญหาดังกล่าว ซึ่งเทคนิคนี้สามารถทำได้ในตัวอย่างที่มีปริมาณดีเอ็นเอน้อย(1) เช่น เส้นผม หรือตัวอย่างที่มีการเน่าสลาย หรืออายุเก่าแก่ เช่น โครงกระดูก เป็นต้น

ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอนั้น อยู่ในส่วนของออร์แกนแนลที่เรียกว่าไมโตคอนเดรีย ซึ่งจะมีลักษณะเป็นวงกลม สองสายพันกัน สายที่มีเบสเพียวรีนมากเรียกว่า สายเอช (H-strand) และอีกสายที่มีเบสไพริมิดีนมากเรียกว่า สายแอล (L- strand) ซึ่งมีความยาวลำดับเบสทั้งหมด 16,569 คู่เบส และมี 37 ยีนที่ถอดรหัสยีนเพื่อใช้ในขบวนการหายใจระดับเซลล์(2)คุณสมบัติของไมโตคอนเดียลดีเอ็นเอที่นำมาใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์คือ การที่มีจำนวนมากในเซลล์ (high copy number) เนื่องจากว่าในแต่ละเซลล์นั้นมีประมาณ 200-1,000 ไมโตคอนเดรีย ซึ่งขึ้นอยู่กับปริมาณในการใช้พลังงานของเซลล์ และในแต่ละไมโตคอนเดรียมีไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเออยู่ประมาณ 2-3 ชุด คุณสมบัติอีกข้อที่สำคัญคือไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอจะได้รับการถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมมาจากแม่เท่านั้น (maternal inheritance) (4,11) ซึ่งคุณสมบัติข้อนี้ทำให้ ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอถูกนำมาใช้ในการพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางเครือญาติฝ่ายแม่

หากจะพิจารณาถึงประโยชน์ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอมีมากมายหลายประการ อาทิเช่น การจำแนก สปีชีส์ โดย Cytochrome b การศึกษาทางชาติพันธุวิทยา หรือการศึกษาทางมานุษยวิทยา โดยอาศัยการดูลักษณะของการแปรผันลำดับเบสเพื่อศึกษาวิวัฒนาการของประชากรในพื้นที่ต่างๆ ซึ่งพบว่ากลุ่มประชากรในแต่ละส่วนของโลกมีถิ่นกำเนิดอยู่ที่ทวีปแอฟริกา(6,12) และได้อพยพกระจายไปทั่วโลก ตามทฤษฎีไมโตคอนเดรียลอีฟ

(Mitochondrial Eve) นอกจากนั้นยังมีการจัดประชากรออกเป็นกลุ่มต่างๆ ตามหลักความผันแปรของเบสในตำแหน่งต่างๆ หรือที่เรียกว่า Haplogroup ซึ่งมีการเปรียบเทียบหาลักษณะของเบสในส่วนคอนโทรล รีเจียน (Control region) ในกลุ่มประชากรแอฟริกันอเมริกัน และกลุ่มคนผิวขาวในอเมริกา หรือในกลุ่มคนเอเชียก็สามารถพบตำแหน่งเบสที่มีความเฉพาะเจาะจง สามารถนำมาใช้แยกเชื้อชาติได้(12, 14) แต่ในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษา Haplotype ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอในแต่ละกลุ่มประชากร คณะผู้วิจัยจึงเห็นความสำคัญในการจัดทำฐานข้อมูลของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของประชากรในภาคเหนือตอนล่าง เพื่อประโยชน์ในงานนิติวิทยาศาสตร์ของศูนย์นิติวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร รวมทั้งการศึกษาทางชาติพันธุวิทยา และมานุษยวิทยาต่อไป

ในทางนิติวิทยาศาสตร์นั้นไมโตคอนเดรียลดีเอ็นถูกนำมาใช้ได้หลายกรณีเช่น การพิสูจน์บุคคลสูญหายในอุบัติภัยหมู่ หรือแม้แต่การพิสูจน์โครงกระดูกนิรนามกับญาติผู้สงสัย ซึ่งในด้านการตรวจนั้นเป็นการนำลำดับเบสในส่วนที่ไม่มีการถอดรหัสมาตรวจพิสูจน์ ในปัจจุบันนั้น ได้นำมาใช้สองบริเวณคือ Hypervariable region I และ II (7, 10, 16, 17, 18) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความแปรผันของเบสค่อนข้างสูง(8, 9, 13, 15) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าในประชากรไทยสามารถพบความแปรผันของ Hypervariable region I และ II เท่ากับ 27.70% และ 16.78 % ตามลำดับ หรือมีค่ากำลังการแยกแยะ (DP) ทั้งสองตำแหน่งเท่ากับ 0.9872 คิดเป็นค่าโอกาสที่จะพบคนที่มีลำดับเบสเหมือนกัน (random match probability) เท่ากับ 0.0128 ซึ่งมีค่าค่อนข้างสูงมาก เมื่อเทียบกับการตรวจแบบ STR 15 ตำแหน่ง ซึ่งมีค่าประมาณ 5.01×10^{-18} แต่อย่างไรก็ตามแม้ว่าการตรวจทางไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอยังมีความจำเพาะเจาะจงน้อย แต่ว่าหากเป็นการใช้งานในลักษณะการเปรียบเทียบกันระหว่างสิ่งส่งตรวจก็ยังถือว่าไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูง

ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิเคราะห์ข้อมูลพันธุกรรมเบื้องต้น (preliminary data) เพื่อหาความจำเพาะทางด้านพันธุกรรม ชาติพันธุวิทยาและมานุษยวิทยาในประชากรของประเทศไทย ในเขตพื้นที่ภาคเหนือตอนล่าง จำนวน 100 ราย ซึ่งการวิเคราะห์ในตัวอย่าง 1 รายจะต้องทำการวิเคราะห์ลำดับเบสทั้งสามตำแหน่ง (HVR I, II และ III) ในแต่ละตำแหน่งจะต้องทำการวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA Sequencing) แยกกันและต้องทำสาย Forward และ Reverse ซึ่งเท่ากับว่าต้องทำการวิเคราะห์ลำดับเบสในแต่ละตัวอย่างเป็นอย่างน้อย 6 ครั้ง ในการวิเคราะห์ลำดับเบสในแต่ละครั้งมีค่าใช้จ่ายสูง ทำให้การวิจัยครั้งนี้มีข้อจำกัดด้านงบประมาณและเวลาในการทำวิจัย

ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของแผนงานวิจัย

กลุ่มประชากรในภาคเหนือตอนล่างมีความหลากหลายทางพันธุกรรมซึ่งแตกต่างไปจากข้อมูลของประชากรที่พื้นที่อื่นในประเทศไทย เนื่องจากความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรกลุ่มย่อยแต่ละพื้นที่ (Geographic distribution) ทำให้ความหลากหลายของ Haplotype ในแต่ละกลุ่มไม่เหมือนกัน และทราบลักษณะของ Haplotype ที่จำเพาะในกลุ่มประชากรดังกล่าวที่มีการกระจายตัว (Haplotype diversity) และกำลังการแยกแยะ (Discrimination Power) สูง เพื่อนำมาใช้ตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลในประชากรที่อาศัยอยู่ในเขตภาคเหนือตอนล่าง ทำงานให้งานทางนิติวิทยาศาสตร์มีความถูกต้อง แม่นยำ รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพ

บทที่3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา

เก็บตัวอย่าง

เก็บจากเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้ม จากประชากรผู้มารับการบริการที่หน่วยทาลัสซีเมียโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร จำนวน 100 คนโดยแต่ละคนไม่มีความสัมพันธ์กันทางสายเลือดฝ่ายแม่ โดยใช้ไม้พันสำลีขูดผนังกระพุ้งแก้ม (buccal swab) ในแต่ละคนจะทำทั้งหมด 2 ไม้ หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้แห้งก่อนเก็บเข้าซองพลาสติก

ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากไม้พันสำลีขูดผนังกระพุ้งแก้มตามวิธีของ Budowle และคณะ ด้วย Chelex protocol

ขั้นตอนการปฏิบัติ

1. ไปเปทท์เลือดมา 50µl ใส่ลงใน microcentrifuge tube
2. เติม PBS 1ml ใส่ลง tube และผสมให้เข้ากัน (Vortex)
3. นำไป Centrifuge 14,000 rpm for 1 min.
4. ใช้ไปเปทท์ ดูด supernatant ที่อยู่ด้านบนออกให้หมด เพื่อให้เหลือแต่ตะกอนที่ก้นหลอดเท่านั้น ไปเปทท์ SLR 1ml ใส่ลงใน tube และผสมให้เข้ากัน (Vortex)
5. นำไป Centrifuge 14,000 rpm for 1 min.
6. ใช้ไปเปทท์ ดูด supernatant ที่อยู่ด้านบนออกให้หมด เพื่อให้เหลือแต่ตะกอนที่ก้นหลอดเท่านั้น แล้วไปเปทท์ 5% Chelex 200µl ใส่ลงใน tube และผสมให้เข้ากัน (Vortex)
7. นำไป Incubated at 100°C 8-10 min และผสมให้เข้ากัน (Vortex)
8. นำไป Centrifuge 14,000 rpm for 3 min.
9. นำไปเก็บที่ -20°C

การเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค PCR

การนำดีเอ็นเอ ที่ได้จากการสกัดมาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction)

วัสดุ/สารเคมี

- 10x buffer : 5 ul
- dNTP [10mM] : 1 ul
- MgCl : 3 ul
- Primer H 5uM : 2 ul
- Primer L 5uM : 2 ul
- DNA template : 5 ul
- Distrill Water : 31.5 ul
- Taq Polymerase [5 unit/µl] : 0.5 ul

Total 50µl

Primer ของการทำ PCR

Primer HVRI	L15997	5'-cac cat tag cac cca aag ct-3'
	H16401	5'-tga ttt cac gga gga tgg tg-3'
Primer HVRII	L 29	5'-ggt cta tca ccc tat taa cca c-3'
	H 408	5'-ctg tta aaa gtg cat acc gcc a-3'
Primer HVRIII	L128	5'-cgc acc tac gtt caa tat tac-3'
	H619	5'-ggt gat gtg agc ccg tct aa-3'

ขั้นตอนการปฏิบัติ

1. ทำการผสมสารเคมีตามสูตรข้างต้น ลงใน PCR tube [volume 0.5ml]
2. vortex และ Centrifuge 3 วินาที ให้สารเคมีผสมกันและลงมารวมที่ก้นหลอด
3. นำเข้าเครื่อง PCR โดยตั้งโปรแกรมไว้ดังต่อไปนี้

PCR condition

Set PCR machine	at 94 °C	4min
Denature	at 94 °C	45sec
Annealing	at 55 °C	30sec
Extention	at 72 °C	3min
Final extention	at 72 °C	7min

4. สิ้นสุดการทำ PCR ทั้งหมด 32 cycle จะได้ product ตามจำนวนรอบ

ขั้นตอนการตรวจเช็คปริมาณดีเอ็นเอ Gel Electrophoresis

วัสดุ/สารเคมี

- 1% Agarose gel
- 1x TBE (Tris Boric acid EDTA)
- Loading dye
- Gel chamber
- Power supple
- Ethidium bromide
- UV transilluminator
- DNA Ladder 100bp

ขั้นตอนการปฏิบัติ

1. เตรียม 1% Agarose gel โดยเตรียมจาก ผง Agarose 0.3g ผสม 1X TBE 30ml ให้เข้ากัน
2. นำเข้า ไมโครเวฟ 2 min จนผง Agarose ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำออกมา
3. ปล่อยไว้ประมาณ 1 min และเท 1% Agarose gel ลงใน Gel chamber
4. วางซี่หวี(comb) ลงไป เพื่อใช้เป็นช่อง เติมsample
5. รอจน Gel แข็งตัว (ประมาณ 20min) ดึงซี่หวีออก
6. เท 1X TBE ลงไปใน chamber ให้ท่วม Gel เล็กน้อย
7. ผสม DNA กับ Loading dye ให้เข้ากัน อัตราส่วน 3µl : 1µl บนแผ่น Parafilm จากนั้นนำ DNA sample หยอดลงในช่อง Agarose gel โดยใช้ micropipette ตามลำดับ
8. ต่อขั้วไฟฟ้ากับเครื่อง Power supple โดยปรับใช้ กระแสไฟฟ้า 100V แล้วปล่อยไว้ประมาณ 40 min แถบสีเหลืองส้มของ DNA marker เลื่อนมาใกล้ขอบเจลอีกด้านหนึ่ง
9. ปิดกระแสไฟฟ้า แล้วนำแผ่น Agarose gel ไปย้อม Ethidium bromide ประมาณ 15 min แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น 3 นาที
10. ตรวจเช็คแถบดีเอ็นเอ โดยใช้เครื่อง UV transilluminator จากนั้นบันทึกภาพ

