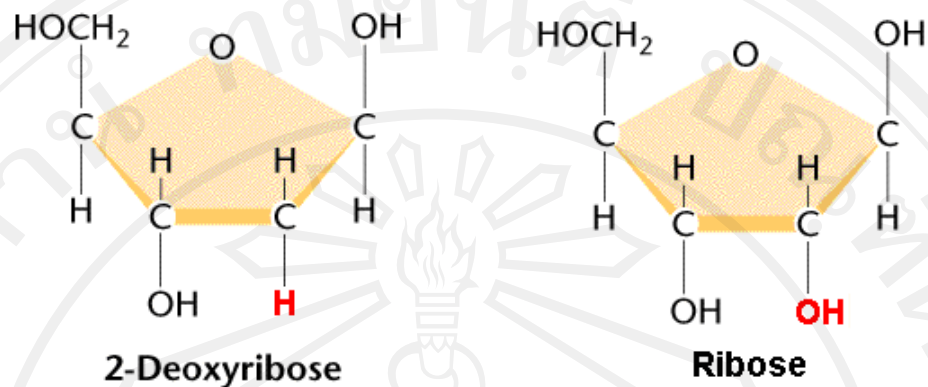


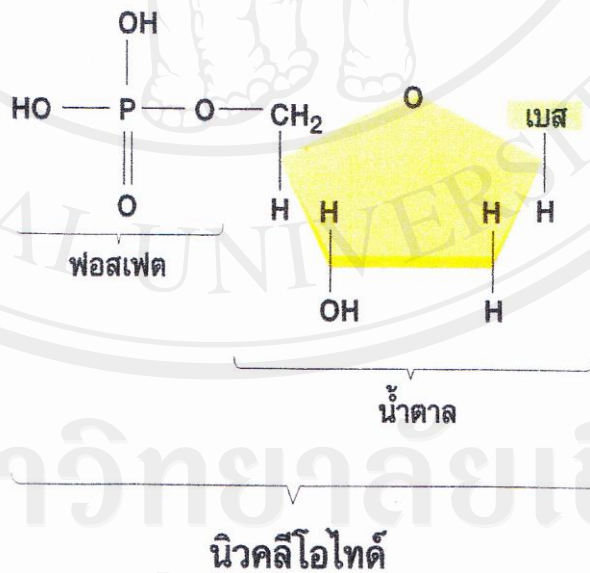
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สิ่งมีชีวิตทุกชนิด เช่น คน (Human), สัตว์ (Animal), พืช (Plant), เชื้อรา (Fungi), แบคทีเรีย (bacteria), ไวรัส (virus) เป็นต้น จะมีชีวิตโมเลกุลพื้นฐาน คือ สารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นรหัสชีวิตที่บรรจุข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นไว้ มีลักษณะที่ผสมผสานมาจากสิ่งมีชีวิตรุ่นก่อน ซึ่งก็คือ พ่อและแม่ (Parent) และสามารถถ่ายทอดไปยังสิ่งมีชีวิตรุ่นถัดไป ซึ่งก็คือ ลูกหลาน (Offspring)

ดีเอ็นเอเป็นสารประกอบประเภทหนึ่งของกรดนิวคลีอิก (Nucleic acid) จากทั้งหมด 2 ชนิด ดีเอ็นเอ มีชื่อย่อมาจากคำว่า ไดออกซีไรโบนิวคลีอิก แอซิด (Deoxyribonucleic acid : DNA) ที่ทำหน้าที่เก็บข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต และมีการถ่ายทอดข้อมูลออกไปให้อยู่ในรูปของสารประกอบอีกประเภทหนึ่งของกรดนิวคลีอิก คือ อาร์เอ็นเอ (Ribonucleic acid : RNA) ด้วยกระบวนการถอดรหัส (Transcription) และการแปลรหัส (Translation) จากอาร์เอ็นเอเป็นโปรตีนสำหรับทำหน้าที่ต่างๆอีกทีหนึ่ง (ภาพ 1) ดีเอ็นเอประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เรียกว่า นิวคลีโอไทด์ (Nucleotide) ซึ่งมีองค์ประกอบ 3 ส่วน คือ น้ำตาลเพนโทส (Pentose sugar) ชนิดไดออกซีไรโบส (Deoxyribose), กรดฟอสฟอริก (Phosphoric Acid) และไนโตรจีนัสเบส (Nitrogenous base) (ตรีทิพย์ รัตนวรชัย, 2522) (ภาพ 2) โดยทั่วไปสารประกอบไนโตรจีนัสเบส (Nitrogenous Base) แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มไพริมิดีนเบส (Pyrimidine) ซึ่งมีโครงสร้างหลักประกอบด้วยวงแหวน 1 วง ได้แก่ ไทมิน (Thymine: T) ไซโทซีน (Cytosine: C) และกลุ่มพิวรีนเบส (Purine) ซึ่งมีโครงสร้างหลักประกอบด้วยวงแหวน 2 วง ได้แก่ อะดีนีน (Adenine: A) กัวนีน (Guanine: G) (วิชัย บุญแสง และคณะ, 2547) (ภาพ 3) โดยสารประกอบไนโตรจีนัสเบสนี้จะรวมตัวกับน้ำตาลไดออกซีไรโบส (Deoxyribose sugar) และกรดฟอสฟอริก (Phosphoric acid) เป็นนิวคลีโอไทด์อยู่ในดีเอ็นเอ การเรียงลำดับของนิวคลีโอไทด์ ส่งผลต่อการเกิดความหลากหลาย และสร้างความแตกต่างในลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอ ซึ่งจะมีเฉพาะในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด

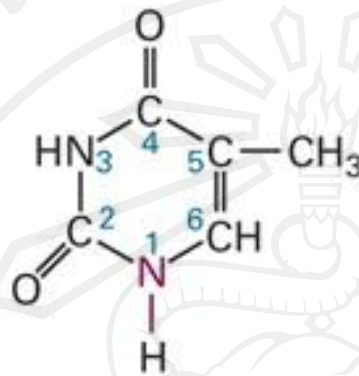


ภาพ 1 โครงสร้างทางเคมีของน้ำตาลเพนโทสที่เป็นองค์ประกอบ
ในดีเอ็นเอคือ ไดออกซีไรโบส (Deoxyribose) และในอาร์เอ็นเอคือไรโบส (Ribose)
(ที่มา : http://www.mun.ca/biology/scarr/Deoxyribose_versus_Ribose.html)

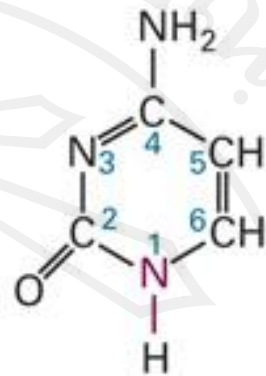


ภาพ 2 โครงสร้างของนิวคลีโอไทด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาล กลุ่มฟอสเฟต และเบส
(ที่มา : วิชัย บุญแสง และคณะ, 2547)

Pyrimidine

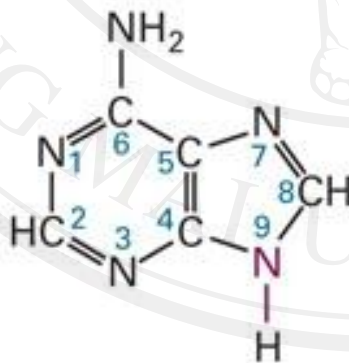


Thymine (T)

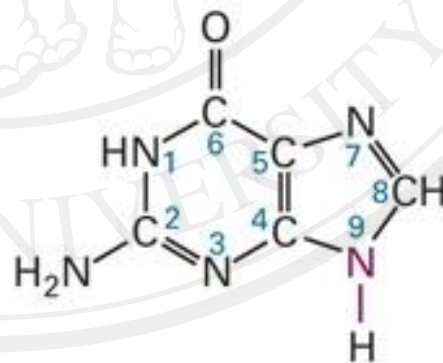


Cytosine (C)

Purine



Adenine (A)



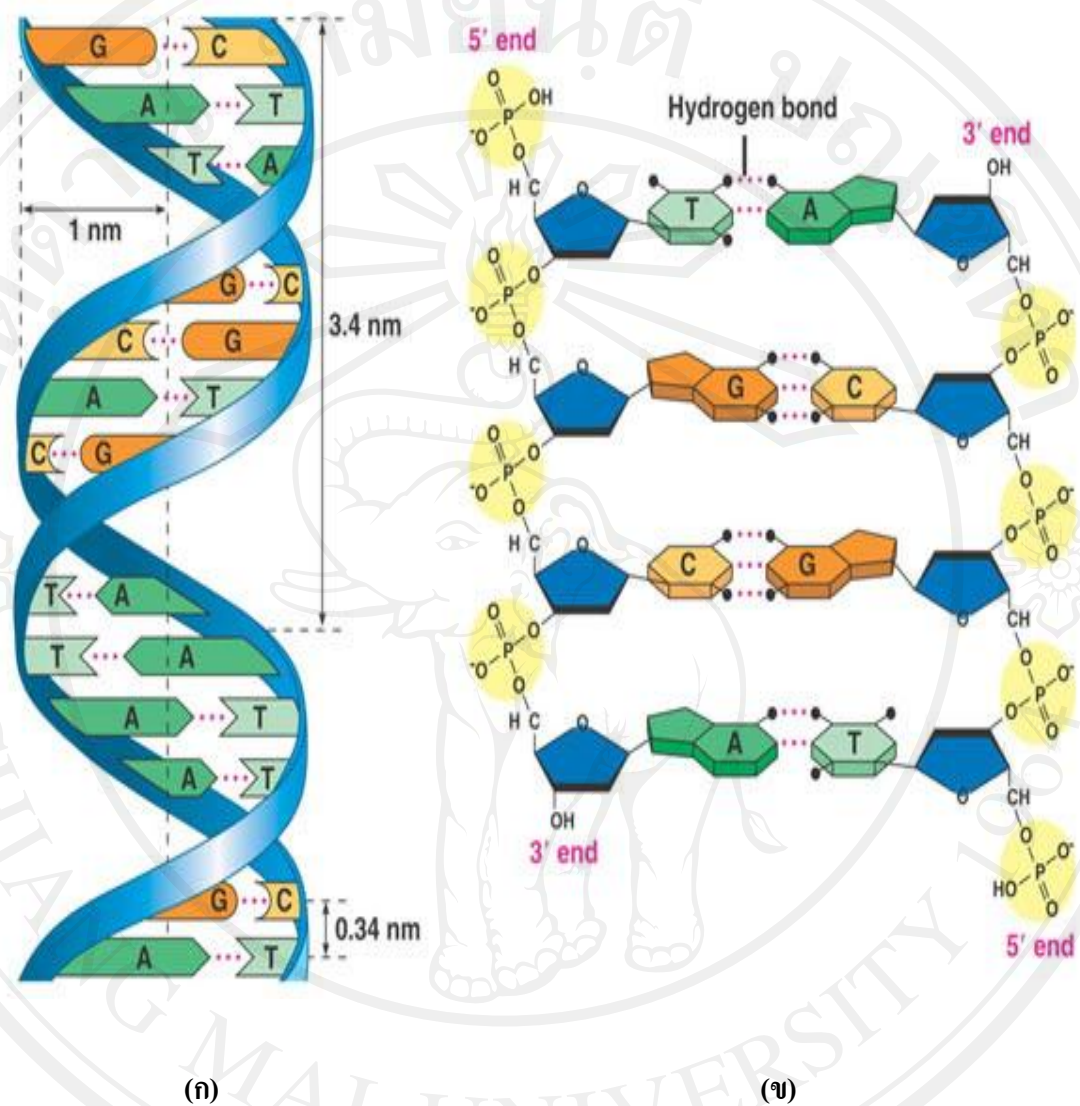
Guanine (G)

