

บทที่ 2

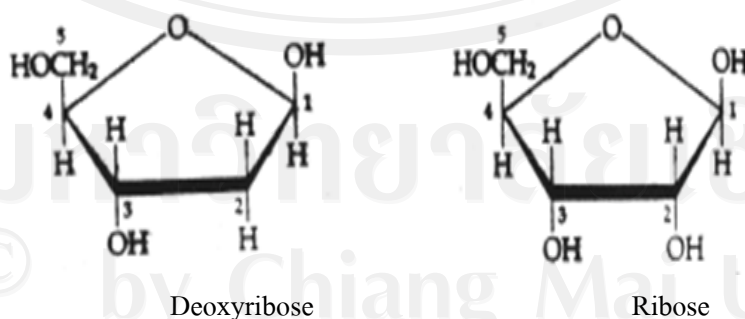
บททวนเอกสาร

สารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอเป็นชีวโมเลกุลพื้นฐานของสิ่งมีชีวิต ที่ใช้เป็นรหัสสำหรับการสร้างโปรตีนที่จำเป็นสำหรับการดำรงชีวิต ลักษณะต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิตที่แสดงออกมาเกิดจากการถอดรหัสของดีเอ็นเอในตำแหน่งต่าง ๆ ของแผนยีน (Genome) ของสิ่งมีชีวิตนั้น ทำให้สิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ดำรงชีพได้อย่างเป็นระบบ และอีกนัยหนึ่งทำให้ระบบต่างๆ ของสิ่งมีชีวิตทั้งหลายมีความสามารถในการดำรงชีพที่มีความแตกต่างกันในรายละเอียด แต่ยังคงมีกระบวนการและหลักการของระบบต่างๆ ไปในทำนองเดียวกัน หน่วยพื้นฐานทางพันธุกรรมที่ถูกถอดรหัสสำหรับการสร้างโปรตีนเรียกว่า ยีน (Genes) ซึ่งประมาณกันว่าในแผนยีนของมนุษย์มีประมาณ 50,000-100,000 ยีน ยีนหนึ่งอาจมีความยาวของลำดับเบสได้ตั้งแต่ 1,000 เบสไปจนถึงมากกว่า 2,000,000 เบส อย่างไรก็ตามเมื่อเทียบกับแผนยีนของมนุษย์ที่มีลำดับเบสทั้งหมดประมาณ 3,000 ล้านเบสแล้วส่วนที่ถูกถอดรหัสออกมาจะมีเพียงประมาณ 5-10 % เท่านั้น (ธานินทร์, 2538)

ดีเอ็นเอจัดเป็นสารประกอบประเภทหนึ่งของกรดนิวคลีอิก (Nucleic acid) ซึ่งมีทั้งหมด 2 ชนิดคือ ดีเอ็นเอ (DNA) และอาร์เอ็นเอ (RNA) ดีเอ็นเอเป็นชื่อย่อมาจากคำเต็มว่า ไดออกซีไรโบนิวคลีอิก แอซิด (Deoxyribonucleic acid; DNA) ประกอบด้วยพอลิเมอร์ของนิวคลีโอไทด์สองสาย (Double-strand) มาพันกันเป็นเกลียวอิลิกซ์ โดยนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอประกอบด้วยน้ำตาลเพนโทสชนิดไดออกซีไรโบส (Deoxyribose) กรดฟอสฟอริก (Phosphoric acid) และไนโตรจีนัสเบส (Nitrogenous base) ชนิดเพียวรีน คือ เบสอะดีนีน (Adenine) และเบสกวีนีน (Guanine) ชนิดไพริมิดีน คือ เบสไทมีน (Thymine) และเบสไซโทซีน (Cytosine) ในขณะที่อาร์เอ็นเอเป็นชื่อย่อมาจากคำเต็มว่า ไรโบนิวคลีอิก แอซิด (Ribonucleic acid; RNA) ประกอบด้วย พอลินิวคลีโอไทด์สายเดี่ยว (Single-strand) นิวคลีโอไทด์ของอาร์เอ็นเอประกอบด้วย น้ำตาลไรโบส (Ribose) กรดฟอสฟอริก (Phosphoric acid) และไนโตรจีนัสเบสชนิดเพียวรีน คือ เบสอะดีนีน (Adenine) และเบสกวีนีน (Guanine) ชนิดไพริมิดีน คือ เบสยูราซิล (Uracil) และเบสไซโทซีน (Cytosine) โดยทั่วไปดีเอ็นเอเป็นแหล่งเก็บข้อมูลทางพันธุกรรมของสัตว์ชั้นต่ำและสัตว์ชั้นสูง และมีการถ่ายทอดข้อมูลออกไปให้อยู่ในรูปของอาร์เอ็นเอ ด้วย

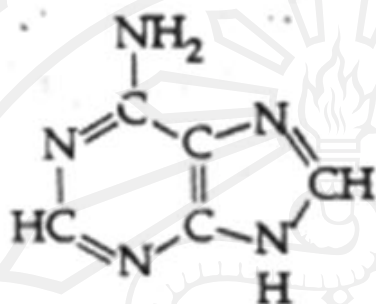
กระบวนการถอดรหัส (Transcription) ซึ่งจะมีกระบวนการแปลรหัส (Translation) จากอาร์เอ็นเอ เป็นโปรตีนสำหรับทำหน้าที่ต่างๆ อีกทีหนึ่ง สารพันธุกรรมเหล่านี้ถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรมให้อยู่ในรูปโปรตีน ซึ่งมีอิทธิพลอย่างมากต่อการเจริญ และการควบคุมลักษณะของสิ่งมีชีวิต นอกจากนี้สารพันธุกรรมเหล่านี้ยังมีความสามารถในการจำลองตัวเองด้วยวิธีการต่างๆ เป็นการรักษาเผ่าพันธุ์และสืบทอดข้อมูลเหล่านี้ไปยังลูกหลาน (ตรีทิพย์, 2552)

เกลียวอีตริกซ์ของดีเอ็นเอ (Double-stranded DNA) มีโครงสร้างทางเคมีเป็นพอลิเมอร์ของนิวคลีโอไทด์สองสายมาพันกันเป็นเกลียว โดยทั่วไปจะเป็นเกลียวเวียนขวา (Right-handed Helix) พอลิเมอร์นิวคลีโอไทด์แต่ละสายประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์เป็นหน่วยย่อยเรียงต่อกันด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ มีปลาย 5'-phosphate และ 3'-OH โดยนิวคลีโอไทด์ทั้งสองสายเรียงตัวกันในทิศทางตรงกันข้าม (Antiparallel) สายหนึ่งเรียงตัวจาก 5'-phosphate ไปยัง 3'-OH อีกสายหนึ่งเรียงจาก 3'-OH ไปยัง 5'-phosphate แกนของของทั้งสองสายเป็นส่วนของน้ำตาลเพนโทสต่อกับหมู่ฟอสเฟตด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ ส่วนเบสไนโตรเจนจะยื่นเข้าหากันโดยมีพันธะไฮโดรเจนยึดอยู่ระหว่างเบสที่จำเพาะคือ อะดีนีนจะจับคู่กับไทมีนด้วยพันธะไฮโดรเจนสองพันธะ (A-T base pair) กัวนีนจะจับคู่กับไซโทซีนด้วยพันธะไฮโดรเจนสามพันธะ (G-C base pair) จึงแข็งแรงกว่าคู่เบสอะดีนีนกับเบสไทมีน การจับตัวของเบสในลักษณะนี้ ทำให้ได้โครงสร้างดีเอ็นเอที่บิดเป็นเกลียวอีตริกซ์ เนื่องจากการจัดตัวของอะตอมในโมเลกุลของเบสแต่ละตัวมีโครงสร้างที่แน่นอน และเมื่อจับคู่กับเบสอีกชนิดหนึ่งจึงทำให้เกิดการบิดตัวของโมเลกุลของดีเอ็นเอ สำหรับตัวเบสไนโตรเจนเป็น Heterocyclic nitrogenous base จะเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบสที่อยู่ซ้อนกันในแต่ละสาย (Stacking base) ดังนั้น พันธะไฮโดรเจนและพันธะไฮโดรโฟบิกจึงเป็นพันธะหลักที่ช่วยให้เกลียวอีตริกซ์ของดีเอ็นเอคงรูปอยู่ได้

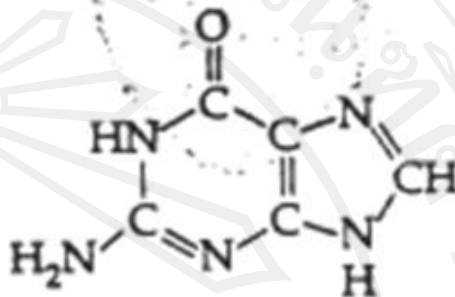


ภาพ 1 โครงสร้างทางเคมีของน้ำตาลเพนโทสที่เป็นองค์ประกอบในดีเอ็นเอคือ ดีออกซีไรโบส (Deoxyribose) และในอาร์เอ็นเอคือไรโบส (Ribose)

Purine

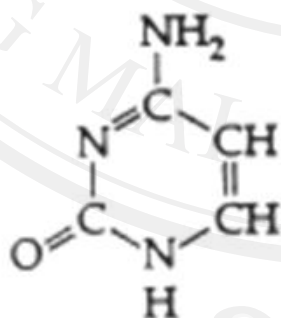


Adenine (A)