ขั้นตอนการทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

วัสดุ/สารเคมี

- Purification Kit

ขั้นตอนการปฏิบัติ

1. ไปเปทท์ PCR Product ใส่ลงใน Eppendrof tube (1.5ml) จากนั้นเติม PB buffer 5 เท่าของปริมาณ PCR Product ,ผสมให้เข้ากัน
2. ไปเปทท์ของเหลว (ในขั้นตอนที่ 1) ทั้งหมด ใส่ลงไปใน QIA quick spin colume แล้วนำไป Centrifuge 10,000 g 1min
3. เทของเหลวที่อยู่ก้น colume ทิ้ง
4. ไปเปทท์ PE buffer 0.75ml ใส่ลงใน QIAquick spin colume นำไป Centrifuge 10,000 g 1min
5. เทของเหลวที่อยู่ก้น colume ทิ้ง
6. นำไป Centrifuge 10,000 g 1min (เป็นการปั่นแห้งเพื่อให้สิ่งที่เจือปนอยู่ ออก)
7. ไปเปทท์ EB buffer 20 ul ใส่ลงไปใน QIA quick spin colume โดยย้าย QIA quick ส่วนบนไปใส่ Eppendrof อันใหม่ ปล่อยไว้ประมาณ 1-2 min แล้วนำไป Centrifuge 10,000 g 1min
8. จะได้ DNA ที่บริสุทธิ์

ขั้นตอน Cycle Sequencing

- เป็นกระบวนการต่อเนื่องจากการ Purification DNA ในการตรวจหาลำดับเบสที่ได้จากกระบวนการเพิ่มจำนวน

วัสดุ/สารเคมี

• 5X buffer	:	2 ul
• BidDye	:	2 ul
• Primer L 3.2pM	:	2 ul
• DNA template	:	2 ul
• Dristrill water	:	12 ul
Total volume	:	20 ul

ขั้นตอนการปฏิบัติ

1. ผสมสารเคมีตามสูตร ลงในหลอดทำปฏิกิริยา PCR tube
2. ผสมให้เข้ากัน นำไป Centrifuge 2-3 วินาที ให้สารเคมีลงมาอยู่ก้น tube
3. นำไปเข้าเครื่อง Thermal cycle โดยตั้งโปรแกรมเข้าสู่ cycle
   - 96°C 10 วินาที
   - 50°C 10 วินาที
   - 60°C 4 นาที
4. สิ้นสุดการทำ cycle sequencing ทั้งหมด 25 cycle.

ขั้นตอน Dyex resin elution kit (purifying extention product)

- เป็นขั้นตอนการตกตะกอนดีเอ็นเอ หลังการทำ cycle sequence โดยใช้ Dyex Kit resin elution.

ขั้นตอนการปฏิบัติ

1. นำ Kit resin elution มา mix ให้สารละลายเข้ากัน หักส่วนล่างออก ฝาคลายเกลียว ประมาณ1/4 รอบ แล้วนำไปใส่ใน Kit colume
2. Centrifuge 7000g 3min จากนั้นนำ Kit ไปใส่ใน Eppendrof อันใหม่
3. ไปเปทท์ DNA product ที่ได้จากกระบวนการ Thermal cycle ทั้งหมด มาใส่ลงใน Kit
4. Centrifuge 7000g 3min จะได้ของเหลวใสที่มีดีเอ็นเอ ใน Eppendrof.
5. ไปเปทท์ DNA ใน Eppendrof ลงใน...tube
6. นำไป Incubate at 90°C 2 hr (จนแห้ง)

ขั้นตอนการทำ Sequencing DNA

- เป็นเทคนิคในการตรวจหาลำดับเบสของ Sequencing Product ด้วยเครื่อง Sequence เป็นกระบวนการต่อเนื่องจาก Dyex เป็นการละลาย Sequencing Product มีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนการปฏิบัติ

1. ไปเปทท์ Hidi formamilde 15 ul ใส่ลงไปใน tube Sequencing Product เพื่อละลาย DNA

2. ผสมให้เข้ากันแล้วนำไป Centrifuge 10 วินาที
3. นำไป Incubate at 95°C 5 นาที
4. นำไป Freeze ในน้ำแข็งอีก 5 นาที
5. นำไปเข้าเครื่อง Sequence ABI 310 Analyzer

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำลำดับเบสที่ได้มาอ่านเปรียบเทียบกับลำดับเบสอ้างอิงของ Anderson หรือ Cambridge Reference Sequence (CRS) เพื่อหาเบสที่แตกต่างกัน หลังจากนั้นก็นำมาหา Haplotype เพื่อนำมาหาค่าสถิติ คือ random match probability (p), discrimination power (DP), Haplotype diversity ของประชากรในเขตภาคเหนือตอนล่าง

Random match probability

$$P = \sum(Xi^2)$$

Discrimination power

$$Dp = 1-\sum(Xi^2)$$

Haplotype $h = \frac{\left(1-\sum x^2\right)n}{(n-1)}$

บทที่4

ผลการทดลอง

รูปแบบความหลากหลายของ HVR I

HVR1

Polymorphisms	Frequency	Xi	Xi^2
16041G 16118A 16290T	1	0.01	0.0001
16042A 16058-A 16129A 16172C 16304C	1	0.01	0.0001
16042A 16223T 16298C 16327T	1	0.01	0.0001
16051G 16206C 16271C 16328T	1	0.01	0.0001
16059-A 16184T 16223T 16274A 16278T	1	0.01	0.0001
16075C 16157C 16304C 16324C	1	0.01	0.0001
16075C 16223T 16293T	1	0.01	0.0001
16075C 16223T 16293T 16295T	1	0.01	0.0001
16086C 16129A 16192T 16223T 16297C	1	0.01	0.0001
16086C 16172C 16223T 16257A 16261T 16295T	1	0.01	0.0001
16093C 16097G 16187T 16249C 16298C 16355T 16362C	1	0.01	0.0001
16093C 16097G 16193T 16223T 16311C 16357C	1	0.01	0.0001
16093C 16129A 16209C 19235C	1	0.01	0.0001
16093C 16129A 16256T 16304C 16357C	1	0.01	0.0001
16093C 16172C 16223T 16298C 16327T	1	0.01	0.0001
16093C 16181G 16223T 16311C 16319A	1	0.01	0.0001
16093C 16223T 16234T 16266T 16290T 16311C	2	0.02	0.0004
16097G 16126A 16148G 16157A 16169T 16194G 16304C	1	0.01	0.0001
16097G 16129A 16172C 16304C	3	0.03	0.0009
16097G 16148G 16172C 16223T 16274A 16291T	1	0.01	0.0001
16097G 16148G 16187T 16223T 16256T 16324C 16352C	1	0.01	0.0001
16108T 16129A 16161G 16172C 16304C 16334G	1	0.01	0.0001
16108T 16129A 16162G 16172C	1	0.01	0.0001
16108T 16129A 16162G 16172C 16304C	4	0.04	0.0016
16108T 16129A 16172C 16223T 16234T 16290T	1	0.01	0.0001
16109G 16129A 16147T 16157A 16162G 16172C 16234G 16304C	1	0.01	0.0001
16124C 16167T 16173C	1	0.01	0.0001
16124C 16183C 16189C 16278T 16362C	1	0.01	0.0001
16124C 16193T 16223T	1	0.01	0.0001
16126C 16223T 16278T 16357C	1	0.01	0.0001
16126C 16223T 16344T	1	0.01	0.0001
16129A 16153A 16223T 16263C 16309G	1	0.01	0.0001