ภาพ 3 โครงสร้างทางเคมีของไนโตรจีนัสเบส ชนิดเพียวรีนและไพริมิดีน

(ที่มา: <http://www.learners.in.th/blogs/posts/172858?locale=en>)

โครงสร้างของดีเอ็นเอจะมีลักษณะที่พันกันเป็นเกลียวคล้ายขดสปริง เรียกว่า ฮีลิคซ์ (Helix) มีโครงสร้างทางเคมีเป็นพอลิเมอร์ของนิวคลีโอไทด์สองสายมาพันกันเป็นเกลียว โดยทั่วไปจะเป็นเกลียวคู่เวียนขวา (Right-handed double helix) พอลิเมอร์นิวคลีโอไทด์แต่ละสายประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์เป็นหน่วยย่อยเรียงต่อกันด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ มีปลาย 5'-phosphate และ 3'-OH โดยนิวคลีโอไทด์ทั้งสองสายเรียงตัวกันในทิศทางตรงกันข้าม (Antiparallel) สายหนึ่งเรียงตัวจาก 5'-phosphate ไปยัง 3'-OH อีกสายหนึ่งเรียงจาก 3'-OH ไปยัง 5'-phosphate แกนของทั้งสองสายเป็นส่วนของน้ำตาลเพนโทสต่อกับหมู่ฟอสเฟตด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ ส่วนเบสนั้นจะยื่นเข้าหากันโดยมีพันธะไฮโดรเจนยึดอยู่ระหว่างเบสที่จำเพาะ คือ อะดีนีนจะจับคู่กับไทมีนด้วยพันธะไฮโดรเจนสองพันธะ (A-T base pair) กัวนีนจะจับคู่กับไซโทซีนด้วยพันธะไฮโดรเจนสามพันธะ (G-C base pair) จึงแข็งแรงกว่าคู่เบสอะดีนีนกับเบสไทมีน การจับตัวของเบสในลักษณะนี้ ทำให้ได้โครงสร้างดีเอ็นเอที่บิดเป็นเกลียวฮีลิคซ์ เนื่องจากการจัดตัวของอะตอมในโมเลกุลของเบสแต่ละตัวมีโครงสร้างที่แน่นอน และเมื่อจับคู่กับเบสอีกชนิดหนึ่งจึงทำให้เกิดการบิดตัวของโมเลกุลของดีเอ็นเอ สำหรับตัวเบสนั้นเป็น Heterocyclic nitrogenous base จะเกิดพันธะไฮโดรโฟบิกระหว่างเบสที่อยู่ซ้อนกันในแต่ละสาย (Stacking base) ดังนั้น พันธะไฮโดรเจนและพันธะไฮโดรโฟบิกจึงเป็นพันธะหลักที่ช่วยให้โครงสร้างเกลียวคู่มีความเสถียร (วิชัย บุญแสง, 2547) (ภาพ 4)

ดีเอ็นเอ สามารถแบ่งประเภทตามแหล่งที่มาได้ 2 แหล่ง คือ ดีเอ็นเอที่พบในนิวเคลียส (Nuclear DNA) และดีเอ็นเอที่พบในไมโทคอนเดรีย (Mitochondrial DNA; mtDNA) การศึกษาดีเอ็นเอที่พบในนิวเคลียสจะได้ข้อมูลด้านระบบวิวัฒนาการเชิงโมเลกุลและวิวัฒนาการ ส่วนข้อมูลการเรียงลำดับเบสของดีเอ็นเอที่พบในไมโทคอนเดรียสามารถนำมาใช้หาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตที่มีสายเลือดใกล้ชิดกันและนำไปใช้ในการศึกษาเพื่อใช้จำแนกชนิดและสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ

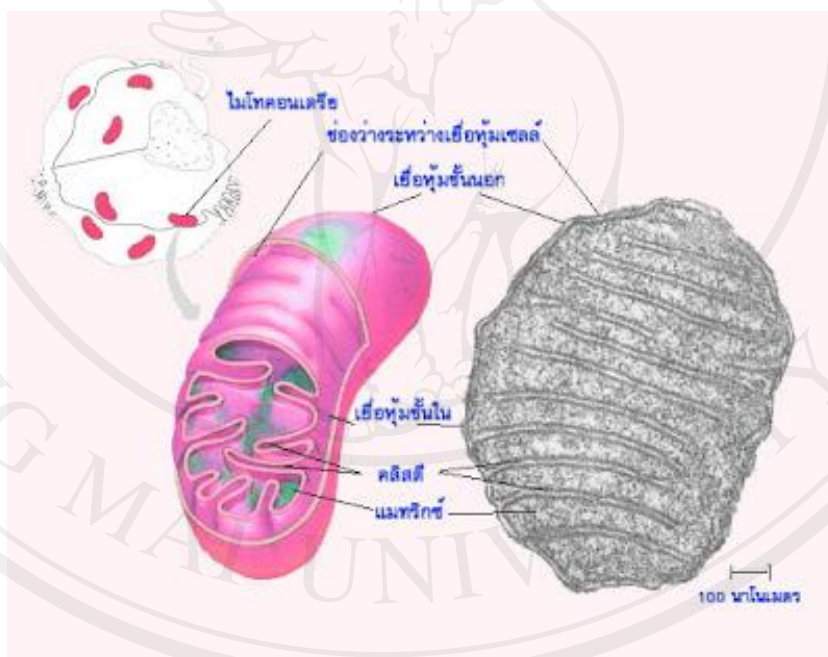


ภาพ 4 (ก) โครงสร้างเกลียวอีลิกซ์ของดีเอ็นเอ

(ข) การจัดตัวของสายพอลินิวคลีโอไทด์สองสายของดีเอ็นเอไปในทิศทางตรงกันข้ามและแสดงพันธะไฮโดรเจนระหว่างคู่เบส (AT หรือ GC)

(ที่มา: <http://www.learners.in.th/blogs/posts/172858?locale=en>)

ไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) เป็นออร์แกเนลล์ที่ทำหน้าที่ในการหายใจ และเป็นแหล่งพลังงานของเซลล์ พบในสิ่งมีชีวิตพวกยูแคริโอตที่หายใจแบบใช้ออกซิเจนทั้งพืชและสัตว์ ไมโทคอนเดรียมีรูปร่างกลม ท่อนสั้น ท่อนยาว หรือกลมรีคล้ายรูปไข่ โดยทั่วไปมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2-1 ไมครอน และยาว 5-7 ไมครอน ประกอบด้วยสารโปรตีนร้อยละ 60-65 และลิพิดประมาณร้อยละ 35-40 ไมโทคอนเดรียเป็นออร์แกเนลล์ที่มีเยื่อหุ้มเมมเบรนหุ้ม 2 ชั้น (Double unit membrane) โดยชั้นนอกเรียบมีความหนาประมาณ 60-70 อังสตรอม เยื่อชั้นในพับเข้าด้านในเรียกว่า คริสตี (Cristae) ภายในของไมโทคอนเดรียมีของเหลวซึ่งประกอบด้วยสารหลายชนิดเรียกว่า เมทริกซ์ (Matrix) ในไมโทคอนเดรีย นอกจากมีสารประกอบเคมีหลายชนิดแล้วยังมีเอนไซม์ที่สำคัญในการสร้างพลังงานจากการหายใจระดับเซลล์ (ภาพ 5)