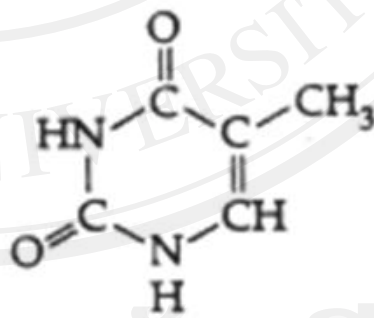


Guanine (G)

Pyrimidine

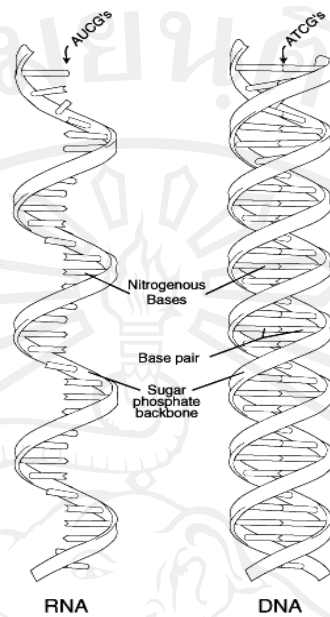


Cytosine (C)



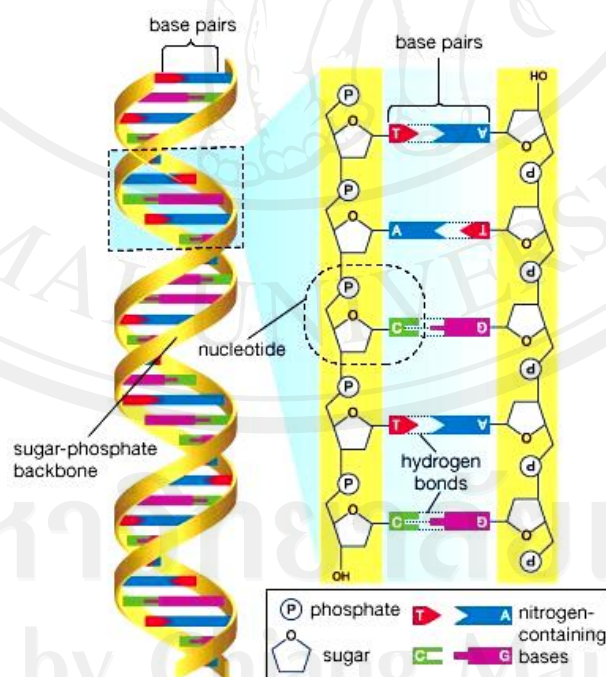
Thymine (T)

ภาพ 2 โครงสร้างทางเคมีของไนโตรจีนัสเบส ชนิดเพียวรีนและไพริมิดีน



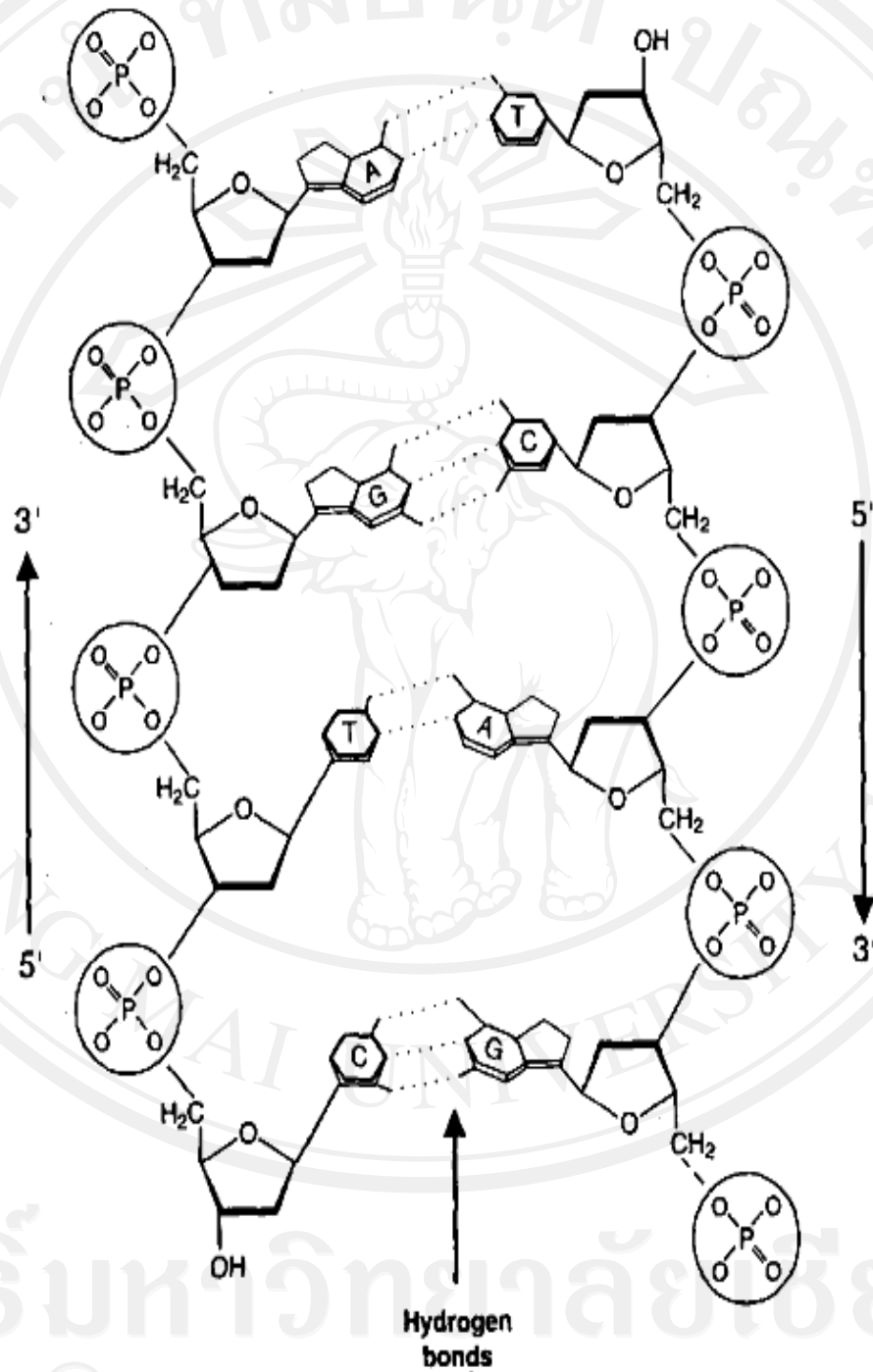
ภาพ 3 ลักษณะพอลินิวคลีโอไทด์สายเดี่ยวของ RNA และพอลินิวคลีโอไทด์สายคู่ของ DNA

ที่มา: <http://www.accessexcellence.org>



ภาพ 4 โครงสร้างเกลียวสีลิคซ์ของดีเอ็นเอ แสดงพันธะไฮโดรเจนระหว่างคู่เบส (AT หรือ GC)

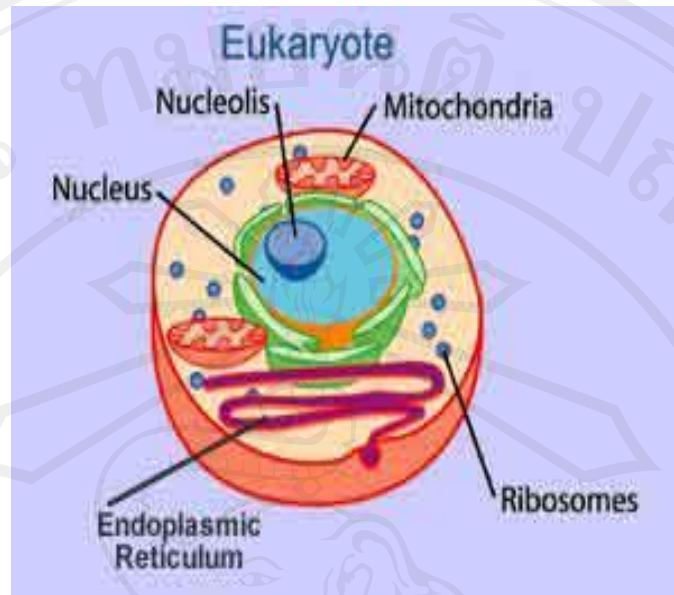
ที่มา: <http://www.biogang.com/images/dnastructure2.jpg>