16129A 16162G 16172C 16287T 16304C	1	0.01	0.0001
16129A 16162G 16172C 16304C	3	0.03	0.0009
16129A 16172C 16223T 16234T 16290T 16319A	1	0.01	0.0001
16129A 16172C 16304C	2	0.02	0.0004
16129A 16172C 16304C 16311C	1	0.01	0.0001
16129A 16192T 16223T 16297C	4	0.04	0.0016
16129A 16223T 16270T 16362C	2	0.02	0.0004
16129A 16223T 16287T 16311C 16327A	1	0.01	0.0001
16129A 16223T 16297C	1	0.01	0.0001
16136C 16223T 16312G	1	0.01	0.0001
16140C 16182C 16183C 16189C 16261T 16266A 16304C	1	0.01	0.0001
16140C 16183C 16189C	1	0.01	0.0001
16140C 16183C 16189C 16218T 16266A	1	0.01	0.0001
16141G 16214A 16223T 16256T 16278T	1	0.01	0.0001
16147T 16183C 16184A 16189C 16217C 16234T	1	0.01	0.0001
16148T 16183.1+C 16219C 16235G 16294C	1	0.01	0.0001
16157C 16278T 19304C	1	0.01	0.0001
16167T 16223T 16234T 16325C 16362C	1	0.01	0.0001
16172C 16223T 16260T 16264T 16271C	1	0.01	0.0001
16181G	3	0.03	0.0009
16183C 16189C 16223T 16298C 16327T	1	0.01	0.0001
16183C 16193.1+C 16212G 16232A 16249C 16304C 16362C	1	0.01	0.0001
16192T 16223T 16271C 16316G 16362C	1	0.01	0.0001
16192T 16239T 16304C 16309G	1	0.01	0.0001
16193T 16223T	1	0.01	0.0001
16214A 16223T 16256T 16278T	1	0.01	0.0001
16219G 16223T 16290T 16291T 16295T	1	0.01	0.0001
16221G 16225T 16291T 16292T 16296T	1	0.01	0.0001
16223T 16224C 16266T 16290T 16311C	1	0.01	0.0001
16223T 16234T 16261T 16320T	1	0.01	0.0001
16223T 16234T 16266T 16290T 16311C	1	0.01	0.0001
16223T 16234T 16290T	1	0.01	0.0001
16223T 16257A 16261T 16292T 16362C	1	0.01	0.0001
16223T 16261T 16292T 16294T 16362C	1	0.01	0.0001
16223T 16263C 16298C 16311C 16327T	1	0.01	0.0001
16223T 16272G	1	0.01	0.0001
16223T 16278T	2	0.02	0.0004
16223T 16297C	2	0.02	0.0004
16223T 16298C 16327T	1	0.01	0.0001
16223T 16304C 16344T 16362C	2	0.02	0.0004
16223T 16311C 16320T	1	0.01	0.0001

16223T 16311C 16355T 16362C	1	0.01	0.0001
16223T 16320T 16354T	2	0.02	0.0004
16223T 16362C	1	0.01	0.0001
16244C 16257T 16259T 16288C 16304C	1	0.01	0.0001
16249C 16259T 16288C 16301T 16304C	1	0.01	0.0001
16298C 16327T	1	0.01	0.0001
16304C 16309G	1	0.01	0.0001
16304C 16362C	1	0.01	0.0001
Total	100	Sum Xi^2 =	0.0156

HVR I พบว่ามี Polymorphisms ทั้งหมด 81 แบบจากตัวอย่างทั้งหมด 100 ตัวอย่าง และนำมาคำนวณหาค่าสถิติได้ดังนี้

Random match probability

$$P = \sum(Xi^2)$$

$$= 0.0156$$

Discrimination power

$$Dp = 1-\sum(Xi^2)$$

$$= 0.9844$$

Haplotype diversity $h = \frac{\left(1-\sum x^2\right)n}{\left(n-1\right)}$

$$= 0.9943$$

ตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงจากลำดับเบสอ้างอิงมีทั้งสิ้น 97 ตำแหน่ง(28.36%) คือ 16041 16042 16051 16058 16059 16075 16086 16093 16097 16108 16109 16118 16124 16126 16129 16136 16140 16141 16147 16148 16153 16157 16161 16162 16167 16169 16172 16173 16181 16182 16183 16184 16187 16189 16192 16193 16194 16206 16209 16212 16214 16217 16218 16219 16221 16223 16224 16225 16232 16234 16235 16239 16244 16249 16256 16257 16259 16260 16261 16263 16264 16266 16270 16271 16272 16274 16278 16287 16288 16290 16291 16292 16293 16294 16295 16296 16297 16298 16301 16304 16309 16311 16312 16316 16319 16320 16324 16325 16327 16328 16334 16344 16352 16354 16355 16357 16362

รูปแบบความหลากหลายของ HVR II

HVR2

Polymorphisms	Frequency	Xi	Xi^2
73G 114T 263G 309.2+2C 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 125C 127C 128T 146C 152C 229G 263G 309.1+C 315.1+C 318C 326G	1	0.01	0.0001
73G 125C 127C 128T 229G 263G 315.1+C 318C	1	0.01	0.0001
73G 125C 128T 146C 152C 263G 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 127C 128T 263G 315.1+C 318G	1	0.01	0.0001
73G 131C 199C 263G 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 143A 150T 195C 263G 309.1+C 315.1+C	2	0.02	0.0004
73G 143A 195C 263G 309.1+C 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 146A 199C 229G 263G 309.1+C 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 146A 199C 229G 309.2+2C 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 146C 151T 229G 263G 309.2+2C 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 146C 152C 184A 263G 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 146C 152C 199C 246C 263G 309.1+C 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 146C 152C 199C 263G 309.1+C 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 146C 152C 229G 263G 309.1+C 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 146C 152C 263G 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 146C 153G 229G 263G 309.1+C 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 146C 199C 263G 309.2+2C 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 146C 210G 263G 309.1+C 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 146C 228T 249-A 263G 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 146C 229G 249-A 263G 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 146C 249-A 263G 315.1+C 318C	1	0.01	0.0001
73G 146C 263G 309.1+C 315.1+C	2	0.02	0.0004
73G 146C 263G 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 150T 151T 195C 229G 263G 309.1+C 315.1+C	2	0.02	0.0004
73G 150T 152C 249-A 263G 309.1+C 315.1+C 316A	1	0.01	0.0001
73G 150T 189G 199C 204C 229G 263G 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 150T 195C 263G 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 150T 199C 204C 229G 263G 309.1+C 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 150T 199C 204C 263G 309.1+C 315.1+C	2	0.02	0.0004