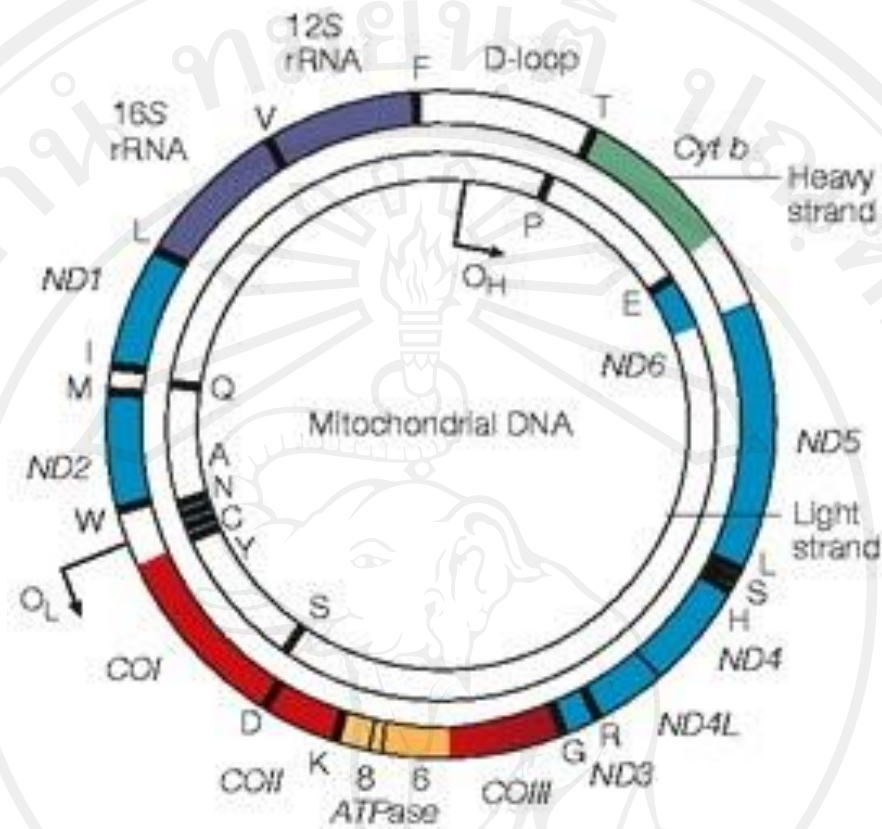


ภาพ 5 โครงสร้างภายในของไมโทคอนเดรีย

(ที่มา : <http://food-mitochondria.blogspot.com/2012/09/mitochondria.html>)

ดีเอ็นเอไมโทคอนเดรีย (Mitochondrial DNA ; mtDNA) เป็นดีเอ็นเอซึ่งมีขนาดเล็กมากเมื่อเทียบกับดีเอ็นเอในนิวเคลียส การที่ไมโทคอนเดรียมีดีเอ็นเอของตัวเอง จึงสามารถจำลองโมเลกุลดีเอ็นเอและสังเคราะห์โปรตีนได้เอง จีโนมในไมโทคอนเดรียของสัตว์มีขนาดค่อนข้างเล็กประมาณ 16-20 กิโลเบส เช่นของมนุษย์ 16,569 คู่เบส พืชมี 40-2,500 กิโลเบส ซึ่งมีขนาดค่อนข้างใหญ่และมีความแตกต่างกันมาก จำนวนไมโทคอนเดรียในเซลล์จะมีปริมาณแตกต่างกันขึ้นกับชนิดและกิจกรรมของเซลล์ โดยแต่ละเซลล์อาจมีจำนวนไมโทคอนเดรียตั้งแต่หลายร้อยจนถึงจำนวนเป็นหลักพัน และในไมโทคอนเดรียแต่ละอันจะมีดีเอ็นเอ 5-10 โมเลกุล รวมจำนวนดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรียอาจมีหลายพันโมเลกุลต่อเซลล์ คิดเป็นประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ของดีเอ็นเอทั้งหมดในเซลล์ (สุรินทร์, 2552) สำหรับดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียของมนุษย์ มีลักษณะเป็นเกลียวคู่แบบวงแหวน (Double-stranded circular DNA) ขนาดเล็ก มีความยาว 16,569 คู่เบส ทุกเบสมีความหมายทั้งหมด ประกอบด้วยยีน 37 ยีน โดยมี 13 ยีนที่เข้ารหัสโปรตีน ที่เหลือเป็นยีนของ tRNA 22 ชนิด และ rRNA 2 ชนิด มีส่วนที่ไม่เป็นรหัสของยีนขนาด 1,200 คู่เบส บริเวณนี้เรียกว่า บริเวณควบคุม (Control region) ซึ่งมีความหลากหลายสูงและมีการสะสมของการกลายพันธุ์ (Mutation) มากกว่าดีเอ็นเอในนิวเคลียสถึง 10 เท่า บางทีจึงเรียกบริเวณนี้ว่า บริเวณหลากหลายสูง (Hypervariable region)

หน้าที่สำคัญของดีเอ็นเอไมโทคอนเดรีย คือ เปลี่ยนอาหารเป็นสารที่ให้พลังงานสูง (Adenosine triphosphate ; ATP) ในรูปที่เซลล์สามารถนำไปใช้ภายในเซลล์ได้ โดยไมโทคอนเดรียสามารถจำลองโมเลกุลดีเอ็นเอและสังเคราะห์โปรตีนได้เอง ทั้งนี้ ดีเอ็นเอมีที่มาจากการถ่ายทอดจากบรรพบุรุษซึ่งปกติจะเป็นไปตามกฎของเมนเดล (มาจากพ่อและแม่) แต่เนื่องจากการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของดีเอ็นเอไมโทคอนเดรียจะเกิดเฉพาะกับฝ่ายมารดาเท่านั้น ทำให้การถ่ายทอดพันธุกรรมไม่เป็นไปตามกฎของเมนเดล (ตรีทิพย์ รัตนวรชัย, 2552) กล่าวคือ เซลล์สืบพันธุ์ของพ่อที่อยู่ในรูปอสุจินั้นเอาเฉพาะส่วนหัวของอสุจิซึ่งมีนิวเคลียสอยู่เข้าไปผสมกับไข่ของแม่ ดังนั้น เซลล์ของลูกที่ได้รับจึงมีแต่ไมโทคอนเดรียที่ได้จากแม่เท่านั้น ซึ่งการถ่ายทอดพันธุกรรมที่ไม่เป็นไปตามกฎของเมนเดลนี้ สามารถใช้เป็นประโยชน์ในการติดตามเชื้อสายทางมารดา และสามารถนำไปใช้ในการตรวจพิสูจน์ชนิดของสัตว์ในทางนิติวิทยาศาสตร์ได้ (สถาบันนิติเวชวิทยา, 2553)

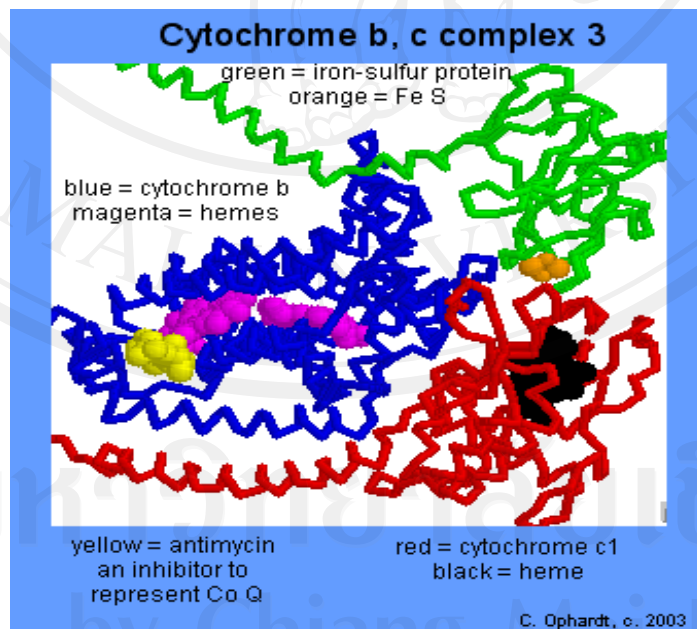


ภาพ 6 แผนผังของยีนต่างๆ ในจีโนมของไมโทคอนเดรีย

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

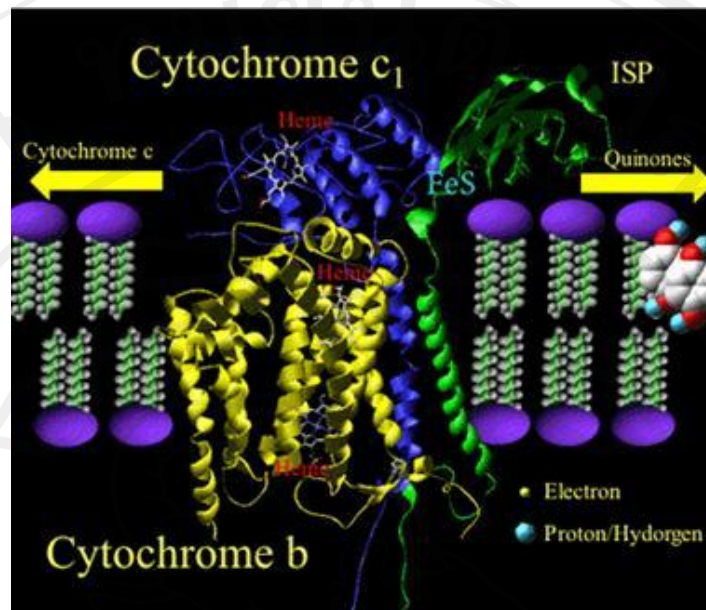
ไซโตโครม (Cytochrome) คือ รงควัตถุที่อยู่ในรูปของโปรตีนที่มีธาตุเหล็ก(Fe) เป็นองค์ประกอบ สามารถพบได้ในเนื้อเยื่อไมโทคอนเดรียชั้นใน การเรียกชื่อจะใช้อักษรแทน ชนิดของไซโตโครมนั้นๆ เช่น ไซโตโครม เอ (Cytochrome *a*) ไซโตโครม บี (Cytochrome *b*) และ ไซโตโครม ซี (Cytochrome *c*) โดยไซโตโครมมีหน้าที่รับและส่งอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจจากไซโตโครมหนึ่งไปยังอีกไซโตโครมหนึ่ง (Cytochrome *b* → Cytochrome *c* → Cytochrome *a*) จนถึงออกซิเจนที่ซึ่งเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย โดยจะไม่มีการส่งต่ออิเล็กตรอนให้แก่สารตัวใดอีก ออกซิเจนที่ได้รับอิเล็กตรอนจะรวมกับโปรตอนที่มีอยู่ในสารละลายภายในไมโทคอนเดรียแล้วกลายเป็นน้ำ (ชนาวลัย อรัญญิก, 2552) (ภาพ 7)