ภาพ 5 การจัดตัวของสายพอลินิวคลีโอไทด์สองสายของดีเอ็นเอเป็นทิศทางตรงกันข้าม

ที่มา: http://upload.vipulg.com/Zoology/759/Chapter4_files/Chapter4-42.png

อย่างไรก็ตาม แม้ว่าดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตของสัตว์ชั้นสูง (Eukaryotic cell) และของสัตว์ชั้นต่ำ (Prokaryotic cell) ต่างมีหน้าที่หลักในการจำลองตัวเองและการถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรมให้ได้ โปรตีนที่ทำหน้าที่ต่างๆ ทำนองเดียวกัน แต่ดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตทั้งสองกลุ่มมีลักษณะและกลไกการทำงานแตกต่างกัน สัตว์ชั้นต่ำเช่นแบคทีเรียไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส (Nuclear membrane) ดีเอ็นเอในเซลล์ของสัตว์ชั้นต่ำจึงอยู่ร่วมกับออร์แกเนลล์อื่นๆ ในไซโทพลาซึม โดยดีเอ็นเอมีลักษณะเป็นวงกลมประกอบด้วย พอลินิวคลีโอไทด์สองสายพันกันเป็นเกลียวต่อเนื่องกัน ไม่มีปลายเปิด อยู่ในลักษณะเดี่ยว เรียกว่า แฮพลอยด์ (Haploid) (มีโครโมโซม 1 ชุด) ส่วนสัตว์ชั้นสูงเช่นพืชหรือสัตว์นั้นมีเยื่อหุ้มนิวเคลียส มีดีเอ็นเอหลักอยู่ภายในนิวเคลียส ลักษณะดีเอ็นเอภายในนิวเคลียสจะเป็นเส้นตรง ภายในประกอบด้วยพอลินิวคลีโอไทด์สองสายพันกันเป็นเกลียวและมีปลายเปิดที่หัวท้าย อยู่ในลักษณะเป็นคู่เรียกว่า ดิพลอยด์ (Diploid) (มีโครโมโซม 2 ชุด) เป็นที่น่าสนใจว่า นอกจากมีดีเอ็นเอในนิวเคลียสแล้วยังมีดีเอ็นเอที่อยู่ภายนอกนิวเคลียส ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่พบในไซโทพลาซึม พบในออร์แกเนลล์บางชนิดเท่านั้น เช่น ในไมโทคอนเดรียและในคลอโรพลาสต์ ดีเอ็นเอภายนอกนิวเคลียสนี้จะมีลักษณะเป็นวงกลม คล้ายกับดีเอ็นเอที่พบในแบคทีเรียหรือพลาสมิดของแบคทีเรีย จัดเป็นสายเปลือยดีเอ็นเอ คือมีพอลินิวคลีโอไทด์สองสายพันกันเป็นเกลียวอีลิคซ์ (circular double-stranded DNA) แต่ไม่มีการพันล้อมรอบฮิสโตนเช่นเดียวกับดีเอ็นเอภายในนิวเคลียส โดยพืชมีดีเอ็นเออยู่ในคลอโรพลาสต์ (Chloroplast) ส่วนสัตว์มีดีเอ็นเออยู่ในไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) ดีเอ็นเอในไซโทพลาซึมนั้นมีลักษณะต่างจากดีเอ็นเอในนิวเคลียสแต่คล้ายคลึงกับดีเอ็นเอของสัตว์ชั้นต่ำ นั่นคือเป็นเกลียวอีลิคซ์ที่เป็นวงกลมปลายปิด ซึ่งมีกระบวนการจำลองตัวเองและถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรมเป็นอิสระจากกระบวนการของดีเอ็นเอในนิวเคลียส แต่ผลผลิตที่ได้ระหว่างดีเอ็นเอในนิวเคลียสและดีเอ็นเอในไซโทพลาซึมทำหน้าที่ร่วมกันคือ ทำให้สิ่งมีชีวิตนั้นๆ สามารถใช้ชีวิตได้อย่างมีประสิทธิภาพและเป็นปกติ (ตรีทิพย์, 2552)



ภาพ 6 องค์ประกอบภายในเซลล์ยูแคริโอต

ที่มา <http://th.wikipedia.org/>

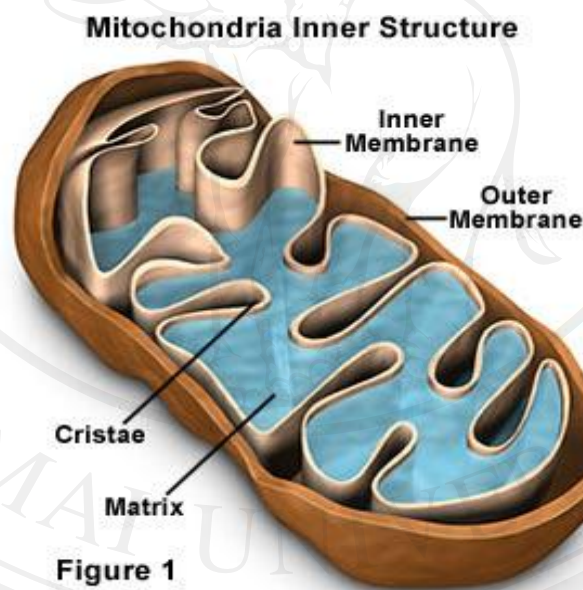
ไมโทคอนเดรีย เป็นออร์แกเนลล์ที่ทำหน้าที่ในการหายใจ และเป็นแหล่งพลังงานของเซลล์ พบในสิ่งมีชีวิตพวกยูแคริโอตที่หายใจแบบใช้ออกซิเจนทั้งพืชและสัตว์ พบครั้งแรกโดย คอลลิคเกอร์ (Kolliker) ไมโทคอนเดรียมีรูปร่างกลม ท่อนสั้น ท่อนยาว หรือกลมรีคล้ายรูปไข่ โดยทั่วไปมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2–1 ไมครอน และยาว 5-7 ไมครอน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

โครงสร้างของไมโทคอนเดรีย มีเยื่อหุ้ม 2 ชั้น ดังนี้

1. เยื่อหุ้มชั้นนอก (Outer membrane) มีลักษณะเรียบหน้าที่คอยควบคุมการผ่านเข้าออก ของสาร
2. เยื่อหุ้มชั้นใน (Inner membrane) มีลักษณะหยักไปมาคล้ายวิลลัสในลำไส้คน เรียกว่า คริสตา (Crista) ที่เยื่อชั้นในมีโครงสร้างเล็กๆ ลักษณะเป็นเม็ดกลมๆ เรียกว่า

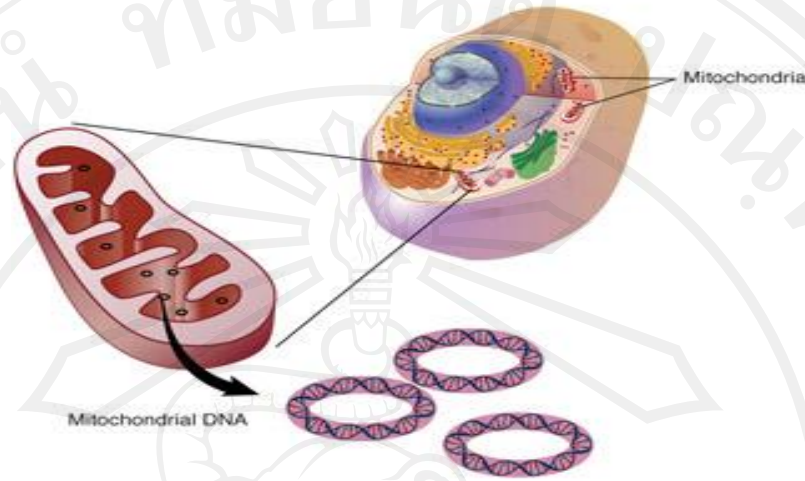
Inner membrane particle ติดอยู่เต็มไปหมด โครงสร้างเล็กๆ มีหน้าที่เป็นแหล่งเก็บสารที่เป็นตัวรับไฮโดรเจนและตัวรับอิเล็กตรอน

ปริมาณของไมโทคอนเดรียในแต่ละเซลล์จะต่างกันตั้งแต่ไม่มีไมโทคอนเดรียเลย จนมีมากกว่า 2,000 อัน เซลล์ที่ต้องการพลังงานสูงหรือมีเมแทบอลิซึมสูงจะมีไมโทคอนเดรียมาก เช่น เซลล์สมอง เซลล์กล้ามเนื้อ และเซลล์หัวใจ เนื่องจากไมโทคอนเดรียเป็นแหล่งของการสร้างพลังงานในรูปแบบของเอทีพี เซลล์ที่ไม่มีไมโทคอนเดรียเลยได้แก่ เซลล์เม็ดเลือดแดงที่โตเต็มวัย โดยทั่วไปไมโทคอนเดรียมีลักษณะเป็นวงรีรูปไข่ แต่อาจมีลักษณะแตกต่างกันออกไปได้ เช่น เซลล์สมองมีไมโทคอนเดรียลักษณะเป็นทรงกลม เซลล์หัวใจมีไมโทคอนเดรียลักษณะเป็นทรงกระบอกเป็นต้น



ภาพ 7 โครงสร้างภายในของไมโทคอนเดรีย

ที่มา : www.cartage.org.lb



ภาพ 8 แสดงลักษณะดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย

ที่มา : <http://ocw.mit.edu>

ทั้งนี้ในไมโทคอนเดรียพบว่ามีดีเอ็นเอเป็นของตัวเอง มีการจำลองโมเลกุลดีเอ็นเอและสังเคราะห์โปรตีนได้เอง โครงสร้างของจีโนมในไมโทคอนเดรียของสิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นวงกลมประกอบไปด้วยพอลินิวคลีโอไทด์สองสายพันกันเป็นเกลียวคู่แบบวงแหวน (Circular double-stranded DNA) ไม่มีการพันล้อมรอบฮิสโตนเหมือนดีเอ็นเอในนิวเคลียส ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียมีขนาดเล็ก เช่นในสัตว์มีขนาดประมาณ 16,000-20,000 คู่เบส ส่วนพืชนั้นมีดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรียใหญ่มากคือประมาณ 100 กิโลเบส ของมนุษย์มีความยาว 16,569 คู่เบสเมื่อเทียบกับดีเอ็นเอในนิวเคลียสของมนุษย์มีความยาวประมาณ 3,000 ล้านเบส และในหนึ่งไมโทคอนเดรียจะมีดีเอ็นเอประมาณ 5-10 วง ซึ่งรหัสบนดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรีย นั้น ทุกเบสมีความหมายทั้งหมด (ไม่มีอินทรอน) และเท่าที่พบในขณะนี้คือมี 37 ยีน ซึ่งในจำนวนนี้เป็นยีนที่สร้างโปรตีนได้ (Polypeptides) จำนวน 13 ยีน เช่น Cytochrome b, ND1-6, ND4L, Cytochrome oxidase และ ATP synthase เป็นต้น ทั้งนี้ความน่าสนใจของดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียคือ รหัสพันธุกรรมมีลักษณะเฉพาะตัว โดยปกติแล้วรหัสพันธุกรรมของดีเอ็นเอ (Universal codon) หมายถึงเบส 3 ตัวที่เรียงต่อกันของ Mature mRNA แล้วบ่งบอกความหมายถึง กรดอะมิโนชนิดใดชนิดหนึ่ง โดยสิ่งมีชีวิตทุกชนิดไม่ว่าจะเป็นสัตว์ชั้นสูงหรือสัตว์ชั้นต่ำ พืชหรือสัตว์ การเรียงตัวของเบสสามตัวจะบ่งบอกถึงกรดอะมิโนชนิดเดียวกันแต่สำหรับดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรียนี้พบว่า บางรหัสไม่ได้บ่งบอกถึง