73G 150T 199C 205C 263G 309.1+C 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 150T 199C 207A 263G 315.1+C 332T	1	0.01	0.0001
73G 150T 199C 263G 309.1+C 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 150T 199C 263G 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 150T 229G 263G 309.1+C 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 150T 249-A 263G 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 150T 263G 309.1+C 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 150T 263G 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 151T 152C 153G 249-A 263G 309.2+2C 315.1C	1	0.01	0.0001
73G 151T 229G 263G 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 152C 195C 263G 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 152C 200G 249-A 263G 309.1+C 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 152C 207A 249-A 263G 309.1+C 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 152C 210G 229G 263G 309.1+C 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 152C 210G 229G 263G 309.2+2C 315.1+C 324G	1	0.01	0.0001
73G 152C 229G 249-A 263G 309.1+C 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 152C 229G 263G 309.1+C 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 152C 229G 263G 315.1+C 329A	1	0.01	0.0001
73G 152C 246C 263G 309.1+C 315.1+C 316A	1	0.01	0.0001
73G 152C 249-A 263G 309.1+C 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 152C 249-A 263G 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 152C 263G 309.1+C 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 152C 269G 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 185A 189G 263G 309.1+C 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 187A 204C 207A 263G 309.2+2C 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 187A 249-A 263G 309.1+C 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 194T 229G 263G 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 195C 263G 309.1+C 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 210G 229G 263G 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 210G 263G 309.2+2C 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 210G 263G 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 229G 249-A 263G 309.1+C 315.1+C	2	0.02	0.0004
73G 229G 263G 309.1+C 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 229G 263G 315.1+C	3	0.03	0.0009
73G 249-A 263G 309.1+C 315.1+C	9	0.09	0.0081

73G 249-A 263G 309.2+2C 315.1+C	2	0.02	0.0004
73G 249-A 263G 315.1+C	4	0.04	0.0016
73G 263G 298T 309.2+2C 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 263G 309.1+C 315.1+C	7	0.07	0.0049
73G 263G 309.1+C 315.1+C 318C	2	0.02	0.0004
73G 263G 309.2+2C 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 263G 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 91G 187A 263G 309.2+2C 315.1+C	1	0.01	0.0001
73G 93G 200G 263G 315.1+C	1	0.01	0.0001
Total	100	Sum Xi^2 =	0.0246

HVR II พบว่ามี Polymorphisms ทั้งหมด 74 แบบจากตัวอย่างทั้งหมด 100 ตัวอย่าง และ นำมาคำนวณหาค่าสถิติได้ดังนี้

Random match probability

$$P = \sum(Xi^2)$$

$$= 0.0246$$

Discrimination power

$$Dp = 1-\sum(Xi^2)$$

$$= 0.9754$$

Haplotype diversity $$h = \frac{\left(1-\sum x^2\right)n}{\left(n-1\right)}$$

$$= 0.9853$$

ตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงจากลำดับเบสอ้างอิงมีทั้งสิ้น 40 ตำแหน่ง (14.93%) คือ 073 091 093 114 125 127 128 131 143 146 150 151 152 153 184 185 187 189 194 195 199 200 204 205 207 210 228 229 246 249 263 298 309 315 316 318 324 326 329 332

รูปแบบความหลากหลายของ HVR III

HVR3

Polymorphisms	Frequency	Xi	Xi^2
-(520,521,522,523)-2CA	1	0.0625	0.003906
-(522,523)-CA	28	1.75	3.0625
455.1+T 489C	2	0.125	0.015625
463T 489C	1	0.0625	0.003906
464A 466T 489C	1	0.0625	0.003906
466T 489C	1	0.0625	0.003906
479G	1	0.0625	0.003906
482C 489C	1	0.0625	0.003906
485C 489C	1	0.0625	0.003906
489C	32	2	4
489C -(522,523)-CA	13	0.8125	0.660156
489C -(522,523)-CA 568T	2	0.125	0.015625
489C 513A -(522,523)-CA	2	0.125	0.015625
489C 523.2+CA	1	0.0625	0.003906
489C 553T	1	0.0625	0.003906
No	12	0.75	0.5625
Total	100	Sum Xi^2 =	0.2142

HVR III พบว่ามี Polymorphisms ทั้งหมด 16 แบบ จากตัวอย่างทั้งหมด 100 ตัวอย่าง และนำมาคำนวณหาค่าสถิติได้ดังนี้

Random match probability

$$P = \sum(Xi^2)$$

$$= 0.2142$$

Discrimination power

$$Dp = 1-\sum(Xi^2)$$

$$= 0.7858$$

$$h = \frac{\left(1-\sum x^2\right)n}{(n-1)}$$

Haplotype diversity

= 0.7937

ตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงจากลำดับเบสอ้างอิงมีทั้งสิ้น 13 ตำแหน่ง (9.49%) คือ 455 463 464 466 479 482 485 489 513 522 523 553 568

การรวมตำแหน่งการตรวจต่างๆ เพื่อเพิ่มความหลากหลาย

การเพิ่มตำแหน่งการตรวจระหว่าง HVR I และ HVR II พบว่าทำให้เกิดความหลายหลาย (Polymorphisms) ทั้งสิ้น 98 แบบจากตัวอย่างทั้งหมด 100 ตัวอย่าง และสามารถคำณวณทางสถิติได้ดังนี้

Random match probability

$P = \sum(Xi^2)$

$= 0.0104$

Discrimination power

$Dp = 1-\sum(Xi^2)$

$= 0.9896$

Haplotype diversity $h = \frac{\left(1-\sum x^2\right)n}{(n-1)}$

= 0.9996

และเมื่อทำการตรวจเพิ่มทั้งสามตำแหน่งพบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมทั้งหมด 100 แบบจากตัวอย่างทั้งหมด 100 ตัวอย่าง และสามารถคำณวณทางสถิติได้ดังนี้