ไซโตโครม บี (Cytochrome *b*) เป็นหนึ่งในไซโตโครม (Cytochromes) ที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจของไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) เป็นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กและพบอยู่ในสัตว์ทุกชนิด ซึ่งไซโตโครม บี มีคุณสมบัติที่ค่อนข้างอนุรักษ์ กล่าวคือ จะคงลักษณะ รูปร่าง และคุณสมบัติต่างๆ ไว้เหมือนเดิม ถึงแม้มีปริมาณตัวอย่างไม่ค่อยหรือถูกเก็บไว้เป็นระยะเวลานาน อีกทั้งมีลำดับเบสแตกต่างกันไป ทำให้มีการสร้างโปรตีนที่มีความจำเพาะสำหรับสัตว์แต่ละชนิดเท่านั้น จากคุณสมบัติดังกล่าว จึงมีการนำเอาดีเอ็นเอในส่วนของยีนไซโตโครม บี มาใช้ในการตรวจวิเคราะห์เพื่อคัดแยกชนิดของสัตว์และมนุษย์ออกจากกัน (Species identification) และเนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ อาจมีปริมาณเพียงเล็กน้อย หรืออาจมีสภาพไม่สมบูรณ์ ไม่สามารถทำการตรวจสอบได้ แต่ด้วยคุณสมบัติดังกล่าว จึงสามารถออกแบบไพรเมอร์ (Primer) เพื่อใช้ในการกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (Polymerase chain reaction ; PCR) ซึ่งเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการจำลองดีเอ็นเอแม่แบบ (Template) โดยสามารถเพิ่มปริมาณเฉพาะส่วนที่เป็นดีเอ็นเอที่ต้องการให้มีจำนวนที่มากขึ้น ในระยะเวลาอันสั้น ซึ่งมีรายงานการเพิ่มปริมาณส่วนของยีนไซโตโครม บี ในสัตว์ได้ถึง 221 ชนิด เมื่อนำส่วนที่เพิ่มปริมาณได้มาหาลำดับเบส จะมีลำดับเบสที่แตกต่างกันไปตามชนิด (Species specific) (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล; 2552)



ภาพ 7 รูปร่างของไซโตโครม

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



ภาพ 8 ไซโตโครมบนเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย
(ที่มา : http://www.pw.ac.th/main/website/sci/5_data.htm)

ดังนั้น ยีนบนไมโทคอนเดรีย (mtDNA) นิยมนำมาใช้ในการศึกษาเพื่อจำแนกชนิดพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากมีข้อได้เปรียบมากกว่ายีนที่ปรากฏบนนิวเคลียส (Nuclear DNA) หลายประการ คือ ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสที่รวดเร็วมากเป็นพิเศษ (มากกว่าดีเอ็นเอในโครโมโซม) ประกอบกับดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียเป็นเพียงสายสั้นๆ และอยู่ในช่วงที่ใช้เทคนิคพีซีอาร์ได้เหมาะสมที่สุด ต่างจากดีเอ็นเอในโครโมโซมที่ยาวมากกว่าและมีความเร็วในการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในแต่ละส่วนของสายดีเอ็นเอไม่เท่ากัน อีกทั้งดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียของสัตว์มีขนาดเล็ก จึงง่ายต่อการศึกษา ประกอบกับการเรียงตัวของยีนที่มีการอนุรักษ์ จึงสามารถใช้ไพรเมอร์ร่วมกันได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ทั้งสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง โดยไม่ต้องทราบลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษามาก่อน รวมถึงมีกระบวนการจำลองตัวเองเพื่อเพิ่มจำนวนด้วยอัตราเร็วของมันเองไม่ขึ้นกับนิวเคลียส เมื่อจำนวนไมโทคอนเดรียมีมากขึ้น ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียจึงมีมากขึ้นตามไปด้วย และแม้ว่าการเรียงตัวของยีนจะเป็นแบบอนุรักษ์ แต่อัตราการกลายพันธุ์โดยรวมค่อนข้างสูง ซึ่งสูงกว่าอัตราการกลายพันธุ์ในนิวเคลียสถึง 10 เท่า บริเวณที่ไม่ได้เป็นส่วนของยีน ซึ่งรวมถึงบริเวณควบคุมการจำลองโมเลกุลและการถอดรหัสเป็นอาร์เอ็นเอ ที่เรียกว่า Control region หรือ Displacement (D) loop หรือ Hypervariable region ซึ่งมี

อัตราการกลายพันธุ์ที่สูงมากในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด อัตราการกลายพันธุ์ที่สูงเกิดจากผลผลิตที่มาจากปฏิกิริยาการหายใจ และกลไกการซ่อมแซมดีเอ็นเอที่ไม่เข้มงวดเท่ากับในนิวคลีอัส การที่ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียมีอัตราการกลายพันธุ์สูงนี้ ทำให้พบความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือ พอลิมอร์ฟิซึม (Polymorphism) ได้มาก จึงใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตได้ดีทั้งภายในประชากรและระหว่างประชากร ทั้งยังไม่มี การแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนและรวมตัวกันใหม่ (Recombination) ลูกจึงมีจีโนมในไมโทคอนเดรียที่เหมือนกับแม่เสมอ คือ มีแฮพลไทป์เพียงแบบเดียวที่ถ่ายทอดจากแม่สู่ลูก ทำให้สามารถศึกษาแบบแผนการถ่ายทอดได้โดยตรง ง่ายกว่าดีเอ็นเอในนิวคลีอัสซึ่งลูกได้รับมาจากทั้งพ่อและแม่ ซึ่งอาจมีการรวมตัวกันใหม่ได้อีก สามารถศึกษาแบบแผนการถ่ายทอด ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียจากเพศเมียไปยังลูกหลานที่เกี่ยวข้อง จากชั่วรุ่นหนึ่งไปยังอีกรุ่นหนึ่งได้โดยไม่จำกัดเวลา ตลอดจนมีลักษณะเป็น Neutral marker เนื่องจากบทบาทหน้าที่ของไมโทคอนเดรียเป็นคุณสมบัติพื้นฐานของสิ่งมีชีวิต ไม่ใช่เป็นลักษณะที่มีการพัฒนาขึ้น เฉพาะสิ่งมีชีวิตชนิดใดชนิดหนึ่ง ดังนั้น Mutation ที่เกิดขึ้นจึงไม่เกี่ยวข้องกับการอยู่รอดของสิ่งมีชีวิต และลักษณะที่เกิดขึ้นใหม่ (New genotype) จะไม่สูญหายไปในช่วงกระบวนการคัดเลือกพันธุ์ตามธรรมชาติ

ด้วยเหตุนี้ จึงได้มีการนำประโยชน์จากดีเอ็นเอบนยีนไซโตโครม บี ในไมโทคอนเดรียมาประยุกต์ใช้ในการระบุชนิดของสัตว์ หรือแม้แต่การระบุว่าเป็นมนุษย์ โดยดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียยังสามารถใช้ได้ดีในกรณีของตัวอย่างที่มีอายุยาวนาน เช่น สม หรือ ขน โบราณวัตถุ ซึ่งมักจะไม่มีดีเอ็นเอในนิวคลีอัสเหลือเพียงพอที่จะตรวจสอบได้ แต่ทั้งนี้ การระบุสารพันธุกรรมด้วยการวิเคราะห์ยีนไซโตโครม บี ในไมโทคอนเดรียนั้นสามารถใช้กับการระบุคุณลักษณะทั่วไป หรือการระบุกลุ่มชั้น (Class characteristics) ของสิ่งมีชีวิตเท่านั้น กล่าวคือ ใช้ระบุชนิดหรือประเภทของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ เช่น มนุษย์ หมู ไก่ วัว สุนัข เป็นต้น แต่ไม่สามารถระบุถึงคุณลักษณะเฉพาะ (Individual characteristics) ซึ่งบ่งบอกความเป็นเอกลักษณ์ (Identity) ของสิ่งนั้นๆ ได้ เพื่อประโยชน์ซึ่งมุ่งถึงการตรวจวิเคราะห์ในการนำไประบุชนิดของสัตว์ เช่น เป็นไก่หรือไม่ โดยไม่ได้มุ่งหาคำตอบว่า เป็นไก่ตัวนั้นตัวนี้หรือไม่ ดังนั้น การใช้การตรวจวิเคราะห์จากดีเอ็นเอบนไซโตโครม บี ในไมโทคอนเดรียจึงเป็นการเพียงพอ

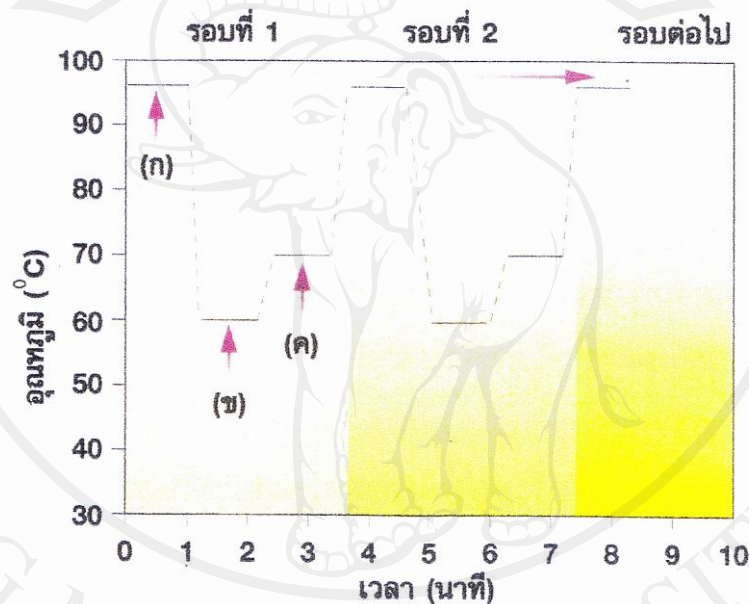
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส (PCR) (ธานินทร์, 2538), (ตรีทิพย์, 2552)