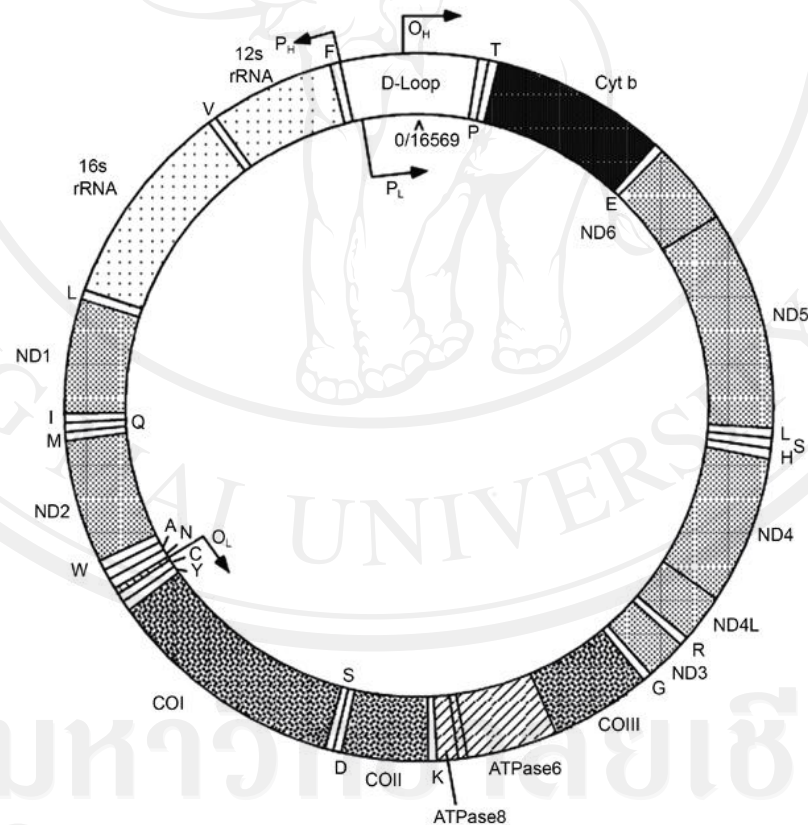
กรดอะมิโนตามกฎของ Universal codon แต่ให้ความหมายต่างออกไป โดยรหัสที่มีการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเป็นเพียงบางรหัสเท่านั้น

ดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรียนี้มีสมมติฐานว่าเดิมเป็นสิ่งมีชีวิตอิสระ เข้ามาอยู่ในเซลล์แบบ พังพาอาศัยกัน (Endosymbiont hypothesis) โดยไมโทคอนเดรียเป็นโพรแคริโอตในกลุ่ม α -purple bacteria ถูกกลืนโดยเซลล์ที่เป็นบรรพบุรุษของยูแคริโอตเมื่อประมาณ 1,200 ล้านปีมาแล้ว และอาศัยอยู่ในเซลล์แบบพังพาอาศัยกัน โดยได้รับอาหารจากเซลล์ ส่วนเซลล์ก็ได้รับพลังงานในรูปของ ATP ตอบแทน และต่อมามีบางเซลล์ได้กลืนเอาแบคทีเรียในกลุ่ม Cyanobacteria เข้าไปจนได้ เป็นสาหร่ายและพืชที่มีการสังเคราะห์แสงได้ ไมโทคอนเดรียสามารถเพิ่มปริมาณได้โดยการแบ่งตัว อาศัยอยู่ในเซลล์เป็นเวลานานจนไม่สามารถกลับไปอยู่แบบอิสระได้อีก เนื่องจากการถ่ายยีนบางตัวเข้าไปในนิวเคลียสของเซลล์ จึงต้องอาศัยโปรตีนหลายชนิดจากไซโทพลาสซึม โดยโปรตีนเหล่านี้จะมีส่วนของพอลิเปปไทด์ที่เป็นสัญญาณนำมายังออร์แกเนลล์ และเข้าไปทำงานในไมโทคอนเดรีย โดยที่มาของไมโทคอนเดรียมิได้มีที่จากการเกิดใหม่ขึ้นเอง (De novo) แต่ต้องได้รับการสืบทอดมาจากบรรพบุรุษ ซึ่งปกติแล้วอวัยวะของเมนเดล คือมาจากพ่อและแม่ แต่เนื่องจากเป็นดีเอ็นเอที่อยู่ในส่วนของไมโทคอนเดรียในไซโทพลาสซึม เซลล์สืบพันธุ์ของพ่อซึ่งอยู่ในรูปของอสุจินั้นเอาเฉพาะส่วนหัวของอสุจิซึ่งมีนิวเคลียสอยู่เข้าไปผสมกับไข่ของเพศแม่ แต่สัดเอาส่วนที่เหลือซึ่งมีไมโทคอนเดรียอยู่เป็นจำนวนมากออกไป ดังนั้น เซลล์ของลูกที่ได้จึงมีแต่ไมโทคอนเดรียที่ได้จากแม่เท่านั้น การถ่ายทอดจากบรรพบุรุษสู่ลูกหลานจึงไม่เป็นไปตามกฎของเมนเดล (Non-Mendelian inheritance) แต่เป็นการถ่ายทอดลักษณะจากเพศแม่เท่านั้น (Maternal Inheritance) นั่นคือความผิดปกติของดีเอ็นเอไมโทคอนเดรียที่เกิดขึ้น หากเกิดกับเพศพ่อก็จะไม่ถ่ายทอดไปสู่ลูกหลานแต่หากเกิดกับเพศแม่ก็จะถ่ายทอดสู่ลูกหลานได้

สรุปการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย มีลักษณะดังนี้

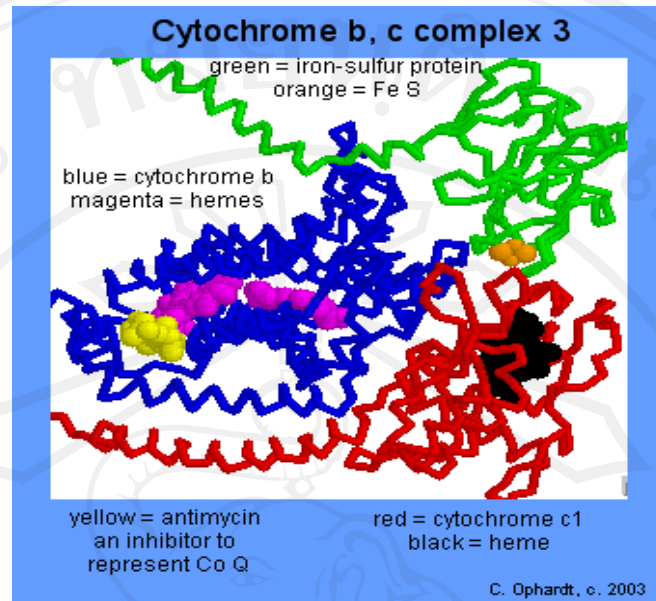
- การถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมเป็นแบบ Uniparental inheritance โดยเป็นชนิด Maternal inheritance จัดเป็น Non-Mendelian inheritance
- ไม่มีกระบวนการแลกเปลี่ยนข้อมูลทางพันธุกรรมโดยกระบวนการรีคอมบินันซ์ (Recombination) ระหว่างดีเอ็นเอจากพ่อและแม่
- มีกระบวนการจำลองตัวเอง (DNA replication) เพื่อเพิ่มจำนวนด้วยอัตราเร็วของมันเอง ไม่ขึ้นกับการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอในนิวเคลียส การจำลองตัวเองของดีเอ็นเอตามมาด้วยการเพิ่มจำนวนของไมโทคอนเดรีย ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกับการแบ่งเซลล์ของแบคทีเรีย