Random match probability

$P = \sum(Xi^2)$

$= 0.0100$

Discrimination power

$Dp = 1-\sum(Xi^2)$

$= 0.9900$

Haplotype diversity $h = \frac{(1-\sum x^2)n}{(n-1)}$

$= 1.0000$

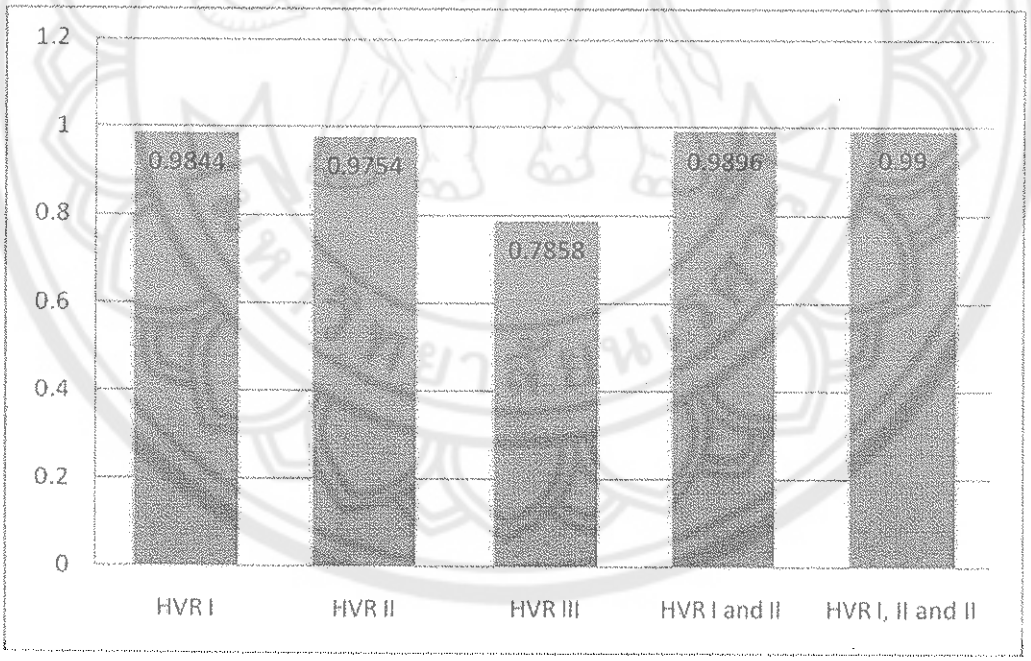
บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

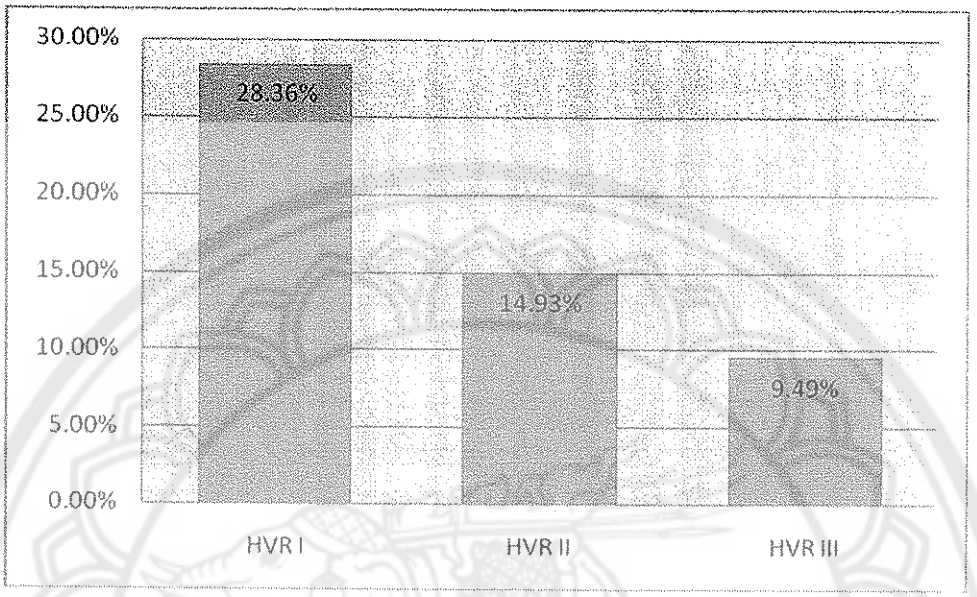
การใช้ตำแหน่งการตรวจทางไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอนั้น ดดยปรกติทางห้องปฏิบัติการทางด้านนิติวิทยาศาสตร์โดยทั่วไปใช้ตำแหน่งของ HVR I และ II ซึ่งมีความหลายหลายในระดับหนึ่ง ในการทดลองครั้งนี้มีการนำตำแหน่งการตรวจเพิ่มเข้ามาคือ HVR II กำลังการแยกแยะในแต่ละตำแหน่งนั้นมีค่าดังนี้คือHVR I มีค่า 0.9844 HVR II มีค่า 0.9754 และ HVR III มีค่า 0.7858 เมื่อเพิ่มตำแหน่งการตรวจเข้าด้วยกันจะพบบว่าทำให้กำลังการแยกแยะในการตรวจพิสูจน์เพิ่มมากขึ้น คือ เมื่อรวมตำแหน่ง HVR I และ II เข้าด้วยกันมีค่ากำลังการแยกแยะเท่ากับ 0.9896 หากนำทั้งสามตำแหน่งมาตรวจพร้อมกันจะทำให้ค่ากำลังการแยกแยะเพิ่มมากขึ้นได้ถึง 0.990

กราฟแสดง Discrimination Power ของการประยุกต์ใช้ในตำแหน่งต่างๆ



จำนวนตำแหน่งการเปลี่ยนในแต่ละส่วนมีค่าดังนี้คือ HVR I II และ III มีร้อยละจำนวนการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเบสต่อความยาวทั้งหมดคือ 28.36 14.93 และ 9.46 ตามลำดับ

กราฟแสดงร้อยละการเปลี่ยนแปลงจากลำดับเบสอ้างอิงทั้งสามตำแหน่ง



ส่วนความหลากหลายทางพันธุกรรม (haplotype diversity) ในแต่ละตำแหน่งมีค่าดังนี้ HVR I II และ III คือ .09943