เทคนิคการทำ Polymerase chain reaction โดยทั่วไปมักมีวัตถุประสงค์ที่จะให้ได้ยีนที่ต้องการ และเพิ่มขยายยีนดังกล่าว ซึ่งเทคนิคนี้สามารถเพิ่มขยายดีเอ็นเอให้มีจำนวนมากขึ้นกว่าเดิมหลายล้านเท่า โดยการเพิ่มปริมาณยีนที่สนใจในหลอดทดลองวิธีนี้มีประโยชน์ในการตรวจหาชิ้นส่วนหรือเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการในสิ่งส่งตรวจ ค้นพบครั้งแรกโดย Kary Mullis และคณะ ในปี 1986 (Kary Mullis, 1986) โดยใช้หลักการเลียนแบบธรรมชาติที่ว่าโดยอาศัยดีเอ็นเอต้นแบบเป็นจุดเริ่มต้น และมีเอ็นไซม์พวก DNA polymerase ช่วยทำให้สายดีเอ็นเอยาวออกไปโดยเลือกจับเอา นิวคลีโอไทด์ตัวใดตัวหนึ่งใน 4 ชนิด dATP, dGTP, dCTP, dTTP เข้ามาต่อเป็นเบสคู่สมกับดีเอ็นเอสายต้นแบบ (Template) ส่วนประกอบต่างๆ ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมีดังนี้คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ (Template DNA), Thermostable DNA polymerase, Deoxynucleotide triphosphate (dNTPs) ทั้ง 4 ชนิด, Oligonucleotide primer อย่างน้อย 1 คู่ และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ปริมาณดีเอ็นเอจะเพิ่มมากขึ้นได้ ต้องอาศัยปฏิกิริยาที่ต่อเนื่องหลายๆรอบ ซึ่งแต่ละรอบจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ (ภาพ 9)

1. ขั้นตอน Denaturation เป็นขั้นตอนการทำให้ ดีเอ็นเอสายคู่แยกเป็นสายเดี่ยว โดยอาศัยความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส
2. ขั้นตอน Primer annealing เป็นขั้นตอนที่มีการลดอุณหภูมิลงมาที่ประมาณ 45-60 องศาเซลเซียส เพื่อให้ไพรเมอร์สามารถเกาะติดกับดีเอ็นเอ ต้นแบบสายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับเบสคู่สม
3. ขั้นตอน Primer extension เป็นขั้นตอนการขยายสายดีเอ็นเอโดยการต่อลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์แล้วมีการขยายสายดีเอ็นเอสายใหม่จากทิศทาง 5' ไป 3' โดยอาศัยเอ็นไซม์ Thermostable DNA polymerase เช่น Taq polymerase ซึ่งปกติใช้อุณหภูมิอยู่ในช่วง 70-75 องศาเซลเซียส

ในกระบวนการพีซีอาร์ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ 2 เส้นจะจับกับเส้นดีเอ็นเอต้นแบบในตำแหน่งที่ห่างจากกัน ถึงบริเวณหัวและท้ายของช่วงดีเอ็นเอที่ต้องการจะสร้างขึ้นใหม่ ไพรเมอร์ไฮบริดส์ เข้ากับสายตรงข้าม และเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ ทำให้เติมช่องว่างระหว่างไพรเมอร์ให้เต็มบริเวณที่อยู่ระหว่างไพรเมอร์ทั้งสองจะเพิ่มเป็น 2 เท่าในแต่ละรอบของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ หลอดปฏิกิริยาจะถูกปรับเปลี่ยนอุณหภูมิในเครื่องปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ (Thermal cycler) ในลักษณะทวีคูณเป็น 2^n เมื่อ n เป็นจำนวนรอบของปฏิกิริยา ดังนั้น ในการสังเคราะห์ 10 รอบ ดีเอ็นเอจะถูกขยาย $2^{10} = 1024$ เท่า 20 รอบประมาณหนึ่งล้านเท่า และ 30 รอบประมาณพันล้านเท่า ในทางทฤษฎีนั้นดีเอ็นเอที่มีปริมาณเป็นนาโนแกรมสามารถขยายให้

ดีเอ็นเอเป็นกรัมได้ โดยใช้พีซีอาร์ 30 รอบ ด้วยกระบวนการอัตโนมัติ จึงทำให้ปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นในเวลาไม่กี่ชั่วโมง พีซีอาร์มีประโยชน์อย่างมากในการทำสำเนาพันธุกรรมหรือการโคลนนิ่งดีเอ็นเอเพราะทำการเพิ่มจำนวนยีนก่อนที่จะโคลนนิ่ง พีซีอาร์ทำให้ได้ลำดับเบสดีเอ็นเอจำเพาะปริมาณมากที่จะใช้เป็นต้นแบบ พีซีอาร์สามารถถูกใช้เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอแม้มีอยู่ในตัวอย่างในปริมาณเพียงเล็กน้อย พีซีอาร์สามารถประยุกต์ใช้ตรวจไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอซึ่งใช้ระบุเอกลักษณ์บุคคลและพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดซึ่งสามารถตรวจได้จากตัวอย่างดีเอ็นเอแม้มีปริมาณเพียงเล็กน้อย (อุไรวรรณ, 2545)



ภาพ 9 ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (ก) Denaturation (ข) Annealing (ค) Extension

การเตรียมและขั้นตอนการ พีซีอาร์

1. การเก็บสิ่งส่งตรวจหรือตัวอย่างเพื่อสกัดดีเอ็นเอ ตัวอย่างที่ส่งตรวจอาจเป็นเนื้อเยื่อจากพืช สัตว์ หรือสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยเช่น เลือด สารน้ำต่างๆ ชิ้นเนื้ออาจเป็น Fixed paraffin-embedded tissue สามารถเอามาสกัดสารพันธุกรรมที่เป็น ดีเอ็นเอ หรือ อาร์เอ็นเอ ก็ได้ โดยใช้วิธีง่ายๆ และรวดเร็ว ซึ่งมีหลายวิธีโดยสามารถสกัดเอาดีเอ็นเอปริมาณน้อยๆได้ เนื่องจากเทคนิคพีซีอาร์มีความไวสูงและอาศัยดีเอ็นเอปริมาณน้อยๆ ทั้งสามารถเลือกเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอช่วงสั้นๆ

ได้ดี จึงสามารถใช้กับสิ่งส่งตรวจที่เป็นตัวอย่างที่เก็บไว้เป็นระยะเวลานาน ทำให้มีประโยชน์นำไปใช้กับงานทางด้านโบราณคดีหรืองานนิติเวชได้

2. ดีเอ็นเอต้นแบบ (Template DNA) ดีเอ็นเอต้นแบบที่มีลำดับเบสเป้าหมายหรือดีเอ็นเอเป้าหมาย (DNA target) สามารถใช้ในปฏิกิริยาของพีซีอาร์ ในลักษณะดีเอ็นเอสายเดี่ยวหรือดีเอ็นเอสายคู่ก็ได้ แม้ว่าขนาดของดีเอ็นเอไม่ใช่จุดที่มีปัญหามากนัก แต่การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยดีเอ็นเอมีขนาดสั้นๆ อยู่ในรูปปลายเปิดจะมีประสิทธิภาพที่ต่ำกว่าเพราะจะเข้าไปจับ ซึ่งช่วยให้ง่ายต่อการเพิ่มจำนวนและลดผลผลิตดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะลง โดยทั่วไปควรทดสอบปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการเพียงพอและมีความไวที่เหมาะสม

3. นิวคลีโอไทด์ตั้งต้น (Primer) การเลือกออกแบบไพรเมอร์ที่จะใช้ต้องเลือกให้เหมาะสมกับแต่ละงานโดยอาศัยหลักการจับคู่กันแบบจำเพาะของสายดีเอ็นเอ ที่ต้องการตรวจหา กับไพรเมอร์ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์เป็นตัวกำหนดความจำเพาะในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ดังนั้นจึงต้องทราบลำดับเบสที่นำมาสังเคราะห์ให้ไพรเมอร์

ข้อแนะนำในการเลือกและออกแบบไพรเมอร์ ได้แก่

- 1) ความยาวของไพรเมอร์ ควรมีความยาวประมาณ 18-30 นิวคลีโอไทด์ ขึ้นอยู่กับงานที่ใช้
- 2) ควรเลือกไพรเมอร์ ที่มีการกระจายของเบสอย่างสม่ำเสมอ
- 3) ควรเลือกไพรเมอร์ ที่มี GC-content อยู่ระหว่าง 50-60% ไม่ควรเลือกไพรเมอร์ที่มีปริมาณ GC content ที่สูงเกินไป
- 4) ไพรเมอร์ต้องมีความจำเพาะกับลำดับเบสเป้าหมาย (Target sequence) ในดีเอ็นเอต้นแบบ นั่นคือลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ ต้องมีความจำเพาะเพียงแห่งเดียวในสายดีเอ็นเอต้นแบบ
- 5) หลีกเลี่ยงลำดับเบสที่จับกับลำดับเบสของตัวเอง
- 6) ควรหลีกเลี่ยงลำดับเบสของแต่ละไพรเมอร์ ไม่ให้เป็นคู่สมกันเอง
- 7) ค่า T_m (Melting temperature) ของแต่ละไพรเมอร์ควรใกล้เคียงกัน โดยทั่วไปควรอยู่ในช่วง 55-80 องศาเซลเซียส
- 8) ไพรเมอร์ควรมีลำดับคู่สมกับปลายด้าน 3 ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละสายของดีเอ็นเอต้นแบบ

4. Thermostable DNA polymerase ที่นิยมใช้กันมากที่สุดคือ Taq DNA polymerase ซึ่งแยกได้จากเชื้อแบคทีเรียที่เจริญได้ในน้ำพุร้อนที่มีชื่อ *Thermus aquaticus* (Taq) ซึ่งมีคุณสมบัติ

ทนความร้อนได้สูงและไม่เสียคุณสมบัติของเอนไซม์ในขั้นตอน Denature และสามารถใช้ในการเร่งปฏิกิริยาการสร้างดีเอ็นเอได้ที่อุณหภูมิสูงคือ 70-85 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาคือ 72 องศาเซลเซียส Taq DNA polymerase เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 94 กิโลดาลตัน ขาดคุณสมบัติ 3-5 Exonuclease activity จึงขาดคุณสมบัติในการตรวจสอบที่เรียกว่า Proofreading ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Taq DNA polymerase อยู่ในช่วง 1.0 - 2.5 unit ความเข้มข้นที่ใช้ขึ้นอยู่กับปริมาณและลักษณะของดีเอ็นเอต้นแบบ(Primer) รวมทั้งสารประกอบอื่นๆ ด้วยการใช้เอนไซม์ที่มากเกินไปจะทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ฟิชัวร์ที่ไม่จำเพาะขึ้น ทำให้เกิด Nonspecific background มาก แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นน้อยไปก็จะทำให้ได้ผลผลิตน้อย

5. Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) ความเข้มข้นของ dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) ปกติอยู่ระหว่าง 50-200 uM ของแต่ละ dNTPs แต่ถ้าเป็น dNTPs ทั้ง 4 ตัว จะมีส่วนประกอบรวมไม่เกิน 800 uM ถ้าหากมีการใช้ dNTPs ที่มีความเข้มข้นที่สูงเกินไป จะเกิดการต่อต้านเบสคู่สมที่ผิดพลาด การเตรียม dNTPs ควรเตรียมเป็น Primary stock solution ที่เจือจาง 10 mM แล้วแบ่ง Aliquot เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

6. บัฟเฟอร์ (Buffer) ส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ประกอบด้วย Tris-HCL, KCL, $MgCl_2$ และ Glycerol ความเข้มข้นและภาวะที่เหมาะสมของส่วนประกอบต่างๆ ในบัฟเฟอร์มีดังนี้

1) ความเข้มข้นของ Magnesium ion (Mg^{2+}) : Taq DNA polymerase ต้องการ Magnesium ion เพื่อช่วยส่งเสริมให้ปฏิกิริยาการขยายสายดีเอ็นเอดำเนินต่อไปได้ โดย Magnesium ion จะทำหน้าที่เป็น Co-factor นอกจากนั้น Magnesium ion ยังมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ด้วย (Enzyme fidelity) และมีผลต่อการ Anneal ของไพรเมอร์ความเข้มข้นของ Magnesium ion ต้องปรับเปลี่ยนให้พอเหมาะกับความเข้มข้นของ dNTPs โดยทั่วไปความเข้มข้นที่พอเหมาะของ Magnesium ion คือต้องเหลือ Magnesium ในรูปอิสระประมาณ 0.5-1.0 mM โดยทั่วไปมักใช้ Magnesium ความเข้มข้นทั้งหมดเป็น 1.5 mM ความเข้มข้นของ Magnesium ion ที่มากเกินไป ทำให้เกิดผลผลิตดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะ และพบว่า การปรับค่า Magnesium ion ก็ช่วยให้ไพรเมอร์มีการ Anneal ที่มีความจำเพาะขึ้นเช่นเดียวกับการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

2) pH : pH ที่เหมาะสมในการทำงานสำหรับ Taq DNA polymerase คือ ที่ pH 7-7.5 ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส แต่ปกติ Taq DNA polymerase จะอยู่ใน Tris buffer ซึ่งมี pH 8.5-9.0 ที่ 25 องศาเซลเซียส เนื่องจาก pH ของ Tris-buffer จะลดลงประมาณ 0.03 ของอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นแต่ละองศา ดังนั้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 72 องศาเซลเซียส จะได้ pH 7.3

7. องค์ประกอบอื่นในปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยทั่วไปส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในพีซีอาร์ คือ 10-15 mM Tris-HCL ที่ pH 8.4 ที่ 25 องศาเซลเซียส, 50 mM KCL, 1.5 mM MgCL₂ 0.01% gelatin (W/V) หรืออาจใช้ Non-ionic detergent แทน Gelatin ได้ เช่น 0.01% NP40 และ 0.01% Tween 20 การทดลองบางแห่งใช้ DMSO ใส่ลงไปปฏิกิริยาเพื่อลด Secondary structure ของดีเอ็นเอ แต่พบว่า 10% DMSO ไม่เหมาะกับ Taq DNA polymerase เพราะไปยับยั้งปฏิกิริยาของ เอนไซม์ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่น้อยลง Gelatin หรือ Bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้นต่ำๆ (100 ug/ml) สามารถช่วยคงสภาพของเอนไซม์ได้ แต่ BSA ถูกทำลายได้ง่าย ที่อุณหภูมิสูงและอาจตกตะกอนกับ Taq DNA polymerase

Temperature cycling

1. ขั้นตอน Denaturation อุณหภูมิที่ใช้ส่วนใหญ่ประมาณ 94-95 องศาเซลเซียส เป็น เวลานาน 30-60 วินาที อย่างไรก็ตาม การใช้เวลานานและอุณหภูมิที่สูงเกินไป จะทำให้เอนไซม์และ นิวคลีโอไทด์สูญเสียคุณสมบัติได้ แต่ถ้าใช้เวลาน้อยและอุณหภูมิที่ต่ำเกินไป จะทำให้สายดีเอ็นเอ แยกออกจากกันได้ไม่ดี ทำให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ลดลง กรณีที่ดีเอ็นเอต้นแบบมีปริมาณ G+C content ที่สูงมาก ต้องเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นด้วย
2. ขั้นตอน Primer annealing โดยทั่วไปใช้อุณหภูมิในขั้นตอนนี้ประมาณ 55-72 องศา เซลเซียส ซึ่งใช้อุณหภูมิ Annealing temperature ที่ต่ำกว่า Tm ของไพรเมอร์ประมาณ 5 องศา เซลเซียส การใช้อุณหภูมิที่สูงในขั้นตอนนี้จะช่วยในการเพิ่มความจำเพาะในการจับคู่ เวลาที่ใช้ใน ขั้นตอนนี้ประมาณ 30 วินาที
3. ขั้นตอน Primer extension เวลาที่ใช้ในขั้นตอนนี้ขึ้นกับความยาว ความเข้มข้น และ ลำดับเบสของดีเอ็นเอต้นแบบ โดยทั่วไปใช้เวลาประมาณ 1 นาที ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส โดยปกติ Taq DNA polymerase สามารถเพิ่มความยาวของสายดีเอ็นเอได้ประมาณ 6,000 นิวคลีโอไทด์ต่อนาที ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส การใช้เวลาที่มากในขั้นตอนแรกจะมีประโยชน์ สำหรับดีเอ็นเอต้นแบบที่มีจำนวนน้อย

จำนวนรอบในการทำพีซีอาร์ (Cycle number)

จำนวนรอบในการทำพีซีอาร์ขึ้นกับปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบตั้งต้น ถ้าใช้จำนวนรอบ ที่มากขึ้นเท่าใด โอกาสที่จะได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ผิดพลาดก็มากขึ้นตามไปด้วย เนื่องจากผลิตภัณฑ์

พีซีอาร์ที่ได้จะมีความจำเพาะเจาะจงที่น้อยลงและ Background มากขึ้น แต่ถ้าใช้จำนวนรอบน้อยเกินไปผลผลิตที่ได้ก็น้อยลงด้วย

การตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product)

การตรวจวิเคราะห์ผลผลิตมีด้วยกันหลายวิธี โดย Gel electrophoresis โดยนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่สร้างได้มาแยกตามขนาดดีเอ็นเอ โดยใช้กระแสไฟฟ้าแยกดีเอ็นเอบน Agarose gel หรือ Polyacrylamide gel เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดที่แน่นอน จากนั้นย้อมขึ้นดีเอ็นเอด้วย Ethidium bromide แล้วนำไปส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเลต ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ดีควรให้เส้นดีเอ็นเอที่ชัดเจน และตรงตามขนาดความต้องการ แต่ถ้ามีขนาดเล็กและแถบดีเอ็นเอไม่ชัดเจนอาจเป็นดีเอ็นเอที่เป็น Primer dimer

ปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับไซโตโครม บี ซึ่งโดยทั่วไปใช้ในการกำหนดความสัมพันธ์ภายใน ไฟโลจีนetik (Phylogenetic) ของสัตว์ จากการผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ และถือว่าเป็นประโยชน์มากที่สุดในในการกำหนดความสัมพันธ์ภายใน ครอบครัว และ สกุล การศึกษาเปรียบเทียบเกี่ยวกับไซโตโครม บี มีผลต่อการจำแนกสกุลสัตว์แบบใหม่ จึงถูกนำมาใช้เป็นทางเลือกหนึ่งในการศึกษาเพื่อแยกมนุษย์ออกจากสัตว์ชนิดอื่นได้ ส่วนใหญ่ยีนยูคาริโอตมีหลายรูปแบบ ประกอบด้วยรูปแบบที่ซ้ำกันสามตัวและซ้ำกันสี่ตัวบนสายดีเอ็นเอสั้นๆ จากการรายงานของ Crouse และคณะ (1995) ได้แสดงให้เห็นถึงความแปรปรวนของการแสดงออกของยีนในหลายกลุ่มประชากรมนุษย์ โดยทำการเปรียบเทียบดีเอ็นเอของสัตว์ 23 ชนิด โดยใช้ 9 โพรเมอร์ของ Short tandem repeat หรือ STR เพื่อประเมินความจำเพาะเจาะจงของพันธุกรรมของมนุษย์ ตำแหน่ง STR ที่ใช้ทดสอบประกอบด้วย CSF1PO, TPOX, THO1, HPRTB, FESPEs, vWF และ FI3A01 เป็นระบบเดี่ยว และระบบที่ตรวจสอบสามตำแหน่ง คือ CSF1PO/ TPOX/THO1 และ HPRTB/FESPEs/vWF จากการสังเกตไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR ของสัตว์ 17 ชนิด จาก 23 ชนิด ในระบบ STR ใดเลย ในลิง Rhesus ตรวจพบ STR fragment DNA ในตำแหน่ง CSF1PO, TPOX และ HPRTB. สำหรับมนุษย์ ชิมแพนซี กอริลลา และอูรังอุตัง ตรวจพบ STR ดีเอ็นเอ 8 ใน 9 ตำแหน่ง โพรเมอร์ FESPEs ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอไม่ว่าจากสัตว์ชนิดใด ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากสัตว์ชนิด Primate (พวกลิง) ส่วนใหญ่เมื่อตรวจทาง Electrophoresis แล้ว จะพบว่าแถบดีเอ็นเอจะวิ่งไปนอกเขตที่เป็น Allelic ladder ของมนุษย์ จากการวิจัยนี้จึงอาจสรุปได้ว่าการออกแบบอัลลิล (Allele) เพื่อคัดแยกดีเอ็นเอของมนุษย์และสัตว์จึงไม่สามารถเป็นไปได้ (Crouse, 1995)

Bateille และคณะ (1999) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการแยกแยะความแตกต่างระหว่างมนุษย์และสัตว์ชนิดอื่นออกจากกันด้วยดีเอ็นเอไมโทคอนเดรีย โดยทำการศึกษาดีเอ็นเอของมนุษย์และสัตว์อื่นอีกจำนวน 4 ชนิด ซึ่งได้แก่ หมู ไก่ วัว และวัว โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์เยื่อกระดูกของมนุษย์และตัวอย่างเนื้อสัตว์ทั้งสี่ชนิด และทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ผลจากการศึกษาพบว่า ดีเอ็นเอของมนุษย์จะเกิดการแยกตัวออกเป็นสองแถบจากการทำ Agarose gel electrophoresis ส่วนดีเอ็นเอของสัตว์จะเกิดเพียงหนึ่งแถบเท่านั้น แถบแรกจะปรากฏที่ตำแหน่ง 309 bp ส่วนแถบที่สองจะอยู่ที่ตำแหน่ง 259 bp ซึ่งเป็นช่วงสายดีเอ็นเอที่เรียกว่าไฮโดโครม บี ดังนั้น จากการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นประโยชน์ในด้านนิติวิทยาศาสตร์เนื่องจากสามารถพิสูจน์เบื้องต้นโดยการแยกแยะดีเอ็นเอของมนุษย์ออกจากสัตว์ที่ทำการศึกษาทั้งสี่ชนิดได้ (Bateille, 1999)

Matsunaga และคณะ (1999) ได้ประยุกต์ใช้เทคนิค Multiplex PCR ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยใช้ไพรเมอร์หลายคู่พร้อมกันในการปฏิกิริยาเดียวกันมาตรวจสอบชนิดเนื้อสัตว์ 6 ชนิด ได้แก่ แพะ ไก่ วัว แกะ หมู และม้า ซึ่งไพรเมอร์ที่ใช้จะมีการออกแบบมาจากยีนในส่วนของยีนไฮโดโครม บี โดย Forward primer จะเป็นการนำลำดับเบสของสัตว์ 6 ชนิดดังกล่าวด้วยอัตราส่วนที่เหมาะสม คือ 1 : 0.2 : 3 : 0.6 : 3 : 0.6 : 2 ส่วน Reverse primer จะใช้ลำดับเบสตามความจำเพาะของสัตว์แต่ละชนิด เมื่อมีการตรวจสอบผลด้วยการแยกแถบดีเอ็นเอโดยการทำ Agarose gel electrophoresis พบว่า ขนาดของดีเอ็นเอของสัตว์แต่ละชนิด (แพะ ไก่ วัว แกะ หมู และม้า) มีความแตกต่างกัน คือ จะปรากฏแถบที่ตำแหน่ง 157, 227, 274, 331, 398 และ 439 bp ตามลำดับ นอกจากนี้ผู้ที่ทำการวิจัยยังได้มีการศึกษาในส่วนของปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบที่จะสามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบ ซึ่งพบว่าขอบเขตของปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบที่จะสามารถนำมาตรวจสอบได้นั้นอยู่ที่ 0.25 นาโนกรัม (Matsunaga, 1999)

Andreo และคณะ (2005) ศึกษาการใช้เทคนิคพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสัตว์เพื่อทำการตรวจสอบชนิดและปริมาณของเนื้อสัตว์ที่ผสมกันอยู่ในอาหารสำเร็จรูปที่ผลิตจากโรงงาน โดยทำการสกัดและเปรียบเทียบดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์ 6 ชนิด ได้แก่ วัว หมู แกะ ไก่ ไก่ทอง และนกกระทาเทศ ซึ่งผสมอยู่ในอาหารสำเร็จรูป จากกระบวนการตรวจสอบพบว่า ขอบเขตปริมาณของดีเอ็นเอแม่แบบที่จะสามารถทำการตรวจสอบได้นั้นอยู่ที่ 0.3 ถึง 0.8 พิโคกรัม สามารถทำการตรวจสอบเนื้อสัตว์ที่ผสมกัน 2 ถึง 4 ชนิด โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสัตว์ทั้งนี้สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนหรือการผสมของเนื้อสัตว์ได้เมื่อมีปริมาณมากกว่า 1% สำหรับเนื้อหมู เนื้อไก่ หรือเนื้อไก่ทอง และมีปริมาณมากกว่า 5% สำหรับเนื้อวัวหรือเนื้อแกะ ซึ่งความถูกต้องแม่นยำของกระบวนการตรวจสอบเชิงปริมาณพบว่า หากมีการผสมหรือการปนเปื้อน

ของเนื้อวัวหรือเนื้อหมูในอาหารสำเร็จรูปในปริมาณตั้งแต่ 10 ถึง 100% สามารถตรวจสอบเชิงปริมาณได้ในความถูกต้องเกือบ 90% ดังนั้นจากการศึกษานี้สรุปได้ว่า สามารถนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในทางนิติวิทยาศาสตร์ เพื่อตรวจสอบชนิดของเนื้อสัตว์กรณีที่เป็นข้อสงสัยว่าอาหารที่ประกอบขึ้นนั้นได้ใช้เนื้อสัตว์ชนิดใดหรือได้ใช้เนื้อสัตว์ที่มีมาตรฐานหรือไม่ ในอัตราส่วนเท่าไร ซึ่งเป็นการตรวจพิสูจน์เพื่อให้การคุ้มครองแก่ผู้บริโภคและให้ความเป็นธรรมแก่ผู้ผลิตอาหารสำเร็จรูป (Andreo, 2005)

Matsuda และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษารูปแบบของดีเอ็นเอไมโทคอนเดรียของมนุษย์ในช่วงของดีเอ็นเอที่เรียกว่า ไซโตโครม บี ของมนุษย์เพื่อทำการเปรียบเทียบกับลิง 4 ชนิด ได้แก่ ลิงชิมแปนซี ลิงกอริลล่า ลิงญี่ปุ่น และลิงแสม โดยการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดของมนุษย์ จำนวน 48 ราย (หญิง 18 ชาย 30) และลิงทั้งหมด และออกแบบไพรเมอร์ใหม่เพื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ หลังทำการตรวจสอบพบว่า ไพรเมอร์ของมนุษย์และไพรเมอร์ของลิงชิมแปนซีมีความแตกต่างกันทั้ง Forward primer และ Reverse primer โดยมีความแตกต่างกัน 26% (7 bp/27 bp) และ 26% (6 bp/23 bp) ตามลำดับ เมื่อทำการตรวจสอบการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบขึ้นด้วย Agarose gel electrophoresis พบว่า มีการปรากฏแถบดีเอ็นเอของมนุษย์ทั้ง 48 ตัวอย่าง แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอของลิงชนิดใดเลย และเมื่อทำการเปรียบเทียบกับสัตว์ชนิดอื่น ได้แก่ วัว หมู สุนัข แกะ หนู ไก่ และปลาเทโพ ผลจากการทดสอบพบว่า ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของสัตว์ชนิดอื่นเช่นกัน และยังพบว่าไพรเมอร์ของสัตว์ชนิดอื่นแตกต่างจากไพรเมอร์ของมนุษย์ทั้ง Forward primer และ Reverse primer จากการศึกษานี้จึงสรุปได้ว่า ไพรเมอร์ดีเอ็นเอไมโทคอนเดรียที่ยีนไซโตโครมบี ที่ออกแบบขึ้นมานั้นมีความจำเพาะกับดีเอ็นเอของมนุษย์และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจพิสูจน์ทราบเลือด เส้นผม เส้นขน หรือกระดูก เพื่อแยกว่าเป็นของมนุษย์หรือสัตว์ได้ในทางนิติวิทยาศาสตร์ (Matsuda, 2005)

Caine และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาถึงการชี้เฉพาะเพื่อระบุสปีชีส์โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนไซโตโครม บี โดยวิธีนี้ได้ถูกใช้กับตัวอย่างจากกรณีศึกษาทางนิติวิทยาศาสตร์ที่มีความเกี่ยวข้องกับการสืบสวนสอบสวนคดีอาชญากรรม โดยคณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาจากกรณีศึกษา 2 กรณี คือ กรณีศึกษาที่ 1 เป็นกรณีศึกษาเกี่ยวกับร่างของเด็กผู้หญิงอายุ 8 ขวบที่หายสาบสูญไป ซึ่งเจ้าหน้าที่ตำรวจได้ชี้ประเด็นการสืบสวนไปในแนวทางฆาตกรรม โดยอาจมีการอำพรางศพ เพื่อเป็นการยืนยันถึงการกระทำผิดดังกล่าวซึ่งสอดคล้องกับแนวทางการสืบสวนว่าอาจมีการโยนศพลงไปในลำห้วย และจากการตรวจสอบลำห้วยได้พบชิ้นส่วนเล็กๆที่มีปริมาณของแคลเซียม และฟอสฟอรัสที่อยู่ภายในร่างกายมนุษย์ (กระดูก) รวมอยู่ด้วย ทั้งนี้เนื่องมาจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี STR นั้นประสบผลล้มเหลว หลักฐานตัวอย่างจึงถูกนำมาตรวจสอบด้วยวิธีการ

วิเคราะห์ลำดับเบสของยีนไซโตโครมบี โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ส่งไปค้นหาฐานข้อมูล Blast บนพื้นฐานของลำดับไซโตโครมบี ที่แสดงในฐานข้อมูลของ Gen bank ผลของการหาข้อมูลนั้นได้ให้รายชื่อของฐานข้อมูลโดยการแบ่งประเภทด้วยการลดลำดับความเหมือนกันไปยังลำดับที่ได้ส่งไป ลำดับของไซโตโครมบีของ *Sus scrofa* (หมู) ได้มีความเหมือนลำดับของงานซึ่งผู้วิจัยได้ทำถึง 100 % จากผลการศึกษาได้อาศัยข้อมูลข้อสงสัยทั้งหมด บนพื้นฐานของหลักฐานที่เก็บได้ซึ่งสามารถระบุได้ว่าเด็กหญิงคนดังกล่าวอาจถูกกินโดยหมูในเล้าดังกล่าว กรณีศึกษาที่ 2 เป็นกรณีศึกษารายงานที่มาจากการพบเจอชิ้นส่วนลำไส้ในป่า การศึกษาทางสรีระวิทยานั้นไม่สามารถค้นหาความจริงว่ามีแหล่งที่มาจากวัตถุทางพันธุกรรมใด โดยห้องปฏิบัติการของผู้วิจัยได้ถูกร้องขอให้ดำเนินการกระบวนการตรวจสอบถึงลักษณะเฉพาะ หลักฐานดังกล่าวนั้นถูกศึกษาในแนวทางเช่นเดียวกับกรณีศึกษาที่ 1 โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี STR นั้นประสบความสำเร็จแล้ว ลำดับนั้นได้ถูกส่งไปค้นหา Blast ผลคือสามารถระบุได้ว่าเป็นลำดับไซโตโครมบีของ *Sus scrofa* (หมู) ถึง 100% จึงสามารถตัดข้อสันนิษฐานก่อนหน้านี้ที่ว่ามีความเป็นไปได้ว่าเป็นลำไส้ของมนุษย์ออกไป (Caine, 2006)

Jain และคณะ (2007) ได้ทำการศึกษการตรวจสอบชนิดเนื้อสัตว์ด้วยวิธีการเช่นเดียวกับ Matsunaga และคณะ (1999) แต่มีบางส่วนที่มีความแตกต่างกัน คือ ได้เพิ่มชนิดของเนื้อสัตว์ที่มีการนำมาตรวจสอบอีก 1 ชนิด คือ กระบือ เมื่อมีการตรวจสอบด้วยการแยกแถบดีเอ็นเอโดยการทำ Agarose gel electrophoresis พบว่า ขนาดของดีเอ็นเอของกระบือปรากฏแถบที่ตำแหน่ง 274 bp ซึ่งตรงกับขนาดดีเอ็นเอของวัว อันเนื่องมาจากการใช้ Reverse primer ชนิดเดียวกันในการตรวจสอบ และลำดับเบสของกระบือในช่วงที่นำมาทดสอบนั้นมีลำดับเบสที่เหมือนกันกับของวัว จึงสรุปได้ว่า ไพรเมอร์ที่มีการออกแบบมาจากยีนไซโตโครม บี มีความจำเพาะกับดีเอ็นเอของสัตว์แต่ละชนิด ทำให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการระบุชนิดของสัตว์ต่างๆ ออกจากกันได้ ถึงแม้ว่าปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้จะมีปริมาณเพียงเล็กน้อย (Jain, 2007)

Karlsson และคณะ (2007) ทำการศึกษาเกี่ยวกับการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมโดยอาศัยการตรวจดีเอ็นเอไมโทคอนเดรีย โดยทำการศึกษาดังกล่าวด้วยสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จำนวน 78 ตัว 28 ชนิด ซึ่งทำการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อของสัตว์ตัวอย่าง แล้วนำผลจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์มาทำการเปรียบเทียบกัน จากนั้นนำไปเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอของมนุษย์ พบว่ามีความแตกต่างกันระหว่างดีเอ็นเอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่นๆ สรุปได้ว่า ดีเอ็นเอไมโทคอนเดรียสามารถแยกมนุษย์ออกจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่นได้ (Karlsson, 2007)

Li-Chin และคณะ (2007) ได้ถูกร้องขอให้เข้าร่วมในการตรวจสอบพยานวัตถุที่ได้จากการกระทำความผิดเกี่ยวกับสัตว์ป่าสงวน จากกระทรวงการเกษตรให้ทำการตรวจสอบและระบุชนิดของ

สัตว์จากวัตถุดิบจำนวน 5 ชิ้น ได้แก่ หนังสือจำนวน 2 ชิ้น อวัยวะสืบพันธุ์ของสัตว์ตัวผู้ อัมตะ และชิ้นเนื้อของสัตว์อีกจำนวน 1 ชิ้น Li-Chin และคณะ ได้ทำการตรวจสอบโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ในการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอในส่วนที่เรียกว่า ไซโตโครม บี ที่สามารถใช้ในการระบุชนิดของสัตว์ ที่ต้องสงสัยได้โดยเป็นการทำเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอถึงสองครั้งเพื่อความแม่นยำมากยิ่งขึ้น โดยการทำ พีซีอาร์ครั้งแรกใช้ไพรเมอร์ที่มีขนาด DNA segment 486 bp และครั้งที่สองใช้ไพรเมอร์ที่มีขนาด DNA segment 251 bp หลังการตรวจสอบพบว่า หนังสือทั้งสองชิ้นนั้นเป็นหนังสือของแมว ส่วนอวัยวะสืบพันธุ์ของสัตว์ตัวผู้ อัมตะ และชิ้นเนื้อของสัตว์อีกจำนวน 1 ชิ้นนั้นเป็นของวัว โดยไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบขึ้นนั้นให้ความแม่นยำในการตรวจไม่ต่ำกว่า 99.7% จากผลดังกล่าว เป็นหลักฐานที่ใช้ยืนยันการกระทำความผิดและช่วยให้สามารถดำเนินการตามกฎหมายเพื่อเอาผิด กับผู้กระทำความผิดเกี่ยวกับการลักลอบล่าสัตว์ป่าได้ (Li-Chin, 2007)

Tanabe และคณะ (2007) ได้ศึกษาการใช้เทคนิคพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบเนื้อหมูในอาหาร และตรวจหาส่วนประกอบที่มาจากหมูซึ่งถูกใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการผลิตอาหาร โดยผู้วิจัยได้ มุ่งทำการทดลองเพื่อหาไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะและเหมาะสมที่สุดในการนำมาวิเคราะห์เนื้อหมู จากยีนไซโตโครม บี จาก 6 คู่ไพรเมอร์จนได้คู่ไพรเมอร์ที่ผู้วิจัยเห็นว่ามีความเหมาะสมที่สุด คือ F(5'-TCTTGCAAATCCTAACAGGCCTG-3') R(5'-TTTGCATGTAGATAGCGAATAAC-3') โดยมีขนาด 130 bp และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบดีเอ็นเอของเนื้อหมู โดยเปรียบเทียบกับวัว ไก่ แกะ ม้า และหมูป่า ซึ่งมีน้ำเป็นตัวควบคุมเชิงลบ และได้ทดลอง ตรวจสอบดีเอ็นเอของหมูภายในชิ้นเนื้อหมูที่ถูกทำด้วยความร้อน ผู้วิจัยทำการทดสอบด้วยการนำ เนื้อหมูมาต้ม , ใช้ความร้อน , อบ และทอด ผลที่ได้รับคือปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาด 130 bp ได้อย่างชัดเจนปรากฏเฉพาะช่องที่เป็นหมูและหมูป่าเท่านั้น จึงเป็นการยืนยันได้ว่าการใช้ความร้อน นั้นไม่ส่งผลกระทบต่อวิธีนี้ และคณะผู้วิจัยยังได้ทำการทดสอบความไวของวิธีการโดยผสม ตัวอย่างดีเอ็นเอจากข้าวสาลี(10 ng/ μ l) ผสมกับตัวอย่างดีเอ็นเอของหมูโดยเจือจางที่ 0, 10 fg/ μ l, 100 fg/ μ l, 1 pg/ μ l, 10 pg/ μ l, 100 pg/ μ l, 1 ng/ μ l, และ 10 ng/ μ l ตามลำดับ ผลที่ได้รับคือสามารถ ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาด 130 bp ได้ที่การเจือจางระดับ 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, และ 1 pg ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงได้ทำการทดลองเพื่อศึกษาถึงประสิทธิภาพของวิธีที่ถูกพัฒนาขึ้นมาแล้ว โดยนำมาใช้กับรูปแบบการผลิตอาหารสำเร็จรูป คือ เกี้ยวซ่า (ไส้หมูกับผัก) โดยนำเกี้ยวซ่ามาหั่น เป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นเติมน้ำลงไปและทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน(10% homogenate)แล้วจึงทำการ เจือจาง Homogenate 10 % ในน้ำกลั่น ให้ได้ระดับ 1 % , 1000 ppm , 100 ppm , 10 ppm, 1 ppm, 100 ppb , 10 ppb, และ 1 ppb homogenates. และทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์คู่ F2/R1 ผลที่ได้รับคือ ปรากฏแถบดีเอ็นเอของหมูในเกี้ยวซ่าในระดับที่สูงกว่า 100 ppb (Tanabe, 2007)