ไซโตโครม (Cytochrome) คือรงควัตถุในรูปโปรตีน ซึ่งมีธาตุเหล็ก(Fe)เป็นองค์ประกอบ มีหน้าที่สำคัญ คือเป็นตัวรับและถ่ายทอดอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจคือ Cytochrome b Cytochrome c และ Cytochrome a ตามลำดับ (ชนาลัย, 2552) ไซโตโครมจะรับและส่งอิเล็กตรอนจากไซโตโครมหนึ่งไปยังอีกไซโตโครมหนึ่งจนถึงออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายและไม่ส่งต่ออิเล็กตรอนให้แก่สารตัวใด ออกซิเจนที่ได้รับอิเล็กตรอนจะรวมกับโปรตอนที่มีอยู่ในสารละลายภายในไมโทคอนเดรีย กลายเป็นน้ำ ดีเอ็นเอที่อยู่ในส่วนของยีนไซโตโครมเป็นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1140 เบส และพบอยู่ในสัตว์ทุกชนิด แต่มีการสร้างโปรตีนที่มีความจำเพาะสำหรับสัตว์แต่ละชนิด จึงมีการนำเอาดีเอ็นเอในส่วนที่ยีนไซโตโครม บี มาใช้ในการตรวจสอบเพื่อระบุชนิดในสัตว์ (Species identification)



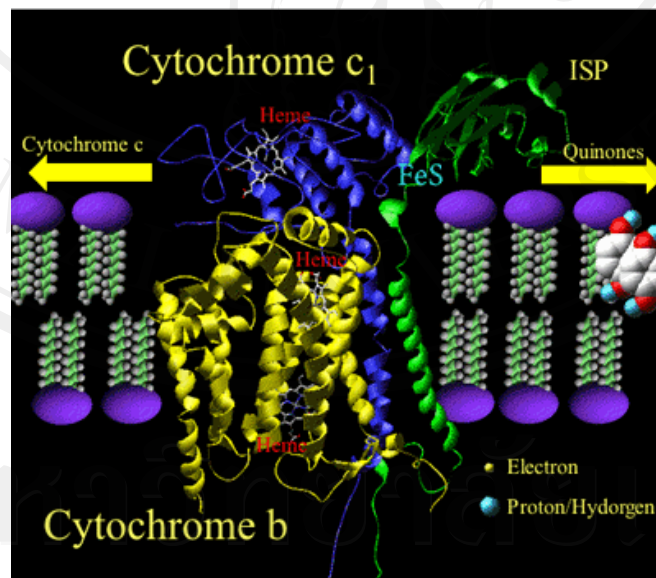
ภาพ 9 พังของยีนต่างๆ ในจีโนมของไมโทคอนเดรีย

ที่มา: <http://www.nature.com/cr/journal/v17/n3/images/7310124f2.jpg>



ภาพ 10 รูปร่างของไซโตโครม

ที่มา : www.bangkokcity.com



ภาพ 11 ไซโตโครมบนเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย

ที่มา : www.emc.maricopa.edu/.../BIOBK/lactferm.gif

ยีนบนไมโทคอนเดรีย (mtDNA) นิยมนำมาใช้ในการศึกษาเพื่อจำแนกชนิดพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากมีข้อได้เปรียบมากกว่ายีนที่ปรากฏบนนิวเคลียส (Nuclear DNA) ดังนี้

1. ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสที่รวดเร็วมากเป็นพิเศษ (มากกว่าดีเอ็นเอในโครโมโซม)
2. ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียเป็นเพียงสายสั้นๆ และอยู่ในช่วงที่ใช้เทคนิค พีซีอาร์ ได้เหมาะสมที่สุด ต่างจากดีเอ็นเอในโครโมโซมที่ยาวมากกว่าและมีความเร็วในการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในแต่ละส่วนของสายดีเอ็นเอไม่เท่ากัน
3. ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียของสัตว์มีขนาดเล็ก จึงง่ายต่อการศึกษา ประกอบกับการเรียงตัวของยีนที่มีการอนุรักษ์ จึงสามารถใช้ไพรเมอร์ร่วมกันได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ทั้งสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง โดยไม่ต้องทราบลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษามาก่อน
4. มีกระบวนการจำลองตัวเองเพื่อเพิ่มจำนวนด้วยอัตราเร็วของมันเองไม่ขึ้นกับนิวเคลียส เมื่อจำนวนไมโทคอนเดรียมีมากขึ้น ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียจึงมีมากขึ้นตามไปด้วย
5. แม้ว่าการเรียงตัวของยีนจะเป็นแบบอนุรักษ์ แต่อัตราการกลายพันธุ์โดยรวมค่อนข้างสูง ซึ่งสูงกว่าอัตราการกลายพันธุ์ในนิวเคลียสถึง 10 เท่า บริเวณที่ไม่ได้เป็นส่วนของยีน ซึ่งรวมถึงบริเวณควบคุมการจำลองโมเลกุลและการถอดรหัสเป็นอาร์เอ็นเอ ที่เรียกว่า Control region หรือ Displacement (D) loop หรือ Hypervariable region ซึ่งมีอัตราการกลายพันธุ์ที่สูงมากในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด อัตราการกลายพันธุ์ที่สูงเกิดจากผลผลิตที่มาจากปฏิกิริยาการหายใจ และกลไกการซ่อมแซมดีเอ็นเอที่ไม่เข้มงวดเท่ากับในนิวเคลียส การที่ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียมีอัตราการกลายพันธุ์สูงนี้ ทำให้พบความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือ พอลิมอร์ฟิซึม (Polymorphism) ได้มาก จึงใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตได้ดีทั้งภายในประชากรและระหว่างประชากร
6. ไม่มีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนและรวมตัวกันใหม่ (Recombination) ลูกจึงมีจีโนมในไมโทคอนเดรียที่เหมือนกับแม่เสมอ คือ มีแฮพลไทป์เพียงแบบเดียวที่ถ่ายทอดจากแม่สู่ลูก ทำให้สามารถศึกษาแบบแผนการถ่ายทอดได้โดยตรง ง่ายกว่าดีเอ็นเอในนิวเคลียสซึ่งลูกได้รับมาจากทั้งพ่อและแม่ ซึ่งอาจมีการรวมตัวกันใหม่ได้อีก สามารถศึกษาแบบแผนการถ่ายทอดดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียจากเพศเมียไปยังลูกหลานที่เกี่ยวข้อง จากชั่วรุ่นหนึ่งไปยังอีกรุ่นหนึ่งได้โดยไม่จำกัดเวลา
7. มีลักษณะเป็น Neutral marker เนื่องจากบทบาทหน้าที่ของไมโทคอนเดรียเป็นคุณสมบัติพื้นฐานของสิ่งมีชีวิต ไม่ใช่เป็นลักษณะที่มีการพัฒนาขึ้นเฉพาะสิ่งมีชีวิตชนิดใดชนิด

หนึ่ง ดังนั้น Mutation ที่เกิดขึ้นจึงไม่เกี่ยวข้องกับการอยู่รอดของสิ่งมีชีวิต และลักษณะที่เกิดขึ้นใหม่ (New genotype) จะไม่สูญหายไปในช่วงกระบวนการคัดเลือกพันธุ์ตามธรรมชาติ

ปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับยีน Cytochrome b อย่างกว้างขวางโดยเป็นประโยชน์มากที่สุดในการกำหนดความสัมพันธ์ภายในครอบครัวและสกุลและการจำแนกสกุลสัตว์แบบใหม่ ดังนั้นจึงนำมาใช้เป็นทางเลือกหนึ่งในการศึกษาเพื่อแยกมนุษย์ออกจากสัตว์ชนิดอื่นได้ เช่น Bateille และคณะ (1999) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการแยกแยะความแตกต่างระหว่างมนุษย์และสัตว์ชนิดอื่นออกจากกันด้วยดีเอ็นเอไมโทคอนเดรีย โดยทำการศึกษาดีเอ็นเอของมนุษย์และสัตว์อื่นอีกจำนวน 4 ชนิด ซึ่งได้แก่ หมู ไก่ ม้า และวัว โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มของมนุษย์และตัวอย่างเนื้อสัตว์ทั้งสี่ชนิด และทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ผลจากการศึกษาพบว่าดีเอ็นเอของมนุษย์จะเกิดการแยกตัวออกเป็นสองแถบจากการทำ Agarose gel electrophoresis ส่วนดีเอ็นเอของสัตว์จะเกิดเพียงหนึ่งแถบเท่านั้น แถบแรกจะปรากฏที่ตำแหน่ง 309 bp ส่วนแถบที่สองจะอยู่ที่ตำแหน่ง 259 bp ซึ่งเป็นช่วงสายดีเอ็นเอที่เรียกว่า ไซโตโครม บี ดังนั้นจากการศึกษานี้จึงเป็นประโยชน์ในด้านนิติวิทยาศาสตร์เนื่องจากสามารถพิสูจน์เบื้องต้นโดยการแยกแยะดีเอ็นเอของมนุษย์ออกจากสัตว์ที่ทำการศึกษาทั้งสี่ชนิดได้ (Bateille, 1999)

Aida และคณะ (2005) ทำการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับวิธีการในการวิเคราะห์เพื่อระบุสปิชีซูกร โดยมีวัตถุประสงค์ในการตรวจวิเคราะห์เนื้อสุกรดิบ และ ไขมันสุกรโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ไซโตโครมบีในไมโทคอนเดรีย เพื่อประโยชน์ในการตรวจสอบอาหารฮาลาล โดยใช้ตัวอย่างเนื้อ และ ไขมัน ของสุกร แกะ วัว ไก่ และสุกร จากตลาดสดในเมืองเซลังงอร์ ประเทศมาเลเซีย เมื่อทำการตรวจสอบผลด้วยกระบวนการ Agarose gel electrophoresis ผลที่ปรากฏคือเกิดแถบดีเอ็นเอทั้งบนช่องที่เป็นตัวอย่างจากเนื้อสุกรดิบ และ ไขมันสุกร ที่ตำแหน่ง 360 bp คณะผู้วิจัยจึงได้สรุปว่าในการนำวิธีการตรวจสอบดีเอ็นเอบนไซโตโครมบีในไมโทคอนเดรียของสุกรโดยตรวจเนื้อดิบ และ ไขมันด้วยเทคนิค พีซีอาร์ นั้นเพียงพอต่อการนำไปใช้ประโยชน์ในการตรวจสอบส่วนประกอบที่มาจากสุกรในอาหารฮาลาล (Aida, 2005)

Andreo และคณะ (2005) ศึกษาการใช้เทคนิคพีซีอาร์ เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสัตว์เพื่อทำการตรวจสอบชนิดและปริมาณของเนื้อสัตว์ที่ผสมกันอยู่ในอาหารสำเร็จรูปที่ผลิตจากโรงงาน โดยทำการสกัดและเปรียบเทียบดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์ 6 ชนิด ได้แก่ วัว หมู แกะ ไก่ ไก่วง และ นกกระจอกเทศ ซึ่งผสมอยู่ในอาหารสำเร็จรูป จากกระบวนการตรวจสอบพบว่า ขอบเขตปริมาณของดีเอ็นเอแม่แบบที่จะสามารถทำการตรวจสอบได้นั้นอยู่ที่ 0.3 ถึง 0.8 พิโคกรัม สามารถทำการ

ตรวจสอบเนื้อสัตว์ที่ผสมกัน 2 ถึง 4 ชนิด โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสัตว์ ทั้งนี้สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนหรือการผสมของเนื้อสัตว์ได้เมื่อมีปริมาณมากกว่า 1% สำหรับ เนื้อหมู เนื้อไก่ หรือเนื้อไก่ทรง และ มีปริมาณมากกว่า 5% สำหรับเนื้อวัวหรือเนื้อแกะ ซึ่งความถูกต้องแม่นยำของกระบวนการตรวจสอบเชิงปริมาณพบว่า หากมีการผสมหรือการปนเปื้อนของเนื้อวัวหรือเนื้อหมูในอาหารสำเร็จรูปในปริมาณตั้งแต่ 10 ถึง 100% สามารถตรวจสอบเชิงปริมาณได้ในความถูกต้องเกือบ 90% ดังนั้นจากการศึกษานี้สรุปได้ว่า สามารถนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในทางนิติวิทยาศาสตร์ เพื่อตรวจสอบชนิดของเนื้อสัตว์กรณีที่เป็นข้อสงสัยว่าอาหารที่ประกอบขึ้นนั้นได้ใช้เนื้อสัตว์ชนิดใดหรือได้ใช้เนื้อสัตว์ที่มีมาตรฐานหรือไม่ ในอัตราส่วนเท่าไร ซึ่งเป็นการตรวจพิสูจน์เพื่อให้การคุ้มครองแก่ผู้บริโภค และให้ความเป็นธรรมแก่ผู้ผลิตอาหารสำเร็จรูป (Andreo, 2005)

Matsuda และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษารูปแบบของดีเอ็นเอไมโทคอนเดรียของมนุษย์ ในช่วงของดีเอ็นเอที่เรียกว่า Cytochrome *b* ของมนุษย์เพื่อทำการเปรียบเทียบกับถึง 4 ชนิด ได้แก่ ลิงชิมแปนซี ลิงกอริลล่า ลิงญี่ปุ่น และลิงแสม โดยการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดของมนุษย์จำนวน 48 ราย (หญิง 18 ชาย 30) และลิงทั้งหมด และออกแบบไพรเมอร์ใหม่เพื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ หลังทำการตรวจสอบพบว่า ไพรเมอร์ของมนุษย์และไพรเมอร์ของลิงชิมแปนซีมีความแตกต่างกันทั้ง Forward primer และ Reverse primer โดยมีความแตกต่างกัน 26% (7 bp/27 bp) และ 26% (6 bp/23 bp) ตามลำดับ เมื่อทำการตรวจสอบการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบขึ้นด้วย Agarose gel electrophoresis พบว่า มีการปรากฏแถบดีเอ็นเอของมนุษย์ทั้ง 48 ตัวอย่าง แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอของลิงชนิดใดเลย และเมื่อทำการเปรียบเทียบกับ สัตว์ชนิดอื่น ได้แก่ วัว หมู สุนัข แกะ หนู ไก่ และปลาเทโพ ผลจากการทดสอบพบว่า ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของสัตว์ชนิดอื่นเช่นกัน และยังพบว่าไพรเมอร์ของสัตว์ชนิดอื่นแตกต่างจากไพรเมอร์ของมนุษย์ทั้ง Forward primer และ Reverse primer จากการศึกษาจึงสรุปได้ว่า ไพรเมอร์ดีเอ็นเอไมโทคอนเดรียที่ยีนไซโตโครมบีที่ออกแบบขึ้นมานั้นมีความจำเพาะกับดีเอ็นเอของมนุษย์และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจพิสูจน์ทราบเลือด เส้นผม เส้นขน หรือกระดูก เพื่อแยกแยะเป็นของมนุษย์หรือสัตว์ได้ในทางนิติวิทยาศาสตร์ (Matsuda, 2005)

Caine และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาลักษณะเฉพาะเพื่อระบุสปีชีส์โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนไซโตโครม บี โดยวิธีนี้ได้ถูกใช้กับตัวอย่างจากกรณีศึกษาทางนิติวิทยาศาสตร์ที่มีความเกี่ยวข้องกับการสืบสวนสอบสวนคดีอาชญากรรม โดยคณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาจากกรณีศึกษา 2

กรณี คือ กรณีศึกษาที่ 1 เป็นกรณีศึกษาเกี่ยวกับร่างของเด็กผู้หญิงอายุ 8 ขวบที่หายสาบสูญไป ซึ่งเจ้าหน้าที่ตำรวจได้ซื้อประเด็นการสืบสวนไปในแนวทางมาตรฐาน โดยอาจมีการอำพรางศพ เพื่อเป็นการยืนยันถึงการกระทำผิดดังกล่าวซึ่งสอดคล้องกับแนวทางการสืบสวนว่าอาจมีการโยนศพลงไปในลำสุกร และจากการตรวจสอบเล้าหมูได้พบชิ้นส่วนเล็กๆ ที่มีปริมาณของ แคลเซียม และ ฟอสฟอรัสที่อยู่ภายในร่างกายมนุษย์ (กระดูก) รวมอยู่ด้วย ทั้งนี้เนื่องมาจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี STR นั้นประสบผลล้มเหลว หลักฐานตัวอย่างจึงถูกนำมาตรวจสอบด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนไซโตโครมบี โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ส่งไปค้นหาฐานข้อมูล Blast บนพื้นฐานของลำดับไซโตโครมบี ที่แสดงในฐานข้อมูลของ Gen bank ผลของการหาข้อมูลนั้นได้ให้รายชื่อของฐานข้อมูลโดยการแบ่งประเภทด้วยการลดลำดับความเหมือนกันไปยังลำดับที่ได้ส่งไป ลำดับของไซโตโครมบีของ *Sus scrofa* (สุกร) ได้มีความเหมือนลำดับของงานซึ่งผู้วิจัยได้ทำถึง 100 % จากผลการศึกษาได้คลี่คลายข้อสงสัยทั้งหมด บนพื้นฐานของหลักฐานที่เก็บได้ซึ่งสามารถระบุได้ว่าเด็กหญิงคนดังกล่าวอาจถูกกินโดยสุกรในเล้าดังกล่าว กรณีศึกษาที่ 2 เป็นกรณีศึกษารายงานที่มาจากการพบเจอชิ้นส่วนลำไส้ในป่า การศึกษาทางสรีระวิทยานั้นไม่สามารถค้นหาความจริงว่ามีแหล่งที่มาจากวัตถุทางพันธุกรรมใด โดยห้องปฏิบัติการของผู้วิจัยได้ถูกร้องขอให้ดำเนินการตรวจสอบถึงลักษณะเฉพาะ หลักฐานดังกล่าวนั้นถูกศึกษาในแนวทางเช่นเดียวกับกรณีศึกษาที่ 1 โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี STR นั้นประสบผลล้มเหลว ลำดับนั้นได้ถูกส่งไปค้นหายัง Blast ผลคือสามารถระบุได้ว่าเป็นลำดับไซโตโครมบีของ *Sus scrofa* (สุกร) ถึง 100% จึงสามารถตัดข้อสันนิษฐานก่อนหน้านี้ที่ว่ามีความเป็นไปได้ว่าเป็นลำไส้ของมนุษย์ออกไป (Caine, 2006)

Li-Chin และคณะ (2007) ได้ถูกร้องขอให้เข้าร่วมในการตรวจสอบพยานวัตถุที่ได้จากการกระทำความผิดเกี่ยวกับสัตว์ป่าสงวน จากกระทรวงการเกษตรให้ทำการตรวจสอบและระบุชนิดของสัตว์จากวัตถุพยานจำนวน 5 ชิ้น ได้แก่ หนังสัตว์จำนวน 2 ชิ้น อวัยวะสืบพันธุ์ของสัตว์ตัวผู้ อัมตะ และชิ้นเนื้อของสัตว์อีกจำนวน 1 ชิ้น Li-Chin และคณะ ได้ทำการตรวจสอบโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอในส่วนที่เรียกว่า ไซโตโครม บี ที่สามารถใช้ในการระบุชนิดของสัตว์ที่ต้องสงสัยได้โดยเป็นการทำเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอถึงสองครั้งเพื่อความแม่นยำมากยิ่งขึ้น โดยการทำพีซีอาร์ ครั้งแรกใช้ไพรเมอร์ที่มีขนาด DNA segment 486 bp และครั้งที่สองใช้ไพรเมอร์ที่มีขนาด DNA segment 251 bp หลังการตรวจสอบพบว่า หนังสัตว์ทั้งสองชิ้นนั้นเป็นหนังของแมว ส่วนอวัยวะสืบพันธุ์ของสัตว์ตัวผู้ อัมตะ และชิ้นเนื้อของสัตว์อีกจำนวน 1 ชิ้นนั้นเป็นของวัว โดยไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบขึ้นนั้นให้ความแม่นยำในการตรวจไม่ต่ำกว่า 99.7% จากผลดังกล่าวเป็น

หลักฐานที่ใช้ยืนยันการกระทำคามผิดและช่วยให้สามารถดำเนินการตามกฎหมายเพื่อเอาผิดกับผู้กระทำความผิดเกี่ยวกับการลักลอบล่าสัตว์ป่าได้ (Li-Chin, 2007)

Tanabe และคณะ (2007) ได้ศึกษาการใช้เทคนิคพีซีอาร์ เพื่อตรวจสอบเนื้อสุกรในอาหาร และตรวจหาส่วนประกอบที่มาจากสุกรซึ่งถูกใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการผลิตอาหาร โดยผู้วิจัยได้มุ่งทำการทดลองเพื่อหาไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะและเหมาะสมที่สุดในการนำมาวิเคราะห์เนื้อสุกรจากยีนไซโตโครม บี จาก 6 คู่ไพรเมอร์จนได้คู่ไพรเมอร์ที่ผู้วิจัยเห็นว่ามีความเหมาะสมที่สุดคือ f (5'-TCTTGCAAATCCTAACAGGCCTG-3') R(5'-TTTGCATGTAGATAGCGAATAAC-3') โดยมีขนาด 130 bp และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ เพื่อตรวจสอบดีเอ็นเอของเนื้อสุกรโดยเปรียบเทียบกับ วัว ไก่ แกะ ม้า และหมูป่า ซึ่งมีน้ำเป็นตัวควบคุมเชิงลบ และได้ทดลองตรวจสอบดีเอ็นเอของสุกรภายในชิ้นเนื้อสุกรที่ถูกทำด้วยความร้อน ผู้วิจัยทำการทดสอบด้วยการนำเนื้อสุกรมาต้ม , ใช้ความร้อน , อบ และทอด ผลที่ได้รับคือปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาด 130bp ได้อย่างชัดเจนปรากฏเฉพาะช่องที่เป็นสุกรและหมูป่าเท่านั้น จึงเป็นการยืนยันได้ว่าการใช้ความร้อนนั้นไม่ส่งผลกระทบต่อวิธีนี้ และคณะผู้วิจัยยังได้ทำการทดสอบความไวของวิธีการโดยผสมตัวอย่างดีเอ็นเอจากข้าวสาลี(10 ng/μl) ผสมกับตัวอย่างดีเอ็นเอของสุกรโดยเจือจางที่ 0, 10 fg/μl, 100 fg/μl, 1 pg/μl, 10 pg/μl, 100 pg/μl, 1 ng/μl, และ 10 ng/μl ตามลำดับ ผลที่ได้คือสามารถปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาด 130 bp ได้ที่การเจือจางระดับ 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, และ 1 pg ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงได้ทำการทดลองเพื่อศึกษาถึงประสิทธิภาพของวิธีที่ถูกพัฒนาขึ้นมาแล้ว โดยนำมาใช้กับรูปแบบการผลิตอาหารสำเร็จรูป คือ เกี้ยวซ่า (ไข่หมู กับ ผัก) โดยนำเกี้ยวซ่ามาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นเติมน้ำลงไปและทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน(10 % homogenate)แล้วจึงทำการเจือจาง Homogenate 10 % ในน้ำกลั่น ให้ได้ระดับ 1 % , 1000 ppm , 100 ppm , 10 ppm, 1 ppm, 100 ppb , 10 ppb, และ 1 ppb homogenates. และทำพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์คู่ F2/R1 ผลที่ได้รับคือปรากฏแถบดีเอ็นเอของสุกรในเกี้ยวซ่าในระดับที่สูงกว่า 100 ppb (Tanabe, 2007)

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

เทคนิคการทำ Polymerase chain reaction โดยทั่วไปมักมีวัตถุประสงค์ที่จะให้ได้ชิ้นที่ต้องการและเพิ่มขยายยีนดังกล่าว ซึ่งเทคนิคนี้สามารถเพิ่มขยายดีเอ็นเอให้มีจำนวนมากขึ้นกว่าเดิมหลายล้านเท่า โดยการเพิ่มปริมาณยีนที่สนใจในหลอดทดลอง ดังนั้นเทคนิคนี้จึงเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า In vitro enzymatic gene amplification วิธีนี้มีประโยชน์ในการตรวจหาชิ้นส่วนหรือเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการในสิ่งส่งตรวจ ค้นพบครั้งแรกโดย Kary Mullis และคณะ ในปี 1986 โดยใช้

หลักการเลียนแบบธรรมชาติที่ว่าโดยอาศัยดีเอ็นเอต้นแบบเป็นจุดเริ่มต้น และมีเอนไซม์พวก DNA polymerase ช่วยทำให้สายดีเอ็นเอยาวออกไปโดยเลือกจับเอานิวคลีโอไทด์ตัวใดตัวหนึ่งใน 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: เป็นขั้นตอนการทำให้ดีเอ็นเอ สายคู่แยกเป็นสายเดี่ยว โดยอาศัยความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส
2. ขั้นตอน Primer annealing: เป็นขั้นตอนที่มีการลดอุณหภูมิลงมาที่ประมาณ 45-60 องศาเซลเซียส เพื่อให้ Primer สามารถเกาะติดกับดีเอ็นเอ ต้นแบบสายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับเบสคู่สม
3. ขั้นตอน Primer extension: เป็นขั้นตอนการขยายสายดีเอ็นเอโดยการต่อลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าไปปลาย 3' ของ Primer แล้วมีการขยายสายดีเอ็นเอสายใหม่จากทิศทาง 5' ไป 3' โดยอาศัยเอนไซม์ Thermostable DNA polymerase เช่น Taq polymerase ซึ่งปกติใช้อุณหภูมิอยู่ในช่วง 70-75 องศาเซลเซียส

ถ้าพิจารณาสายดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น โดยเริ่มจากสายดีเอ็นเอต้นแบบ 1 คู่ เมื่อสิ้นสุดรอบที่ 1 จะได้สายดีเอ็นเอเป็น 2 คู่ เมื่อทำเช่นนี้หลายๆ รอบของพีซีอาร์ ดีเอ็นเอก็จะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ของทุกๆ รอบลักษณะทวีคูณเป็น 2^n เมื่อ n เป็นจำนวนรอบของปฏิกิริยา ดังนั้นถ้าปฏิกิริยาคำเนินไปได้ 20 รอบ จะได้ดีเอ็นเอ 2^{20} ชุด หรือมีปริมาณของดีเอ็นเอประมาณ 1 ล้านเท่า

การเตรียมและขั้นตอนการพีซีอาร์

1. การเก็บสิ่งส่งตรวจหรือตัวอย่างเพื่อสกัดดีเอ็นเอ ตัวอย่างที่ส่งตรวจอาจเป็นเนื้อเยื่อจากพืช สัตว์ หรือสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยเช่น เลือด สารน้ำต่างๆ ชิ้นเนื้ออาจเป็น Fixed paraffin-embedded tissue สามารถเอามาสกัดสารพันธุกรรมที่เป็นดีเอ็นเอ หรืออาร์เอ็นเอ ก็ได้ โดยใช้วิธีง่ายๆ และรวดเร็ว ซึ่งมีหลายวิธีซึ่งสามารถสกัดเอาดีเอ็นเอ ปริมาณน้อยๆ ได้เนื่องจากเทคนิคพีซีอาร์ มีความไวสูงและอาศัยดีเอ็นเอ ปริมาณน้อยๆ ได้ ทั้งสามารถเลือกเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ช่วงสั้นๆ ได้ดี จึงสามารถใช้กับสิ่งส่งตรวจที่เป็นตัวอย่างที่เก็บไว้เป็นระยะเวลานาน ทำให้มีประโยชน์นำไปใช้กับงานทางด้านโบราณคดีหรืองานนิติเวชได้

2. ดีเอ็นเอต้นแบบ (Template DNA) ดีเอ็นเอ ต้นแบบที่มีลำดับเบสเป้าหมายหรือ ดีเอ็นเอเป้าหมาย (DNA Target) สามารถจะใช้ในปฏิกิริยาของพีซีอาร์ ในลักษณะดีเอ็นเอ สายเดี่ยว หรือดีเอ็นเอ สายคู่ก็ได้ แม้ว่าขนาดของดีเอ็นเอไม่ใช่จุดที่มีปัญหามากนัก แต่การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ โดยดีเอ็นเอมีขนาดสั้นๆ อยู่ในรูปปลายเปิดจะมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าเพราะ Primer จะเข้าไปจับ ซึ่ง ช่วยให้ง่ายต่อการเพิ่มจำนวนและลดผลผลิตดีเอ็นเอ ที่ไม่จำเพาะลง โดยทั่วไปควรทดสอบปริมาณ ดีเอ็นเอ ต้นแบบที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอ ที่ต้องการเพียงพอและมีความไวที่เหมาะสม

3. นิวคลีโอไทด์ตั้งต้น (Primer) การเลือกออกแบบ Primer ที่จะใช้ต้องเลือกให้ เหมาะสมกับแต่ละงาน โดยอาศัยหลักการจับคู่กันแบบจำเพาะต่อสายดีเอ็นเอ ที่ต้องการตรวจหาคับ Primer โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Primer เป็นตัวกำหนดความจำเพาะในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ดังนั้นจึงต้องทราบลำดับเบสที่นำมาสังเคราะห์ Primer

ข้อแนะนำในการเลือกและออกแบบ Primer ได้แก่

- 1). ความยาวของ Primer: ควรมีความยาวประมาณ 18-30 นิวคลีโอไทด์ ขึ้นอยู่กับงานที่ใช้
- 2). ควรเลือก Primer ที่มีการกลายของเบสอย่างสม่ำเสมอ
- 3). ควรเลือก Primer ที่มี GC-content อยู่ระหว่าง 50-60% ไม่ควรเลือก Primer ที่มีปริมาณ GC content ที่สูงเกินไป
- 4). Primer ต้องมีความจำเพาะกับลำดับเบสเป้าหมาย (Target sequence) ในดีเอ็นเอต้นแบบ นั่นคือลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Primer ต้องมีความจำเพาะเพียงแห่งเดียวในสายดีเอ็นเอต้นแบบ
- 5). หลีกเลี่ยงลำดับเบสที่จับกับลำดับเบสของตัวเอง
- 6). ควรหลีกเลี่ยงลำดับเบสของแต่ละ Primer ไม่ให้เป็นคู่สมกันเอง
- 7). ค่า T_m (Melting temperature) ของแต่ละ Primer ควรใกล้เคียงกัน โดยทั่วไปควรอยู่ในช่วง 55-80 องศาเซลเซียส

8). Primer ควรมีลำดับคู่สมกับปลายด้าน 3 ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละสายของ ดีเอ็นเอต้นแบบ

4. Thermostable DNA polymerase ที่นิยมใช้กันมากที่สุดคือ Taq DNA polymerase ซึ่งแยกได้จากเชื้อแบคทีเรียที่เจริญได้ในน้ำพุร้อนที่มีชื่อ *Thermus aquaticus* (Taq) ซึ่งมี คุณสมบัติทนความร้อนได้สูงและไม่เสียคุณสมบัติของเอนไซม์ในขั้นตอน denature และสามารถใช้ในการเร่งปฏิกิริยาการสร้างดีเอ็นเอ ได้ที่อุณหภูมิสูงคือ 70-85 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาคือ 72 องศาเซลเซียส Taq DNA polymerase เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนัก โมเลกุล 94 กิโลดาลตัน ขาดคุณสมบัติ 3-5 exonuclease activity จึงขาดคุณสมบัติในการตรวจสอบ

ที่เรียกว่า Proofreading ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Taq DNA polymerase อยู่ในช่วง 1.0 - 2.5 unit ความเข้มข้นที่ใช้ขึ้นอยู่กับปริมาณและลักษณะของดีเอ็นเอต้นแบบ(Primer) รวมทั้งสารประกอบอื่นๆ ด้วยการใช้เอนไซม์ที่มากเกินไปจะทำให้เกิดผลผลิตฟิชเชอร์ ที่ไม่จำเพาะขึ้น ทำให้เกิด Nonspecific background มาก แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นน้อยไปก็จะทำให้ได้ผลผลิตน้อย

5. Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) ความเข้มข้นของ dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) ปกติอยู่ระหว่าง 50-200 μ M ของแต่ละ dNTPs แต่ถ้าเป็น dNTPs ทั้ง 4 ตัว จะมีส่วนประกอบรวมไม่เกิน 800 μ M 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 ของ Primer ความเข้มข้นของ Magnesium ion ต้องปรับเปลี่ยนให้พอเหมาะกับความเข้มข้นของ dNTPs โดยทั่วไปความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Magnesium ion คือต้องเหลือ Magnesium ในรูปอิสระประมาณ 0.5-1.0 mM โดยทั่วไปมักใช้ Magnesium ความเข้มข้นทั้งหมดเป็น 1.5 mM ความเข้มข้นของ Magnesium ion ที่มากเกินไป ทำให้เกิดผลผลิตดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะ และพบว่าการปรับค่า Magnesium ion ก็ช่วยให้ Primer มีการ Anneal ที่มีความจำเพาะขึ้นเช่นเดียวกับการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

2) pH pH ที่เหมาะสมในการทำงานสำหรับ Taq DNA polymerase คือที่ 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. องค์ประกอบอื่นในปฏิกิริยาฟิชเชอร์ โดยทั่วไปส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ที่ใช้ใน PCR คือ 10-15 mM Tris-HCL ที่ pH 8.4 ที่ 25 องศาเซลเซียส, 50 mM KCL, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.01% gelatin (W/V) หรืออาจใช้ non-ionic detergent แทน gelatin ได้ เช่น 0.01% NP40 และ 0.01% Tween 20 การทดลองบางแห่งใช้ DMSO ใส่ลงไปในการปฏิกิริยาเพื่อลด secondary structure ของ DNA แต่พบว่า 10% DMSO ไม่เหมาะกับ Taq DNA polymerase เพราะไปยับยั้งปฏิกิริยาของ

เอนไซม์ทำให้ได้ผลผลิตพีซีอาร์ ที่น้อยลง Gelatin หรือ Bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้นต่ำๆ (100 ug/ml) สามารถช่วยคงสภาพของเอนไซม์ได้ แต่ BSA ถูกทำลายได้ง่ายที่อุณหภูมิสูงและอาจตกตะกอนกับ Taq DNA polymerase

Temperature cycling

1. ขั้นตอน Denaturation อุณหภูมิที่ใช้ส่วนใหญ่ประมาณ 94-95 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30-60 วินาที อย่างไรก็ตาม การใช้เวลานานและอุณหภูมิที่สูงเกินไป จะทำให้เอนไซม์และนิวคลีโอไทด์สูญเสียคุณสมบัติได้ แต่ถ้าใช้เวลาน้อยและอุณหภูมิที่ต่ำเกินไป จะทำให้สายดีเอ็นเอแยกออกจากกันได้ไม่ดี ทำให้ผลผลิตพีซีอาร์ ลดลง กรณีที่ดีเอ็นเอ ต้นแบบมีปริมาณ G+C content ที่สูงมาก ต้องเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นด้วย
2. ขั้นตอน Primer annealing โดยทั่วไปใช้อุณหภูมิในขั้นตอนนี้ประมาณ 55-72 องศาเซลเซียส ซึ่งใช้อุณหภูมิ Annealing temperature ที่ต่ำกว่า T_m ของ Primer ประมาณ 5 องศาเซลเซียส การใช้อุณหภูมิที่สูงในขั้นตอนนี้จะช่วยในการเพิ่มความจำเพาะในการจับคู่ เวลาที่ใช้ในขั้นตอนนี้ประมาณ 30 วินาที
3. ขั้นตอน Primer extension เวลาที่ใช้ในขั้นตอนนี้ขึ้นกับความยาว ความเข้มข้น และลำดับเบสของดีเอ็นเอ ต้นแบบ โดยทั่วไปใช้เวลาประมาณ 1 นาที ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส โดยปกติ Taq DNA polymerase สามารถเพิ่มความยาวของสายดีเอ็นเอ ได้ประมาณ 6,000 นิวคลีโอไทด์ต่อครั้งที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส การใช้เวลาที่มากในขั้นตอนแรกจะมีประโยชน์สำหรับดีเอ็นเอต้นแบบที่มีจำนวนน้อย

จำนวนรอบในการทำพีซีอาร์ (Cycle number)

จำนวนรอบในการทำพีซีอาร์ ขึ้นกับปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบตั้งต้น ถ้าใช้จำนวนรอบที่มากขึ้นเท่าใด โอกาสที่จะได้ผลผลิตพีซีอาร์ ผิดพลาดก็มากขึ้นตามไปด้วย เนื่องจากผลผลิตพีซีอาร์ ที่ได้จะมีความจำเพาะเจาะจงที่น้อยลงและ Background มากขึ้น แต่ใช้จำนวนรอบน้อยเกินไป ผลผลิตที่ได้ก็น้อยลงด้วย

การตรวจวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ (PCR Product)

การตรวจวิเคราะห์ผลผลิตมีด้วยกันหลายวิธี โดย Gel electrophoresis โดยนำผลผลิต

พีซีอาร์ ที่สร้างได้มาแยกตามขนาดดีเอ็นเอ โดยใช้กระแสไฟฟ้าแยกดีเอ็นเอ บน Agarose gel หรือ Polyacrylamide gel เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอ มาตรฐานที่ทราบขนาดที่แน่นอน จากนั้นย้อมขึ้น ดีเอ็นเอด้วย Ethidium bromide แล้วนำไปส่องดูด้วยแสงอุลตราไวโอเลต ผลผลิตพีซีอาร์ ที่ดีควรให้ขึ้นดีเอ็นเอที่ชัดเจน และตรงตามขนาดความต้องการ แต่ถ้ามีขนาดเล็กและแถบดีเอ็นเอไม่ชัดเจน อาจเป็นดีเอ็นเอที่เป็น Primer dimer