การวิจารณ์การทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้จัยมีความมุ่งหมายถึงการหาค่ากำลังการแยกแยะในการตรวจพิสูจน์ทางไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ โดยได้หาส่วนบริเวณที่มาเพิ่มเติมเดิมที่ใช้ตรวจในห้องปฏิบัติการทั่วไป โดยตำแหน่งที่นำมาใช้ในการตรวจพิสูจน์เพิ่มเติมนั้นได้แก่ HVR III ที่อยู่บริเวณลำดับเบสที่ 438 ถึง 574 โดยมีความยาวทั้งสิ้น 137 คู่เบส พบว่าในลำดับขอลการทำกระบวนการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอ หรือ PCR นั้นมีความยุ่งยากในบางตัวอย่าง โดยเฉพาะตัวอย่างที่มีลำดับเบสที่มี C- stretch ตรงบริเวณลำดับเบสที่ 303 ถึง 315 และ 568ถึง 573 แม้ว่าบางตำแหน่งอาจอยู่นอกเหนือลำดับเบสที่เราสนใจ แต่ว่าการใช้ไพรเมอร์นั้นเราใช้ไพรเมอร์ L128 และ H619 ซึ่งมีลำดับเบสครอบคลุมบริเวณดังกล่าวในการแก้ปัญหานั้นทางผู้วิจัยได้ทำการ sequence ลำดับเบสย้อนกลับมาทางด้านไพรเมอร์สายเอช หรือ สายรีเวอร์สเพื่อเป็นการยืนยันลำดับเบสให้ถูกต้อง ลำดับเบสที่น่าสนใจอีกบริเวณของ HVR III อีกบริเวณคืออยู่ลำดับเบสที่ 514-523 คือ การซ้ำกันเป็นชุดๆของเบส CA โยการศึกษาครั้งนี้เฉพาะ

ตำแหน่งบริเวณนี้สามารถจัดกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 3 แบบ คือ 4CA, 5CA, 6CA แต่รูปแบบที่ผมมากที่สุดคือ 4CA ซึ่งถือว่ามีการ deletion CA จากลำดับเบสอ้างอิง ลักษณะการเพิ่มและลดลงของลำดับเบสอย่างละสองตัว ซึ่งมีลักษณะการกลายพันธุเหมือนกับไมโครแซทเทิลไลท์ในการตรวจพิสูจน์บุคคลของนิวเคลียดีเอ็นเอในปัจจุบัน นอกจากการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวยังพบว่าตำแหน่งเบสที่ 73 และ 263 มีลำดับเบสเป็น G และลำดับเบส 315.1 มี insertion ของลำดับเบส C ซึ่งอาจถือได้ว่าในประชากรไทยจะมีลักษณะทางพันธุกรรมดังรูปแบบนี้ทั้งหมด เหมือนกับชาติเอเชียอื่นๆเช่น ชาวญี่ปุ่น (19) เป็นต้น

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าค่าสถิติความน่าจะเป็นที่จะพบบุคคลที่มีความเหมือนกันของรูปแบบพันธุกรรม (P) เมื่อนำ HVR I และ II มาวิเคราะห์มีค่าเท่ากับ 0.0104 หรือคิดเป็นร้อยละได้ 1.04 หากเมื่อเทียบกับกลุ่มประชากรอื่นเช่น ชาวญี่ปุ่นร้อยละ 1.1 (19) ชาวฝรั่งเศษ 1.30 ชาวออสเตรียน 1.28 (20) จะเห็นได้ว่าในกลุ่มประชากรไทยนั้นมีค่าน้อยกว่า นั้นแสดงให้เห็นว่าการใช้ไมโตรคอนเดรียลดีเอ็นเอในการตรวจพิสูจน์ทั้งสองตำแหน่งนั้น ในคนไทยสามารถใช้ได้ดีกว่าหากมองในแง่ของสถิติ โดยเฉพาะเมื่อนำการวิเคราะห์เพิ่ม HVR III มาใช้ยิ่งทำให้มีขีดความสามารถเพิ่มขึ้นอีก ($P = 0.010$ หรือลดลงเหลือร้อยละ 1เท่านั้น) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการตรวจพิสูจน์บุคคลในกลุ่มประชากรไทยนั้นสามรถทำได้อย่างยอดเยี่ยมและหากเพิ่มตำแหน่งการตรวจเพิ่มขึ้นเป็นสามตำแหน่งโดยใช้ HVR III ยิ่งทำให้การตรวจมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น

บรรณานุกรม

1. Budowle B, Allard MW, Wilson MR, Chakraborty R. Forensics and mitochondrial DNA: applications, debates, and foundations. Ann Rev of Genom Hum Genet 2003;4:119–41.
2. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature 1981;290:457–65.
3. Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. Nat Genet 1999;23:147.
4. Giles RE, Blanc H, Cann HM, Wallace DC. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Proc. Natl. Acad.1980.
5. Gill P, Ivanov PL, Kimpton C, Piercy R, Benson N, et al.. Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. Nat. Genet. 1994;6:130–35
6. Herrnstadt C, Elson JL, Fahy E, Preston G, Turnbull DM, et al. Reducedmedian network analysis of complete mitochondrial DNA coding-region sequences for the major African, Asian, and European haplogroups. Am. J. Hum. Genet 2002; 70:1152–71
7. Holland MM, Fisher DL, Mitchell LG, Rodriquez WC, Canik JJ, et al. Mitochondrial DNA sequence analysis of human skeletal remains: identification of remains from the Vietnam War. J. Forensic Sci. 1993; 38:542–53
8. Jazin E, Soodyall H, Jalonen P, Lindholm E, Stoneking M, Gyllensten U. Mitochondrial mutation rate revisited: hot spots and polymorphism. Nat. Genet 1998;18:109–10
9. Pääbo S.. Mutational hot spots in the mitochondrial microcosmos. Am. J. Hum. Genet. 1996; 59:493–96
10. Parsons TJ, Muniec DS, Sullivan K, Woodyatt N, Alliston-Greiner R, et al.. A high observed substitution rate in the human mitochondrial DNA control region. Nat. Genet 1997; 15:363–68
11. Schwartz M, Vissing J.. Paternal inheritance of mitochondrial DNA. N. Engl. J. Med. 2002; 347:576–80
12. Stoneking M.. DNA and recent human evolution. Evol. Anthropol. 1993; 2:60–73
13. Stoneking M.. Hypervariable sites in the mtDNA control region are mutational hotspots. Am. J. Hum. Genet. 2000; 67:1029–32

25 ส.ค. 54
สำนักหอสมุด
- 1 SEP 2011

14. Tanaka M, Cabrera VM, Gonzalez AM, Larruga JM, Takeyasu T, et al. Mitochondrial genome variation in eastern Asia and the peopling of Japan. Genome Res. 2004;14:1832–50

15. Wakeley J.. Substitution rate variation among sites in hypervariable region 1 of human mitochondrial DNA. J. Mol. Evol. 1993; 37:613–23

16. Yao YG, Bravi CM, Bandelt HJ. A call for mtDNA data quality control in forensic science. Forensic Sci. Int. 2004;141:1– 6

17. Melton T, Dimick G, Higgins B, Lindstrom L, Nelson K. Forensic mitochondrial DNA analysis of 691 casework hairs. J Forensic Sci 2005;50:73–80.

