

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ได้เข้ามามีบทบาทในการทำประโยชน์กับงานหลายๆ ด้าน อาทิเช่น ด้านการแพทย์เพื่อการวินิจฉัยโรค อุตสาหกรรม และสิ่งแวดล้อมเพื่อการเกษตรกรรมเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ รวมไปถึงการตรวจดีเอ็นเอทางนิติวิทยาศาสตร์ เรามักจะคุ้นเคยกับคำว่า ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ซึ่งเป็นสิ่งที่ใช้บ่งบอกลักษณะจำเพาะของแต่ละบุคคล พัฒนาค้นใช้ครั้งแรกโดย ศาสตราจารย์ Alec Jeffreys ในปี ค.ศ. 1985 และพบว่าลายพิมพ์ ดีเอ็นเอ จะเป็นเอกลักษณ์ของแต่ละบุคคล โอกาสที่คนสองคนจะมีดีเอ็นเอเหมือนกันมีค่าเท่ากับ 1 ใน 9,340 ล้าน ซึ่งมีค่าสูงกว่าจำนวนประชากรในโลกนี้ (สุรินทร์, 2552) งานนิติวิทยาศาสตร์นำลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาใช้ประโยชน์ในการตรวจหาความสัมพันธ์ของบุคคลว่าเป็น พ่อ แม่ ลูกกันจริงหรือไม่ อีกทั้งยังช่วยในการหาตัวผู้กระทำความผิดจากวัตถุพยานทางชีวภาพที่คนร้ายได้ทิ้งเอาไว้ในที่เกิดเหตุ และเรามักจะพบว่าวัตถุพยานชีวภาพที่คนร้ายได้ทิ้งไว้ในที่เกิดเหตุนั้นมีปริมาณที่น้อยมากซึ่งอาจทำให้ยากต่อการตรวจพิสูจน์ ด้วยเหตุนี้ จึงมีการนำเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์เข้ามาช่วยเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจำเพาะส่วนก่อนโดยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) พัฒนาค้นในปี ค.ศ. 1986 โดย Kary Mullis สามารถเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอเฉพาะส่วนที่ต้องการ เป็นจำนวนมากภายในระยะเวลาอันสั้นในหลอดแก้ว (In vitro) (หัตยา, 2549) ทำให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจำนวนมาก เพื่อง่ายต่อการตรวจสอบ

สารพันธุกรรม หรือ ดีเอ็นเอ (Deoxyribonucleic acid: DNA) เป็นกรดนิวคลีอิก (Nucleic acid) ที่ทำหน้าที่เก็บข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต ดีเอ็นเอส่วนใหญ่อยู่ในรูปโครโมโซม (Chromosome) วางตัวอยู่ในส่วนนิวเคลียสภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ดีเอ็นเอประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เรียกว่า นิวคลีโอไทด์ (Nucleotide) ซึ่งเป็นสารประกอบไนโตรจีนัสเบส (Nitrogenous base) แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มพิวรีนเบส (Purine) ได้แก่ ไทมีน (Thymine: T) ไซโทซีน (Cytosine: C) และกลุ่มไพริมิดีนเบส (Pyrimidine) ได้แก่ อะดีนีน (Adenine: A)

กวีนีน (Guanine: G) โดยสารประกอบในไตรจีนัสเบสนี้จะรวมตัวกับน้ำตาลดีออกซีไรโบส (Deoxyribose sugar) และกรดฟอสฟอริก (Phosphoric acid) เป็นนิวคลีโอไทด์อยู่ในดีเอ็นเอ การเรียงลำดับของนิวคลีโอไทด์ ทั้ง 4 ชนิด ส่งผลต่อการเกิดความหลากหลาย และสร้างความแตกต่างในลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอ ซึ่งจะมีความจำเพาะในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด

ดีเอ็นเอไมโทคอนเดรีย (Mitochondrial DNA หรือ mtDNA) เป็นดีเอ็นเอที่อยู่ในโครงสร้างที่เรียกว่า ไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) ซึ่งเป็นออร์แกเนลล์ที่ทำหน้าที่ในการหายใจ และเป็นแหล่งพลังงานของเซลล์ โดยทำหน้าที่เปลี่ยนพลังงานจากอาหารให้อยู่ในรูปที่เซลล์สามารถนำไปใช้ภายในเซลล์ได้ พบในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตจำพวกยูคาริโอติก (Eukariotic) ทั้งพืชและสัตว์ โดยไมโทคอนเดรียมีดีเอ็นเอของตัวเอง มีการจำลองโมเลกุลดีเอ็นเอและสังเคราะห์โปรตีนได้เอง จีโนมในไมโทคอนเดรียของสัตว์มีขนาดค่อนข้างเล็ก ประมาณ 16-20 กิโลเบส เช่นของมนุษย์ 16,569 คู่เบส พืชมี 40-2,500 กิโลเบส ซึ่งมีขนาดค่อนข้างใหญ่และมีความแตกต่างกันมาก จำนวนไมโทคอนเดรียในเซลล์จะมีปริมาณแตกต่างกันขึ้นกับชนิดและกิจกรรมของเซลล์ โดยแต่ละเซลล์อาจมีจำนวนไมโทคอนเดรียตั้งแต่หลายร้อยจนถึงจำนวนเป็นหลักพัน และในไมโทคอนเดรียแต่ละอันจะมีดีเอ็นเอ 5-10 โมเลกุล รวมจำนวนดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรียอาจมีหลายพัน โมเลกุลต่อเซลล์ คิดเป็นประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ของดีเอ็นเอทั้งหมดในเซลล์ (สุรินทร์, 2552) ทั้งนี้ดีเอ็นเอไมโทคอนเดรียมีที่มาจากการสืบทอดจากบรรพบุรุษ ซึ่งปกติแล้วอาศัยของเมนเดล คือมาจากพ่อและแม่ แต่เนื่องจากเป็นดีเอ็นเอที่อยู่ในส่วนของไมโทคอนเดรียในไซโตพลาซึม เซลล์สืบพันธุ์ของพ่อซึ่งอยู่ในรูปของอสุจินั้นเอาเฉพาะส่วนหัวของอสุจิซึ่งมีนิวเคลียสอยู่เข้าไปผสมกับไข่ของเพศแม่ แต่สัดเอาส่วนที่เหลือซึ่งมีไมโทคอนเดรียอยู่เป็นจำนวนมากออกไป ดังนั้น เซลล์ของลูกที่ได้จึงมีแต่ไมโทคอนเดรียที่ได้จากแม่เท่านั้น การถ่ายทอดจากบรรพบุรุษสู่ลูกหลานจึงไม่เป็นไปตามกฎของเมนเดล (Non-Mendelian inheritance) แต่เป็นการถ่ายทอดลักษณะจากเพศแม่เท่านั้น (Maternal inheritance) (ตรีทิพย์, 2552)

ไซโตโครม บี (Cytochrome b) เป็นหนึ่งในไซโตโครม (Cytochromes) ที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งอิเล็กตรอนในโซ่การหายใจของไมโทคอนเดรีย โดยไซโตโครมมีหลายชนิดใช้ตัวอักษรเป็นชื่อชนิดของไซโตโครม เช่น ไซโตโครมเอ ไซโตโครมบี หรือไซโตโครมซี เป็นต้น ไซโตโครมจะรับและส่งอิเล็กตรอนจากไซโตโครมหนึ่งไปยังอีกไซโตโครมหนึ่งจนถึงออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายและไม่ส่งต่ออิเล็กตรอนให้แก่สารตัวใด ออกซิเจนที่ได้รับอิเล็กตรอนจะรวมกับโปรตอนที่มีอยู่ในสารละลายภายในไมโทคอนเดรีย กลายเป็นน้ำ ดีเอ็นเอที่อยู่ในส่วนของยีนไซโตโครมบีเป็นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กและพบอยู่ในสัตว์ทุกชนิด แต่มีการสร้างโปรตีนที่มีความจำเพาะสำหรับสัตว์แต่ละชนิด จึงมีการนำเอาดีเอ็นเอในส่วนของยีน ไซโตโครม บี มาใช้ในการตรวจสอบเพื่อระบุชนิดในสัตว์ (Species identification) เนื่องจากลำดับเบสของยีนไซโตโครม

ปีของสัตว์จะค่อนข้างอนุรักษ์ จึงสามารถออกแบบไพรเมอร์ (Primer) สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ส่วนดังกล่าวด้วยวิธี พีซีอาร์ ซึ่งมีรายงานการเพิ่มปริมาณส่วนของยีนไซโตโครมบีในสัตว์ได้ถึง 221 ชนิด เมื่อนำส่วนที่เพิ่มปริมาณได้มาหาลำดับเบส จะมีลำดับเบสที่แตกต่างกันไปตามชนิด (Species specific) (สุรินทร์, 2552) ด้วยเหตุนี้ จึงได้มีการนำประโยชน์จากดีเอ็นเอบนยีนไซโตโครม บีในไมโทคอนเดรียมาประยุกต์ใช้ในการระบุชนิดของสัตว์ หรือแม้แต่การระบุว่าเป็นมนุษย์ โดยดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียยังสามารถใช้ได้ดีในกรณีของตัวอย่างที่มีอายุยาวนาน เช่น ผม หรือ ขน โบราณวัตถุ ซึ่งมักจะไม่มีดีเอ็นเอในนิวเคลียสเหลือเพียงพอที่จะตรวจสอบได้ แต่ทั้งนี้การระบุสารพันธุกรรมด้วยการวิเคราะห์ยีนไซโตโครมบีในไมโทคอนเดรียสามารถใช้กับการระบุคุณลักษณะทั่วไป หรือการระบุกลุ่มชั้น (Class characteristics) ของสิ่งมีชีวิตเท่านั้น กล่าวคือ ใช้ระบุชนิดหรือประเภทของสิ่งมีชีวิต หรือ ของสิ่งนั้นๆ เช่น เป็นไก่ หรือเป็นมนุษย์ เป็นต้น แต่ไม่สามารถระบุถึงคุณลักษณะเฉพาะ (Individual characteristics) ซึ่งบ่งบอกถึงความเป็นเอกลักษณ์ (Identity) ของสิ่งๆ นั้นได้ว่าไม่ใช่สิ่งอื่นแต่เป็นสิ่งนั้นสิ่งเดียวอันเดียว ดังนั้นเพื่อประโยชน์ซึ่งมุ่งถึงการตรวจวิเคราะห์ในการนำไประบุชนิดของสัตว์ เช่น เป็นสุกรหรือไม่ ไม่ได้มุ่งหาคำตอบว่าเป็นสุกรตัวนี้หรือไม่นั้น การตรวจวิเคราะห์จากดีเอ็นเอบนไซโตโครมบีในไมโทคอนเดรียจึงเป็นการเพียงพอแล้ว

การระบุสารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอของสัตว์ด้วยยีนไซโตโครมบีในไมโทคอนเดรีย สามารถนำไปปรับใช้ในทางนิติวิทยาศาสตร์กรณีที่มีข้อพิพาททางกฎหมายเกิดขึ้นในคดีที่เกี่ยวข้องกับสัตว์ เช่น กรณีที่มีการกล่าวอ้างว่าเลือดที่พบในที่เกิดเหตุเป็นของสัตว์ และในกรณีที่มีการลักลอบล่าสัตว์ป่า เป็นต้น ซึ่งกรณีต่างๆ ที่กล่าวมานี้ล้วนจำเป็นต้องมีหลักฐานยืนยันในการกระทำความผิด โดยเฉพาะวัตถุพยานนั้นเป็นเพียงเศษชิ้นส่วนใดชิ้นส่วนหนึ่งที่ไม่สามารถระบุชนิดของสัตว์นั้นได้ด้วยวิธีทางกายภาพหรือด้วยวิธีการทางชีวเคมี เช่น เศษชิ้นเนื้อ เศษผิวหนัง เศษกระดูก เป็นต้น

ปัญหาสำคัญของการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์จากวัตถุพยานทางชีวภาพอย่างหนึ่ง คือ ตัวอย่างที่ได้มามักจะอยู่ในสภาวะที่กำหนดไม่ได้ บางครั้งอาจมีปริมาณเพียงเล็กน้อย บางครั้งอาจมีสิ่งเจือปนหรือมาจากคนหลายคนปนกันอยู่ บางครั้งอยู่ในสภาพที่เสื่อมสลายอย่างมาก ทำให้ตัวอย่างมีปริมาณดีเอ็นเอน้อยหรืออาจมีสภาพที่ไม่สมบูรณ์ ดังนั้นจึงต้องนำตัวอย่างมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) เทคนิคนี้สามารถเพิ่มขยายดีเอ็นเอให้มีจำนวนมากขึ้นกว่าเดิมหลายล้านเท่า โดยการเพิ่มปริมาณยีนที่สนใจในหลอดทดลอง จึงเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า In vitro enzymatic gene amplification วิธีนี้มีประโยชน์ในการตรวจหาชิ้นส่วนหรือเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการในสิ่งส่งตรวจ ค้นพบครั้งแรกโดย Kary Mullis และคณะ ในปี 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 ต้องอาศัยปฏิกิริยาที่ต่อเนื่องหลายรอบ ซึ่งแต่ละรอบจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

1. ขั้นตอน Denaturation
2. ขั้นตอน Primer annealing
3. ขั้นตอน Primer extension

ในกระบวนการ พีซีอาร์ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ 2 เส้นจะจับกับเส้นดีเอ็นเอต้นแบบในตำแหน่งที่ห่างจากกัน ถึงบริเวณหัวและท้ายของช่วงดีเอ็นเอที่ต้องการจะสร้างขึ้นใหม่ ไพรเมอร์ไฮบริดส์เข้ากับสายตรงข้าม และเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ ทำให้เดิมช่องว่างระหว่างไพรเมอร์ให้เต็มบริเวณที่อยู่ระหว่างไพรเมอร์ทั้งสองจะเพิ่มเป็นสองเท่าในแต่ละรอบของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ หลอดปฏิกิริยาจะถูกปรับเปลี่ยนอุณหภูมิในเครื่องปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ (Thermal cycler) ในการสังเคราะห์ 10 รอบ ดีเอ็นเอจะถูกขยาย $2^{10} = 1024$ เท่า 20 รอบประมาณล้านเท่า และ 30 รอบประมาณพันล้านเท่า ในทางทฤษฎี ดีเอ็นเอที่ปริมาณเป็นนาโนแกรมสามารถขยายให้ดีเอ็นเอเป็นกรัมได้โดยใช้ พีซีอาร์ 30 รอบ ด้วยกระบวนการอัตโนมัติ จึงทำให้ปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นในเวลาไม่กี่ชั่วโมง พีซีอาร์ มีประโยชน์อย่างมากในการทำสำเนาพันธุกรรมหรือการโคลนนิ่งดีเอ็นเอ เพราะทำการเพิ่มจำนวนขึ้นก่อนที่จะโคลนนิ่ง พีซีอาร์ ทำให้ได้ลำดับเบสดีเอ็นเอจำเพาะปริมาณมากที่จะใช้เป็นต้นแบบ พีซีอาร์ สามารถถูกใช้เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอแม้มีอยู่ในตัวอย่างในปริมาณเพียงเล็กน้อย พีซีอาร์ สามารถประยุกต์ใช้ตรวจไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอซึ่งใช้ระบุเอกลักษณ์บุคคลและพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดซึ่งสามารถตรวจได้จากตัวอย่างดีเอ็นเอแม้มีปริมาณเพียงเล็กน้อย (อุไรวรรณ, 2545)

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อหา primer และสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ ในการตรวจยืนยัน ลักษณะ ดีเอ็นเอ ของมนุษย์และสุกรในคราวเดียวกันโดยใช้ Mitochondrial DNA ในส่วนของยีน Cytochrome *b*

สมมติฐานของการศึกษา

หลังจากทำการศึกษาจะได้ primer และสภาวะที่เหมาะสม ที่มีความจำเพาะเจาะจงและมีประสิทธิภาพสำหรับการระบุสารพันธุกรรมของมนุษย์และสุกรในคราวเดียวกันได้ ด้วยการวิเคราะห์ฮัยโซโตโครมบีในไมโทคอนเดรีย

ขอบเขตการวิจัย

ขอบเขตประชากร

- ตัวอย่างดีเอ็นเอของของสุกรและตัวอย่างดีเอ็นเอของมนุษย์จำนวนอย่างละ 45

ตัวอย่าง

- ตัวอย่างดีเอ็นเอของ ไก่ วัว สุนัข และปลา จำนวนชนิดละ 12 ตัวอย่าง

นิยามศัพท์เฉพาะ

Cytochrome *b* gene หมายถึง ยีนที่อยู่ในโครงสร้างของเซลล์ที่เรียกว่า ไมโทคอนเดรีย ทำหน้าที่เกี่ยวกับห่วงโซ่การหายใจภายในเซลล์

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

Agarose gel electrophoresis หมายถึง เทคนิคที่ใช้แยกสาร วิเคราะห์ และเตรียมสารที่มีประจุไฟฟ้า เช่น กรดอะมิโน โปรตีน และ กรดนิวคลีอิกให้บริสุทธิ์บนวุ้นอะกาโรส โดยอาศัยหลักการที่ว่า เมื่อให้สนามไฟฟ้า สารที่มีประจุไฟฟ้าจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วที่ตรงข้ามกันด้วย อัตราเร็วในการเคลื่อนที่ ซึ่งขึ้นกับปริมาณประจุสุทธิบนโมเลกุลของสาร รูปร่างและขนาดของโมเลกุลของสารนั้น

Base pair (bp) หมายถึง คู่เบส เป็นการจับคู่เบส A กับ T และ G กับ C ในดีเอ็นเอเกลียวคู่ การจับคู่อาจเกิดขึ้นได้ในอาร์เอ็นเอในบางสถานการณ์