18. Holland MM, Parsons TJ. Mitochondrial DNA sequence analysis—validation and use for forensic casework. Forensic Sci Rev 1999;11:21–50.

19. Yasuhisa Seo, S.B. Beate, R. Christian, T. Keiichi, S.M. Peter. sequence polymorphism of mitochondrial DNA control region in Japanese. Forensic Sci Int. 97(1998)155-64.

20. Bruce Budowle, Mark R. Wilson, Joseph A. Dizinno, Clinton Stauffer, Michael A.Fasano, Mitchell M. Holland et.al,. Mitochondrial DNA regions HVI and HVII population data. For Sci Int. 103 (1999):23-35.

ภาคผนวก

ภาคผนวก

HVR I SEQUENCE (16024-16365)

15970 15980 15990 16000 16010 16020

GAAAAAGTCT TTAACTCCAC CATTAGCACC CAAAGCTAAG ATTCTAATTT AAACTATTCT

CTTTTTCAGA AATTGAGGTG GTAATCGTGG GTTTCGATTC TAAGATTAAA TTTGATAAGA

16030 16040 16050 16060 16070 16080

CTGTTCTTTC ATGGGGAAGC AGATTTGGGT ACCACCCAAG TATTGACTCA CCCATCAACA

GACAAGAAAG TACCCCTTCG TCTAAACCCA TGGTGGGTTC ATAACTGAGT GGGTAGTTGT

16090 16100 16110 16120 16130 16140

ACCGCTATGT ATTTCGTACA TTACTGCCAG CCACCATGAA TATTGTACGG TACCATAAAT

TGGCGATACA TAAAGCATGT AATGACGGTC GGTGGTACTT ATAACATGCC ATGGTATTTA

16150 16160 16170 16180 16190 16200

ACTTGACCAC CTGTAGTACA TAAAAACCCA ATCCACATCA AAACCCCCTC CCCATGCTTA

TGAACTGGTG GACATCATGT ATTTTTGGGT TAGGTGTAGT TTTGGGGGAG GGGTACGAAT

16210 16220 16230 16240 16250 16260

CAAGCAAGTA CAGCAATCAA CCCTCAACTA TCACACATCA ACTGCAACTC CAAAGCCACC

GTTCGTTCAT GTCGTTAGTT GGGAGTTGAT AGTGTGTAGT TGACGTTGAG GTTTCGGTGG

16270 16280 16290 16300 16310 16320

CCTCACCCAC TAGGATACCA ACAAACCTAC CCACCCTTAA CAGTACATAG TACATAAAGC

GGAGTGGGTG ATCCTATGGT TGTTTGGATG GGTGGGAATT GTCATGTATC ATGTATTTCG

16330 16340 16350 16360 16370 16380

CATTTACCGT ACATAGCACA TTACAGTCAA ATCCCTTCTC GTCCCCATGG ATGACCCCCC

GTAAATGGCA TGTATCGTGT AATGTCAGTT TAGGGAAGAG CAGGGGTACC TACTGGGGGG

HVR II SEQUENCE (73 – 340)

10 20 30 40 50 60

GATCACAGGT CTATCACCCT ATTAACCACT CACGGGAGCT CTCCATGCAT TTGGTATTTT

CTAGTGTCCA GATAGTGGGA TAATTGGTGA GTGCCCTCGA GAGGTACGTA AACCATAAAA

70 80 90 100 110 120

CGTCTGGGGG GTATGCACGC GATAGCATTG CGAGACGCTG GAGCCGGAGC ACCCTATGTC

GCAGACCCCC CATACGTGCG CTATCGTAAC GCTCTGCGAC CTCGGCCTCG TGGGATACAG

130 140 150 160 170 180

GCAGTATCTG TCTTTGATTC CTGCCTCATC CTATTATTTA TCGCACCTAC GTTCAATATT

CGTCATAGAC AGAAACTAAG GACGGAGTAG GATAATAAAT AGCGTGGATG CAAGTTATAA

190 200 210 220 230 240

ACAGGCGAAC ATACTTACTA AAGTGTGTTA ATTAATTAAT GCTTGTAGGA CATAATAATA

TGTCCGCTTG TATGAATGAT TTCACACAAT TAATTAATTA CGAACATCCT GTATTATTAT

250 260 270 280 290 300

ACAATTGAAT GTCTGCACAG CCACTTTCCA CACAGACATC ATAACAAAAA ATTTCCACCA

TGTTAACTTA CAGACGTGTC GGTGAAAGGT GTGTCTGTAG TAT T GTTTTT TAAAGGTGGT

310 320 330 340 350 360

AACCCCCCCT CCCCCGCTTC TGGCCACAGC ACTTAAACAC ATCTCTGCCA AACCCCAAAA

TTGGGGGGGA GGGGGCGAAG ACCGGTGTCG TGAATTTGTG TAGAGACGGT TTGGGGTTTT

HVR III SEQUENCE (438-574)

```
          430        440        450        460        470        480
TTTTAACAGT CACCCCCCAA  CTAACACATT ATTTTCCCCT  CCCACTCCCA TACTACTAAT

AAAATTGTCA GTGGGGGGTT  GATTGTGTAA TAAAAGGGGA GGGTGAGGGT ATGATGATTA


          490        500        510        520        530        540
CTCATCAATA CAACCCCCGC  CCATCCTACC  CAGCACACAC ACACCGCTGC TAACCCCATA

GAGTAGTTAT GTTGGGGGCG GGTAGGATGG  GTCGTGTGTG TGTGGCGACG ATTGGGGTAT


          550        560        570        580        590        600
CCCCGAACCA ACCAAACCCC AAAGACACCC CCCACAGTTT  ATGTAGCTTA CCTCCTCAAA

GGGGCTTGGT TGGTTTGGGG TTTCTGTGGG  GGGTGTCAAA  TACATCGAAT GGAGGAGTTT
```

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ (ไทย)	นายสุทัศน์ ดวงจิตร
(อังกฤษ)	Mr. Suthat Duangchit
วัน เดือน ปีเกิด	4 มีนาคม 2524
ประวัติการศึกษา	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย , 2543-2546:
	วท.บ. (กายภาพบำบัด)
	Bachelor of Science (Physical Therapy)
	มหาวิทยาลัย มหิดล , 25472549:
	วท..ม. (นิติวิทยาศาสตร์)
	Master of Science (Forensic Science)
สถานที่ติดต่อ	ภาควิชาสรีระวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์
	มหาวิทยาลัยนเรศวร
	suthatd@gmail.com

ทุนการวิจัย	ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่
	สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย