การศึกษาความหลากหลายของลำดับเบสเดี่ยวบนโครโมโซม Y ของผู้ชายไทยชาติพันธุ์มาเลย์และชาติพันธุ์จีนในกลุ่มตัวอย่างขนาดเล็ก

Study of Single Nucleotide Polymorphism on the Y-Chromosome in a small sample size of Thai-Malays and Thai-Chinese.

มนฤดี ธนบัตร

Monruedee Thanabut

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Forensic science
Prince of Songkla University

2553

ก ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

QH600.5 ม134 2553 ฉ.2
324438
30 ธ.ค. 2553

ชื่อวิทยานิพนธ์	การศึกษาความหลากหลายของลำดับเบสเดี่ยวบนโครโมโซม Y ของผู้ชายไทยชาติพันธุ์มาเลย์และชาติพันธุ์จีนในกลุ่มตัวอย่างขนาดเล็ก
ผู้เขียน	นางสาวมนฤดี ธนบัตร
สาขาวิชา	นิติวิทยาศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ พรหมวิกร)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.บุษบา ฤกษ์อำนวยโชค)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ พรหมวิกร)

.....กรรมการ
(ดร.ชุติมา มัญชวินทร์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การศึกษาความหลากหลายของลำดับเบสเดี่ยวบนโครโมโซม Y ของชายไทยชาติพันธุ์มาเลย์และชาติพันธุ์จีนในกลุ่มตัวอย่างขนาดเล็ก
ผู้เขียน	นางสาวมนฤดี ธนบัตร
สาขาวิชา	นิติวิทยาศาสตร์
ปีการศึกษา	2553

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความจำเพาะของลำดับเบสเดี่ยวบนโครโมโซม Y (Y-SNPs) ตำแหน่ง M95 และ M172 ของผู้ชายไทยกลุ่มชาติพันธุ์มาเลย์และจีน ด้วยวิธี conventional gel electrophoresis ร่วมกับ direct sequencing ทำโดยสกัดดีเอ็นเอจากรากผมของอาสาสมัครเพศชายชาติพันธุ์มาเลย์และจีน กลุ่มละ 10 คน ในกลุ่มประชากรที่ผ่านการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นผมมาแล้ว และพบลักษณะจำเพาะของเส้นผมที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มชาติพันธุ์ทั้งสอง ทำการวัดปริมาณดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR ในตำแหน่ง M95 และ M172 บนโครโมโซม Y ด้วย primers ที่ถูกออกแบบมาให้มีความจำเพาะต่อลำดับเบสที่ปกติหรือสนิป SNP ในผลผลิต PCR ถูกศึกษาด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis และ single strand conformation polymorphism ร่วมกับ direct sequencing ผลการศึกษาพบว่า ในตำแหน่ง M95 ตรวจพบ SNP จำนวน 2 ใน 20 คน โดยทั้ง 2 คน มี haplotype M95C → T และเป็นกลุ่มชาติพันธุ์มาเลย์ คิดเป็นความถี่เท่ากับ 20 % ของกลุ่มชาติพันธุ์มาเลย์ (n = 10) หรือ เท่ากับ 10 % ของกลุ่มประชากรทั้งหมดที่ศึกษา (n = 20) และตรวจไม่พบ SNP ในกลุ่มชาติพันธุ์จีนเลย ส่วนตำแหน่ง M172 ไม่พบ SNP เลยทั้ง 20 คน จึงสรุปว่า SNP ในตำแหน่ง M95 น่าจะมีศักยภาพเป็น SNP marker ที่จำเพาะกับกลุ่มชาติพันธุ์มาเลย์มากกว่ากลุ่มชาติพันธุ์จีน ส่วน SNP ในตำแหน่ง M172 ยังไม่สามารถระบุได้ว่าสามารถใช้เป็น SNP marker ที่จำเพาะกับลุ่มชาติพันธุ์ใดในทั้ง 2 ชาติพันธุ์นี้ ผลการศึกษาครั้งนี้จะเป็นประโยชน์อย่างมากในการศึกษา Y-SNPs ในกลุ่มประชากรที่มีขนาดใหญ่ขึ้น เพื่อนำไปสู่การสร้าง Y-SNP markers ที่มีความจำเพาะต่อการจำแนกชาติพันธุ์ เพื่อเป็นเครื่องมือช่วยคลี่คลายคดีต่างๆ รวมทั้งคดีความไม่สงบที่เกิดขึ้นในเขตชายแดนภาคใต้ ในกรณีที่ไม่สามารถตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธี STR ตามปกติได้

Thesis Title	Study of Single Nucleotide Polymorphism on the Y-chromosome in a small sample size of Thai Malays and Thai Chinese.
Author	Miss Monruedee Thanabut
Major Program	Forensic science
Academic Year	2010

ABSTRACT

This study was aimed to investigate specificity of single nucleotide polymorphisms (SNPs) at polymorphic sites M95 and M172 on the human Y chromosome in Thai Malay and Thai Chinese males (n = 20) using conventional gel electrophoresis techniques in conjunction with direct sequencing method. The hair samples, used in this study, were previously examined for hair characteristics, and found significant differences between these 2 ethnic groups. DNA, from the hair roots of 10 each Thai Malay and Thai Chinese males, was extracted, quantified, and amplified at M95 and M172. The Y-SNPs in PCR products were analyzed using techniques agarose gel electrophoresis, single strand conformation polymorphism, and direct sequencing. The result showed that at the M95 locus, 2 of 10 Thai Malays were detected for SNP (haplotype M95C → T). The frequency of finding was 20% of the Thai Malay group (n = 10), or 10% of the total populations (n = 20). None of M95 Y-SNP was found in Thai Chinese. At the M172 locus, Y-SNP was not detected in all samples. It was concluded that the Y-SNP at M95 locus was more specific to Thai Malay than Thai Chinese, while the Y-SNP at M172 locus was still unable to specify to which ethnic group. The result of this study will be useful for further studies of Y-SNPs in larger populations, and discriminating ethnic origin of forensic samples in the case of unsuccessful conventional STR analysis.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ลุล่วงได้อย่างดี ด้วยความกรุณา และเมตตาอย่างดียิ่ง จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วราภรณ์ พรหมวิกร ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำในด้านการเรียน การทำวิทยานิพนธ์ และตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องจนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ รวมทั้งกรุณาปลูกฝังกระบวนการคิดในการทำงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ ปลูกฝังแนวคิดสำหรับการดำรงชีวิตในสังคม และให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยตลอดมา

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.บุษบา ฤกษ์อำนวยโชค ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ดร.ชุติมา มัญชวินทร์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาเสียสละเวลาอันมีค่ามาสอบวิทยานิพนธ์ รวมทั้งให้คำแนะนำในการแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ อาสาสมัครทุกท่านที่กรุณาบริจาคเส้นผมสำหรับใช้ในการทำวิจัย พี่ตุ่ม หน่วยมนุษย์พันธุศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี และ คุณอัจฉรา มาฆทาน (พี่อัจ) ที่ช่วยสอนเทคนิค SSCP ขอขอบคุณ คุณทวีภรณ์ ดีรีคช (พี่ปาล์ม) ที่เก็บตัวอย่างเส้นผมไว้ให้เป็นอย่างดี และคุณปรัชญา ละงู (พี่หลีม) ที่ให้คำแนะนำด้านเทคนิคการทำ PCR

ขอขอบคุณ หลักสูตรนิติวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับเงินทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ ที่อนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์การทำวิจัย

ขอขอบคุณ คุณสุวรรณี ขุนทองปาน (พี่ณี) คุณพัชรภรณ์ ทองวัชระ (พี่แอล) คุณพิทักษ์ จันทร์ธรรมชาติ (พี่มิ้ล) คุณมณีรัตน์ ศรีขาว (น้องณี) และ นักศึกษานิติวิทยาศาสตร์ทุกคน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเพื่อนๆ นิติวิทยาศาสตร์ รุ่น 3 สำหรับคำปรึกษา คำแนะนำ กำลังใจ และมิตรภาพดีๆ ที่มีให้กับผู้วิจัยตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อประภาส ธนบัตร คุณแม่ทองมา ธนบัตร และพี่จีรศักดิ์ ธนบัตร ที่คอยอบรมสั่งสอน แนะนำ และให้กำลังใจตลอดมา รวมทั้งให้โอกาสทางการศึกษาตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีจากความกรุณาของทุกท่านที่ได้กล่าวนามมาข้างต้น ซึ่งคุณประโยชน์และความดีที่ได้รับจากงานวิจัยนี้ขอมอบแด่ คุณพ่อ คุณแม่ และอาจารย์ทุกท่าน ที่ได้มอบความรู้และอบรมสั่งสอนให้ผู้วิจัยสามารถก้าวเดินอย่างมั่นคงมาจนถึงปัจจุบันนี้ จึงขอกราบขอบพระคุณทุกท่านมา ณ ที่นี้ด้วย

มนฤดี ธนบัตร

สารบัญ

		หน้า
สารบัญ		(6)
รายการตาราง		(9)
รายการภาพประกอบ		(10)
บทที่ 1	บทนำ	
	1.1 บทนำต้นเรื่อง	1
	1.2 บทตรวจเอกสาร	2
	1.2.1 คำศัพท์ที่เกี่ยวข้อง	2
	1.2.2 สนิปส์	3
	1.2.3 โครโมโซมวาย	16
	1.2.4 สนิปส์บนโครโมโซมวาย	17
	1.2.5 ตำแหน่งสนิปส์ที่ทำการศึกษา	26
	1.2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาสนิปส์บนโครโมโซมวาย	29
	1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	41
บทที่ 2	วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	
	2.1 วัสดุและอุปกรณ์	42
	2.1.1 กลุ่มตัวอย่าง	42
	2.1.2 สารเคมี	42
	2.1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์	44
	2.2 วิธีการทดลอง	45
	2.2.1 การออกแบบการทดลอง	45
	2.2.2 Primer	46
	2.2.3 การออกแบบ Primer ตำแหน่ง M172	46
	2.2.4 การวิเคราะห์ความจำเพาะของ primer กับฐานข้อมูล NCBI	47
	2.2.5 การเก็บตัวอย่าง	47
	2.2.6 การสกัดสารพันธุกรรม	49
	2.2.7 การวัดปริมาณของสารพันธุกรรม	50

สารบัญ (ต่อ)

	2.2.8	การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา PCR	50
	2.2.9	การแยกแถบสารพันธุกรรมด้วย agarose gel electrophoresis	51
	2.2.10	การแยกแถบสารพันธุกรรมด้วย SSCP	51
	2.2.11	การสกัดสารพันธุกรรมจาก agarose gel	52
	2.2.12	การวิเคราะห์ลำดับเบส	53
	2.2.13	การวิเคราะห์ความจำเพาะของลำดับเบสกับฐานข้อมูล NCBI	53
	2.2.14	การวิเคราะห์ความถี่ของสนิปส์	55
บทที่ 3	ผลการศึกษา		
	3.1 สนิปตำแหน่ง M95		56
	3.1.1	การออกแบบ Primer	56
	3.1.2	การตรวจสอบความจำเพาะของ Primer	56
	3.1.3	การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม	58
	3.1.4	การศึกษาสนิปด้วยวิธี agarose ge electrophoresis	59
	3.1.5	การศึกษาสนิปด้วยวิธี SSCP	61
	3.1.6	การศึกษาสนิปด้วยวิธี direct sequencing	62
	3.1.7	การตรวจสอบความจำเพาะของลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้กับฐานข้อมูล NCBI	68
	3.1.8	การวิเคราะห์ความถี่	68
	3.2 สนิปตำแหน่ง M172		76
	3.2.1	การออกแบบ Primer	76
	3.2.2	การตรวจสอบความจำเพาะของ Primer	76
	3.2.3	การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม	77
	3.2.4	การศึกษาสนิปด้วยวิธี agarose gel electrophoresis	80
	3.2.5	การศึกษาสนิปด้วยวิธี SSCP	80

สารบัญ (ต่อ)

	3.2.6 การศึกษาสนิปด้วยวิธี direct sequencing	82
	3.2.7 การตรวจสอบความจำเพาะของลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้กับฐานข้อมูล NCBI	85
บทที่ 4	อภิปรายและสรุปผลการศึกษา	
	4.1 สนิปตำแหน่ง M95	95
	4.2 สนิปตำแหน่ง M172	100
	สรุปผลการศึกษา	104
รายการเอกสารอ้างอิง		105
ภาคผนวก ก	ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี direct sequencing ของสนิปตำแหน่ง M95	113
ภาคผนวก ข	ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี direct sequencing ของสนิปตำแหน่ง M172	120
ประวัติผู้เขียน		129

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	สนิปส์บนโครโมโซมวาย	21
1.2	สรุปผลการศึกษา Y-chromosome haplogroups ในชาติพันธุ์ต่างๆ ทั่วโลก	35
2.1	รายการสารเคมีที่ใช้ในการศึกษา	42
2.2	รายการเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา	44
2.3	รายการ Primer ที่ใช้ในการศึกษา	46
3.1	ขนาดของแถบผลผลิต PCR แถบที่ 1 (dsDNA) ตำแหน่ง M95 ที่ผ่านการต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที	65
3.2	ขนาดของแถบผลผลิต PCR แถบที่ 2 (สาย antisense) ตำแหน่ง M95 ที่ผ่านการต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที	65
3.3	ขนาดของแถบผลผลิต PCR แถบที่ 3 (สาย sense) ตำแหน่ง M95 ที่ผ่านการต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที	65
3.4	สรุปผลการศึกษาสนิปในตำแหน่ง M95 ด้วยวิธี AGE, SSCP และ direct sequencing	75
3.5	ขนาดของแถบผลผลิต PCR แถบที่ 1 (dsDNA) ตำแหน่ง M172 ที่ผ่านการต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที	83
3.6	ขนาดของแถบผลผลิต PCR แถบที่ 2 (สาย antisense) ตำแหน่ง M172 ที่ผ่านการต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที	83
3.7	ขนาดของแถบผลผลิต PCR แถบที่ 3 (สาย sense) ตำแหน่ง M172 ที่ผ่านการต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที	83
3.8	สรุปผลการศึกษาสนิปในตำแหน่ง M172 ด้วยวิธี AGE, SSCP และ direct sequencing	94
4.1	ความถี่ของสนิปตำแหน่ง M95 ในการศึกษาครั้งนี้และในการศึกษาอื่นๆ	99
4.2	ความถี่ของสนิปตำแหน่ง M172ในการศึกษาครั้งนี้และในการศึกษาอื่นๆ	103

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1.1	การเกิดสนิปส์: การแทนที่ของเบสในนิวคลีโอไทด์แบบ transition และ transversion	4
1.2	ประเภทของสนิปส์	5
1.3	หลักการทำงานของ SSCP	6
1.4	หลักการทำงานของ Allele specific hybridization	7
1.5	หลักการทำงานของ LightCycler	9
1.6	หลักการทำงานของ Molecular baccons	9
1.7	หลักการทำงานของ Taqman probe	10
1.8	หลักการทำงานของ SNaPshot	11
1.9	หลักการทำงานของ Microarray และ fluorescence detection	12
1.10	หลักการทำงานของ Pyrosequencing	13
1.11	ลักษณะของโครโมโซมวาย	17
1.12	Y-chromosome DNA haplogroups	20
1.13	สนิปตำแหน่ง M95	26
1.14	ลำดับเบสของยีน EIF1AY	27
1.15	สนิปตำแหน่ง M172	28
1.16	ลำดับเบสของยีน USP9Y	28
1.17	ยีน USP9Y และยีน EIF1AY บนโครโมโซมวาย	29
2.1	การกำหนดค่าเพื่อวิเคราะห์ความจำเพาะของ primer ในตำแหน่ง M172	48
2.2	การกำหนดค่าเพื่อการวิเคราะห์ความจำเพาะของ nucleotide sequence กับฐานข้อมูล NCBI	54
3.1	ความจำเพาะของ primer ตำแหน่ง M95 กับฐานข้อมูล NCBI	57
3.2	แถบผลผลิต PCR ตำแหน่ง M95 จากการหาสภาวะการทำ PCR ที่เหมาะสม แยกใน 2% agarose gel ย้อมด้วย ethidium bromide	59
3.3	แถบผลผลิต PCR ตำแหน่ง M95 ที่ได้จากการใช้ forward primer 1 และ forward primer 2 ในตัวอย่างผู้ชายชาติพันธุ์มาเลย์และจีนแยกใน 1% agarose gel ย้อมด้วย ethidium bromide	60

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
3.4	แถบผลผลิต PCR ตำแหน่ง M95 ที่ได้จาก forward primer 1 และ forward primer 2 ในผู้ชายชาติพันธุ์มาเลย์และจีน ผ่านการต้มและไม่ต้มแยกใน 12% polyacrylamide gel ย้อมด้วย silver nitrate	63
3.5	แถบผลผลิต PCR ตำแหน่ง M95 ที่ได้จากการใช้ forward primer 1 และ forward primer 2 ในตัวอย่างผู้ชายชาติพันธุ์มาเลย์และจีน จำนวน 20 คน ผ่านการต้ม แยกใน 12% polyacrylamide gel และย้อมด้วยสารละลาย silver nitrate	64
3.6	การเตรียมผลผลิต PCR ตำแหน่ง M95 เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบส	66
3.7	ลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากผลผลิต PCR สาย antisense ตำแหน่ง M95 ด้วยวิธี direct sequencing	67
3.8	ผลการตรวจสอบความจำเพาะของลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากตัวอย่าง Ma4 (ตำแหน่ง M95) กับฐานข้อมูล NCBI	69
3.9	ผลการตรวจสอบความจำเพาะของลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากตัวอย่าง Ma9 (ตำแหน่ง M95) กับฐานข้อมูล NCBI	70
3.10	ผลการตรวจสอบความจำเพาะของลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากตัวอย่าง Ch7 (ตำแหน่ง M95) กับฐานข้อมูล NCBI	71
3.11	ผลการตรวจสอบความจำเพาะของลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากตัวอย่าง Ch9 (ตำแหน่ง M95) กับฐานข้อมูล NCBI	72
3.12	ผลการตรวจสอบความจำเพาะของลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากตัวอย่าง Ma2 (ตำแหน่ง M95) กับฐานข้อมูล NCBI	73
3.13	ผลการตรวจสอบความจำเพาะของลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากตัวอย่าง Ma3 (ตำแหน่ง M95) กับฐานข้อมูล NCBI	74
3.14	การตรวจสอบความจำเพาะของ primer ตำแหน่ง M172 กับฐานข้อมูลของ NCBI	76
3.15	แถบผลผลิต PCR ตำแหน่ง M172 จากการหาสภาวะการทำ PCR ที่เหมาะสม	79
3.16	แถบผลผลิต PCR ตำแหน่ง M172 ที่ได้ในตัวอย่างผู้ชายชาติพันธุ์มาเลย์และจีน แยกใน 2% agarose gel ย้อมด้วย ethidium bromide	80

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
3.17	แถบผลผลิต PCR ตำแหน่ง M172 ที่ได้จากตัวอย่างผู้ชายชาติพันธุ์มาเลย์และจีน จำนวน 20 คน ผ่านการต้ม แยกใน 12% polyacrylamide gel ย้อมด้วยสารละลาย silver nitrate	81
3.18	การเตรียมผลผลิต PCR ตำแหน่ง M172 เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบส	82
3.19	ลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากผลผลิต PCR สาย antisense ในตำแหน่ง M172 ด้วยวิธี direct sequencing	84
3.20	ผลการตรวจสอบความจำเพาะของลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากตัวอย่าง Ma1 (ตำแหน่ง M172) กับฐานข้อมูล NCBI	86
3.21	ผลการตรวจสอบความจำเพาะของลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากตัวอย่าง Ma5 (ตำแหน่ง M172) กับฐานข้อมูล NCBI	87
3.22	ผลการตรวจสอบความจำเพาะของลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากตัวอย่าง Ch3 (ตำแหน่ง M172) กับฐานข้อมูล NCBI	88
3.23	ผลการตรวจสอบความจำเพาะของลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากตัวอย่าง Ch5 (ตำแหน่ง M172) กับฐานข้อมูล NCBI	89
3.24	ผลการตรวจสอบความจำเพาะของลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากตัวอย่าง Ma6 (ตำแหน่ง M172) กับฐานข้อมูล NCBI	90
3.25	ผลการตรวจสอบความจำเพาะของลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากตัวอย่าง Ch4 (ตำแหน่ง M172) กับฐานข้อมูล NCBI	91
3.26	ผลการตรวจสอบความจำเพาะของลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากตัวอย่าง Ch6 (ตำแหน่ง M172) กับฐานข้อมูล NCBI	92
3.27	ผลการตรวจสอบความจำเพาะของลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากตัวอย่าง Ch9 (ตำแหน่ง M172) กับฐานข้อมูล NCBI	93
4.1	ทฤษฎีปฏิกิริยา PCR ในตำแหน่ง M95 ที่เกิดในคนปกติ	96
4.2	ทฤษฎีปฏิกิริยา PCR ในตำแหน่ง M95 ที่เกิดในคนที่มีสนิป	97
4.3	ตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอตำแหน่ง M95ที่คาดว่าจะปรากฏบน polyacrylamide gel	97
4.4	ทฤษฎีปฏิกิริยา PCR ในตำแหน่ง M172 ที่เกิดในคนปกติและคนที่เกิดสนิป	100
4.5	ตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอตำแหน่ง M172ที่คาดว่าจะปรากฏบน polyacrylamide gel	101

บทที่ 1
บทนำ

1.1 บทนำต้นเรื่อง

จากปัญหาความรุนแรงใน 3 จังหวัดชายแดนภาคใต้ที่เกิดขึ้นมาแล้วเป็นระยะเวลาหนึ่ง การคลี่คลายคดีเพื่อจับกุมตัวผู้กระทำผิดมาลงโทษยังไม่สัมฤทธิ์ผลเท่าที่ควร สาเหตุหนึ่งอาจเนื่องมาจากนิติวิทยาศาสตร์ของประเทศไทยยังไม่เข้มแข็งเท่าที่ควรเมื่อเทียบกับอารยประเทศ เครื่องมือที่ใช้แก้ไขความรุนแรงที่เกิดขึ้นในเขต 3 จังหวัดภาคใต้ ทั้งในระยะเฉพาะหน้าและในระยะยาวอย่างหนึ่งคือ การวิจัยและพัฒนางานนิติวิทยาศาสตร์อย่างจริงจังและต่อเนื่อง ซึ่งการศึกษาวิจัยในด้านนิติอณูชีววิทยา (Forensic DNA) เป็นส่วนสำคัญของการพัฒนางานในสาขานิติวิทยาศาสตร์ และมีส่วนร่วมในการช่วยแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นอย่างยั่งยืนได้

คดีที่เกิดขึ้นในเขต 3 จังหวัดภาคใต้นั้น ผู้ต้องสงสัยหรือผู้ที่กระทำผิดส่วนใหญ่เป็นกลุ่มผู้ชายที่มักมีความสัมพันธ์ทางสายเลือดหรือเป็นเครือญาติกัน ซึ่งในทางพันธุศาสตร์ประชากร ชายที่มีความเกี่ยวพันทางสายเลือดจะมีรหัสพันธุกรรมบนโครโมโซม Y ที่เหมือนกันเกือบร้อยเปอร์เซ็นต์ ดังนั้นการศึกษาวิจัยพันธุศาสตร์ของโครโมโซม Y จะเป็นประโยชน์ต่อการระบุตัวผู้กระทำผิด และการสืบหากลุ่มคนที่เป็นเครือข่ายผู้กระทำผิด ด้วยเหตุที่ประชากรที่อาศัยอยู่ในเขต 3 จังหวัดภาคใต้เป็นบุคคลชาติพันธุ์มาเลย์ถึงร้อยละ 70 และเป็นชาติพันธุ์ไทยและจีนอีกร้อยละ 30 และผู้ต้องสงสัยที่ถูกจับกุมในคดีก่อความไม่สงบในเขต 3 จังหวัดชายแดนภาคใต้เป็นชาติพันธุ์มาเลย์แทบทั้งสิ้น จึงทำให้เป็นที่มาของการศึกษาหาความแตกต่างของสนิปส์บนโครโมโซม Y (Y-SNPs) ระหว่างผู้ชายชาติพันธุ์มาเลย์ และจีน เพื่อนำไปสู่การจำแนกทางพันธุกรรมของบุคคลทั้ง 2 ชาติพันธุ์

ความหลากหลายของลำดับเบสเดี่ยว (Single Nucleotide Polymorphisms) หรือ สนิปส์ (SNPs) เป็นการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบนสายนิวคลีโอไทด์เพียงตำแหน่งเดียวแล้วทำให้เกิดความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างมนุษย์แต่ละคน เนื่องจากสนิปส์มีอัตราการกลายพันธุ์ (mutation) ต่ำ (10^{-8}) จึงทำให้สนิปส์คงอยู่ภายในจีโนม และสามารถถ่ายทอดสนิปส์ดังกล่าวไปยังทายาทรุ่นต่อๆไปได้

ในการแยกแยะกลุ่มคนที่มีเชื้อชาติและชาติพันธุ์ที่แตกต่างกัน นิยมศึกษาสนิปส์บนโครโมโซม Y เพราะเป็นข้อมูลทางพันธุกรรมที่มีการเปลี่ยนแปลง (mutation) จากรุ่นสู่รุ่น

น้อยมากและถ่ายทอดมาจากพ่อเท่านั้น สนิปส์บนโครโมโซม X นิยมค่อนข้างน้อย เนื่องจากถ่ายทอดมาจากแม่เท่านั้นสามารถแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนกับโครโมโซมร่างกายได้ ส่วนสนิปส์บนโครโมโซมร่างกาย การแปลผลการวิเคราะห์ค่อนข้างยุ่งยาก เพราะได้รับการถ่ายทอดพันธุกรรมจากทั้งพ่อและแม่ การศึกษาความแตกต่างของสนิปส์บนโครโมโซมวาย ระหว่างกลุ่มประชากรได้ทำกันมาเป็นระยะเวลาหนึ่งแล้ว ตัวอย่างของการศึกษา ได้แก่ การศึกษาเปรียบเทียบระหว่างผู้ชายที่อาศัยอยู่ทางตอนใต้ของโปรตุเกสกับผู้ชายแอฟริกัน ระหว่างผู้ชายชาวเยอรมัน จีน และไทย ระหว่างผู้ชายชาวยุโรปกลุ่มต่างๆ และระหว่างชายชาวญี่ปุ่นกลุ่มต่างๆ ซึ่งการศึกษาเหล่านี้พบว่าสนิปส์สามารถใช้แยกชาติพันธุ์ได้ โดยแต่ละชาติพันธุ์จะมีสนิปส์ที่จำเพาะ และมีความแตกต่างกับชาติพันธุ์อื่น และบุคคลชาติพันธุ์เดียวกันที่อาศัยอยู่ต่างบริเวณกัน ทั้งนี้ยังไม่มีรายงานเปรียบเทียบสนิปส์ระหว่างชาติพันธุ์มาเลย์ และชาติพันธุ์จีนมาก่อน

การศึกษาสนิปส์โดยปกติจะทำในกลุ่มประชากรขนาดใหญ่ (มากกว่า 50 คน) แต่ในโครงการวิจัยนี้ได้ใช้กลุ่มประชากรขนาดเล็ก คือ กลุ่ม (ชาติพันธุ์) ละ 10 คน ซึ่งเป็นกลุ่มประชากรที่ผ่านการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นผมมาแล้วและ พบลักษณะจำเพาะของเส้นผมที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มชาติพันธุ์ทั้งสอง (ทวีภรณ์ , 2552) เพื่อตอบคำถามว่าในทางพันธุศาสตร์แล้วประชากรทั้ง 2 กลุ่มนี้มีความจำเพาะของสนิปส์บนโครโมโซมวายแตกต่างกันหรือไม่ และเป็นชนิดใด ผลการศึกษาที่ได้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการริเริ่มสร้างฐานข้อมูล Y-SNPs ของประชากรไทย

1.2 บทตรวจเอกสาร

1.2.1 คำศัพท์ที่เกี่ยวข้อง

1.2.1.1 Haplotype คือ สนิปส์หรืออัลลีล ที่พบบนโครโมโซมแท่งเดียวกัน ซึ่งมีแนวโน้มที่จะถูกถ่ายทอดไปด้วยกันทั้งหมดเป็นชุดโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลง ตัวอย่าง haplotype ได้แก่ haplotype M122C M9G เป็นต้น

1.2.1.2 Haplogroup คือ กลุ่มของ haplotype ขนาดใหญ่ที่อยู่บนโครโมโซมแท่งเดียวกัน หรือกลุ่มคนที่มี Haplotype เดียวกัน ตัวอย่าง haplogroup ได้แก่ haplogroup O haplogroup J เป็นต้น ในพันธุศาสตร์มนุษย์นั้น haplogroups ที่มีการศึกษาอย่างแพร่หลายได้แก่ Haplogroups ของโครโมโซม Y (Y-Chromosome haplogroups) และไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA haplogroups) โดย Y-chromosome haplogroups นั้นจะมีการถ่ายทอดสู่รุ่นลูกหลานที่เป็นชาย ส่วน mitochondria DNA haplogroups จะมีการถ่ายทอดสู่รุ่นลูกหลานที่มีสายเลือดแม่เดียวกัน

1.2.1.3 ชาติพันธุ์ (Ethnicity หรือ Ethnos)

ชาติพันธุ์ คือ กลุ่มคนที่มีวัฒนธรรมขนบธรรมเนียมประเพณี ภาษาพูดเดียวกัน และเชื่อว่ามีการสืบเชื้อสายมาจากบรรพบุรุษกลุ่มเดียวกัน เช่น ชาติพันธุ์ไทย และชาติพันธุ์พม่า เป็นต้น ประชากรในภาคใต้ของไทยประกอบด้วยชาติพันธุ์ไทย มาเลย์ จีน และอินเดีย อาศัยอยู่ปะปนกัน (เอกวิทย์, 2540) โดยประชากรใน 3 จังหวัดชายแดนภาคใต้เป็นชาติพันธุ์มาเลย์มากกว่าร้อยละ 70 ของประชากรทั้งหมด (จรัญ, 2546)

1.2.2 สนิปส์

1.2.2.1 ความหมายของสนิปส์

สนิปส์ หรือ SNPs เป็นการเปลี่ยนแปลงแทนที่เบสบนสายนิวคลีโอไทด์เพียงตำแหน่งเดียว (ภาพที่ 1.1) ซึ่งสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมไปยังรุ่นลูกหลานได้

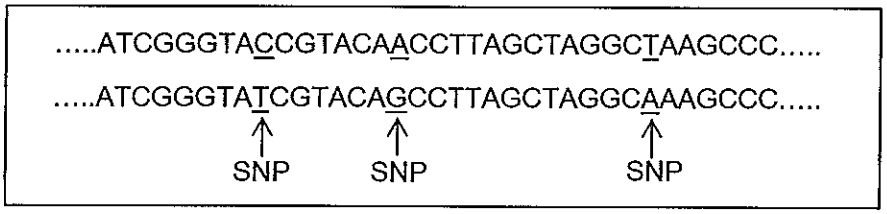
การแทนที่ของเบสในนิวคลีโอไทด์ของสนิปส์มี 2 แบบ คือ

1.) Transition เป็นการแทนที่ของเบสภายในกลุ่ม Purine (A, G) หรือภายในกลุ่ม Pyrimidine (C, T) เช่น AAGGCTAA เปลี่ยนเป็น AGGGCTAA หรือ ATGGCTAA เปลี่ยนเป็น ACGGCTAA

2.) Transversion เป็นการแทนที่ของเบสระหว่างกลุ่ม Purine และ Pyrimidine เช่น AAGGCTAA เปลี่ยนเป็น ATGGCTAA

ลำดับเบสทั้งจีโนมของมนุษย์ทุกคนมีความเหมือนกันถึงร้อยละ 99.9 และมีส่วนแตกต่างกันประมาณร้อยละ 0.1 ความแตกต่างนี้ถ้าพบมากกว่าร้อยละ 1 ของจำนวนประชากรจะจัดเป็นสนิปส์ แต่หากพบน้อยกว่าร้อยละ 1 ของจำนวนประชากรจะจัดเป็นการกลายพันธุ์เฉพาะจุด (point mutation)

สนิปส์จะพบในทุกๆ 100–300 เบส บนสายดีเอ็นเอทั้งจีโนม ปัจจุบันได้มีการค้นพบสนิปส์แล้ว 5 ล้านสนิปส์ ที่ก่อให้เกิดความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรม เช่น ความสูงที่ต่างกัน ผิวสีที่ต่างกัน ความแข็งแรงที่ต่างกัน ความว่องไวต่อการเป็นโรคที่ต่างกัน และการตอบสนองต่อยาที่แตกต่างกัน เป็นต้น



ภาพที่ 1.1 การเกิดสนิปส์: การแทนที่ของเบสในนิวคลีโอไทด์แบบ transition และtransversion โดยแถวบนเป็นลำดับเบสบนสายนิวคลีโอไทด์ที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง แถวล่างเป็นลำดับเบสบนสายนิวคลีโอไทด์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลง (ศรชี้ตำแหน่งของ SNP)
ที่มา: Sripichai and Fucharoen, 2007. Genetic Polymorphisms and Implications for Human Diseases. J Med Assoc Thai. 90 (2): Page 395. Figure 1.

1.2.2.2 ประเภทของสนิปส์

สนิปส์แบ่งได้เป็น 2 ประเภทตามตำแหน่งที่เกิดสนิปส์ คือ

1) สนิปส์ที่เกิดขึ้นในส่วนที่ไม่มีการถอดรหัส (non-coding SNP) ได้แก่

- Regulatory SNP (rSNP) เป็นสนิปที่เกิดบริเวณโปรโมเตอร์ (promoter region) ซึ่งมีผลทำให้การแสดงออกของยีน และการสร้างโปรตีนเกิดมากขึ้นหรือลดลงจากปกติ

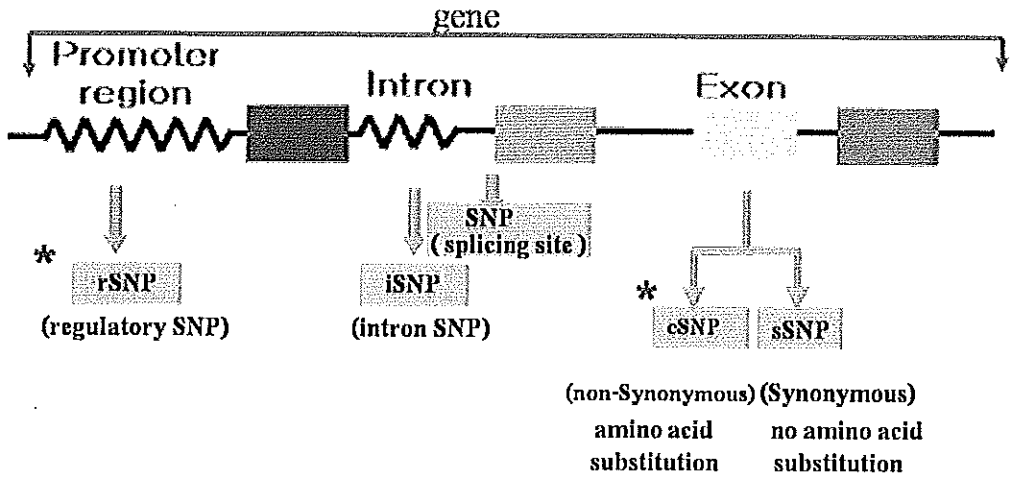
- Intronic SNP (iSNP) เป็นสนิปที่เกิดบริเวณอินทรอน ยังไม่พบว่าทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงฟีโนไทป์ที่สำคัญ

- สนิปที่เกิดบริเวณสไปลซิงไซต์ (splicing site) ซึ่งเป็นรอยต่อระหว่างเอ็กซอน (exon) และอินทรอน (intron) จะทำให้การตัดต่ออาร์เอ็นเอ (RNA) ผิดปกติ ส่งผลให้จำนวนกรดอะมิโนในสายพอลิเพปไทด์เกิดผิดปกติได้

2) สนิปส์ที่เกิดขึ้นในส่วนที่มีการถอดรหัส (coding SNP หรือ cSNP) ได้แก่

- Non-synonymous SNP เป็น cSNP ที่เกิดขึ้นภายในลำดับเบส 3 ตัวที่ใช้ในการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน (triplet codon) แล้วทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโน

- Synonymous SNP เป็น cSNP ที่เกิดขึ้นภายใน triplet codon แล้วไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโน (ภาพที่ 1.2)



ภาพที่ 1.2 ประเภทของสนิปส์ ได้แก่ (1) สนิปส์ที่เกิดขึ้นในส่วนที่ไม่มีการถอดรหัส ประกอบไปด้วย regulatory SNP (rSNP), intronic SNP (iSNP) และสนิปส์บริเวณสไปลซิงไซต์ (splicing site) และ (2) สนิปส์ที่เกิดขึ้นในส่วนที่มีการถอดรหัส ประกอบด้วย non-synonymous SNP (cSNP) และ synonymous SNP (sSNP) โดย rSNP และ cSNP จะมีโอกาสทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงฟีโนไทป์ (*)
ที่มา: ดัดแปลงจาก สุทธิดา. 2546. ความแตกต่างทางพันธุกรรมและการตรวจหา. จดหมายข่าว. ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพด้านการแพทย์และสาธารณสุข. หน้า 6. รูปที่ 2.

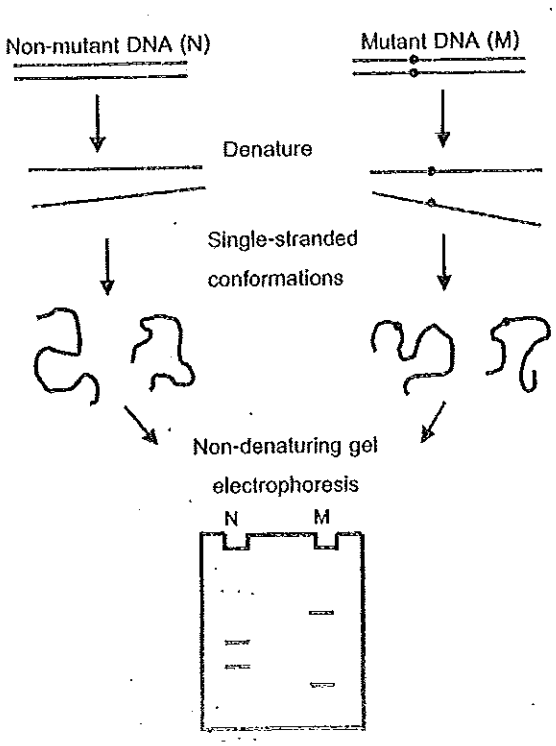
1.2.2.3 เทคนิคสำหรับการวิเคราะห์สนิปส์

เทคนิคที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาสนิปส์นั้นได้รับการพัฒนาอยู่ตลอดเวลา ซึ่งเทคนิคที่ใช้อยู่ในปัจจุบันมีพอสังเขปดังนี้

1) Single strand conformation polymorphism (SSCP)

SSCP เป็นเทคนิคหนึ่งที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการตรวจการกลายพันธุ์ เนื่องจากเป็นวิธีที่ค่อนข้างง่ายและมีศักยภาพในการบอกความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอที่ต่างกันแม้เพียง 1 เบส วิธีนี้ใช้ได้ดีกับดีเอ็นเอที่มีความยาวประมาณ 100-400 คู่เบส หลักการของเทคนิคนี้คือ การเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอสายเดี่ยวซึ่งเตรียมโดยนำผลิตผล PCR ผสมรวมเข้ากับบัฟเฟอร์ แล้วให้เคลื่อนที่ผ่าน non-denaturing polyacrylamide gel โดยตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏให้เห็นจะขึ้นอยู่กับขนาดและโครงสร้าง (conformation) ของสายดีเอ็นเอ ซึ่งจะเป็นตัวกำหนดโครงสร้าง

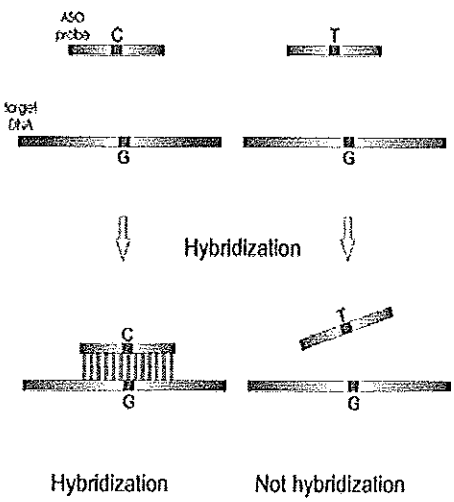
ทุติยภูมิ (secondary conformation) และตติยภูมิ (tertiary conformation) ของโมเลกุลดีเอ็นเอสายเดี่ยวนั้นๆ ดังนั้นความยาวของสายดีเอ็นเอตลอดจนตำแหน่งและจำนวนของเบสที่มีการกลายพันธุ์จึงมีผลต่อโครงสร้างทั้งสิ้น ซึ่งหมายความว่าเมื่อสายดีเอ็นเอมีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่ง เมื่อนำมาแยกใน non-denaturing polyacrylamide gel โมเลกุลของดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ต่างกันเพียงหนึ่งนิวคลีโอไทด์ก็สามารถแยกจากกันได้ เพราะมีการเปลี่ยนแปลงการเคลื่อนที่ ดังนั้นสายดีเอ็นเอที่เป็นปกติและสายดีเอ็นเอที่เกิดสนิปส์ เมื่อนำมาแยกด้วย non-denaturing polyacrylamide gel จะพบว่าโมเลกุลของดีเอ็นเอสายเดี่ยวทั้ง 2 สายมีการเคลื่อนที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 1.3)



ภาพที่ 1.3 หลักการทำงานของ SSCP ในการศึกษาการกลายพันธุ์แสดงโดย conformation ของดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่มีการกลายพันธุ์ (M) และดีเอ็นเอสายเดี่ยวปกติ (N) ภายหลังที่มีการแยกสายคู่สายดีเอ็นเอในสารละลาย จะมีการเคลื่อนที่ใน non-denaturing polyacrylamide gel ต่างกัน เนื่องจากโครงสร้างของโมเลกุลดีเอ็นเอที่ต่างกัน
ที่มา: สุราง และ เผด็จ. 2546. เทคนิคทางอณูชีววิทยา พิมพ์ครั้งที่ 1. หน้า 47. รูปที่ 2.

2) Allele specific hybridization

Allele specific hybridization (ASH) หรือ Allele specific oligonucleotide hybridization (ASO) เป็นการแยกแยะความแตกต่างของดีเอ็นเอต้นแบบที่มีลำดับเบสแตกต่างกันเพียง 1 ตำแหน่ง ด้วยการไฮบริไดเซชัน (hybridization) ระหว่างโพรบกับดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งจะเกิดขึ้นได้ต่อเมื่อเป็นคู่เบสที่จับกับเบสคู่สมในทุกตำแหน่งของเบส ถ้ามีความแตกต่างระหว่างคู่เบสเพียง 1 ตำแหน่ง ก็จะไม่ทำให้เกิดการไฮบริไดเซชันได้ (อมรา, 2542) โดยเทคนิคนี้ต้องสังเคราะห์โพรบ ASO จำนวน 2 ชนิด คือ โพรบ ASO ชนิดที่บริเวณตรงกลางของโพรบมีลำดับเบสปกติ และโพรบ ASO ชนิดที่บริเวณตรงกลางของโพรบมีลำดับเบสที่เป็นสนิปส์ หากดีเอ็นเอต้นแบบมีลำดับเบสที่เป็น
สนิปส์ โพรบ ASO ชนิดที่บริเวณตรงกลางของโพรบมีลำดับเบสปกติ จะไม่สามารถจับกับเบสคู่สมของดีเอ็นเอต้นแบบ ทำให้ไม่เกิดการไฮบริไดเซชัน ส่วนโพรบที่บริเวณตรงกลางของโพรบมีลำดับเบสที่เป็นสนิปส์จะสามารถจับกับเบสคู่สมของดีเอ็นเอ
ต้นแบบ และเกิดการไฮบริไดเซชัน ทำให้สามารถตรวจหาความผิดปกติได้ (ภาพที่ 1.4)



ภาพที่ 1.4 หลักการทำงานของ Allele specific hybridization โดยโพรบที่มีความจำเพาะกับดีเอ็นเอต้นแบบจะสามารถจับกับเบสคู่สมของดีเอ็นเอต้นแบบ และทำให้เกิดการไฮบริไดเซชัน ทำให้สามารถตรวจหาความผิดปกติได้
ที่มา: Sobrino *et al.*, 2005. SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. Forensic Sci. Int.154: Page 184. Figure 1A.

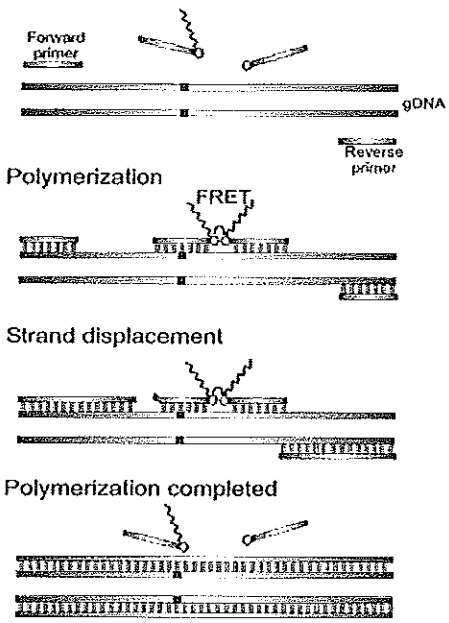
3) LightCycler

หลักการของเทคนิคนี้คือ ใช้โพรบ 2 ชนิดที่ติดฉลาดด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ 2 ชนิด โดยโพรบชนิดที่ 1 ติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสซีน (fluorescein) บริเวณปลาย 3' ส่วนโพรบชนิดที่ 2 ติดฉลากด้วยสี LightCycler-Red fluorophore (LC Red) บริเวณปลาย 5' เมื่อโพรบชนิดที่ 1 และโพรบชนิดที่ 2 เข้ามาจับกับเบสคู่สมของดีเอ็นเอต้นแบบ โดยจะหันปลาย 5' ที่ติดฉลากด้วยสี LC Red เข้ามาจับกับโพรบชนิดที่ 1 จากนั้นสีฟลูออเรสซีนจะถูกกระตุ้นและปล่อยแสงฟลูออเรสเซนต์สีเขียวออกมา ซึ่งแสงที่ปล่อยออกมาจะไปกระตุ้นสี LC Red ให้ปล่อยพลังงานแสงออกมาและถูกวัดด้วยเครื่อง *LightCycler*® หลังขั้นตอน annealing หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์จีโนไทป์ (genotype) โดยพิจารณาจาก melting temperature (Tm) ซึ่งอาศัยหลักการของ ASO หากไม่สามารถจับกับเบสคู่สมได้ ค่า Tm จะต่ำกว่าโพรบที่สามารถจับกับเบสคู่สมได้ โดย *LightCycler*® software แปลค่าออกมาเป็น peak ของ Tm (ภาพที่ 1.5) โดยในลำดับเบสปกติ โพรบทั้ง 2 ชนิดสามารถจับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้จะทำให้สามารถวัดพลังงานแสงที่ปล่อยออกมาได้ หากเป็นลำดับเบสที่มีสนิปโพรบทั้ง 2 ชนิดจะไม่สามารถจับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้ จะทำให้ไม่สามารถวัดพลังงานแสงที่ปล่อยออกมาได้

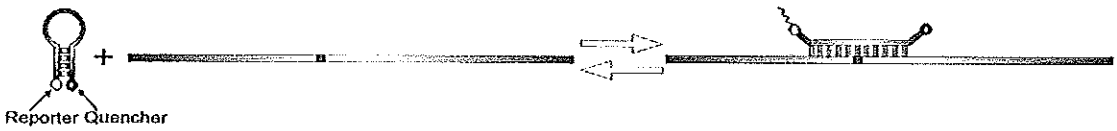
4) Molecular beacons

มีการออกแบบโพรบ 2 ชนิด คือ โพรบที่มีลำดับเบสปกติ และโพรบที่มีลำดับเบสสนิป คล้ายกับโพรบของ Taqman assay (ในข้อ 5) โดยโพรบทั้ง 2 ชนิด จะมีการติดฉลากด้วยสารเรืองแสงต่างชนิดกัน โดยปลายด้านหนึ่งของโพรบติดด้วยสารเรืองแสง reporter dye อีกด้านหนึ่งติดฉลากด้วย quencher dye และบริเวณปลายทั้ง 2 ด้านของโพรบจะมีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกัน ทำให้โพรบมีลักษณะเป็นรูปบ่วง (loop) และ reporter dye อยู่ใกล้กับ quencher ซึ่งเป็นตัวกด reporter dye ไม่ให้ปล่อยแสงฟลูออเรสเซนต์ออกมา บริเวณบ่วงของโพรบมีลำดับเบสที่จำเพาะกับลำดับเบสของดีเอ็นเอต้นแบบ เมื่อมีการจับกันระหว่างโพรบและดีเอ็นเอต้นแบบ จะทำให้มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโพรบ ซึ่งจะแยก quencher ออกจาก reporter dye ทำให้สามารถปล่อยฟลูออเรสเซนต์ออกมาได้ (ภาพที่ 1.6) โดยหากลำดับเบสของดีเอ็นเอต้นแบบและลำดับเบสของโพรบไม่จำเพาะ

ต่อกัน จะทำให้โพรบจะไม่สามารถจับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้ ส่งผลให้โพรบไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง จึงไม่สามารถวัดแสงฟลูออเรสเซนต์ได้



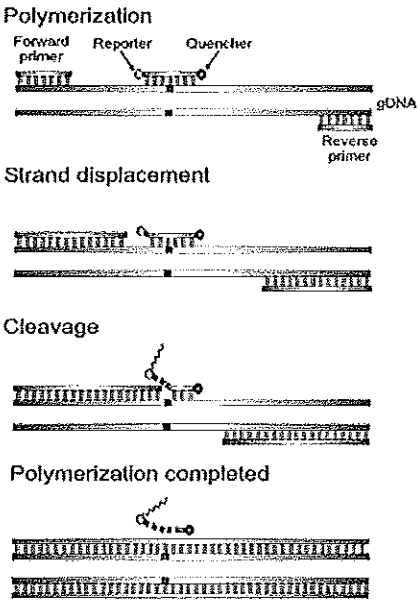
ภาพที่ 1.5 หลักการทำงานของ *LightCycler*® โดยโพรบชนิดที่ 1 ติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสซีน (fluorescein) บริเวณปลาย 3' ส่วนโพรบชนิดที่ 2 ติดฉลากด้วยสี LightCycler-Red fluorophore (LC Red) บริเวณปลาย 5' เมื่อโพรบชนิดที่ 1 สามารถจับกับเบสคู่สมของดีเอ็นเอต้นแบบ โพรบชนิดที่ 2 ก็จะเข้ามาจับกับเบสคู่สมของดีเอ็นเอต้นแบบ โดยจะหันปลาย 5' ที่ติดฉลากด้วยสี LC Red เข้ามาจับกับโพรบชนิดที่ 1 จากนั้นสีฟลูออเรสซีนจะถูกกระตุ้นและปล่อยแสงฟลูออเรสเซนต์ออกมา
ที่มา: Sobrino *et al.*, 2005. SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. Forensic Sci. Int.154: Page 185. Figure 2A.



ภาพที่ 1.6 หลักการทำงานของ Molecular beacons โดยปลายด้านหนึ่งของโพรบติดด้วยสารเรืองแสง reporter dye อีกด้านหนึ่งติดฉลากด้วย quencher dye และบริเวณปลายทั้ง 2 ด้านของโพรบจะมีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกัน ทำให้โพรบมีลักษณะเป็นรูปบ่วง (loop) บริเวณบ่วงของโพรบมีลำดับเบสที่จำเพาะกับลำดับเบสของดีเอ็นเอต้นแบบ เมื่อเกิดการจับกันของเบสคู่สมจะทำให้มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโพรบ ซึ่งจะแยก quencher ออกจาก reporter dye ทำให้สามารถปล่อยฟลูออเรสเซนต์ออกมาได้
ที่มา: Sobrino *et al.*, 2005. SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. Forensic Sci. Int.154: Page 185. Figure 2C.

5) *5' exonuclease activity*: *Taqman*® *assay*

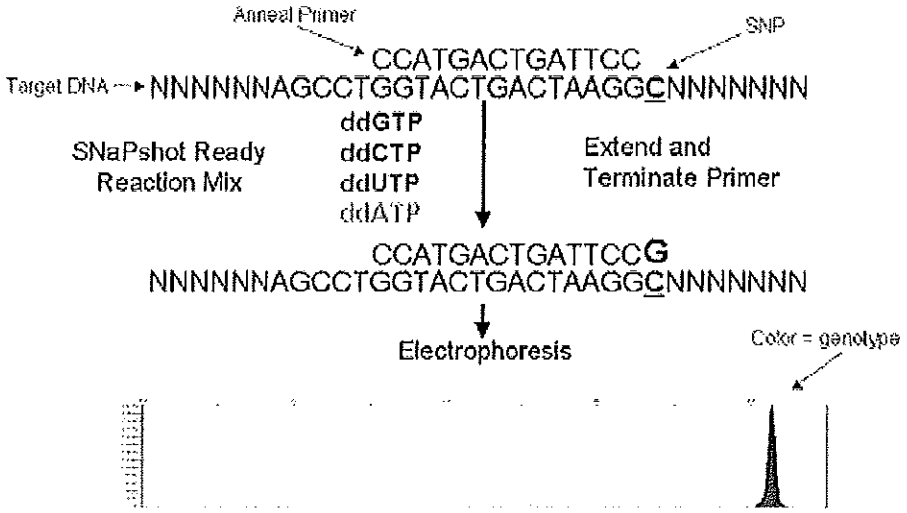
เทคนิคนี้มีการออกแบบโพรบ 2 ชนิด คือ โพรบที่มีลำดับเบสปกติและโพรบที่มีลำดับเบสเป็นสนิป โพรบที่มีลำดับเบสเป็นปกติจะสามารถคอมพลีเมนทารีกับลำดับเบสปกติได้ แต่ไม่สามารถจับกับเบสคู่สมของลำดับเบสที่เป็นสนิปได้ และโพรบที่มีลำดับเบสสนิป จะสามารถจับกับเบสคู่สมของลำดับเบสสนิปได้ แต่ไม่สามารถจับกับเบสคู่สมของลำดับเบสปกติได้เช่นกัน โดยโพรบทั้ง 2 ชนิด จะมีการติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ต่างชนิดกัน เมื่อ
โพรบถูกย่อยด้วย 5' exonuclease activity ของ *Taq* polymerase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสร้างสายดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR จะทำให้ reporter dye และ quencher dye แยกออกจากกัน ทำให้ปล่อยแสงฟลูออเรสเซนต์ของ reporter dye ออกมาเพิ่มขึ้นและผลของ quencher dye จะลดลง โดยจะทราบได้ว่าดีเอ็นเอต้นแบบมีการเกิดสนิปส์หรือไม่จากสีฟลูออเรสเซนต์ที่ติดฉลากไว้ว่าเป็นของโพรบชนิดไหน (ภาพที่ 1.7)



ภาพที่ 1.7 หลักการทำงานของ Taqman probe โดยปลายด้าน 5' ของโพรบติดฉลากด้วยสารเรืองแสง เรียกว่า reporter dye และทางด้านปลาย 3' จะติดฉลากด้วย quencher dye เมื่อโพรบเกิดการจับกับเบสคู่สมของดีเอ็นเอต้นแบบ reporter dye จะถูกกดทับด้วย quencher dye ต่อมาโพรบถูกย่อยด้วย 5' exonuclease activity ของ *Taq* polymerase จะทำให้ reporter dye และ quencher dye แยกออกจากกัน ทำให้ปล่อยแสงฟลูออเรสเซนต์ออกมา ทำให้สามารถวิเคราะห์หาชนิดของ
สนิปส์ได้
ที่มา: Sobrino *et al.*, SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. Forensic Sci. Int.154: Page 185. Figure 2B.

6) Electrophoresis และ fluorescence detection: *SNaPshot* ™

ใช้หลักการของ single base extension โดยบริเวณปลาย 3' ของไพรเมอร์จะมาจับกับดีเอ็นเอต้นแบบในตำแหน่งที่อยู่ก่อนตำแหน่งที่เกิดสนิป จากนั้นในตำแหน่งที่เกิดสนิปจะมี ddNTP มาจับ ซึ่ง ddNTP ตัวไหนจะมาจับนั้นขึ้นอยู่กับเบสของสนิป เช่น สนิปมีเบสเป็น C ดังนั้น ddGTP จะเข้ามาจับ เมื่อผ่าน capillary electrophoresis ผลที่ได้จะออกมาในรูป peak จึงทำให้ทราบชนิดของสนิปส์ได้จากสีของ peak ที่ปรากฏ (ภาพที่ 1.8)



ภาพที่ 1.8 หลักการทำงานของ *SNaPshot* ™ โดยบริเวณปลาย 3' ของไพรเมอร์จะมาจับกับดีเอ็นเอต้นแบบในตำแหน่งที่อยู่ก่อนตำแหน่งที่เกิดสนิปส์ และตำแหน่งที่เกิดสนิปส์จะมี ddNTP มาจับ เมื่อผ่าน capillary electrophoresis ผลที่ได้จะออกมาในรูป peak
ที่มา: http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/general documents/cms_042107.pdf (21 มิถุนายน 2551)

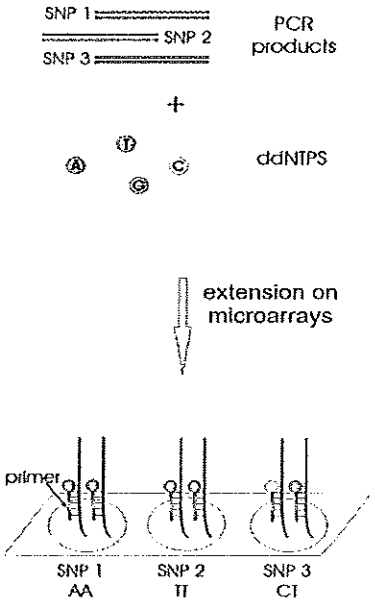
7) MALDI-TOF MS

Matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) เป็นเทคนิคที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์สนิปส์ ด้วยการวัดมวลโมเลกุลของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา minisequencing โดยใช้ ddNTP ในปฏิกิริยา

extension เพื่อเพิ่มมวลของอัลลีลสนิปส์ ทำให้แต่ละอัลลีลของแต่ละสนิปส์มีมวลโมเลกุลที่แตกต่างกัน จากนั้นนำดีเอ็นเอผสมกับส่วนประกอบ (matrix) ที่จับอยู่บริเวณผิวของเพลท (plate) หรือชิบ (chip) เมื่อยิงด้วยแสงเลเซอร์ พลังงานของแสงเลเซอร์จะถูกส่งมายัง matrix และดีเอ็นเอ ทำให้องค์ประกอบทั้ง 2 ส่วนหลุดออกมาจาก chip โดยโมเลกุลที่มีขนาดเล็กจะถูกส่งผ่านออกมาก่อนและถูกตรวจจับด้วยดีเทคเตอร์ (detector) ทำให้สามารถทราบชนิดของสนิปส์จากมวลของ ddNTP

8) Microarray และ fluorescence detection

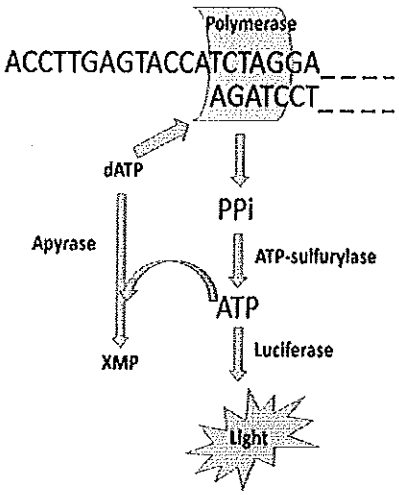
เทคนิคนี้อาศัยการจับกันอย่างจำเพาะเจาะจงของสายดีเอ็นเอสองสายที่เป็นคู่กัน โดยนำไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสที่จำเพาะต่อลำดับเบสปกติและลำดับเบสที่มีสนิปมาติดบนแผ่นกระจก ซึ่งได้ปรับให้มีคุณสมบัติที่ยอมให้ดีเอ็นเอสามารถเกาะติดที่ผิวหน้าของแผ่นกระจกได้และสามารถบรรจุชิ้นดีเอ็นเอได้ประมาณ 30,000 ชิ้น (วรพรรณ, 2549) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ต้องการวิเคราะห์มาทำปฏิกิริยา PCR และติดฉลากด้วย ddNTPs จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยา เพื่อให้จับคู่กับไพรเมอร์ที่อยู่บนแผ่นกระจก หลังจากล้างเอาดีเอ็นเอที่ไม่จับกับไพรเมอร์ออก สัญญาณจากแต่ละจุดจะถูกตรวจวัดด้วยการตรวจสอบสีฟลูออเรสเซนต์ว่าเป็นสีของ ddNTPs ชนิดใด ก็จะทำให้ทราบชนิดของสนิปส์ได้ (ภาพที่ 1.9)



ภาพที่ 1.9 หลักการทำงานของ Microarray และ fluorescence detection โดยนำดีเอ็นเอที่ทราบลำดับเบสมาติดบนแผ่นกระจก จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ต้องการวิเคราะห์มาทำปฏิกิริยา PCR ด้วยการใช้ไพรเมอร์ที่ติดฉลากด้วย ddNTPs จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยา เมื่อเกิดการจับกับเบสคู่สมทำให้สามารถวัดสีฟลูออเรสเซนต์ของ ddNTPs ได้
ที่มา: Sobrino *et al.*, 2005. SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. Forensic Sci. Int.154: Page 188. Figure 3A

9) Pyrosequencing

ในระหว่างการทำปฏิกิริยา PCR เมื่อไพรเมอร์เข้ามาจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ ตามด้วยการเติม dNTP ครั้งละ 1 ตัว หาก dNTP สามารถจับคู่กับดีเอ็นเอต้นแบบ เอนไซม์ DNA polymerase จะนำเอา dNTP ชนิดนั้นๆ เข้าต่อกับสายดีเอ็นเอ และปล่อย pyrophosphate (PPi) ออกมา ต่อมาเอนไซม์ ATP sulfurylase จะเปลี่ยน PPi เป็น ATP ซึ่งเอนไซม์ luciferase จะใช้ ATP ในการเปลี่ยน luciferin เป็น oxyluciferin และปล่อยแสงออกมาในปริมาณที่เป็นสัดส่วนกับปริมาณของ ATP สามารถตรวจจับแสงที่ปลดปล่อยออกมาโดยใช้กล้อง CCD โดยแสดงออกมาเป็นพีค (Pyrogram) ความสูงของพีค ก็เป็นสัดส่วนกับจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่ เอนไซม์ DNA polymerase ต่อกับสายดีเอ็นเอ ส่วนเอนไซม์ apyrase จะย่อย ATP และนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ถูกนำไปต่อกับสายดีเอ็นเอ ทำให้หยุดปฏิกิริยาการปลดปล่อยแสง จากนั้นก็จะเริ่มการเติม dNTP ชุดถัดไปเช่นนี้ไปตลอดการวิเคราะห์ (Ronaghi, 2003) (ภาพที่ 1.10) โดยแสงที่ปลดปล่อยออกมาจากการใช้ ATP เปลี่ยน luciferin เป็น oxyluciferin ของลำดับเบสคนปกติและคนที่มีการเกิดสนิปส์จะแตกต่างกัน ทำให้ทราบชนิดของสนิปส์ได้



ภาพที่ 1.10 หลักการทำงานของ Pyrosequencing โดยที่ไพรเมอร์เข้ามาจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ จากนั้นมีการเติม dNTP ครั้งละ 1 ตัว ต่อเข้ากับสายดีเอ็นเอเมื่อเอนไซม์ DNA polymerase ทำงานก็จะปล่อย pyrophosphate (PPi) ออกมา เอนไซม์ ATP sulfurylase จะเข้ามาเปลี่ยน PPi เป็น ATP เอนไซม์ luciferase จะใช้ ATP ในการเปลี่ยน luciferin ให้เป็นแสง ส่วนเอนไซม์ apyrase จะย่อย ATP และนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ถูกนำไปต่อกับสายดีเอ็นเอ ทำให้หยุดปฏิกิริยาการปลดปล่อยแสง จากนั้นก็จะเริ่มการเติม dNTP ชุดถัดไป

ที่มา: Ronaghi, 2003. Pyrosequencing for SNP Genotyping. Single Nucleotide Polymorphism *Methods and Protocols.* Human Press (212): Page 190. Figure 1.

1.2.2.4 การประยุกต์ใช้สนิปส์

ปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้สนิปส์ในด้านต่างๆ อย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะอย่างยิ่งทางการแพทย์ การประยุกต์ใช้สนิปส์ในด้านต่างๆมีดังนี้

1) ด้านเภสัชพันธุศาสตร์ (Pharmacogenetics)

ได้มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสนิปส์กับการตอบสนองต่อยาในแต่ละบุคคล เพื่อนำสนิปส์ไปใช้ทำนายประสิทธิภาพในการรักษาของยา และอาการข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นจากการตอบสนองต่อยาในเชิงลบ เพื่อใช้ปรับการรักษาด้วยยาให้เหมาะสมแก่ผู้ป่วยแต่ละราย ยกตัวอย่างเช่น การศึกษาผลของสนิปส์ที่เกิดในยีน N-acetyltransferase2 (NAT2) ต่อ Fluoropyrimidine metabolism และการควบคุมระดับของยา 5-FU ซึ่งทำให้มีประโยชน์ต่อการรักษามะเร็ง นอกจากนี้ยังสามารถใช้สนิปส์อธิบายความสัมพันธ์ทางเภสัชพลศาสตร์ (pharmacodynamics) ของยา และผลการรักษา

2) ด้านความผิดปกติของกระบวนการเมแทบอลิซึม (Metabolic disorders)

โดยตรวจสอบสนิปส์ที่มีความสัมพันธ์กับโรคที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมที่ผิดปกติแต่กำเนิด อันเป็นสาเหตุให้เอนไซม์บางชนิดทำงานผิดปกติ ไม่ทำงาน หรือไม่มีการสร้างเอนไซม์ แล้วส่งผลให้กระบวนการเปลี่ยนแปลงสารต่างๆ ในร่างกายเกิดบกพร่อง ยกตัวอย่างเช่น การขาดเอนไซม์ฟีนิลอะลานีนไฮดรอกซีเลส (phenylalanine hydroxylase) ซึ่งในทารกปกติจะใช้เอนไซม์ชนิดนี้ในการเปลี่ยนฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) ไปเป็นไทโรซีน (tyrosine) เมื่อขาดเอนไซม์ฟีนิลอะลานีนไฮดรอกซีเลสจึงก่อให้เกิดการคั่งของฟีนิลอะลานีนในสมองทำให้การพัฒนาสมองของทารกเกิดความบกพร่อง

3) ด้านโรคทางพันธุกรรม (Genetic diseases)

ใช้สนิปส์เป็นตัวบ่งชี้โรคทางพันธุกรรมบางชนิด เช่น สนิปส์ของยีน Adrenomedullin (AM) ที่ตำแหน่งอินทรอน 1 (+223A/C) และอินทรอน 3 (+1100C/G) มีผลต่อการแสดงออกของยีน ทำให้เพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจ และหลอดเลือด

สนิปส์ของยีน Apolipoprotein B (ApoB) ที่ตำแหน่ง C9774T (Arg 3500→Trp) และ G9115A (Arg 3500→Trp) ทำให้เกิดโรค familial hypercholesterolemia, atherosclerosis และ ischemic heart disease

สนิปส์ที่ codon 508 (F508 del) ทำให้เกิดโรค Cystic fibrosis ซึ่งเป็นความผิดปกติแบบ autosomal recessive disorder

สนิปส์ของยีน N - ras family ที่ตำแหน่ง codon 12, 13 และ 61 ทำให้เกิดโรค Acute lymphoblastic leukemia

4) ด้านพันธุศาสตร์ประชากร (Population genetics)

การวิเคราะห์เปรียบเทียบสนิปส์ระหว่างประชากรกลุ่มต่างๆ สามารถนำมาใช้ศึกษาประวัติศาสตร์ วิวัฒนาการของมนุษย์ การแพร่กระจายของมนุษย์แต่ละชาติพันธุ์ และรูปแบบการอพยพของประชากรได้ ทำให้ทราบต้นกำเนิด และบรรพบุรุษของมนุษย์

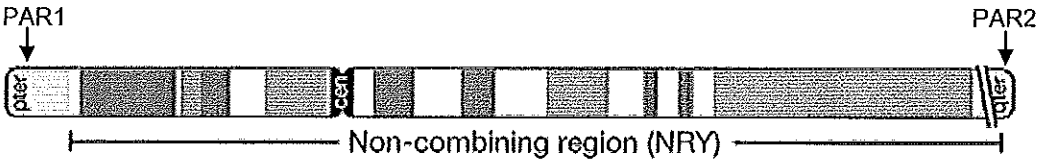
5) ด้านนิติวิทยาศาสตร์ (Forensic science)

ประโยชน์ด้านนิติวิทยาศาสตร์โดยตรงนั้นยังไม่ปรากฏชัดเจนเหมือนเช่นในด้านอื่นๆ อย่างไรก็ตาม การตรวจวิเคราะห์สนิปส์นั้นเหมาะสมกับดีเอ็นเอที่เก่า และเสื่อมสภาพ โดยวัตถุพยานที่เก็บมาจากสถานที่เกิดเหตุเพื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอควรมีคุณภาพดี ซึ่งหากสัมผัสกับแสงอัลตราไวโอเลต อุณหภูมิและความชื้นที่สูงมากเกินไป (Sanqoor *et al.*, 2008) หรือเกิดการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย รา หรือเป็นเนื้อเยื่อที่ผ่านการคงสภาพ (fixative) ก็จะเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ดีเอ็นเอเสื่อมสภาพ โดยชิ้นดีเอ็นเอที่เสื่อมสภาพจะมีขนาดเล็กกว่า 100 คู่เบส (Asari *et al.*, 2009) ซึ่งไม่สามารถวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วย STR ตามปกติได้ ดังนั้นจึงมีการนำสนิปส์มาใช้ในการวิเคราะห์วัตถุพยานทางนิติวิทยาศาสตร์ เนื่องจากเหมาะสมต่อการวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่เสื่อมสภาพ และดีเอ็นเอที่มีปริมาณน้อย (Petkovski *et al.*, 2006; Blanco-Verea *et al.*, 2008) ซึ่งในคดีตึกเวิร์ดเทรดได้มีการนำสนิปส์มาใช้ในการวิเคราะห์ร่วมกับ mini-STR และ mtDNA เพื่อหาความสัมพันธ์ทางเครือญาติของผู้เสียชีวิต โดยสนิปส์มีความสำคัญมากเนื่องจากดีเอ็นเอที่นำมาวิเคราะห์ส่วนใหญ่เป็นดีเอ็นเอที่เสื่อม สภาพจากความร้อน แบคทีเรีย และปัจจัยอื่นๆ ที่เป็นสาเหตุทำให้ดีเอ็นเอเสื่อมสภาพ

(Biesecker *et al.*, 2005) นอกจากนี้ Y-SNP ยังสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างที่เป็น mixed sample ได้เช่นกัน (Larue *et al.*, 2001; Lessig *et al.*, 2005; Blanco-Verea *et al.*, 2008) จึงทำให้การตรวจสนิปส์ในงานนิติวิทยาสาสตร์ได้รับความสนใจมากขึ้น นอกจากนี้การตรวจวิเคราะห์สนิปส์จะช่วยเพิ่มเติมข้อมูลที่ได้จากการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และลายพิมพ์นิ้วมือว่าผู้ที่เป็นฆาตกรหรือผู้เสียชีวิตเป็นคนชาติพันธุ์ใด และมีลักษณะพันธุกรรมที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะหรือไม่ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการคลี่คลายคดียากๆได้ การตรวจหาสนิปส์บนโครโมโซม Y จะทำให้ทราบว่าผู้ต้องสงสัยอยู่ในกลุ่มครอบครัวใด โดยสามารถสืบทราบได้จากเครือญาติฝ่ายพ่อที่เป็นเพศชาย

1.2.3 โครโมโซมวาย (Y-chromosome)

โครโมโซมวายเป็นโครโมโซมเพศ ทำหน้าที่กำหนดลักษณะเพศชายและเป็นโครโมโซมมนุษย์ที่มีขนาดเล็กที่สุด โดยมีความยาวของลำดับเบสประมาณ 60 ล้านคู่เบส (Mb) เมื่อเปรียบเทียบกับจีโนม (genome) ทั้งหมดของมนุษย์ คิดเป็นประมาณ 2 เปอร์เซนต์ โดยบริเวณปลายแขนทั้ง 2 ข้างของโครโมโซมวาย สามารถแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนกับโครโมโซมเอ็กซ์ (X-chromosome) ได้ เรียกบริเวณนี้ว่า pseudoautosomal regions (PAR) (Quintana-Murci *et al.*, 2001) ซึ่งบริเวณปลายแขนข้างสั้นเรียก PAR1 มีความยาวประมาณ 2.4 Mb ปลายแขนข้างยาวเรียก PAR2 1 มีความยาวประมาณ 0.4 Mb (Bianchi., 2009) นอกจากนี้ประมาณ 95 เปอร์เซนต์ ของโครโมโซมวายเป็นบริเวณที่ไม่สามารถแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนกับโครโมโซมเอ็กซ์ได้ เรียกบริเวณนี้ว่า non-recombining region of Y chromosome (NRY) ปัจจุบันเปลี่ยนชื่อเป็น male-specific region of Y chromosome (MSY) (Skaletsky *et al.*, 2003) (ภาพที่ 1.11) โดยการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของโครโมโซมวายจะผ่านสู่บุตรที่เป็นผู้ชายเท่านั้น ดังนั้นชายที่มีความเกี่ยวพันทางสายเลือดจะมีรหัสพันธุกรรมบนโครโมโซมวายที่เหมือนกันเกือบร้อยเปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 1.11 ลักษณะของโครโมโซมวาย โดยบริเวณปลายแขนทั้ง 2 ข้างของโครโมโซมวาย เรียกว่า pseudoautosomal regions (PAR) สามารถแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนกับโครโมโซมเอ็กซ์ได้ ส่วนบริเวณ non-recombining region (NRY) หรือ male-specific region (MSY) จะไม่สามารถแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนกับโครโมโซมเอ็กซ์ได้
ที่มา: ดัดแปลงจาก Tilford *et al.* 2001. A physical map of the human Y chromosome. Nature. Page 944. Figure 1.

บนโครโมโซมวายจะมีส่วนที่มีลำดับเบสซ้ำแบบไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) หรือเรียกว่า shot tandem repeats (STR) อยู่บริเวณ NRY ซึ่งจะมีการซ้ำของเบสขนาด 1-6 เบส และมีจำนวนซ้ำแต่ละตำแหน่งไม่เกิน 100 ครั้ง จำนวนซ้ำที่พบในบริเวณนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เนื่องจากมีความหลากหลายสูง ปัจจุบันพบว่า Y-STR มีมากกว่า 400 ตำแหน่ง ซึ่งการวิเคราะห์ Y-STR ในงานทางนิติวิทยาศาสตร์ในปัจุบันมีชุดวิเคราะห์ 2 ชุด คือ SWGDAM ใช้วิเคราะห์ Y-STR จำนวน 12 ตำแหน่ง และ Yfiler ใช้วิเคราะห์ Y-STR จำนวน 17 ตำแหน่ง (Butler *et al.*, 2008) เพื่อใช้ในการจำแนกบุคคลที่เป็นเพศชายจากวัตถุพยานที่มีการผสมกันของสารพันธุกรรมระหว่างเพศชายและเพศหญิง (mixed samples) และหาความสัมพันธ์ระหว่างพ่อ ลูก หรือเครือญาติทางพ่อ (Ya-jun *et al.*, 2008)

1.2.4 สนิปส์บนโครโมโซมวาย (Y-chromosome SNPs; Y-SNPs)

โดยทั่วไปการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในงานทางนิติวิทยาศาสตร์จะวิเคราะห์ STR ซึ่งบ่อยครั้งที่ไม่สามารถวิเคราะห์ได้ เนื่องจากดีเอ็นเอในตัวอย่างเกิดเสื่อมสภาพโดยเฉพาะตัวอย่างที่เก็บจากสถานที่เกิดเหตุ ซึ่งชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่จะนำมาวิเคราะห์ด้วย STR ส่วนใหญ่มีขนาด 100 คู่เบส ถึง 450 คู่เบส จึงทำให้มีการนำสนิปส์มาใช้ในงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ทดแทนในกรณีตัวอย่างเกิดเสื่อมสภาพจนไม่สามารถวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอประเภท STR ได้ เพราะชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถวิเคราะห์ให้สำเร็จได้ด้วยสนิปส์มีขนาดเพียง 45-55 คู่เบส (Kidd *et al.*, 2006) ซึ่งง่ายในการวิเคราะห์มากกว่า

สนิปส์บนโครโมโซมวายพบในบริเวณ NRY เช่นเดียวกับ STR ปัจจุบันพบสนิปส์บนโครโมโซมวาย ประมาณ 599 สนิปส์ โดยสามารถจัดเป็น haplogroup (Hg) และแต่ละ haplogroup สามารถแบ่งออกเป็น sub-haplogroup ย่อยๆ อีกมากมาย ซึ่งในปัจจุบันมีการค้นพบ Y-chromosome haplogroups ทั้งสิ้นจำนวน 311 Hg (ภาพที่ 1.12 และตารางที่ 1.1) การพบ haplogroup แต่ละชนิดจะแตกต่างกันในประชากรทั่วโลก ทำให้สามารถนำ haplogroup มาวิเคราะห์ชาติพันธุ์ต่างๆได้

ชนิด ตำแหน่ง และการแพร่กระจายของ Y chromosome haplogroup ในประชากรกลุ่มต่างๆ มีดังนี้

1) Haplogroup A เป็นกลุ่มที่เกิดสนิปส์ จำนวน 2 ตำแหน่ง ได้แก่ M91 และ P97 พบกระจายในบริเวณทวีปแอฟริกา โดยเฉพาะชาว Khoisan, Ethiopians และ Sudian

2) Haplogroup B เป็นกลุ่มที่เกิดสนิปส์ จำนวน 4 ตำแหน่ง ได้แก่ M60 M181 P85 และ P90 พบกระจายในบริเวณทวีปแอฟริกาโดยเฉพาะชาว Pygmies

3) Haplogroup C เป็นกลุ่มที่เกิดสนิปส์ จำนวน 5 ตำแหน่ง ได้แก่ RPS4Y711 M216 P184 P255 และ P260 พบกระจายในบริเวณเอเชีย Oceania และออสเตรเลีย

4) Haplogroup D เป็นกลุ่มที่เกิดสนิปส์ จำนวน 2 ตำแหน่ง ได้แก่ M174 และ JST021355 พบกระจายในบริเวณทิเบต และญี่ปุ่น

5) Haplogroup E เป็นกลุ่มที่เกิดสนิปส์ จำนวน 18 ตำแหน่ง ได้แก่ SRY4064 M96 P29 P150 P152 P154 P155 P156 P162 P168 P169 P170 P171 P172 P173 P174 P175 และ P176 พบกระจายในประเทศต่างๆ ในทวีปแอฟริกา

6) Haplogroup F เป็นกลุ่มที่เกิดสนิปส์ จำนวน 25 ตำแหน่ง ได้แก่ P14 M89 M213 P133 P134 P135 P136 P138 P139 P140 P141 P142 P145 P146 P148 P149 P151 P157 P158 P159 P160 P161 P163 P166 และ P187 พบกระจายในบริเวณอินเดียตะวันตก ศรีลังกา และเนเธอร์แลนด์

7) Haplogroup G เป็นกลุ่มที่เกิดสนิปส์ จำนวน 2 ตำแหน่ง ได้แก่ M201 และ P257 พบกระจายในตะวันออกกลาง เมดิเตอร์เรเนียน และเทือกเขา Caucasus

8) Haplogroup H เป็นกลุ่มที่เกิดสนิปส์ จำนวน 1 ตำแหน่ง ได้แก่ M69 พบกระจายในประเทศอินเดีย

9) Haplogroup I เป็นกลุ่มที่เกิดสนิปส์ จำนวน 6 ตำแหน่ง ได้แก่ M170 P19 P38 M258 P212 U179 พบกระจายในทวีปยุโรป

10) Haplogroup J เป็นกลุ่มที่เกิดสนิปส์ จำนวน 3 ตำแหน่ง ได้แก่ 12f2a M304 และ P209 โดย M172 เป็นสนิปใน Hg J2 ซึ่งสนิปส์ใน Hg J พบกระจายในตะวันออกกลาง ตอนเหนือของแอฟริกา ยุโรป เอเชียกลาง ปากีสถาน และอินเดีย

11) Haplogroup K เป็นกลุ่มที่เกิดสนิปส์ จำนวน 1 ตำแหน่ง ได้แก่ M9 พบกระจายในประเทศอินโดนีเซีย และออสเตรเลีย

12) Haplogroup L เป็นกลุ่มที่เกิดสนิปส์ จำนวน 6 ตำแหน่ง ได้แก่ M11 M20 M22 M61 M185 และ M295 พบกระจายในอินเดีย ตะวันออกกลาง เอเชียกลาง ตอนเหนือของแอฟริกา และทวีปยุโรปในประเทศแถบทะเลเมดิเตอร์เรเนียน

13) Haplogroup M เป็นกลุ่มที่เกิดสนิปส์ จำนวน 7 ตำแหน่ง ได้แก่ M4 M5 M106 M186 M189 M296 และ P35 พบกระจายบริเวณตะวันออกของอินโดนีเซีย และ Melanesia ได้แก่ ประเทศฟิจิ ประเทศนิวกินี และเกาะ Solomon

14) Haplogroup N เป็นกลุ่มที่เกิดสนิปส์ จำนวน 1 ตำแหน่ง ได้แก่ M231 พบกระจายในบริเวณตอนเหนือของยุโรป

15) Haplogroup O เป็นกลุ่มที่เกิดสนิปส์ จำนวน 4 ตำแหน่ง ได้แก่ M175 P186 P191 และ P196 โดย M95 เป็นสนิปใน Hg O2a ซึ่งสนิปส์ใน Hg O พบกระจายในเอเชียตะวันออก เอเชียกลาง และตะวันออกเฉียงใต้ และประเทศทางตอนใต้ของมหาสมุทรแปซิฟิก

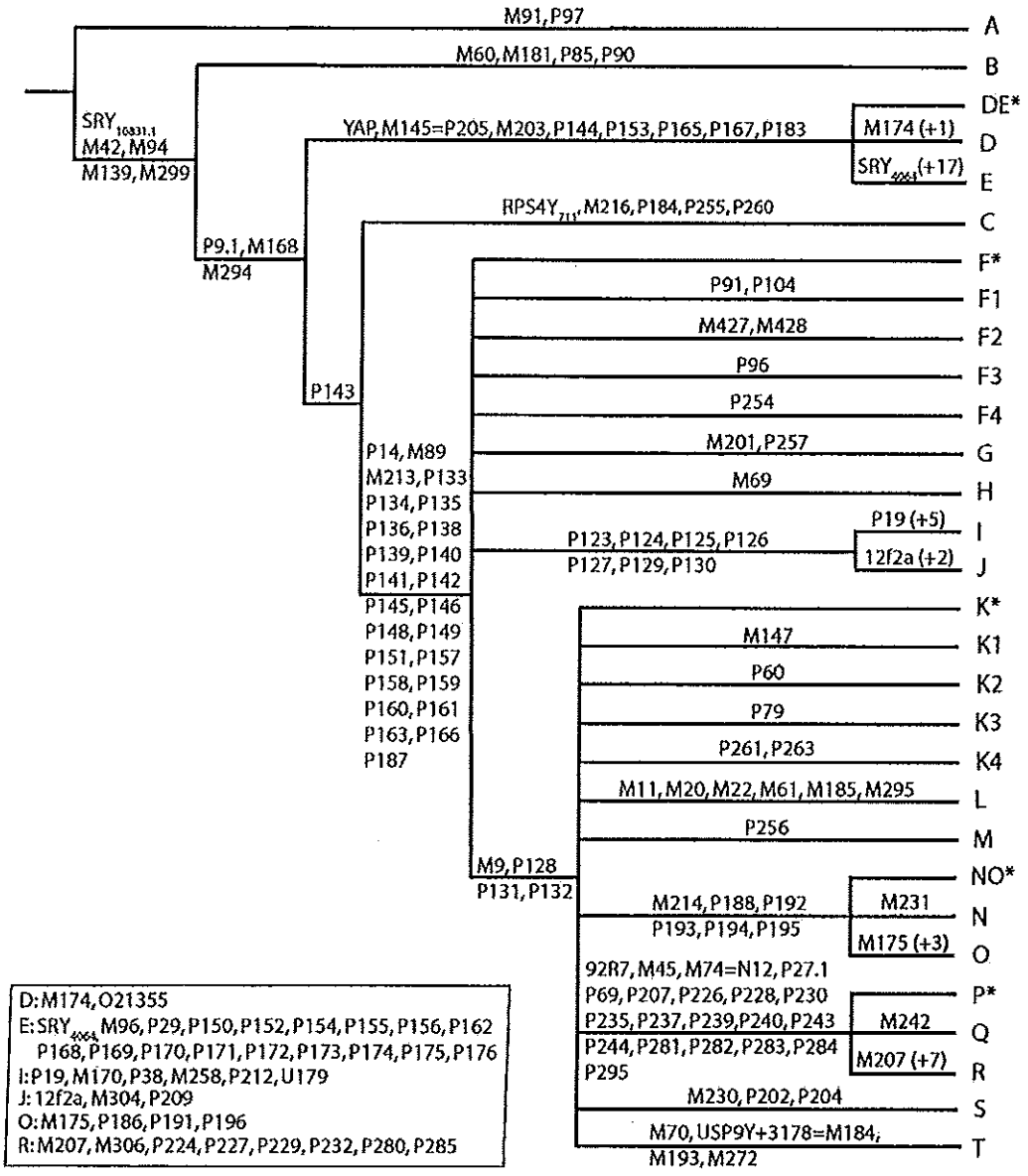
16) Haplogroup Q เป็นกลุ่มที่เกิดสนิปส์ จำนวน 1 ตำแหน่ง ได้แก่ M242 พบกระจายในบริเวณไซบีเรีย และอเมริกา

17) Haplogroup R เป็นกลุ่มที่เกิดสนิปส์ จำนวน 8 ตำแหน่ง ได้แก่ M207 M306 P224 P227 P229 P232 P280 และ P285 พบกระจายในทวีปยุโรป

18) Haplogroup S เป็นกลุ่มที่เกิดสนิปส์ จำนวน 3 ตำแหน่ง ได้แก่ M230 P202 และ P204 พบกระจายแถบประเทศอินโดนีเซีย

19) Haplogroup T เป็นกลุ่มที่เกิดสนิปส์ จำนวน 4 ตำแหน่ง ได้แก่ M170 M193 M272 และ M184 พบกระจายบริเวณตะวันออกกลาง แอฟริกา และยุโรป (Karafet *et al.*, 2008) ดังแสดงในตารางที่ 1.1

สำนักวิทยบริการฯ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่1.12 Y-chromosome DNA haplogroups แบ่งได้เป็น haplogroup A-T ซึ่งแต่ละ haplogroup สามารถแยกออกเป็น sub-haplogroup ได้อีกหลายกลุ่มตามความตกลงของ Y-Chromosome Consortium (YCC)

ที่มา: Karafet *et al.*, 2008. New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosomal haplogroup tree. Genome Res. Page 833. Figure 1.

ตารางที่ 1.1 สนิปส์บนโครโมโซมวาย จำนวน 246 ตำแหน่ง โดยสามารถจัดเป็น haplogroup (Hg) ต่างๆ ได้ จำนวน 153 Hg (ปี 2003) ซึ่งในปี 2008 ได้มีการค้นพบ Y-SNP ทั้งหมดรวม 599 ตำแหน่ง จัดเป็น haplogroup ต่างๆ ได้ จำนวน 311 Hg

ที่มา: Butler, 2003. Recent Developments in Y-Short Tandem Repeat and Y-Single Nucleotide Polymorphism Analysis. Page 101. Table 6.

Marker	Ancest/Der	YCC Hg	Marker	Ancest/Der	YCC Hg	Marker	Ancest/Der	YCC Hg	Marker	Ancest/Der	YCC Hg
M2	A>G	E3a	M70	A>C	K2	M138	C>T	H1c	M207	A>G	R
M3	C>T	Q3	M71	C>T	A2	M139	5G>4G	B-R	M208	C>T	
M4	A>G	M	M72	A>G	I1a3	M141	T>A	A2	M209	A>G	
M5	C>T	M	M73	2 bp DE[a]	R1b4	M143	G>T	Q2	M210	A>T	
M6	T>C	A2	M74	G>A	P-R	M144	T>C	A3b	M211	C>T	B2b4b
M7	C>G	O3d	M75	G>A	E2	M145	G>A	D-E	M212	C>A	
M8	G>T	C1	M76	T>G	L1	M146	A>C	B1	M213	T>C	F-R
M9	C>G	K-R	M77	C>T	C3c	M147	1 bp IN[a] (T)	K3	M214	T>C	O
M10	T>C	E2a6	M78	C>T	E3b1	M148	A>G	Eb1a	M215	A>G	
M11	A>G	L	M81	C>T	E3b2	M150	C>T	B2a	M217	A>C	C3
M12	G>T	J2e	M82	2 bp	H1	M151	G>A	D2b2	M218	C>T	
M13	G>C	A3b2	M85	C>A	E2b	M152	C>T	B2a1	M219	T>C	
M14	T>C	A2	M86	T>G	C3c	M153	T>A	R1b5	M220	A>G	A3b

ตารางที่ 1.1 (ต่อ)

Marker	Ancest/Der	YCC Hg	Marker	Ancest/Der	YCC Hg	Marker	Ancest/Der	YCC Hg	Marker	Ancest/Der	YCC Hg
M15	9 bp IN[a]	D1	M87	T>C	R1a1c	M154	T>C	E3a4	M221	G>A	
M16	C>A	M2a	M88	A>G	O2a1	M155	G>A		M223	C>T	
M17	4G>3G	R1a1	M89	C>T	F-R	M156	A>G	E3a6	M224	T>C	
M18	2 bp IN[a]	R1b1	M90	C>G	E2b	M157	A>C	R1a1b	YAP	Alu > Alu+	D-E
M19	T>A	Q3a	M91	9T>8T	A	M158	G>A	J2d	P1	C>T	E3a
M20	A>G	L	M92	T>C	J2f1	M159	A>C	O3c	P2	C>T	E3
M21	A>T	I1a2	M93	C>T	C3a	M160	A>C	R1b7	P3	G>A	A2
M22	A>G	L	M94	C>A	B-R	M161	C>A	I1b2a	P4	C>T	A2
M23	A>G	A2	M95	C>T	O2a	M163	A>C	J2f2	P5	C>T	A2
M25	G>C	Q2	M96	G>C	E	M164	T>C	O3b	P6	G>C	B2b1
M26	G>A	I1b2	M97	T>G	H1b	M165	A>G	E3a5, E3b2b	P7	T>C	B2b4
M27	C>G	L1	M98	G>C	E2b	M166	G>A	J2f2	P8	G>A	B2b4a
M28	T>G	A3a	M99	1 bp DE[a]	J2e1a	M168	C>T	C-R	P9	C>A	C-R
M30	G>A	B2b3	M101	C>T	O1a	M169	T>C	B2b2	P14	C>T	F-R
M31	G>C	A1	M102	G>C	J2e1	M170	A>C	I	P15	C>T	G2

ตารางที่ 1.1 (ต่อ)

Marker	Ancest/Der	YCC Hg	Marker	Ancest/Der	YCC Hg	Marker	Ancest/Der	YCC Hg	Marker	Ancest/Der	YCC Hg
M32	T>C	A3	M103	C>T	O1b	M171	G>C	A3b2a	P16	A>T	G2a
M33	A>C	E1	M105	C>T	C1	M172	T>G	J2	P18	C>T	G2a1
M34	G>T	B3b3a	M106	A>G	M	M173	A>C	R1	P19	T>G	I
M35	G>C	E3b	M107	A>G	E3b2a	M174	T>C	D	P20	C DE[a]	G1
M36	T>G	H1a	M108	T>C	B2a2, B2b3a	M175	5 bp	O	P21	C>A	N3a1
M37	C>T	I1b, R1b2	M109	C>T	B2a1	M178	T>C	N3a	P22 (M104)	G/A>A	M2
M38	T>G	C2	M110	T>C	O1b	M179	C>T		P25	C>A	R1b
M39	C DE[a]	H1c	M111	2 bp (TT) DE[a]	O2a1	M180	T>C		P27	G>A	P-R
M42	A>T	B-R	M112	G>A	B2b	M181	T>C	B	P28	C>T	A2b
M43	A>G	B2a2a	M113	A>G	O3d1	M182	C>T	B2	P29	A>C	E
M44	G>C	E1a	M114	T>C	A2a	M183	A>C		P31	T>C	O2
M45	G>A	P-R	M115	C>T	B2b2	M184	G>A		P33	T>C	C2a
M47	G>A	J2a	M116	A>C, triallelic	D2b, E3a2	M185	C>T		P36	G>A	Q

ตารางที่ 1.1 (ต่อ)

Marker	Ancest/Der	YCC Hg	Marker	Ancest/Der	YCC Hg	Marker	Ancest/Der	YCC Hg	Marker	Ancest/Der	YCC Hg
M48	A>G	C3c	M117	4 bp DE[a]	O3e1	M186	1 bp DE[a]	M	P37	T>C	D2
M49	T>C	A2	M118	A>T	A3b2b	M188	C>T		P44	G>A	C3
M50	T>C	O1b	M119	A>C	O1	M189	G>T	M	SRY_{4054}	G>A	E
M52	G>A	A3b1	M120	T>C	Q1	M190	A>G	A3b	SRY_{9138}	C>T	K1
M52	A>C	H	M121	5 bp DE[a]	O3a	M191	T>G		SRY_{10331a}	A>G	B-R
M54	G>A	E2b	M122	T>C	O3	M192	C>T		SRY_{10331b}	G>A	R1a
M55	T>C	D2	M123	G>A	E3b3	M193	4 bp IN[a]		92R7	G>A	P-R
M56	A>T	R1a1a	M124	C>T	P1	M194	T>C	Q3b	Tat (M46)	T>C	N3
M57	+ 1 bp	D2	M125	T>C	D2b1	M195	A>G		Apt	G>A	F1
M58	G>A	E3a1	M126	4 bp DE[a]	R1b5	M196	C>G	A2	LINE1	LINE > LINE+	O3c
M59	A>C	A3a	M127	C>T	A3b2	M197	T>C		MSY2	4>3	B2b1b,O1
M60	+ 1 bp	B	M128	2 bp	N1	M198	C>T		SRY_{2627}	C>T	R1b8
M61	C>T	L	M129	G>A	B2b3	M199	1 bp IN[a] (G)	Q3c	SRY_{+465}	C>T	

ตารางที่ 1.1 (ต่อ)

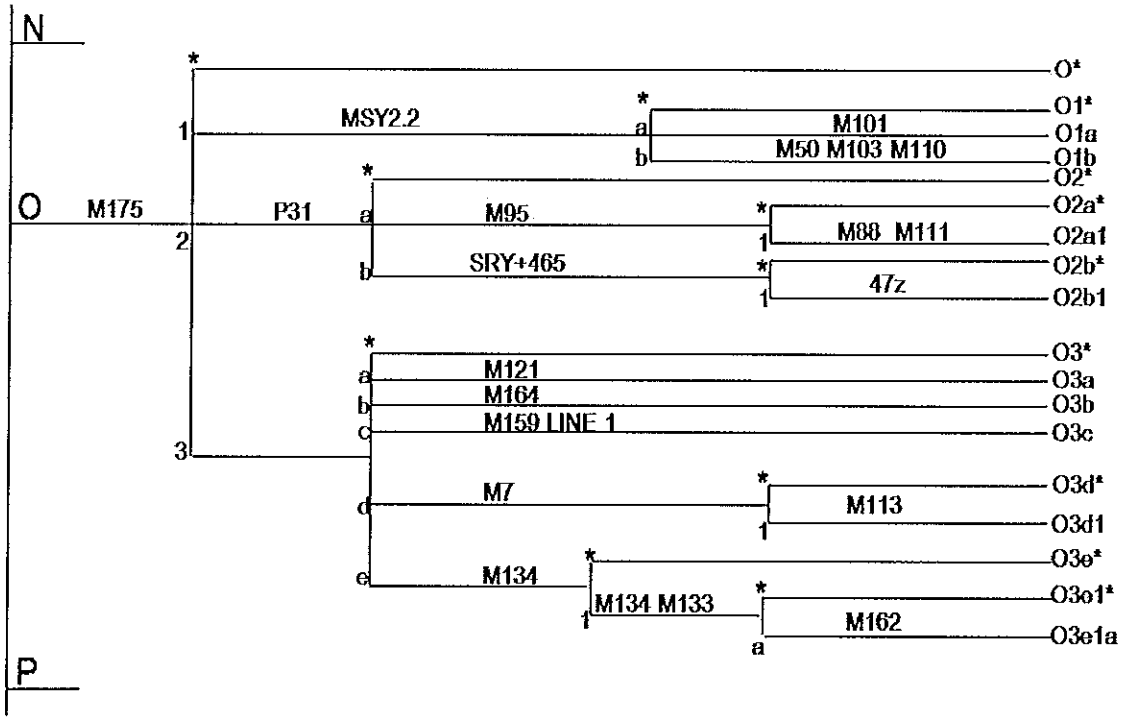
Marker	Ancest/Der	YCC Hg	Marker	Ancest/Der	YCC Hg	Marker	Ancest/Der	YCC Hg	Marker	Ancest/Der	YCC Hg
M62	T>C	J1	M131	9 bp DE[a]	C1	M200	G>A		47z	G>C	
M63	G>A	A3b2	M132	G>T	E1	M201	G>T	G	MEH1	C>G	A2
M64	A>G RE[a]	"D2,R1 a1c"	M133	1 bp (T) DE[a]	O3c1	M202	T>G		MEH2	G>T	Q
M65	A>T	R1b3	M134	-1 bp	O3c	M203	G>C	D-E	50f2 (P)	G>C	B2b
M66	A>C	E3a6	M135	+1 bp	A2	M204	T>G		12f2	present>absent	D2,J
M67	A>T	J2f	M136	C>T	E3b3a1	M205	T>A				
M68	A>G	J2b	M137	T>C	J2c	M206	T>G	A2			
M69	A>C	H	M138	C>T	H1c	M207	A>G	R			

1.2.5 ตำแหน่งสนิปส์ที่ทำการศึกษา

สนิปส์บนโครโมโซมวายที่ทำการศึกษามี จำนวน 2 ตำแหน่ง ได้แก่ M95 และ M172 โดยมีข้อมูลทางพันธุกรรมของแต่ละตำแหน่งดังนี้

1.2.5.1 ตำแหน่ง M95

เบสมีการเปลี่ยนแปลงจาก Cytosine (C) ไปเป็น Thymine (T) (Vallone and Butler, 2004b) จัดอยู่ใน Hg O2a (ภาพที่ 1.13) มีตำแหน่งนิวคลีโอไทด์บนโครโมโซมวายที่ 21,938,444 พบในประชากรชาวจีน ญี่ปุ่น และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้



ภาพที่ 1.13 สนิปตำแหน่ง M95 จัดอยู่ใน Haplogroup O2a

ที่มา: ดัดแปลงจาก Jobling and Tyler-Smith, 2003.The human Y chromosome:an evolutionary markercomes of age. Nature Reviews Genetics. (4): Page 602. Figure 3.

ตำแหน่งของสนิปอยู่ในบริเวณเอกซอน (exon) เป็นสนิปประเภท sSNP ของยีน Eukaryotic translation intiation factor 1A, Y chromosome (EIF1AY) (ภาพที่ 1.14) ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ในบริเวณ Azoospermia factor b (AZFb) ของโครโมโซมวาย ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับการสร้างตัวอสุจิ และการสร้าง

โปรตีนที่จำเป็นต่อการสร้างตัวอสุจิ (Kleiman *et al.*, 2007) ขณะนี้ยังไม่มีการยืนยันอย่างชัดเจนว่าการขาดหายของชิ้นส่วนของยีนชนิดนี้ มีผลทำให้เกิดโรคทางพันธุกรรมหรือฟีโนไทป์หรือไม่ (Huynh *et al.*, 2002)

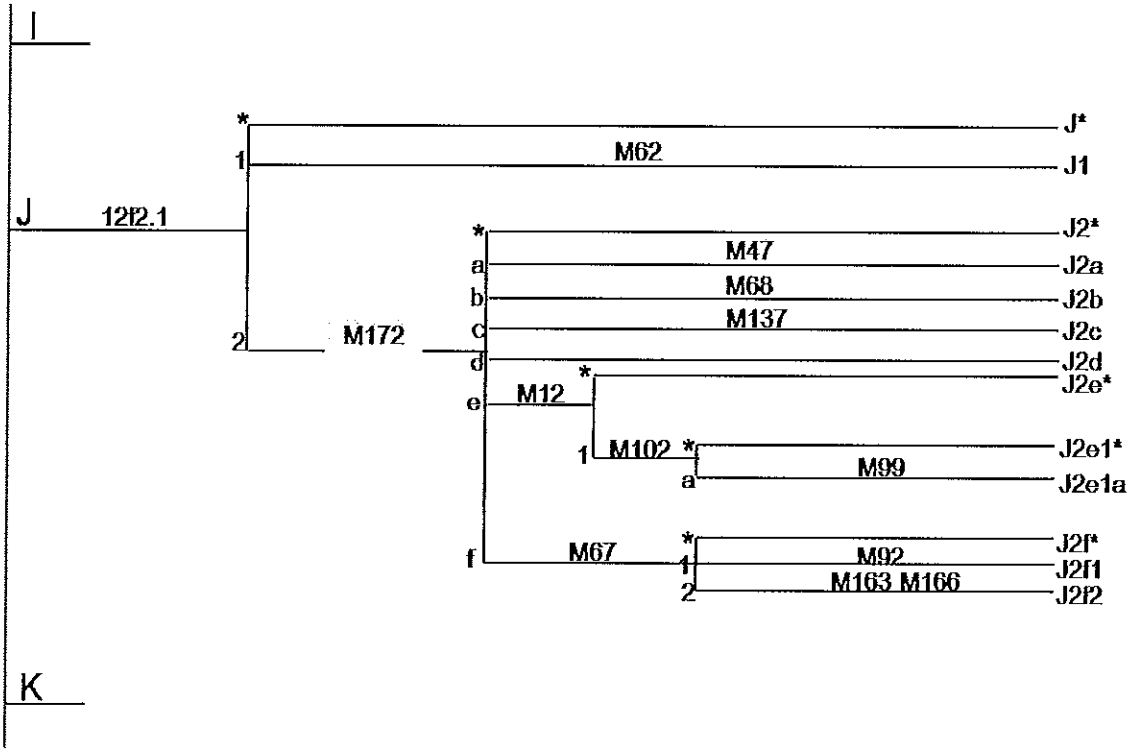
```
1   CAGCATTGGTCTGTGAACCCCACTTTCACAACATTTCACAAGCTAAAAGC  50
51  CCACTGGCTTGGATTTCCAGTCAGCTGCCAGCAATAGTGTTGCACCTTCT 100
101 TGGGATCAAATGGAGTTCCTGAGGATAAGGAAAGACTACCATATTAGTGC 150
151 TGGATGGCTTAGCCTTTCCAACCTGTAGGCTTAGGAGAGTCCAGACTTAC 200
201 TAGGGATGTAAGGGATCCTCTTACACAAAACAGGTGCACTACCAAAATGT 250
251 GGCCAGAGTGCTTTAAACAGGACCTTGACCCATTTCTCATCTCTGGGAAG 300
301 GACCTCACAACTGGGGCCTTCAAACACACCCACCCTCATTGTCTGGCTGA 350
351 CAAAGTTTTTACTTATTGCTGAAAAATAGTGCCCTGAGGGAAAGGCAGGC 400
401 TCCCATCACTGATGCTTTAATGACTCATCTGTTCTAG 437
```

ภาพที่ 1.14 ลำดับเบสของยีน EIF1AY อยู่ในช่วงนิวคลีโอไทด์ที่ 21,938,295 ถึง 21,938,731 มีตำแหน่งสนิปอยู่ที่นิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 21,938,444 ของเบสที่ขีดเส้นใต้ (150)
ที่มา: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi (8 เมษายน 2551)

1.2.5.2 ตำแหน่ง M172

เบสมีการเปลี่ยนแปลงจาก Thymine (T) ไปเป็น Guanine (G) (Vallone and Butler, 2004b) จัดอยู่ใน Hg J2 (ภาพที่ 1.15) มีตำแหน่งนิวคลีโอไทด์บนโครโมโซมวายที่ 14,969,635 พบในประชากรชาวอินเดีย และมาเลเซีย

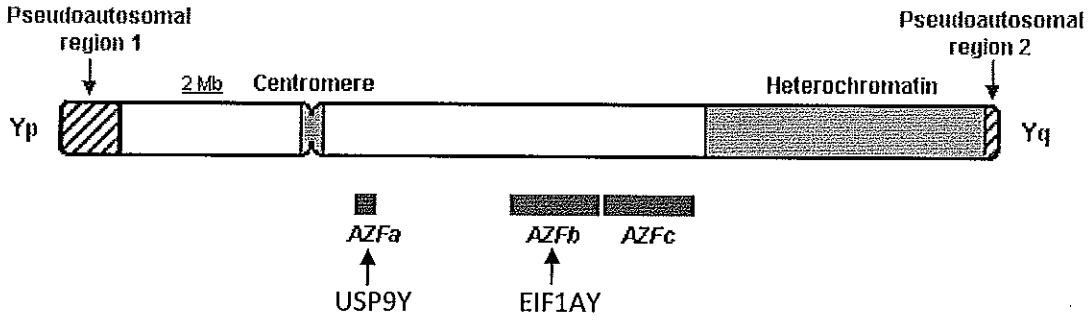
ตำแหน่งของสนิปอยู่ในบริเวณอินทรอน (intron) เป็นประเภท iSNP ของยีน Ubiquitin specific protease 9, Y-linked (USP9Y) (ภาพที่ 1.16) ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ในบริเวณ AZFa ของโครโมโซมวายที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการสร้างตัวอสุจิ โดยมีรายงานว่าในผู้ชายที่เป็นหมันจะมีความสัมพันธ์กับการกลายพันธ์ของยีน USP9Y (Layman, 2002)



ภาพที่ 1.15 สนิปตำแหน่ง M172 จัดอยู่ใน Haplogroup J2
ที่มา: ดัดแปลงจาก Jobling and Tyler-Smith, 2003. The human Y chromosome:an evolutionary markercomes of age. Nature review Genetic. (4): Page 602. Figure 3.

1 AATCTCTTTAAATATTTAAAATTAGGAGCCAGATGACCAGGATGCCCCAG 50
51 ATGAGCATGAGCCCTCTCCATCAGAAGATGCCCCATTATATCCTCATTCA 100
101 CCTGCCTCTCAGTATCAACAGGTAAAAAGGATTTTTCATTTTTATCCCCCA 150
151 AACCCATTTTGATGCTTTACTTAAAAGGTCTTCAATTATTATTTTCTTAA 200
201 ATATTTTGAAAGTCCAAACTTTCTCTGTACCTGGCTGATATTTAAAACTG 250
251 GATAAACTGTTCCAAACCAACATGGAGTGAAGATGGAT 288

ภาพที่ 1.16 ลำดับเบสของยีน USP9Y อยู่ในช่วงนิวคลีโอไทด์ที่ 14,969,466 ถึง 14,969,754 มีตำแหน่งสนิปอยู่ที่นิวคลีโอไทด์ที่ 14,969,635 ของเบสที่ขีดเส้นใต้ (168)
ที่มา: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi (8 เมษายน 2551)



ภาพที่ 1.17 ยีน USP9Y และยีน EIF1AY อยู่บริเวณ AZFa และ AZFb ของบริเวณ NRY ของโครโมโซมวาย

ที่มา: ดัดแปลงจาก http://images.google.co.th/imgres?imgurl=http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/picrender.fcgi%3Fbook%3Dgene%26part%3Dyci%26blobname%3Dycif1.jpg&imgrefurl=http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi%3Fbook%3Dgene%26part%3Dyci&usg=__LtVJQ8vwdHQFn9tnR1MSwGXXiis=&h=251&w=622&sz=46&hl=th&start=70&tbnid=tXh9eMJ18r9QM:&tbnh=55&tbnw=136&prev=/images%3Fq%3DUSP9Y%26gbv%3D2%26ndsp%3D18%26hl%3Dth%26sa%3DN%26start%3D54 (28 ธันวาคม 2552)

1.2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาสนิปส์บนโครโมโซมวาย (Y-SNPs)

การศึกษา Y-SNP ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน สามารถสรุปได้ 3 กลุ่มงานวิจัย คือ กลุ่มงานวิจัยด้านการแยกชาติพันธุ์ กลุ่มงานวิจัยด้านนิติวิทยาศาสตร์ และกลุ่มงานวิจัยด้านการพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์สนิปส์

1.2.6.1 กลุ่มงานวิจัยด้านการแยกชาติพันธุ์

Y-SNP และ Y-STR นิยมนำมาใช้ในการวิเคราะห์สืบค้นต้นกำเนิดของมนุษย์แต่ละชาติพันธุ์ และการอพยพย้ายถิ่นฐานของประชากรในยุคก่อนๆ โดยพิจารณาจากความคล้ายคลึงกันของลักษณะทางพันธุกรรม (genotype หรือ phenotype) และความถี่ของ Y-chromosome haplogroup ต่างๆ รวมทั้งนำมาใช้แยกชาติพันธุ์ โดยศึกษาจากเอกลักษณ์ของสนิปส์ ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงต่อชาติพันธุ์นั้นๆ และแตกต่างจากชาติพันธุ์อื่น

การศึกษา Y-STRs จำนวน 7 ตำแหน่ง และ Y-SNPs จำนวน 8 ตำแหน่ง ในประชากรชาว Polynesians และชนพื้นเมืองที่อาศัยอยู่บนเกาะ

ต่างๆ ของมหาสมุทรแปซิฟิก ขอบเขตโดยรอบประเทศฟิจิ จนถึงนิวซีแลนด์ ทำให้ทราบว่าประชากรในพื้นที่เหล่านี้ มีต้นกำเนิดมาจากเอเชีย/ไต้หวัน และ Melanesia (กลุ่มประเทศปาปัวนิวกินี ฟิจิ และอินโดนีเซียตะวันออก) เพราะมีสนิปส์ใน ตำแหน่ง M122 และ M9G เหมือนกัน ซึ่งน่าจะเกิดจากการอพยพมาจากชาวเอเชีย/ไต้หวันมายัง Melanesia แล้วเกิดการผสมผสานทางพันธุกรรมกับชาวพื้นเมือง ก่อนจะมีการอพยพต่อไปยังเกาะต่างๆ ในมหาสมุทรแปซิฟิก เช่น นิวซีแลนด์ และฮาวาย (Kayser *et al.*, 2000)

งานวิจัยของ Bender *et al.* (2003) แสดงให้เห็นว่าประชากรชาวไทย และจีน มีลักษณะทางพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกัน โดยได้ทำการเปรียบเทียบ Y-STRs จำนวน 8 ตำแหน่ง และ Y-SNPs จำนวน 11 ตำแหน่ง ระหว่างชายชาวเยอรมัน จีน และไทย จำนวน 229 คน พบว่า Y-STRs ตำแหน่ง DYS390 และ DYS391 มีความถี่ใกล้เคียงกันใน 3 กลุ่มประชากร และ Y-STRs ตำแหน่ง DYS19, DYS392 และ DYS393 มีความถี่ใกล้เคียงกันเฉพาะในประชากรชาวไทย และจีน ส่วนผลการศึกษา Y-SNPs พบว่าประชากรชาวเยอรมันและไทยต่างก็มี Y-SNP haplogroups จำนวน 5 haplogroups ส่วนประชากรชาวจีนมี Y-SNP haplogroups จำนวน 2 haplogroups โดยประชากรชาวไทยและจีนส่วนใหญ่มี Y-SNP haplogroups เดียวกัน คือ Hg 26 ซึ่งมีความเป็นไปได้สูงว่าไทยและจีนมีบรรพบุรุษร่วมกันแต่เกิดการอพยพย้ายถิ่นฐานของบรรพบุรุษ ส่วน haplogroup ของประชากรชาวเยอรมันมีความสัมพันธ์กับของประชากรชาวไทย และจีนเล็กน้อย โดยพบ Hg 2 ร่วมกันในประชากรทั้ง 3 กลุ่ม ทำให้คาดว่าในอดีตอาจมีความสัมพันธ์ทางสายเลือดกันอยู่บ้าง

Brion *et al.* (2004) ได้ศึกษา Y-SNPs จำนวน 29 ตำแหน่ง ในประชากรชาวกาลิเซีย ที่อาศัยอยู่ทางตะวันตกเฉียงเหนือของประเทศสเปน จำนวน 150 คน พบว่า Y-SNP มีความเฉพาะเจาะจงกับ Hg E* (E3b) ต่อมาได้ศึกษา Y-SNPs จำนวน 11 ตำแหน่ง ในประชากรที่อาศัยอยู่ในประเทศต่างๆ ในทวีปยุโรป ได้แก่ ชาวออสเตรเลีย เดนมาร์ค สเปน เยอรมัน เบลเยี่ยม และชาวนอร์เวย์ พบ Y-SNPs haplogroup ทั้งหมด 13 haplogroup โดย haplogroup ที่พบมากที่สุด คือ Hg R1b* (sub-haplogroup R1B1 และ R1b3df) ซึ่งพบในทุกกลุ่มประชากร ยกเว้นประชากรชาวสเปน โดยประชากรชาวนอร์เวย์มีความหลากหลายของ haplogroup มากที่สุด (ความหลากหลายเท่ากับ 0.793) (Brion *et al.*, 2005) ต่อมาได้ศึกษา Y-SNPs จำนวน 29

ตำแหน่ง จากประชากรผู้ชายในหลากหลายประเทศทั่วโลก ได้แก่ ชาวเดนมาร์ค ควีนสแลนด์ ตุรกี ไทย จีน ญี่ปุ่น เยอรมัน กาลิเซีย โมแซมบิค โซมาเลีย อาเจนตินา และโคลัมเบีย พบว่า Y-SNP Hg C3 พบในประชากรชาวไทย จีน และญี่ปุ่น ส่วน Hg D พบในประชากรชาวจีน และญี่ปุ่น ซึ่งจะเห็นได้ว่าประชากรชาวไทย จีน และญี่ปุ่น อาจจะมีบรรพบุรุษร่วมกัน ชาวจีนและญี่ปุ่น มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างกันมากกว่าชาวไทย (Brion *et al.*, 2006)

การศึกษา Y-SNPs จำนวน 20 ตำแหน่ง ในผู้ชายที่อาศัยอยู่ในตำบลต่างๆ ทางตอนใต้ของประเทศโปรตุเกส และชาวแอฟริกัน พบ Y-SNPs haplogroup ที่มีความถี่สูงที่สุดในประชากรชาวโปรตุเกส คือ Hg R1b* ส่วนประชากรชาวแอฟริกัน มี Hg E31b มากที่สุด (Silva *et al.*, 2006)

การศึกษาการแพร่กระจายของ Y-STRs และ Y-SNPs ระหว่างผู้ชายชาวอิตาลี 2 กลุ่ม จำนวน 163 คน ได้แก่ Rimini และ Valmarecchia ที่อาศัยอยู่ต่างภูมิภาคในประเทศอิตาลี โดยใช้ Y-STRs จำนวน 11 ตำแหน่ง และ Y- SNPs จำนวน 20 ตำแหน่ง พบจำนวน Y-STR haplotypes 155 ชนิด และ Y-SNPs haplogroup 13 haplogroups ซึ่ง Hg R1b มีความถี่สูงทั้งใน 2 กลุ่มประชากร แสดงว่าประชากรทั้ง 2 กลุ่มมีความสัมพันธ์ทางสายเลือดกัน เพราะมีลักษณะทางพันธุศาสตร์ที่คล้ายคลึงกัน (Ferri *et al.*, 2006)

จากการศึกษาความถี่ของ Y-SNPs จำนวน 16 ตำแหน่ง ในประชากรชาวแอฟริกัน ชาวมองโกเลีย และชาวอิตาลี พบว่า สนิปส์ที่มีความถี่สูงมี 3 ตำแหน่งได้แก่ ตำแหน่ง rs1482650 (พบความถี่ในชาวแอฟริกันเท่ากับ 0.91 และชาวมองโกเลียเท่ากับ 0.85) ตำแหน่ง rs1453461 (พบความถี่ในชาวอิตาลีเท่ากับ 0.89 และชาวแอฟริกันเท่ากับ 0.87) และตำแหน่ง rs675236 (พบในชาวแอฟริกันเท่ากับ 0.90) ซึ่งแสดงว่าในอดีตชาวแอฟริกันอาจเป็นบรรพบุรุษของชาวอิตาลี และชาวมองโกเลีย จึงทำให้มีความสัมพันธ์ทางสายเลือดกันบ้าง (Giardina *et al.*, 2007)

ได้มีการศึกษาการขาดหาย (deletion) ของยีน Amelogenin ในประชากรชายชาวมาเลเซียชาติพันธุ์ต่างๆ จำนวน 980 คน ได้แก่ ชาติพันธุ์อินเดีย มาเลย์ และจีน จากประชากร พบว่ามีจำนวน 18 คนไม่มียีน Amelogenin โดยแบ่งเป็น ชาติพันธุ์อินเดีย จำนวน 14 คน และชาติพันธุ์มาเลย์ จำนวน 4 คน การขาดหายของยีนเกิดขึ้นในบริเวณ Yp11.2 (DYS458-MSY1-AMEL-Y) ของโครโมโซม Y เมื่อนำมาทำการวิเคราะห์ Y-SNPs ในประชากรทั้ง 18 คน ที่มีการขาดหายของยีน Amelogenin พบว่าส่วนใหญ่มี

haplogroup เป็น Hg J2 (sub-haplogroup เป็น Hg J2e) (Chang *et al.*, 2007)

Yoshida *et al.* (2008) ได้ทำการศึกษาวิเคราะห์ Y-STRs จำนวน 11 ตำแหน่ง และ Y-SNPs จำนวน 4 ตำแหน่ง ในประชากรชาวญี่ปุ่นที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศญี่ปุ่น จำนวน 207 คน พบว่า Y-STR ตำแหน่ง DYS385 มีค่าความหลากหลายของยีน (Genetics Diversity) สูงที่สุด ตำแหน่ง DYS391 มีค่าความหลากหลายต่ำที่สุด พบ Y-SNPs จำนวน 2 haplogroups คือ Hg O พบมากในประชากรที่มาอาศัยอยู่บริเวณเคาโกชิมา (Kagoshima) ซึ่งอยู่ทางตอนใต้ของญี่ปุ่น ส่วน Hg D พบในประชากรที่มาอาศัยอยู่บริเวณกุนมะ (Gunma) ซึ่งอยู่ตอนกลางของประเทศญี่ปุ่น ซึ่งมีบันทึกว่าชาวโจมอน (Jomon) (บรรพบุรุษของ Hg D) ได้อพยพมายังญี่ปุ่นเมื่อ 10,000 ปีผ่านมา จากการศึกษานี้จึงทำให้เชื่อได้ว่าบรรพบุรุษชาวโจมอนได้มาอาศัยอยู่บริเวณกุนมะจริง

การศึกษา Y-SNPs จำนวน 8 ตำแหน่ง ใน Haplogroup J2 ในประชากรชาวอิตาลี จำนวน 1096 คน ที่อยู่อาศัยอยู่บริเวณตรงกลางของทิศเหนือ และที่อาศัยอยู่ทางทิศใต้ของประเทศอิตาลี พบว่าสามารถตรวจพบสนิปส์ตำแหน่ง M172 จำนวน 212 คน คิดเป็น 19% ของประชากรที่ทำการศึกษา โดยมีความถี่ของการแพร่กระจายสูงที่สุดทางตรงกลางของทิศเหนือของประเทศ คิดเป็น 0.065 และทางทิศใต้คิดเป็น 0.095 จึงเห็นได้ว่าบุคคลที่อยู่ในชาติพันธุ์เดียวกันแม้ว่าอาศัยอยู่ต่างบริเวณกัน ต่างก็มีสนิปชนิดเดียวกัน (Onofri *et al.* 2008)

การศึกษา Y-STRs จำนวน 11 ตำแหน่ง และ Y-SNPs จำนวน 48 ตำแหน่ง ในประชากรชาวฮังการี พบความหลากหลายของ haplotype 0.9939 ความหลากหลายของ haplogroup 0.8668 ตำแหน่งสนิปส์ที่มีความถี่สูงสุด คือ ตำแหน่ง M198 อยู่ใน Hg R1a1 การที่ประชากรชาวฮังการีมีความหลากหลายของสนิปส์ค่อนข้างสูง แสดงว่าบรรพบุรุษอาจจะมีการผสมผสานทางพันธุกรรมค่อนข้างหลากหลาย (Volgyi *et al.*, 2008)

Lessig et al. (2008) ได้ทำการศึกษาชนิดของ Y-SNPs จำนวน 29 ตำแหน่ง ในประชากร 3 กลุ่ม จำนวน 394 คน ได้แก่ ชาวเมือง Leipzig ประเทศเยอรมัน จำนวน 141 คน ชาวเมือง Wroclaw ประเทศโปแลนด์ จำนวน 101 คน และชาวเมือง Vladivostok ประเทศรัสเซีย จำนวน 151 คน พบว่าชาว Leipzig มีลักษณะพันธุกรรมที่แตกต่างกับชาว Wroclaw และ Vladivostok ซึ่ง

ประชากร 2 กลุ่มหลังนี้มีลักษณะพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกันค่อนข้างมาก ได้วิเคราะห์ว่าการที่ Lepzig มี Y-SNPs ที่แตกต่างจาก Wroclaw แม้ว่าจะอาศัยอยู่ในพื้นที่ติดกัน อาจมีสาเหตุมาจากปัญหาทางการเมืองและสังคม (การฆ่าล้างเผ่าพันธุ์ชาวยิวในโปแลนด์โดยผู้นำของเยอรมันในอดีต) ทำให้ทั้ง 2 ประเทศนี้ไม่มีการติดต่อสัมพันธ์กันส่งผลให้ไม่มีการผสมผสานทางพันธุกรรมระหว่าง Leipzig และ Wroclaw และการไม่มีการผสมผสานทางพันธุกรรมระหว่าง Leipzig และ Vladivostok เชื่อว่าเนื่องจาก Vladivostok เป็นกลุ่มลูกหลานเชื้อสาย Wroclaw ที่ได้มีการอพยพมาอยู่บริเวณทวีปเอเชียในประเทศรัสเซีย จึงได้สืบทอดความคิดมาจาก Wroclaw ทำให้ไม่มีการผสมผสานทางพันธุกรรมกับชาว Leipzig เช่นเดียวกัน ในขณะที่แม้ว่าชาว Vladivostok จะอาศัยอยู่บริเวณติดกับประเทศเกาหลีเหนือ แต่ก็ไม่พบว่ามีการผสมผสานทางพันธุกรรมกับชาวเอเชีย ซึ่งเป็นไปได้ว่าจะเกิดจากปัญหาความแตกต่างของภาษาที่ใช้ในการสื่อสารและวัฒนธรรมในการดำรงชีวิต แต่ยังไม่มีหลักฐานที่มายืนยันในสมมุติฐานนี้

การศึกษา Y-SNPs จำนวน 12 ตำแหน่ง ในประชากรผู้ชายชาว Bahia ที่อาศัยอยู่ทางตะวันตกเฉียงเหนือของประเทศบราซิล จำนวน 100 คน พบ Y-SNP haplogroup ที่มีความถี่สูงที่สุดคือ Hg E1b1a* ซึ่งเป็นสนิปส์ในตำแหน่ง M2 พบในประชากรที่อาศัยอยู่บริเวณ sub-Saharan ของทวีปแอฟริกา แสดงให้เห็นว่าผู้ชายชาว Bahia มีเชื้อสายแอฟริกัน (Nascimento *et al.*, 2009)

การศึกษา Y-SNPs จำนวน 14 ตำแหน่ง ในชาวบราซิล จำนวน 81 คน ที่อาศัยอยู่บริเวณเมืองซานเปาโล พบ Y-chromosome haplogroups จำนวน 11 haplogroups ซึ่ง Hg R1b1 มีความถี่สูงที่สุด และเป็นสนิปที่พบมากที่สุดในประชากรชาวยุโรป haplogroup ที่มีความถี่รองลงมาคือ Hg J2 ซึ่งพบในประชากรที่อาศัยอยู่บริเวณตะวันออกกลาง ตอนเหนือของแอฟริกา ยุโรป เอเชียกลาง ปากีสถาน และอินเดียแสดงให้เห็นว่าประชากรชาวบราซิลที่อาศัยอยู่บริเวณเมืองซานเปาโล อาจมีบรรพบุรุษที่มีต้นกำเนิดจากชาวยุโรป (Saobento *et al.*, 2009)

จากการศึกษาที่ผ่านมาสนิปส์สามารถใช้สืบค้นการอพยพย้ายถิ่นฐานของประชากรในยุคก่อนๆ โดยการศึกษาความคล้ายคลึงของสนิปส์ที่พบในประชากรที่อาศัยอยู่ต่างภูมิภาคทั้งใกล้และไกลและนำมาอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างกัน หากประชากรมีอพยพย้ายถิ่นฐานและมีการผสมผสานทาง

พันธุกรรมกับกลุ่มประชากรพื้นเมืองที่อาศัยอยู่ดั้งเดิมจะทำให้เกิดกลุ่มพันธุกรรมใหม่ขึ้น ในทางตรงกันข้ามถึงแม้ประชากรอาศัยอยู่บริเวณใกล้เคียงกันแต่หากไม่มีการปฏิสัมพันธ์ระหว่างกันก็จะไม่มีการผสมผสานทางพันธุกรรมระหว่างกัน ซึ่งจะทำให้ทราบถึงต้นกำเนิดหรือบรรพบุรุษของประชากรแต่ละชาติพันธุ์ รวมทั้งการอพยพย้ายถิ่นฐานของประชากรได้ ผลการสรุป Y-SNP ในประชากรกลุ่มต่างๆ ข้างต้นแสดงดังตารางที่ 1.2

1.2.6.2 กลุ่มงานวิจัยด้านนิติวิทยาศาสตร์

สนิปส์สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์เพื่อประโยชน์ทางนิติวิทยาศาสตร์ได้ เนื่องจากประชากรแต่ละชาติพันธุ์จะมีสนิปส์ที่เป็นเอกลักษณ์ของตนเอง และมีความแตกต่างจากชาติพันธุ์อื่น การตรวจสอบสนิปส์จะทำให้ทราบชาติพันธุ์ของผู้ต้องสงสัยหรือผู้เสียชีวิต เพราะมีอัตราการกลายพันธุ์ที่ต่ำกว่า STR (10^{-8} ต่อ 10^{-3}) ทำให้สนิปส์คงอยู่ในจีโนมได้ดีกว่า STR เมื่อมีการถ่ายทอดสนิปส์ดังกล่าวไปยังทายาทรุ่นต่อๆ ไป ทำให้สามารถตรวจสอบกลุ่มบุคคลที่มีเชื้อสายเดียวกันได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการคลี่คลายคดียากๆได้ นอกจากนี้สนิปส์ยังเป็นประโยชน์ต่องานทางนิติวิทยาศาสตร์ในกรณีที่ไม่สามารถวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยการวิเคราะห์ STR ตามปกติได้ เนื่องจากเหมาะสมต่อการวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่เสื่อมสภาพ (degraded DNA) และดีเอ็นที่มีปริมาณน้อย (traced DNA) และ Y-SNP ยังสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีการผสมของดีเอ็นเอผู้ชายและผู้หญิง (mixed DNA) ได้

การศึกษา Y-SNPs จำนวน 3 ตำแหน่ง จากตัวอย่างที่เป็น mixed sample ระหว่างผู้ชายและผู้หญิง พบว่า สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างที่เป็น mixed sample โดยสามารถระบุ Y-SNP haplogroups ได้เป็น Hg K-R, Hg E3a, Hg R1a และ Hg R1b3f (Lareu et al., 2001)

การศึกษา Y-SNPs จำนวน 8 ตำแหน่ง ในตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีปริมาณน้อย และตัวอย่างที่เป็น mixed sample พบว่า สามารถวิเคราะห์สนิปส์ทั้ง 5 ตำแหน่งได้ โดยสามารถระบุ Y-SNP haplogroups ได้เป็น Hg E3b และ Hg N3 (Lessig *et al.*, 2005)

ตารางที่ 1.2 สรุปผลการศึกษา Y-chromosome haplogroups ในชาติพันธุ์ต่างๆ ทั่วโลก

ชาติพันธุ์	รายละเอียดการศึกษา Y-SNPs				ผู้ศึกษา
	จำนวนตำแหน่ง	จำนวนคน	Y-SNP haplogroupsที่พบ	F/HgD/HtD	
สเปน (กาลิเซีย)	29	150	R1b*, J2	F= 53.33%, 11.33%	Brion *et al.*, 2004
	11	100	E3b, R1b*, F*	F= 55%, 32%, 8% HgD= 0.593	Brion *et al.*, 2005
	29	130	E3b*,E3b2	F= 6%, 6%	Brion *et al.*, 2006
โปรตุเกส	20	102	R1b*	F= 0.4901	Silva *et al.*, 2006
อิตาลี (Rimini)	20	98	R1b, E3b1, J2, G	F= 51.02%,11.22%,17.35%, 7.104%	Ferri *et al.*, 2006
อิตาลี (Valmerrecchia)	20	65	R1b, E3b1, J2, G	F= 46.15%, 18.46%, 15.38% 10.77%	
อิตาลี	8	212	J2	F= 19%	Onofri *et al.* (2008)
	16	680	rs145346	F= 0.89	Giardina et al. (2007)
ตุรกี	29	51	E3b3	F= 5.88	Brion *et al.*, 2006
เบลเยี่ยม	11	54	R1b*, F*, E3b, R1a1	F= 57%, 24.07%, 7.04%, 3.70% HgD= 0.617	Brion *et al.* (2005)
ออสเตรีย	11	129	R1b*, F*, R1a1, E3b	F= 62.79%, 38.75%, 13.95%, 12.40% HgD= 0.719	

ตารางที่ 1.2 (ต่อ)

ชาติพันธุ์	รายละเอียดการศึกษา Y-SNPs				ผู้ศึกษา
	จำนวนตำแหน่ง	จำนวนคน	Y-SNP haplogroups ที่พบ	F/HgD/HtD	
เยอรมัน	11	95	R1b*, F*, E3b, R1a1	F= 38.94%, 36.84%, 9.47% ,6.31% HgD= 0.705	Brion *et al.* (2005)
	29	150	B3b*, E3*b, E3a	F= 6.67%, 2%, 2%	Brion *et al.*, 2006
	10	95	1, 2	F= 41.1%, 34.7%	Bender *et al.*(2003)
เยอรมัน (Leipzig)	29	141	R1b, R1a1, I	F= 0.454, 0.270, 0.142	Lessig *et al.* (2008)
โปแลนด์(Wroclaw)	29	101	R1a1, R1b, E3b2	F= 0.495, 0.119, 0.020 HgD= 0.727	
ฮังการี	48	215	R1a1	F= 24.1% HgD= 0.8668	Volgyi *et al.* (2008)
เดนมาร์ค	11	107	R1a1, R1b*, F*	F= 42.05%, 26.16%, 17.75% HgD= 0.664	Brion *et al.* (2005)
	29	150	E3b*	F= 2%	Brion *et al.* (2006)
นอร์เวย์	11	51	F*, P*, R1a1, K*	F= 31.37%, 23.52%, 17.64%, 17.64% HgD= 0.793	Brion *et al.* (2005)
กรีนแลนด์	29	90	E3b*, C3	F= 1.11%, 1.11%	Brion *et al.* (2006)
โคลัมเบีย	29	60	E3a, E3b*	F= 8.33%, 6.67%	
อาเจนตินา	29	81	E3b3	F= 1.23%	

ตารางที่ 1.2 (ต่อ)

ชาติพันธุ์	รายละเอียดการศึกษา Y-SNPs				ผู้ศึกษา
	จำนวนตำแหน่ง	จำนวนคน	Y-SNP haplogroups ที่พบ	F/HgD/HtD	
บราซิล (Bahia)	12	100	E1b1a*	F= 19%	Nascimento *et al.* (2009)
บราซิล(San paolo)	14	81	R1b1, J2	F= 53.09%, 12.35%	Sao-bento *et al.* (2009)
โมแซมบิค	29	130	E3a, B, E2	F= 71.53%,17.69%,6.92%	Brion *et al.*(2006)
โซมาเลีย	29	105	E3b*	F= 74.28%	
แอฟริกา	20	104	E31b	F= n.d.	Silva *et al.*(2006)
แอฟริกา (Benin Gulf)	16	180	rs1482650, rs675236	F= 0.91, 0.90	Giardina et al. (2007)
มาเลเซีย (เชื้อสายมาเลย์)	21	4	J2, D	F= 0.59%, 0.29%	Chang *et al.*(2007)
มาเลเซีย (เชื้อสายอินเดีย)	21	14	J2, H	F= 3.17%, 0.31%	
ไทย	29	84	C3, C*, CR*	F= 5.37%, 5.37%, 5.37%	Brion *et al.*(2006)
	10	78	26, 2	F= 80.8%, 11.5%	Bender *et al.*(2003)

ตารางที่ 1.2 (ต่อ)

ชาติพันธุ์	รายละเอียดการศึกษา Y-SNPs				ผู้ศึกษา
	จำนวนตำแหน่ง	จำนวนคน	Y-SNP haplogroups ที่พบ	F/HgD/HtD	
มองโกเลีย	16	160	rs675236, rs1482650	F= 0.87, 0.85	Giardina et al. (2007)
จีน	29	55	C3, D	F= 5.45%, 1.81%	Brion *et al.*(2006)
	10	56	26, 2	F= 89.3%, 10.7%	Bender *et al.*(2003)
ญี่ปุ่น	29	40	D, C3	F= 30%, 7.5%	Brion et al.(2006)
	4	207	D, O	F= n.d. HtD= 0.9988	Yoshida *et al.*(2008)
	15	159	Haplotype 1-13	F= n.d. HtD= 0.838	Inagaki *et al.*(2002)
รัสเซีย (Vladivostok)	29	151	R1a1, R1b, E3*	F= 0.474, 0.059, 0.013 HgD= 0.719	Lessig *et al.*(2008)
Polynesians และชนพื้นเมืองที่อาศัยอยู่บนเกาะของมหาสมุทรแปซิฟิก	8	611	Haplotype M9, M122	F= 10.7%, 7.1%	Kayser *et al.*(2000)

หมายเหตุ HgD คือ ค่าความหลากหลายของ haplogroup ต่างๆในกลุ่มประชากรเดียวกัน rs คือ รหัสของสนิปส์จากฐานข้อมูลของ GenBank
HtD คือ ค่าความหลากหลายของ haplotype ในแต่ละ haplogroup F คือ ความถี่ของ haplogroup ที่พบในกลุ่มประชากร
n.d. คือ ไม่มีรายงาน

การศึกษา Y-SNPs จำนวน 5 ตำแหน่ง ในตัวอย่างดีเอ็นเอที่ผสมกันระหว่างเซลล์จากช่องคลอดและสเปิร์ม ก้นบุหรี่ เลือด เนื้อเยื่อกระพุ้งแก้ม และกระดูก พบว่าสามารถระบุสนิปส์ทั้ง 5 ตำแหน่งได้ เป็น Hg K-R, Hg R1a1, Hg P-R, Hg I และ Hg R1 (Schell *et al.*, 2006)

การศึกษา Y-SNPs จำนวน 3 ตำแหน่ง ในตัวอย่างดีเอ็นเอปริมาณน้อยจากตัวอย่างประชากรที่อาศัยอยู่บริเวณ Egyin Gol valley ทางตอนเหนือของมองโกเลีย จำนวน 201 คน พบว่า สามารถวิเคราะห์ Y-SNPs ในตัวอย่างที่มีปริมาณดีเอ็นเอเพียง 30 pg ได้ โดยระบุได้เป็น Hg N3, Hg C และ Hg Q (Petkovski *et al.*, 2006)

การศึกษา Y-SNPs จำนวน 27 ตำแหน่ง และ Y-STRs จำนวน 16 ตำแหน่ง ในตัวอย่างดีเอ็นเอจากกระดูกที่เสื่อมสภาพ ชิ้นส่วนของฟัน และตัวอย่างจากคดีลวนลามทางเพศ พบว่า Y-SNPs ใช้ปริมาณดีเอ็นเอในการวิเคราะห์เพียง 0.1 นาโนกรัม และสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างที่เป็น mixed sample ของผู้ชายอย่างน้อย 2 คนได้ โดยสามารถระบุ Y-SNP haplogroups ได้เป็น Hg R1b1c และ Hg E3b1 ในขณะที่ปริมาณดีเอ็นเอ 0.1 นาโนกรัม ไม่สามารถวิเคราะห์ด้วย Y-STR ได้ (Blanco-Verea *et al.*, 2008)

การวิเคราะห์ Y-SNPs จำนวน 9 ตำแหน่ง ที่พบมากที่สุดในประชากรชาวยุโรป ในตัวอย่างดีเอ็นเอผู้ชายจากคดีข่มขืน และ Y-SNP haplogroups ในตัวอย่างกระดูกที่ไม่ประสบผลสำเร็จจากการวิเคราะห์ด้วย Y-STR พบว่า สามารถระบุตัวอย่างดีเอ็นเอจากทั้ง 2 แหล่ง ได้เป็น Hg F (Brito *et al.* 2009)

อย่างไรก็ตามในการประยุกต์ใช้สนิปส์บนโครโมโซมวายเพื่อระบุบุคคลมีข้อด้อยมากกว่า STR โดยจำเป็นต้องมีจำนวนตำแหน่งของสนิปส์ที่มากพอ คือ 45-60 ตำแหน่ง จึงจะมีความน่าเชื่อถือเทียบเท่ากับ STR จำนวน 13-15 ตำแหน่ง (Butler *et al.*, 2007)

1.2.6.3 กลุ่มงานวิจัยด้านพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์สนิปส์

จากอดีตจนถึงปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์สนิปส์ เพื่อให้เกิดความสะดวกและรวดเร็วในการวิเคราะห์สนิปส์

ในปี 2001 Lareu *et al.* ได้มีการศึกษาการตรวจวิเคราะห์ Y-SNP ด้วยการใช้ LightCycler ในตัวอย่างที่เป็น mixed sample ระหว่างผู้ชายและผู้หญิง พบว่าสามารถแยกและวิเคราะห์ส่วนประกอบของผู้ชายออกจากผู้หญิงได้

ตั้งแต่ปี 2002 เป็นต้นมาได้มีการพัฒนาเทคนิค SNaPshot ซึ่งใช้ในการหาชนิดของสนิปส์ โดย Inagaki S. *et al.* (2002) ได้นำ SNaPshot มาศึกษา Y-SNP ในตัวอย่างผู้ชายชาวญี่ปุ่น จำนวน 159 คน และผู้หญิงชาวญี่ปุ่น จำนวน 3 คน ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์สนิปส์ จำนวน 15 ตำแหน่ง พบสนิปส์ของผู้ชายชาวญี่ปุ่น จำนวน 13 ชนิด ต่อมา Shanchez *et al.* (2003) การศึกษาสนิปส์บนโครโมโซม Y จำนวน 35 ตำแหน่ง โดยใช้ตัวอย่างผู้ชาย จำนวน 194 คนและผู้หญิง จำนวน 15 คน พบสนิปส์ทั้ง 35 ตำแหน่ง Quintans *et al.* (2004) ได้ทำการศึกษาสนิปส์บนไมโทคอนเดรีย บริเวณ HV-I (จากตำแหน่ง 16024-16400) ในตัวอย่างชาวไอบีเรีย จำนวน 266 คน โดยใช้สนิปส์ 17 ตำแหน่ง พบว่า haplogroup ที่พบมากที่สุดคือ haplogroup H ซึ่งพบ sub-haplogroup H* (23 เปอร์เซนต์), H1 (3010A; 39 เปอร์เซนต์), H2 (4769A; 7 เปอร์เซนต์), H3 (6776C; 18 เปอร์เซนต์), H4 (3992T; 6 เปอร์เซนต์), H5 (4336C; 6 เปอร์เซนต์), และ H6 (3915A; 1 เปอร์เซนต์) และ Schell *et al.* (2006) ได้ศึกษา Y-SNPs จำนวน 5 ตำแหน่ง ของผู้ชายชาวคอเคเซียน (Caucasian) จำนวน 50 คน และตรวจสอบการใช้ได้ของเทคนิค (validate) ของตัวอย่างดีเอ็นเอที่ผสมกันระหว่างเซลล์จากช่องคลอดและสเปิร์ม ก้นบุหรี่ เลือด เนื้อเยื่อกระพุ้งแก้ม และกระดูก พบว่าสามารถวิเคราะห์สนิปส์ทั้ง 5 ตำแหน่งได้ในทุกตัวอย่าง ทำให้ทราบว่า SNaPshot สามารถใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างชีววัตถุที่เป็น mixed sample และตัวอย่างที่เสื่อมสภาพได้

ในปัจจุบัน SNaPshot เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์สนิปส์มากที่สุด เนื่องจากสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีปริมาณน้อย ตัวอย่างที่เสื่อมสภาพ และตัวอย่างที่เป็น mixed sample ระหว่างผู้ชายและผู้หญิงได้ และมีราคาถูก

ในปี 2004 Vallone and Butler (a) ได้ทำการวิเคราะห์ Y-SNPs ในชาวยุโรปที่อาศัยอยู่ในประเทศอังกฤษ จำนวน 114 คน และชาวอเมริกา เชื้อสายแอฟริกัน ที่อาศัยอยู่ในประเทศอังกฤษ จำนวน 115 คน โดยใช้สนิปส์จำนวน 50 ตำแหน่ง ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยการใช้เทคนิค Allele-Specific Primer Extension (ASPE) ร่วมกับ Allele-Specific Hybridization (ASH) พบว่า ASPE และ ASH สามารถนำมาวิเคราะห์สนิปส์ได้ และการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ASPE มีสิ่งรบกวน (background) น้อยกว่า ASH

ตั้งแต่ปี 2005 ได้มีการนำเทคนิค MALDI-TOF-MS มาใช้ในการวิเคราะห์ Y-SNPs ในตัวอย่างที่เสื่อมสภาพ ซึ่ง Lessig *et al.* (2005) ได้

เปรียบเทียบการศึกษาสนิปส์ด้วยวิธี SNaPshot กับ MALDI-TOF MS พบว่า เทคนิคทั้ง 2 ชนิดนี้ สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีปริมาณน้อย และตัวอย่างที่เป็น mixed sample ระหว่างผู้ชายและผู้หญิง ในอัตราส่วน 1:1000 ได้ โดย MALDI-TOF MS จะใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยกว่า แต่มีข้อเสียคือ ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์จะต้องมีความบริสุทธิ์สูง เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ราคาแพงกว่าวิธี SNaPshot ในปี 2006 Petkovski *et al.* ได้ใช้ตัวอย่างที่มาจากผู้ชายจำนวน 201 คน ที่อาศัยอยู่บริเวณ Egyin Gol valley ทางตอนเหนือของมองโกเลีย ทำการศึกษาสนิปส์ 3 ตำแหน่ง พบว่าสามารถวิเคราะห์ Y-SNP ได้โดยใช้ปริมาณดีเอ็นเอเพียง 30 pg ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบของ MALDI-TOF MS ที่เหนือกว่าวิธีอื่น คือสามารถตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอในปริมาณต่ำมากได้ และ Hou *et al.* (2006) ได้ใช้ MALDI-TOF MS วิเคราะห์ Y-SNPs จำนวน 3 ตำแหน่ง ในตัวอย่างที่มาจากผู้ชายชาวจีน เชื้อสายฮั่น (Han) พบว่าสามารถวิเคราะห์สนิปส์ทั้ง 3 ตำแหน่งได้

การพัฒนาเทคนิคในการตรวจวิเคราะห์สนิปส์ยังคงดำเนินไปอย่างต่อเนื่อง เพื่อที่จะลดข้อจำกัด เพิ่มประสิทธิภาพในการวิเคราะห์สนิปส์ และประยุกต์สนิปส์ในการศึกษาด้านต่างๆ มากขึ้น

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาความจำเพาะของลำดับเบสเดี่ยวบนโครโมโซม Y (Y-SNPs) ตำแหน่ง M95 และ M172 ต่อผู้ชายไทยกลุ่มชาติพันธุ์มาเลย์และจีน ด้วยวิธี conventional gel electrophoresis ร่วมกับ direct sequencing

บทที่ 2
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

2.1 วัสดุและอุปกรณ์

2.1.1 กลุ่มตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้เป็นเส้นผมที่เก็บจากอาสาสมัครเพศชาย ที่มีชาติพันธุ์มาเลย์หรือจีน ที่มีภูมิลำเนาอยู่ในจังหวัดปัตตานี ยะลา และนราธิวาส และมีอายุ 20 ปีขึ้นไป จำนวนชาติพันธุ์ละ 10 คน โดยเกณฑ์ในการพิจารณาชาติพันธุ์มาเลย์ คือ มี ปู่ ย่า ตา ยาย บิดา และมารดาสืบเชื้อสายมาจากบรรพบุรุษมาเลย์ 3 รุ่น และดำรงชีวิตตามขนบประเพณีชาวมุสลิม เกณฑ์ในการพิจารณาชาติพันธุ์จีน คือ มี ปู่ ยา ตา ยาย บิดา และมารดาสืบเชื้อสายมาจากบรรพบุรุษจีน 3 รุ่น และดำรงชีวิตตามขนบประเพณีชาวพุทธ ซึ่งการศึกษานี้ได้ผ่านการพิจารณาและเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยที่ทดลองในมนุษย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เลขที่หนังสือ วท/จธ/50/10-2 และได้รับความยินยอมจากอาสาสมัครทุกคน โดยมีการลงนามเป็นลายลักษณ์อักษรในใบยินยอมเข้าร่วมโครงการ (ทวีภรณ์, 2553)

2.1.2 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษามีรายชื่อดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 รายการสารเคมีที่ใช้ในการศึกษา

สารเคมี		บริษัทผู้ผลิต
1.	Acetic acid (CH_3COOH)	J.T. Baker
2.	30% Acrylamide / Bis Solution ($C_3H_5NO/C_7H_{10}N_2O_2$)	Bio-Rad
3.	Agarose powder	USB Corporation
4.	Ammonium persulfate $(NH_4)_2S_2O_8$)	Bio-Rad
5.	Boric acid ($B(OH)_3$)	Amresco
6.	Ditiothreitol ($CHOHCH_2SH_2$)	PlusOne
7.	DNA Ladder (100 bp)	NEB

8.	Ethylenediaminetetraacetic acid (0.5M) (EDTA, $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8.2H_2O$)	USB Corporation
9.	Ethanol (CH_2OH)	J.T. Baker
10.	Ethidium bromide (EtBr, $C_{21}H_{20}BrN_3$) (10 mg/ml)	PlusOne
11.	Formaldehyde 37% (CH_2O)	BDH
12.	FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit	Favorgen
13.	Gel Loading Dye Blue (6X)	NEB
14.	Magnesium chloride($MgCl_2$)	Invitrogen
15.	Magnesium sulfate ($MgSO_4$)	Invitrogen
16.	N,N,N'N'-Tetramethyl-ethylamine (TEMED,$(CH_3)_2NCH_2CH_2N(CH_3)_2$)	PlusOne
17.	PCR buffer (10X)	Invitrogen
18.	*Pfx50™* DNA polymerase	Invitrogen
19.	*Pfx50™* PCR Mix (10X)	Invitrogen
20.	Sodium hydroxide (NaOH)	Ajax Finechem Pty Ltd.
21.	Sodium carbonate (Na_2CO_3)	Fisher Scientific
22.	Silver nitrate ($AgNO_3$)	BDH
23.	Taq DNA polymerase	Invitrogen
24.	Tris ($Na_2C(CH_2OH)_3$)	USB Corporation
25.	QIAamp DNA investigation Kit	QIAGEN
26.	2'-Deoxynucleotide 5'triphosphate Mix (10 mM, dNTP)	Invitrogen

2.1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

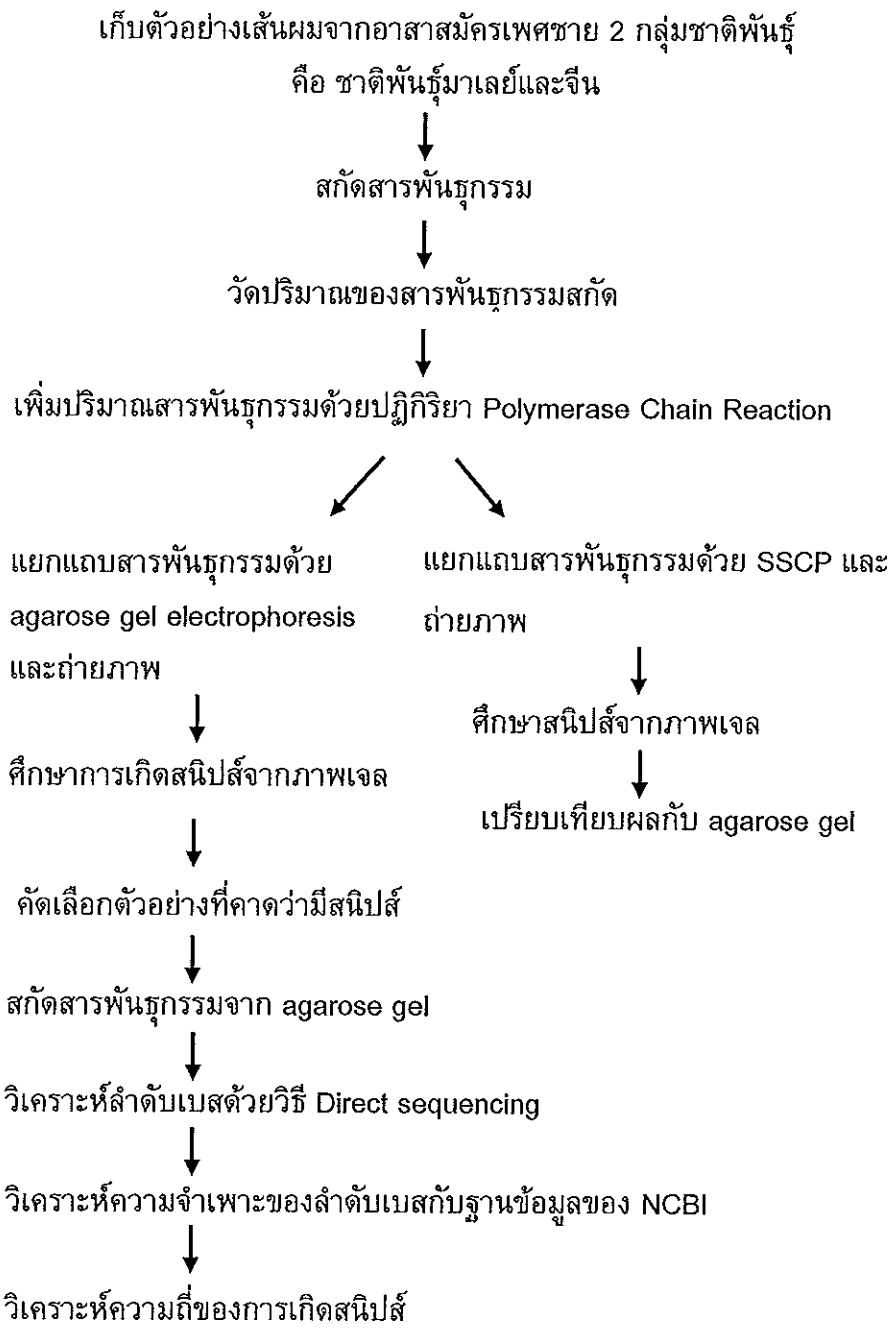
เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษามีรายชื่อดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 รายการเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา

เครื่องมือและอุปกรณ์		ยี่ห้อ	รุ่น	ประเทศผู้ผลิต
1.	เครื่องเขย่าสาร	Bibby Stuart	STR6	อังกฤษ
2.	เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง	Sartorious	ED 224S	เยอรมนี
3.	เครื่องหมุนเหวี่ยงสาร	HERMLE	Z223 M-2	เยอรมนี
4.	เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม	MJ Research	PTC-200	สหรัฐอเมริกา
5.	เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า	C.B.S.	ESP-300series II	สหรัฐอเมริกา
6.	ชุดอุปกรณ์เตรียมเจลสำหรับ Agarose gelelectrophoresis	Bio-rad Laboratory	Cell GT	สหรัฐเอริกา
7.	ชุดอุปกรณ์เตรียมเจลสำหรับ Polyacrylamide gel electrophoresis	Amersham Biosciences	Mini-VE	อังกฤษ
8.	เครื่องถ่ายภาพเจล	UVP	BioDoc-It	อังกฤษ
9.	เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม	Amersham Bioscience	Ultrospec 2100 pro	อังกฤษ
10.	ไมโครปิเปตแบบอัตโนมัติ	Eppendorf	Research	ญี่ปุ่น
11.	เครื่องกวนสาร	IKA	Big-squid	เยอรมนี
12.	ตู้เตรียมปฏิกิริยา PCR	Lab-Tech	ไม่ระบุ	เกาหลี
13.	เครื่องสแกนภาพ	Amersham Bioscieces	ไม่ระบุ	อังกฤษ
14.	Thermoblock	BioSan	TDB-120	ลัตเวีย

2.2 วิธีการทดลอง

2.2.1 การออกแบบการทดลอง



2.2.2 Primer

Primer ที่ใช้ในการศึกษามีรายการดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 รายการ primer ที่ใช้ในการศึกษา

ตำแหน่งสนิปส์	ลำดับเบส (5' ⟶3')	ขนาดผลผลิตพีซีอาร์ (คู่เบส)	ที่มา
M95	Forward primer: (1) GAT AAG GAA AGA CTA CCA TAT TAG TGC (27mer) (2) GAT AAG GAA AGA CTA CCA TAT TAG TGT (27 mer) Reverse primer: (1) GGG TGG GTG TGT TTG AAG G (19 mer)	212	Yuehai *et al.* (2001)
M172	Forward primer: (1) ATG AGC CCT CTC CAT CAG AA (20 mer) Reverse primer: (1) TCA CTC CAT GTT GGT TTG GA (20 mer)	225	ออกแบบโดยใช้โปรแกรม Primer 3

2.2.3 การออกแบบ primer ตำแหน่ง M172

ออกแบบ primer ตำแหน่ง M172 ด้วยโปรแกรม Primer 3 (http://www4a.biotec.or.th/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) มีหลักในการออกแบบ primer ดังนี้

1.) มีความยาว 18-30 นิวคลีโอไทด์

2.) มีการกระจายของเบสอย่างสม่ำเสมอ

3.) มี GC-content อยู่ระหว่าง 50-60 เปอร์เซ็นต์

4.) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer จำเพาะเพียงแห่งเดียวในสายพันธุกรรม

ต้นแบบ

5.) มีค่า Tm (melting temperature) อยู่ในช่วง 55-80 องศาเซลเซียส และ Tm ของ forward primer และ reverse primer มีค่าใกล้เคียงกัน

6.) หลีกเลี่ยงลำดับเบสที่จับกับลำดับเบสของตัวเอง

7.) หลีกเลี่ยงการลงท้ายด้วยเบส Thymine และ Guanine บริเวณปลาย 3' ของ Primer

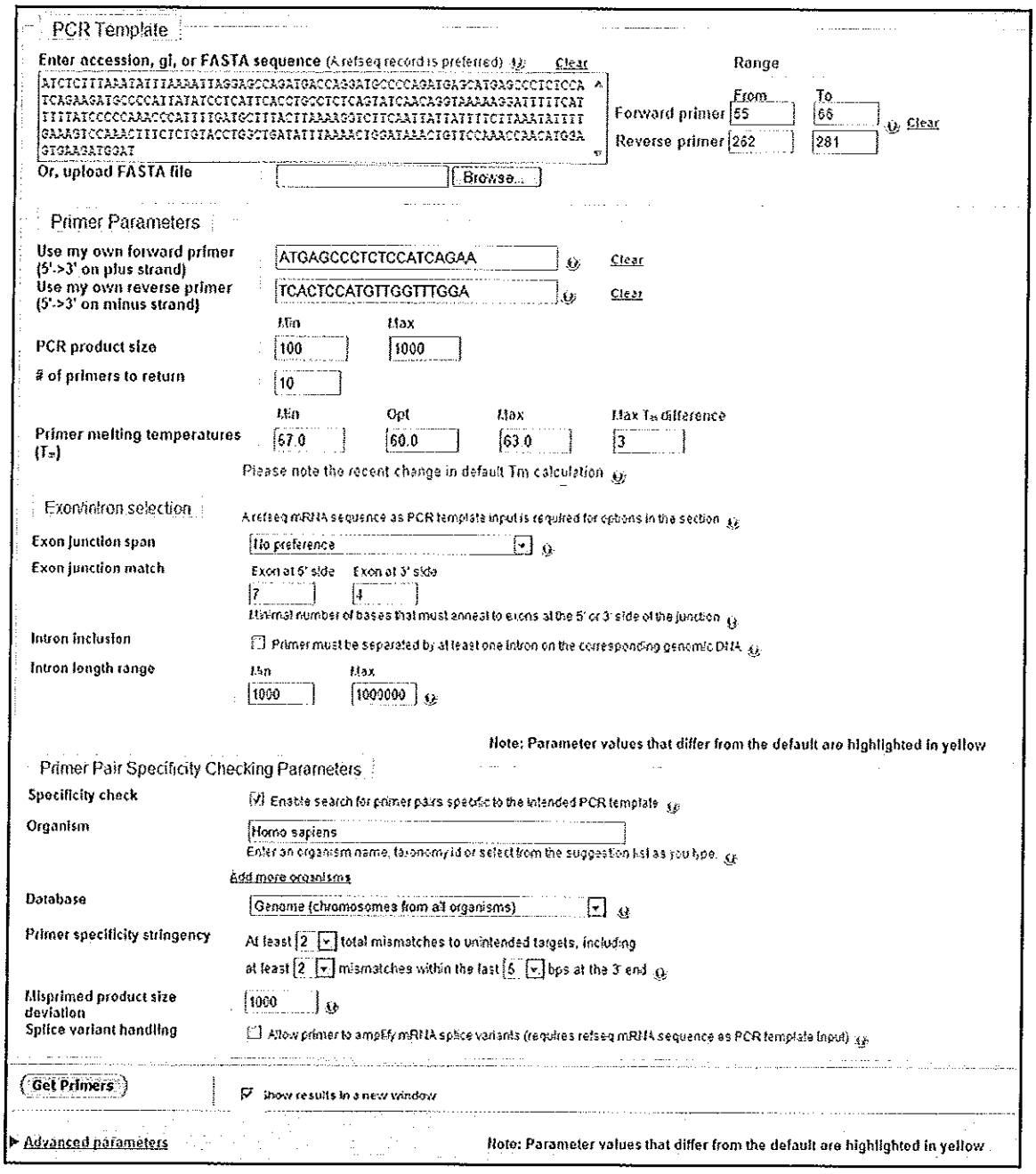
2.2.4 การวิเคราะห์ความจำเพาะของ primer กับฐานข้อมูลของ NCBI

ทำการวิเคราะห์ความจำเพาะของ primer ของสนิปส์ตำแหน่ง M172 กับฐานข้อมูลของ NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) ดังภาพที่ 2.1 ในส่วนของ Specialized BLAST เลือก Primer-BLAST จากนั้นนำลำดับเบสของ standard sequence ของตำแหน่ง M172 จำนวน 289 นิวคลีโอไทด์ใส่ลงไปในช่องของ PCR template ส่วนช่อง Range ใส่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของ forward primer และ reverse primer ที่ออกแบบได้ (ตามหัวข้อ 2.2.3) โดย forward primer เป็นนิวคลีโอไทด์ที่ 55 ถึงนิวคลีโอไทด์ที่ 66 reverse primer เป็น นิวคลีโอไทด์ที่ 262 ถึงนิวคลีโอไทด์ที่ 281

ในส่วนของ Primer Parameters ใส่ลำดับเบสของ forward primer ในช่องUse my own forward primer (5'->3' on plus strand) และ reverse primer ในช่อง Use my own reverse primer (5'->3' on minus strand) พร้อมระบุ Homo sapiens ในช่องของ organism และเลือก Genome (chromosomes from all organisms) ในช่อง database ของ Primer Pair Specificity Checking Parameters และเลือก Get primer โปรแกรมจะทำการวิเคราะห์ความจำเพาะของ primer ที่ใช้ในการศึกษาว่ามีความจำเพาะต่อลำดับบนโครโมโซม หรือยีนได้ในฐานข้อมูลมากน้อยเพียงใด โดยจะรายงานผลให้ทราบว่า ลำดับเบสที่ได้ระบุไว้นั้นพบในสิ่งมีชีวิตชนิดใด บนโครโมโซมแท่งไหน และมีความจำเพาะต่อยีนใด

2.2.5 การเก็บตัวอย่าง

ถอนเส้นผมให้ติดส่วนของรากผมจากอาสาสมัครเพศชายที่มีชาติพันธุ์มาเลย์ หรือชาติพันธุ์จีน กลุ่มละ 10 คน โดยการถอนคนละ 50 เส้น และเก็บรักษาตัวอย่างเส้นผมในตู้ที่มีการควบคุมความชื้นไม่เกิน 50 เปอร์เซนต์



ภาพที่ 2.1 การกำหนดค่าเพื่อวิเคราะห์ความจำเพาะของ primer ในตำแหน่ง M172 ที่ออกแบบโดยใช้โปรแกรม Primer 3 กับฐานข้อมูลของ NCBI

2.2.6 การสกัดสารพันธุกรรม

ทำการสกัดสารพันธุกรรมจากเส้นผมด้วยชุดสกัดสารพันธุกรรม QIAamp DNA investigator Kit โดยตัดตัวอย่างเส้นผม (เส้นผม 3 เส้นรวมเป็น 1 ตัวอย่าง) ให้มีความยาว 0.5-1 เซนติเมตร จากปลายรากผมใส่ในหลอด ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และย่อยตัวอย่างด้วยการเติม ATL buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และ 1M Ditiothreitol (DTT) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวางใน heating blocks และบ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยนำออกมาผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า (vortex) ทุกๆ 10 นาที เมื่อครบตามระยะเวลาที่กำหนด เติม AL buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และนำไป vortex เป็นเวลา 10 วินาที ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยนำออกมา vortex ทุกๆ 3 นาที เมื่อครบตามระยะเวลาที่กำหนด เติม ethanol (100%) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร และ vortex เป็นเวลา 15 วินาที ปิเปตของเหลวที่อยู่ด้านบน (supernatant) ใส่ลงไปใน QIAamp MinElute column ที่วางอยู่ใน collection tube และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นย้าย QIAamp MinElute column ไปใส่ใน collection tube อันใหม่ ทำการชะล้างสิ่งปนเปื้อนด้วยการเติม AW1 buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นย้าย QIAamp MinElute column ไปใส่ใน collection tube อันใหม่ เติม AW2 buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตร และนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นย้าย QIAamp MinElute column ไปใส่ใน collection tube อันใหม่ เติม ethanol (100%) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร และนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นย้าย QIAamp MinElute column ไปใส่ใน collection tube อันใหม่ นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที จน membrane แห้งสนิท ย้าย QIAamp MinElute column ไปใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เปิดฝา และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นทำการชะสารพันธุกรรมออกจาก membrane ด้วยการเติม ATE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงบริเวณตรงกลางของ membrane วางไว้อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 1 นาที และ centrifuge ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เก็บสารละลายสารพันธุกรรม ซึ่งมีลักษณะเป็นของเหลวที่อยู่ใน microcentrifuge tube ไปใส่ในหลอดใหม่ และนำไปวัดปริมาณของสารพันธุกรรมด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม

2.2.7 การวัดปริมาณของสารพันธุกรรม

ทำการวัดปริมาณของสารพันธุกรรมด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม โดยกำหนดค่าของเครื่องให้ตรวจวัดเฉพาะดีเอ็นเอ ตั้งค่า path length เท่ากับ 5 nm เพื่อกำหนดขนาดของช่องสำหรับให้แสงผ่าน และเหมาะสมกับขนาดของ cuvette quartz กำหนดค่าการเจือจาง (dilution) เท่ากับศูนย์ เนื่องจากตัวอย่างเป็นสารละลายดีเอ็นเอเข้มข้น ไม่ได้ทำการเจือจางก่อนทำการวัด จากนั้นปิเปตน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 7 ไมโครลิตร ซึ่งใช้เป็นสารละลาย blank ใส่ใน cuvette quartz และให้เครื่องอ่านค่า หลังจากนั้นปิเปตสารละลายสารพันธุกรรมใส่ใน cuvette quartz ปริมาตร 7 ไมโครลิตร และให้เครื่องอ่านค่าความเข้มข้น โดยค่าที่อ่านได้ มีหน่วยเป็นนาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ng/µl) โดยค่าที่อ่านได้จากตัวอย่างเท่ากับ 13-28 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร นำค่าที่อ่านได้ 3 ครั้ง ซึ่งมีค่าความเข้มข้นแตกต่างกันไม่เกิน ±0.4 ng/µl จากตัวอย่างเดียวกันมาหาค่าเฉลี่ยเพื่อให้ได้ค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอ จากนั้นจึงเตรียมสารละลายพันธุกรรมที่มีความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ในปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร เพื่อนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา PCR

2.2.8 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา Polymerase chain reaction (PCR)

1) การเตรียม PCR master mix ของสนิปส์ตำแหน่ง M95

ปิเปตตัวอย่างดีเอ็นเอ 20 นาโนกรัม ในปริมาตร 2.5 ไมโครลิตรใส่ในหลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร จากนั้นเตรียมสารละลาย PCR master mix (1X PCR buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP, 2.5 unit Taq DNA polymerase, 0.5 µM forward primer และ 0.5 µM reverse primer) ปริมาตร 22.5 ไมโครลิตร ลงไปผสมกับตัวอย่างดีเอ็นเอแล้วนำไปใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยทุกการทดลองมี negative control เป็นน้ำกลั่น และดีเอ็นเอของผู้หญิง และนำไปทำปฏิกิริยา PCR

2) การเตรียม PCR master mix ของสนิปส์ตำแหน่ง M172

ปิเปตตัวอย่างดีเอ็นเอ 20 นาโนกรัม ในปริมาตร 2.5 ไมโครลิตรใส่ในหลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร จากนั้นเตรียมสารละลาย PCR master mix (1X *Pfx* PCR buffer, 0.3 mM dNTP, 5 unit *Pfx50*^{TM}DNA polymerase, 0.3 µM forward primer และ reverse primer) ปริมาตร 22.5 ไมโครลิตร ลงไปผสมกับตัวอย่างดีเอ็นเอแล้วนำไปใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยทุกการ

ทดลองมี negative control เป็นน้ำกลั่น และสารพันธุกรรมของผู้หญิง และนำไปทำปฏิกิริยา PCR

3) การทำปฏิกิริยา PCR

ตำแหน่ง M95 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมทำปฏิกิริยาทั้งสิ้น 35 รอบ ประกอบด้วย Denaturation 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที Annealing 62 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.30 นาที และ Final extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

ตำแหน่ง M172 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมทำปฏิกิริยาทั้งสิ้น 35 รอบ ประกอบด้วย Denaturation 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที Annealing 60องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Extension 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ Final extension 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

2.2.9 การแยกแถบสารพันธุกรรมด้วย agarose gel electrophoresis

เตรียมแท่นหล่อเจล และซี่หวีสำหรับหลุมตัวอย่าง จากนั้นเตรียม 2% agarose gel ใน TBE buffer (0.1 mM Tris, 88.9 mM Boric acid และ 0.089 M EDTA) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และเทเจลลงบนแท่นหล่อเจลที่เตรียมไว้ รอให้เจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที จึงนำไปประกอบกับชุด electrophoresis จากนั้นเติม TBE buffer จนกระทั่งท่วมแผ่นเจล นำ PCR product ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับ Gel Loading Dye Blue 2.5 ไมโครลิตร มาหยอดลงในหลุมตัวอย่าง ให้กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำแผ่นเจลมาแช่ในสารละลาย Ethidium bromide ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที และแช่ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 15 นาที นำแผ่นเจลไปส่องดูแถบของสารพันธุกรรมภายใต้แสง UV ด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล และบันทึกภาพ

2.2.10 การแยกแถบสารพันธุกรรมด้วย Single strand conformation polymorphism (SSCP)

1) ขั้นตอนการเตรียมชุดอุปกรณ์ electrophoresis

ทำความสะอาดกระจกด้วยผ้าชุบ 70% alcohol ประกอบแผ่นกระจกและ spacer (หนา 0.75 มิลลิเมตร) เข้ากับชุดอุปกรณ์ electrophoresis (Mini-VE)

2) ขั้นตอนการเตรียมเจล

เทสารละลายเจล 12% polyacrylamide (12% Acrylamide/ Bis Solution ในตัวทำละลาย 0.5X TBE, 0.14% APS และ 0.07% TEMED) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ และประกอบซี่หวี่สำหรับหลุมตัวอย่าง รอให้เจลแข็งตัว ประมาณ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นดึงซี่หวีออก และประกอบชุด Mini-VE ให้สมบูรณ์ เติม 0.5X TBE buffer ลงไปจนท่วมแผ่นเจล และใน plastic casing หยอด PCR product ปริมาตร 7.5 ไมโครลิตร ที่ผสมกับ Gel Loading Dye Blue 2.5 ไมโครลิตร ที่ผ่านการต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ลงไปในหลุมตัวอย่าง ให้กระแสไฟฟ้า 180 โวลต์ จนกระทั่งแถบ Gel Loading Dye Blue หรือ dye front ตกขอบด้านล่างของแผ่นเจล และให้กระแสไฟฟ้าต่อเป็นเวลาอีกประมาณ 4 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นเจลมาย้อมในสารละลาย Silver nitrate

3) ขั้นตอนการย้อมแผ่นเจลด้วยสารละลาย Silver nitrate

นำแผ่นเจลแช่ใน solution I (10% EtOH, 0.5% acetic acid) เพื่อให้สารพันธุกรรมเกิดการเชื่อมโยง (crosslink) กับเนื้อเจล เขย่าเป็นเวลา 3 นาที และเททิ้ง แช่แผ่นเจลใน solution II (0.1% Silver nitrate) เพื่อย้อมสารพันธุกรรม เขย่าเป็นเวลา 15 นาทีแล้วเททิ้ง เติม solution III (1.5%NaOH, 0.1% formaldehyde) ลงไป เพื่อทำแถบสารพันธุกรรมให้ปรากฏ พร้อมกับ เขย่าเป็นเวลาประมาณ 4 นาที จึงเท solution III ทิ้ง และเติม solution IV (0.7M sodium carbonate) ลงไปเพื่อหยุดปฏิกิริยา เขย่าเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลไปล้างในน้ำกลั่น และนำไปถ่ายภาพด้วยเครื่องสแกนภาพ

2.2.11 การสกัดสารพันธุกรรมจาก Agarose gel

ตัดแถบดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่างในแผ่นอะกาโรสเจลด้วยใบมีดออกเป็นชิ้นเล็กๆ นำเจลที่ตัดแล้วปริมาณไม่เกิน 300 มิลลิกรัม ใส่ลงไปในหลอด ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม FADF buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มเพื่อให้ชิ้นส่วนของเจลละลายที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเขย่าเบาๆ ทุก 2-3 นาที นำออกมาวางให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปิเปตอะกาโรสเจลที่ละลายแล้วมาประมาณ 800 ไมโครลิตร ใส่ลงไปใน FADF column ซึ่งวางอยู่ใน collection tube จากนั้นนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวที่อยู่ใน collection tube ออก และวาง FADF column กลับลงไปใน collection tube อันเดิม เติม wash buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ลงไปใน FADF column นำไป

centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวที่อยู่ใน collection tube ออก และวาง FADF column กลับลงไปใน collection tube อันเดิม นำไป centrifuge อีกครั้งที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ย้าย FADF column ลงไปในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ไมโครลิตรใหม่ เติม elution buffer ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 3 นาที นำไป centrifuge อีกครั้งที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จะได้สารพันธุกรรมที่สกัดออกมาจากอะกาโรสเจล ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เก็บสารพันธุกรรมที่ได้ที่อุณหภูมิโดยเร็ว 4 องศาเซลเซียส และนำไปวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี Direct sequencing

2.2.12 การวิเคราะห์ลำดับเบส

นำ PCR product ของสนิปส์ตำแหน่ง M95 และ M172 ในตัวอย่างที่คาดว่ามีการเกิดสนิปส์ไปสกัดสารพันธุกรรมจากอะกาโรสเจล และนำสารพันธุกรรมที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับเบสที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

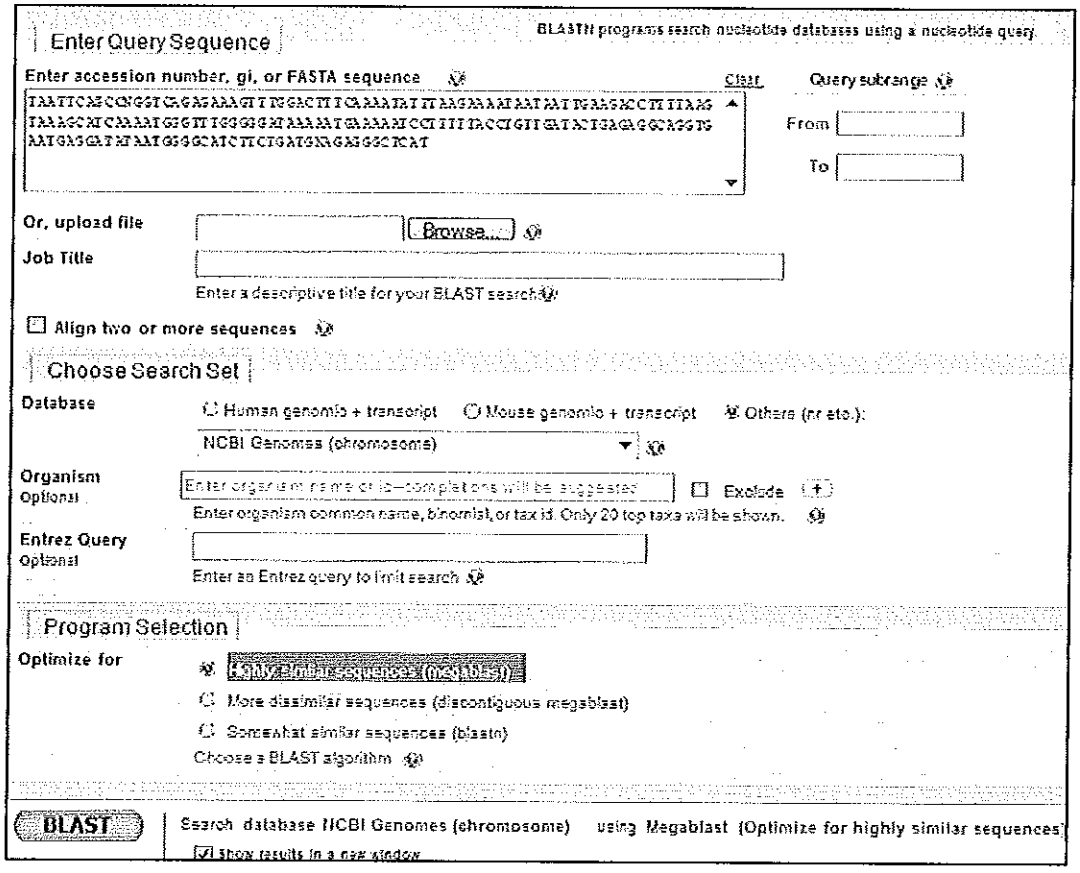
ซึ่งการวิเคราะห์ลำดับเบสมีหลักการ คือ เป็นการวิเคราะห์ชนิดของเบสแต่ละตัวในสายดีเอ็นเอ (genotyping) ด้วยวิธี direct sequencing โดยใช้สารเรืองแสงที่มีความยาวคลื่นต่างกันติด (Tag) เข้ากับ Dideoxyribonucleotide triphosphate (ddNTP) ทั้ง 4 ตัว ทำให้ ddATP, ddTTP, ddGTP และ ddCTP มีสีที่แตกต่างกัน เมื่อ DNA polymerase ทำการต่อ ddNTPs ที่ติดฉลากสารเรืองแสงเหล่านี้เข้ากับสายพันธุกรรมต้นแบบเพื่อสร้างสายพันธุกรรม การสร้างสายพันธุกรรมก็จะหยุดลงทันที แสงฟลูออเรสเซนต์จากสายพันธุกรรมนั้นก็จะถูกส่งไปยังเครื่องประมวล และแปลเป็นลำดับเบสของดีเอ็นเอ โดย peak แรกที่ปรากฏ คือ เบสตัวแรกที่สามารถวิเคราะห์ได้ ส่วน peak ที่ 2 คือ เบสตัวที่ 2 ที่สามารถวิเคราะห์ได้ ซึ่งตำแหน่งของ peak จะสัมพันธ์กับลำดับของเบสเช่นนี้ไปจนสิ้นสุดสายดีเอ็นเอ เมื่อการวิเคราะห์เสร็จสิ้นจะรายงานผลออกมาในรูปแบบของ electropherogram

ในลำดับถัดมานำข้อมูลลำดับเบสมาวิเคราะห์หาตำแหน่งของสนิปส์ โดยเปรียบเทียบลำดับเบสที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างกับลำดับเบสมาตรฐาน หาลำดับเบสที่แตกต่างกัน และดูว่าเบสมีการเปลี่ยนแปลงไปอย่างไร จากนั้นนำผลมาเปรียบเทียบทั้งภายในกลุ่มชาติพันธุ์เดียวกัน และระหว่างกลุ่มชาติพันธุ์มาเลย์และจีน

2.2.13 การวิเคราะห์ความจำเพาะของลำดับเบสกับฐานข้อมูลของ NCBI

ทำการวิเคราะห์ความจำเพาะของลำดับเบสกับฐานข้อมูลของ NCBI โดยเข้าไปที่ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ ดังภาพที่ 2.2 เลือก BLAST ในส่วนของ Basic

BLAST ให้เลือก nucleotide blast จากนั้นนำลำดับเบส (nucleotide sequence) ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี direct sequencing มาใส่ลงไปในช่องของ Enter Query Sequence โดยให้ลำดับเบสเรียงจากปลาย 5' ไปยัง 3' จากนั้นในส่วนของ Choose Search Set ให้เลือกฐานข้อมูลจาก NCBI Genomes (chromosome) ในช่อง Program Selection เลือก Highly similar sequences (megablast) และเลือก blast โปรแกรมจะทำการตรวจสอบความจำเพาะของลำดับเบสที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี direct sequencing กับลำดับเบสจากฐานข้อมูลของ NCBI โดยจะรายงานผลให้ทราบว่าลำดับเบสที่ต้องการทราบ พบในสิ่งมีชีวิตชนิดใด บนโครโมโซมแท่งไหน มีความจำเพาะต่อยีนใด และเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกันของลำดับเบสที่ต้องการวิเคราะห์กับลำดับเบสของฐานข้อมูลเป็นเท่าไหร่



ภาพที่ 2.2 การกำหนดค่าเพื่อวิเคราะห์ความจำเพาะของ nucleotide sequence กับฐานข้อมูลของ NCBI

2.2.14 การวิเคราะห์ความถี่ของสนิปส์

ทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความถี่ของสนิปส์ 2 ตำแหน่ง ระหว่างชาติพันธุ์มาเลย์ และจีน โดยประเมินคราวละ 1 ตำแหน่ง ซึ่งคำนวณได้จาก

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความถี่} = \frac{\text{จำนวนคนที่พบสนิปส์ในตำแหน่งนั้นๆ} \times 100}{\text{จำนวนคนทั้งหมดในกลุ่มชาติพันธุ์นั้นๆ}}$$

(Sao-Bento *et al.*, 2009)

บทที่ 3
ผลการศึกษา

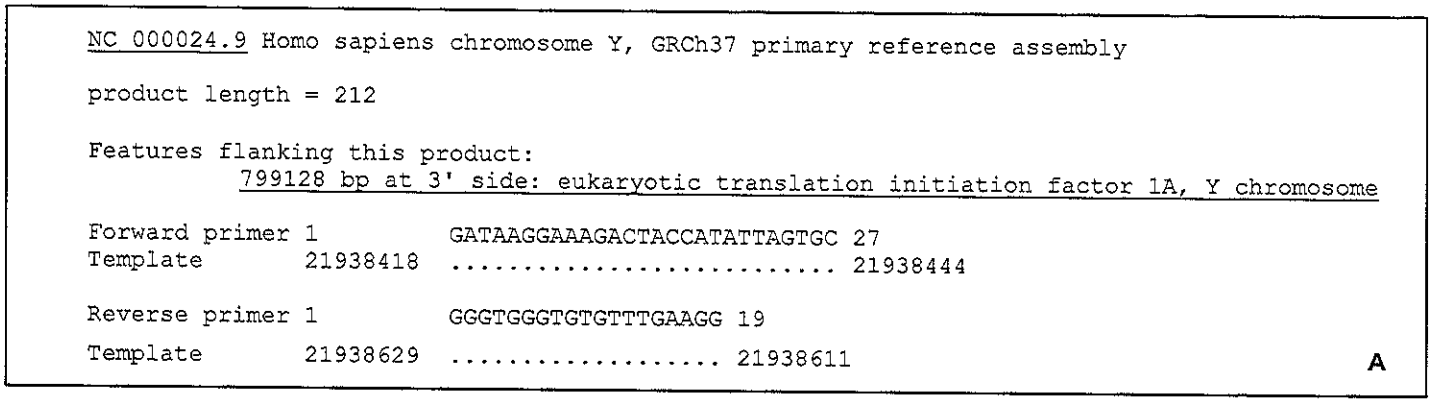
3.1 สนิปตำแหน่ง M95

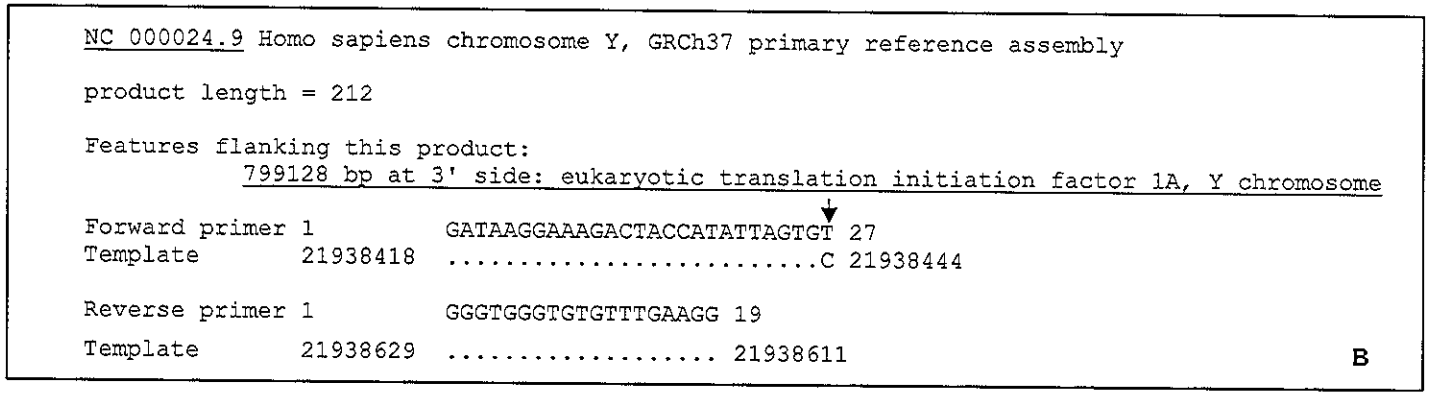
3.1.1 การออกแบบ primer

ลำดับเบสของ primer ตำแหน่ง M95 อ้างอิงมาจากงานวิจัยของ Yuehai *et al.* (2001) โดยใช้ forward primer จำนวน 2 ชนิด โดยชนิดแรก (forward primer1) เบสตำแหน่งสุดท้ายของบริเวณปลาย 3' เป็นเบสปกติ (เบส C) ซึ่งพบได้ในคนปกติ และชนิดที่ 2 (forward primer 2) เบสตำแหน่งสุดท้ายของบริเวณปลาย 3' เป็นเบสที่มีการเปลี่ยนแปลงไป (เบส T) ซึ่งพบได้ในคนที่มีการเกิดสนิปส์ โดย forward primer 1 มีค่า melting temperature (Tm) เท่ากับ 55.2 และค่า GC-content เท่ากับ 37.04 เปอร์เซ็นต์ และ forward primer 2 มีค่า Tm เท่ากับ 53.7 และค่า GC-content เท่ากับ 33.33 เปอร์เซ็นต์ ส่วน reverse primer มีชนิดเดียว ลำดับเบสเหมือนคนปกติ มีค่า Tm เท่ากับ 53.2 และค่า GC-content เท่ากับ 57.9 เปอร์เซ็นต์

3.1.2 การตรวจสอบความจำเพาะของ Primer

นำ forward primer 1, 2 และ reverse primer ไปหาความจำเพาะ (primer specificity)กับฐานข้อมูล Human genome ใน NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) พบว่า primer มีความจำเพาะกับยีน EIF1AY (eukaryotic translation initiation factor 1A, Y chromosome) บนโครโมโซม Y (ภาพที่ 3.1A และภาพที่ 3.1B) ตำแหน่งของ forward primer อยู่ในช่วงนิวคลีโอไทด์ที่ 21,938,418 ถึง 21,938,444 ตำแหน่งสนิปอยู่นิวคลีโอไทด์ที่ 21,938,444 ตำแหน่งของ reverse primer อยู่ในช่วงนิวคลีโอไทด์ที่ 21,938,629 ถึง 21,938,611 ผลผลิต PCR มีขนาด 212 คู่เบส น้ำหนักโมเลกุลของดีเอ็นเอสาย sense เท่ากับ 65,336.4 Da น้ำหนักโมเลกุลของดีเอ็นเอสาย antisense เท่ากับ 65,570.4 Da





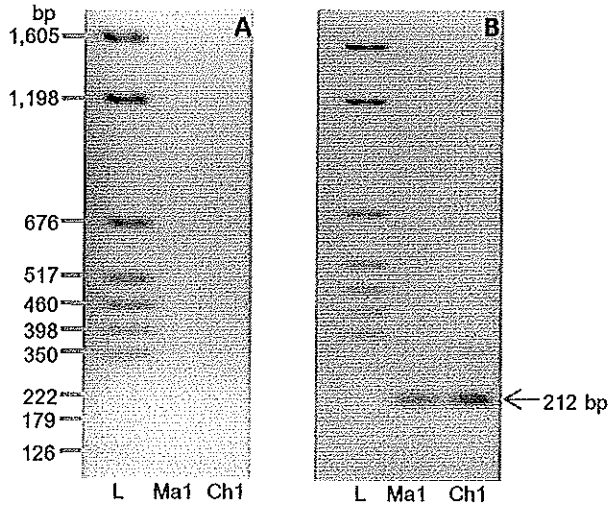
ภาพที่ 3.1 ความจำเพาะของ primer ตำแหน่ง M95 กับฐานข้อมูล NCBI โดย (ภาพ A) คือ forward primer 1 โดยเบสตำแหน่งสุดท้ายของบริเวณปลาย 3' เป็นเบสปกติ (เบส C) และ (ภาพ B) คือ forward primer 2 โดยเบสตำแหน่งสุดท้ายของบริเวณปลาย 3' เป็นเบสที่มีการเปลี่ยนแปลงไป (เบส T) (ศรชี้) ซึ่ง forward primer ทั้ง 2 ชนิด มีความจำเพาะกับยีน EIF1A (Eukaryotic translation intiation factor 1A) บนโครโมโซมวาย

3.1.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเป็นการหาความเข้มข้นของ PCR master mix และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา PCR ทำโดย

การทดลองที่ 1 ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยเตรียมสารละลาย PCR master mix (1X PCR buffer, 4 mM $MgCl_2$, 2.5 mM dNTP, 0.5 unit Taq DNA polymerase, 0.4 µM forward/reverse primers) และทำปฏิกิริยาทั้งสิ้น 35 รอบ ประกอบด้วย denaturation 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที annealing 62 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ตามที่เผยแพร่ใน Yuehai *et al.*, 2001 และนำไปแยกแถบดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis พบว่า ไม่เกิดผลผลิต PCR (ภาพที่ 3.2A) ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากความเข้มข้นของ PCR master mix และอุณหภูมิไม่เหมาะสม จึงทำการปรับหาสภาวะที่ความเหมาะสมของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมต่อไป

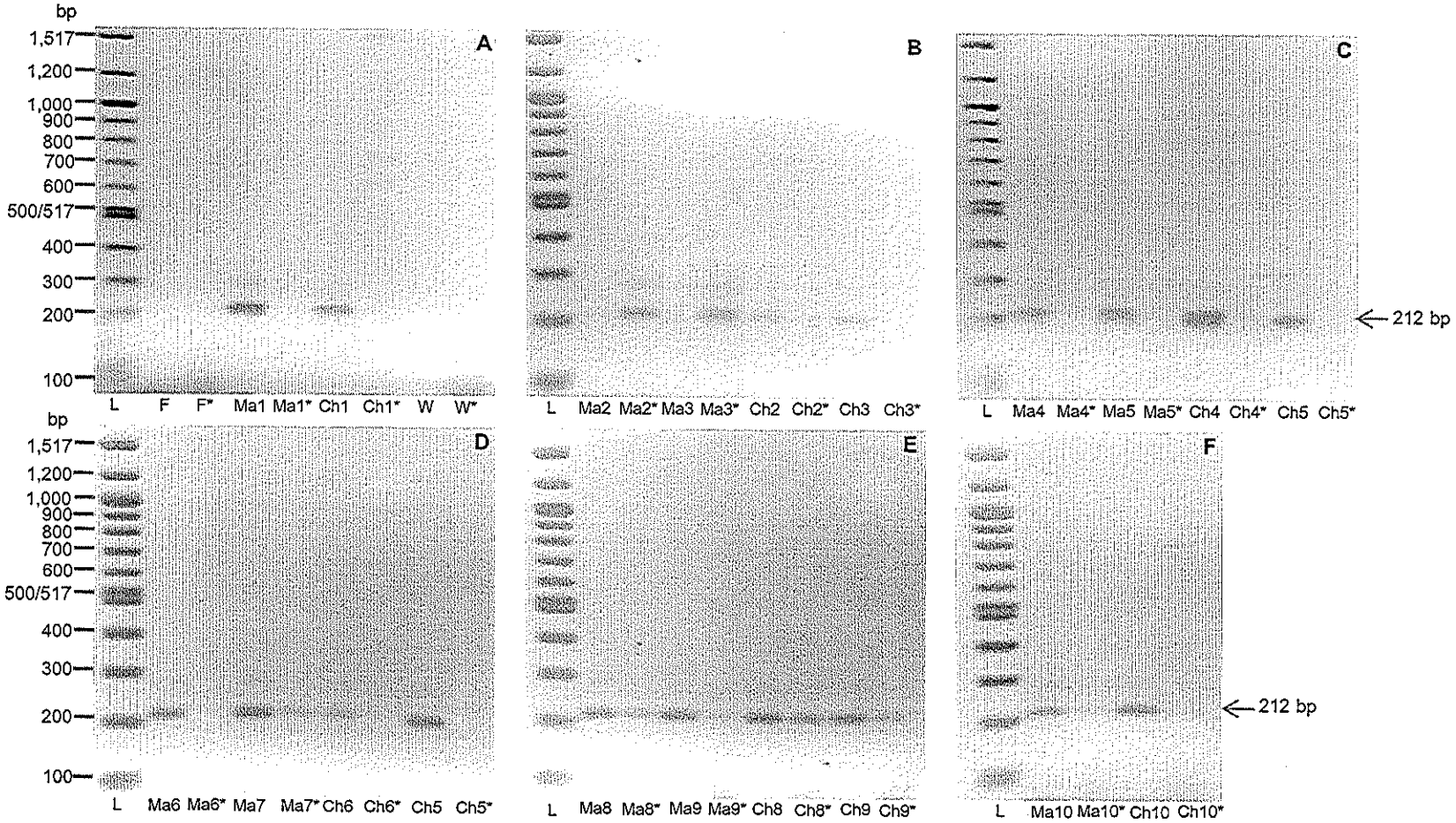
การทดลองที่ 2 ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยปรับส่วนผสมสารละลาย PCR master mix โดยใช้ 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP, 2.5 unit Taq DNA Polymerase, 0.5 µM forward/reverse primers และนำไปทำปฏิกิริยา จำนวนทั้งสิ้น 35 รอบ และปรับเปลี่ยนระยะเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้ denaturation 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที annealing 62 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.30 นาที และ final extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต Taq DNA polymerase (Invitrogen) และนำไปแยกแถบดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis พบว่าเกิดผลผลิต PCR ขนาด 212 คู่เบส อย่างชัดเจน ดังภาพที่ 3.2B



ภาพที่ 3.2 แถบผลผลิต PCR ตำแหน่ง M95 จากการหาสภาวะการทำ PCR ที่เหมาะสมแยกใน 2% agarose gel ย้อมด้วย ethidium bromide (EtBr) ในการทดลองที่ 1 (A) และ การทดลองที่ 2 (B) Ma1 = ตัวอย่างดีเอ็นเอของอาสาสมัครชาติพันธุ์มาเลย์หมายเลข 1 Ch1 = ตัวอย่างดีเอ็นเอของอาสาสมัครชาติพันธุ์จีนหมายเลข 1 L = pGEM DNA marker

3.1.4 การศึกษาสนิปด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา PCR ตำแหน่ง M95 ในตัวอย่างผู้ชายไทยชาติพันธุ์มาเลย์และจีน จำนวน 10 คน ต่อกลุ่มชาติพันธุ์ โดยใช้ forward primer ที่ละชนิดคู่กับ reverse primer ชนิดเดียวกัน นำแถบผลผลิต PCR มาแยกด้วย agarose gel electrophoresis ย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide และถ่ายภาพแถบผลผลิต PCR ภายใต้แสง UV ด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล เมื่อนำภาพที่ได้มาสังเกตลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ forward primer ทั้ง 2 แบบ เปรียบเทียบกันพบว่า ในการใช้ forward primer 1 แถบผลผลิต PCR ที่ได้จากอาสาสมัครเพศชายที่มีชาติพันธุ์มาเลย์ (Ma) จำนวน 8 คน และชาติพันธุ์จีน (Ch) ทั้ง 10 คน (ภาพที่ 3.3A, 3.3C-F) มีการติดสีเข้มเห็นได้ชัดเจน ขนาดประมาณ 212 คู่เบส ส่วนแถบผลผลิต PCR ของผู้ชายชาติพันธุ์มาเลย์ที่เหลืออีก 2 คน (ตัวอย่าง Ma2 และ Ma3) ปรากฏเพียงแถบจางๆ ส่วนในการใช้ forward primer 2 แถบผลผลิต PCR ที่ได้มีจำนวน 2 คน ใน 20 คน เท่านั้นที่แถบสีเข้มเห็นได้ชัดเจน (ภาพที่ 3.3B) และเป็นผลผลิต PCR ของผู้ชายชาติพันธุ์มาเลย์ทั้งคู่ (ตัวอย่าง Ma2 และ Ma3) ซึ่งเป็น 2 คน ที่มีแถบผลผลิต PCR จาง เมื่อทำ PCR ด้วย forward primer 1 ส่วนแถบผลผลิต PCR ของผู้ชายชาติพันธุ์มาเลย์ อีก 8 คน ที่เหลือและชาติพันธุ์จีนทั้งหมด (10 คน) ปรากฏแถบเพียงจางๆ



ภาพที่ 3.3 แถบผลผลิต PCR ตำแหน่ง M95 ที่ได้จากการใช้ forward primer 1 และ forward primer 2 (*) ในตัวอย่างผู้ชายชาติพันธุ์มาเลย์และจีน จำนวนกลุ่มละ 10 คน (Ma1-Ma10 และ Ch1-Ch10) แยกใน 2% agarose gel ย้อมด้วย ethidium bromide (EtBr) โดยใช้ตัวอย่างเส้นผมผู้หญิง (F) และน้ำกลั่น (W) เป็น negative control

3.1.5 การศึกษาสนิปด้วยวิธี Single strand conformation polymorphism (SSCP)

เมื่อนำผลผลิต PCR มาแยกแถบดีเอ็นเอด้วย polyacrylamide gel electrophoresis ย้อมแผ่นเจลด้วยสารละลาย silver nitrate และนำไปถ่ายภาพ พบว่าจากการใช้ forward primer 1 ปรากฏแถบผลผลิต PCR จำนวน 1 แถบ โดยแถบผลผลิต PCR จากอาสาสมัครเพศชายที่มีชาติพันธุ์จีน จำนวน 1 คน (ตัวอย่าง Ch1) มีการติดสีเข้มเห็นได้ชัดเจน ซึ่งแถบผลผลิต PCR มีขนาดเทียบเท่านิวคลีโอไทด์ที่ 221 คู่เบสโดยประมาณ หรือน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 72 kDa ส่วนการใช้ forward primer 2 ปรากฏแถบผลผลิต PCR จำนวน 1 แถบ โดยแถบผลผลิต PCR ที่ได้มีแถบผลผลิต PCR จางๆ ซึ่งแถบผลผลิต PCR มีขนาดเทียบเท่านิวคลีโอไทด์ที่ 231 คู่เบสโดยประมาณ หรือน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 76 kDa (ภาพที่ 3.4A)

เมื่อนำผลผลิต PCR มาต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เพื่อแยกดีเอ็นเอเป็นสายเดี่ยว (single-stranded DNA, ssDNA) ด้วย polyacrylamide gel electrophoresis ย้อมแผ่นเจลด้วยสารละลาย silver nitrate และนำไปถ่ายภาพ พบว่าจากการใช้ forward primer 1 แถบผลผลิต PCR แยกเป็น 3 แถบ ที่ติดสีเข้มเห็นได้ชัดเจน โดยแถบที่ 1 มีขนาดเทียบเท่านิวคลีโอไทด์ 221 คู่เบส หรือน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 72 kDa ซึ่งมีขนาดและน้ำหนักโมเลกุลที่เท่ากับแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการแยกสายดีเอ็นเอจากผลผลิต PCR ที่ไม่ผ่านการต้ม จึงคาดว่าเป็นชิ้น double-stranded DNA (dsDNA) ที่เหลือหลังการต้ม ส่วนแถบที่ 2 มีขนาดเทียบเท่านิวคลีโอไทด์ 207 คู่เบส หรือน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 68 kDa คาดว่าเป็นสาย antisense (ssDNA) ที่เกิดขึ้นหลังจากการต้ม ส่วนแถบที่ 3 ซึ่งอยู่ล่างสุด มีขนาดเทียบเท่านิวคลีโอไทด์ 188 คู่เบส หรือน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 62 kDa ซึ่งคาดว่าเป็นสาย sense (ssDNA) การใช้ forward primer 2 ปรากฏแถบผลผลิต PCR จำนวน 3 แถบเช่นกัน แต่มีความเข้มของแถบเพียงจางๆ โดยแถบแรกมีขนาดเทียบเท่านิวคลีโอไทด์ 231 คู่เบส หรือน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 76 kDa ส่วนแถบที่ 2 มีขนาดเทียบเท่านิวคลีโอไทด์ 214 คู่เบส หรือน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 70 kDa ส่วนแถบที่ 3 มีขนาดเทียบเท่านิวคลีโอไทด์ 191 คู่เบส หรือน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 63 kDa (ภาพที่ 3.4B)

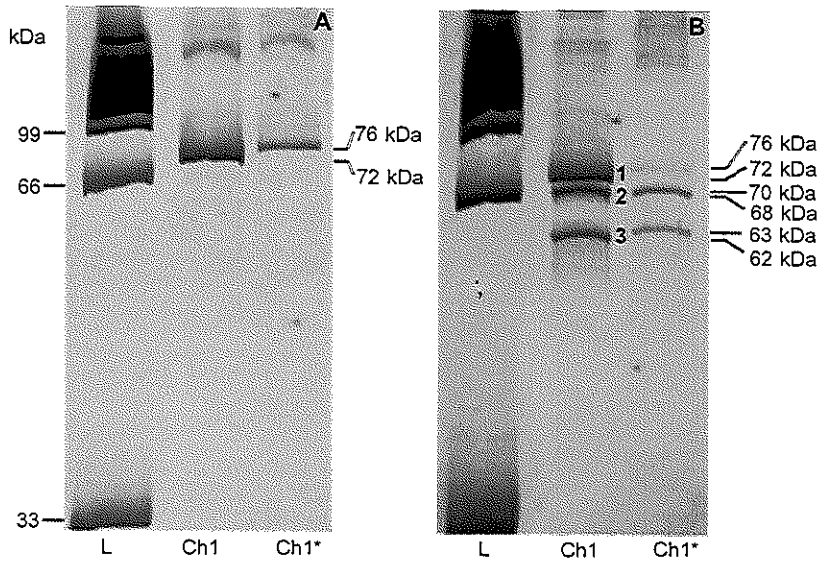
เมื่อนำผลผลิต PCR จากตัวอย่างอาสาสมัครเพศชายชาติพันธุ์มาเลย์และจีน ทั้ง 20 คนมาตรวจสอบสนิป โดยนำผลผลิต PCR มาต้มที่อุณหภูมิ 95

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที พบว่าจากการใช้ forward primer 1 ทุกตัวอย่างปรากฏแถบผลผลิต PCR จำนวน 3 แถบ โดยแถบผลผลิต PCR จากอาสาสมัครเพศชายที่มีชาติพันธุ์มาเลย์ จำนวน 8 คน และอาสาสมัครเพศชายที่มีชาติพันธุ์จีน ทั้ง 10 คน มีการติดสีเข้มเห็นได้ชัดเจน ส่วนแถบผลผลิต PCR ของผู้ชายชาติพันธุ์มาเลย์ที่เหลืออีก 2 คน (ตัวอย่าง Ma2 และ Ma3) ปรากฏเป็น 3 แถบจางๆ (ภาพที่ 3.5B และ 3.5C) โดยน้ำหนักโมเลกุลของแถบผลผลิต PCR จากทั้งชาติพันธุ์มาเลย์และจีน จำนวน 20 คน แถบที่ 1 มีขนาดเฉลี่ยเทียบเท่านิวคลีโอไทด์ 234 คู่เบส หรือน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 77 kDa ส่วนแถบที่ 2 มีขนาดเฉลี่ยเทียบเท่านิวคลีโอไทด์ 215 คู่เบส หรือน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 70 kDa และแถบที่ 3 มีขนาดเฉลี่ยเทียบเท่านิวคลีโอไทด์ 190 คู่เบส หรือน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 62 kDa (ตารางที่ 3.1 - 3.3)

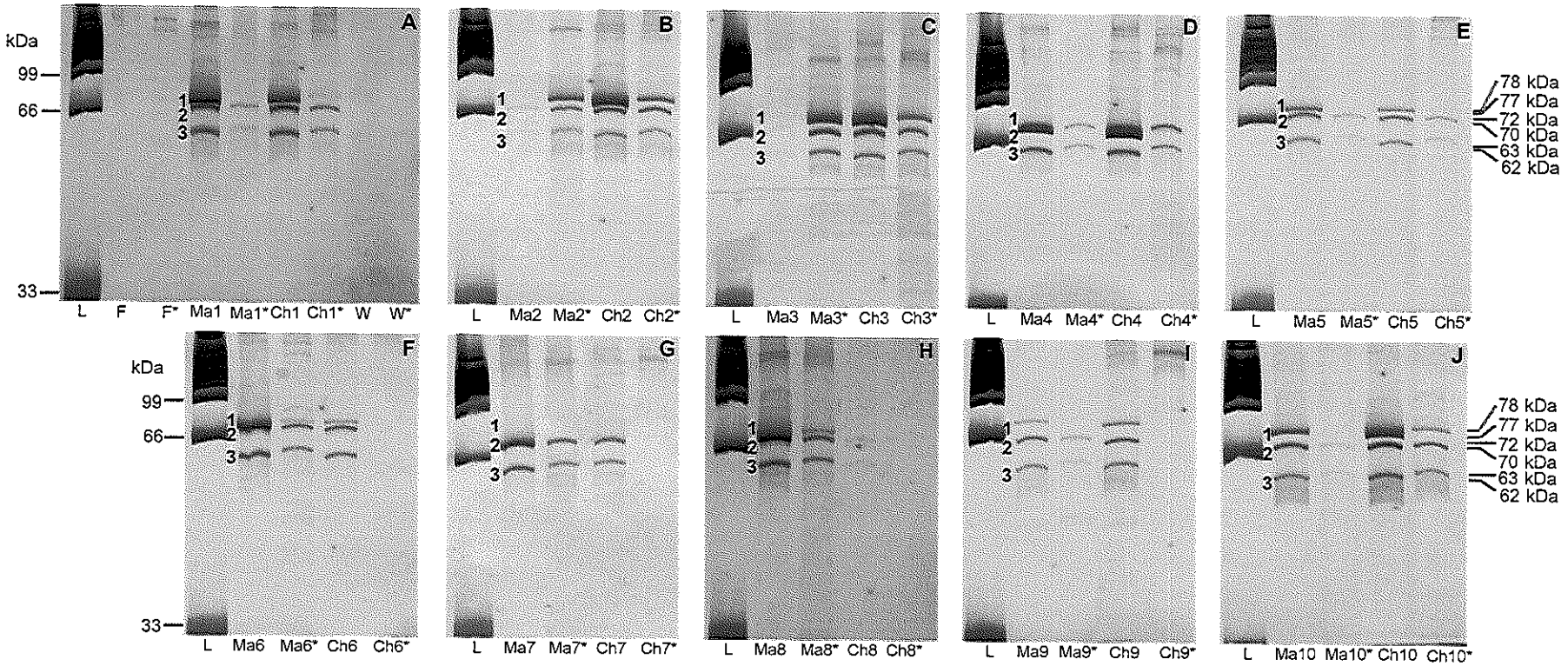
ส่วนการใช้ forward primer 2 ปรากฏแถบผลผลิต PCR จำนวน 3 แถบเช่นกัน โดยแถบผลผลิต PCR จากอาสาสมัครชาติพันธุ์มาเลย์ จำนวน 2 คน (ตัวอย่าง Ma2 และ Ma3) มีการติดสีเข้มเห็นได้ชัดเจน ส่วนแถบผลผลิต PCR ของผู้ชายชาติพันธุ์มาเลย์ จำนวน 8 คน และชาติพันธุ์จีนทั้งหมด (10 คน) ปรากฏเพียงจางๆ (ภาพที่ 3.5A, 3.5D-J) โดยแถบที่ 1 ของผลผลิต PCR มีขนาดเฉลี่ยเทียบเท่านิวคลีโอไทด์ 237 คู่เบส หรือน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 78 kDa ส่วนแถบที่ 2 มีขนาดเฉลี่ยเทียบเท่านิวคลีโอไทด์ 219 คู่เบส หรือน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 72 kDa และแถบที่ 3 มีขนาดเทียบเท่านิวคลีโอไทด์ 192 คู่เบส หรือน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 63 kDa (ตารางที่ 3.1 - 3.3)

3.1.6 การศึกษาสนิปด้วยวิธี Direct sequencing

เนื่องจากการตรวจสอบสนิปด้วยวิธี agarose gel electrophoresis และ SSCP พบว่าผลการศึกษาสอดคล้องกัน คือ แถบผลผลิต PCR ของตัวอย่าง Ma2 และ Ma3 ที่เกิดจากการใช้ forward primer 2 มีสีเข้มชัดเจน ในขณะที่เมื่อใช้ forward primer 1 มีสีจาง ซึ่งตรงกันข้ามกับอีก 18 ตัวอย่าง ที่ทำการวิเคราะห์ จึงคาดว่า ตัวอย่าง Ma2 และ Ma3 เป็นตัวอย่างที่มีสนิป จึงทำการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี direct sequencing เพื่อเป็นการยืนยันการเกิดสนิปในตัวอย่างที่สงสัย



ภาพที่ 3.4 แถบผลผลิต PCR ตำแหน่ง M95 ที่ได้จาก forward primer 1 และ forward primer 2 ในผู้ชายชาติพันธุ์มาเลย์และจีนผ่านการตัมและไม่ตัม แยกใน 12% polyacrylamide gel electrophoresis ย้อมด้วย silver nitrate (ภาพ A) ผลผลิต PCR ไม่ผ่านการตัม ปรากฏแถบผลผลิต PCR จำนวน 1 แถบ โดยแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ด้วย forward primer 1 (Ch1) มีขนาดเทียบเท่านิวคลีโอไทด์ 221 คู่เบส หรือมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 72 kDa และแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ด้วย forward primer 2 (Ch1*) มีขนาดเทียบเท่านิวคลีโอไทด์ 231 คู่เบส หรือมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 76 kDa และ (ภาพ B) ผลผลิต PCR ที่ผ่านการตัมที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ปรากฏแถบผลผลิต PCR จำนวน 3 แถบ ผลผลิต PCR จากการใช้ forward primer 1 (Ch1) แถบมีขนาดเทียบเท่านิวคลีโอไทด์ 221, 207 และ 188 คู่เบส หรือมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 72, 68 และ 62 kDa และผลผลิต PCR จากการใช้ forward primer 2 (Ch1*) แถบมีขนาดเทียบเท่านิวคลีโอไทด์ 231, 214 และ 191 คู่เบส หรือมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 76, 70 และ 63 kDa



ภาพที่ 3.5 แถบผลผลิต PCR ที่ผ่านการตัมและแยกใน 12% polyacrylamide gel จากการใช้ forward primer 1 และ forward primer 2 (*) ในตัวอย่างผู้ชายที่มีชาติพันธุ์มาเลย์ (Ma) และจีน (Ch) จำนวนกลุ่มละ 10 คน โดยใช้ตัวอย่างเส้นผมผู้หญิง (F) และน้ำกลั่น (W) เป็น negative control แต่ละตัวอย่างปรากฏแถบผลผลิต PCR จำนวน 3 แถบ มีขนาดเฉลี่ยเทียบเท่านิวคลีโอไทด์ 234, 215 และ 190 คู่เบส หรือมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยประมาณ 77, 70 และ 62 kDa เมื่อใช้ forward primer 1 และมีขนาดเฉลี่ยเทียบเท่านิวคลีโอไทด์ 237, 219 และ 192 คู่เบส หรือมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยประมาณ 78, 72 และ 63 kDa เมื่อใช้ forward primer 2

ตารางที่ 3.1 ขนาดของแถบผลผลิต PCR แถบที่ 1 (dsDNA) ตำแหน่ง M95 ที่ผ่านการต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

ขนาดของดีเอ็นเอสายคู่ (dsDNA) (kDa)																				
Primer	Ma1	Ma2	Ma3	Ma4	Ma5	Ma6	Ma7	Ma8	Ma9	Ma10	Ch1	Ch2	Ch3	Ch4	Ch5	Ch6	Ch7	Ch8	Ch9	Ch10	ค่าเฉลี่ย (±S.D)
Primer 1	72	-	-	76	75	-	-	-	82	78	77	74	74	76	75	-	79	-	84	76	77 ±3.32
Primer 2	-	76	76	-	-	-	79	78	-	-	-	78	78	-	-	-	-	-	-	80	78 ±1.46

ตารางที่ 3.2 ขนาดของแถบผลผลิต PCR แถบที่ 2 (สาย antisense) ตำแหน่ง M95 ที่ผ่านการต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

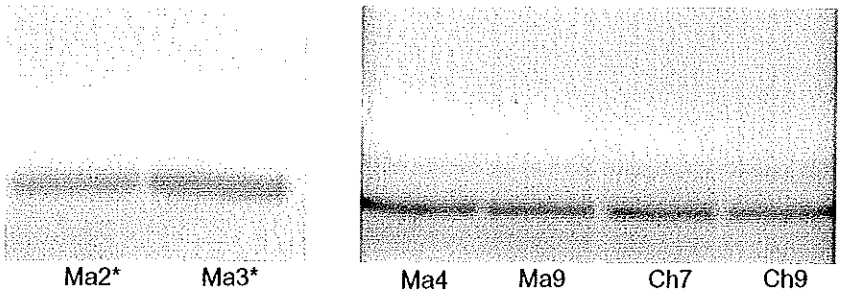
ขนาดของดีเอ็นเอสาย antisense (kDa)																				
Primer	Ma1	Ma2	Ma3	Ma4	Ma5	Ma6	Ma7	Ma8	Ma9	Ma10	Ch1	Ch2	Ch3	Ch4	Ch5	Ch6	Ch7	Ch8	Ch9	Ch10	ค่าเฉลี่ย (±S.D)
Primer 1	68	67	-	74	68	74	74	74	68	67	70	69	69	71	68	78	72	74	68	67	70 ±3.27
Primer 2	70	69	68	80	70	76	74	76	70	67	70	71	71	80	70	-	-	-	-	69	72 ±4.04

ตารางที่ 3.3 ขนาดของแถบผลผลิต PCR แถบที่ 3 (สาย sense) ตำแหน่ง M95 ที่ผ่านการต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

ขนาดของดีเอ็นเอสาย sense (kDa)																				
Primer	Ma1	Ma2	Ma3	Ma4	Ma5	Ma6	Ma7	Ma8	Ma9	Ma10	Ch1	Ch2	Ch3	Ch4	Ch5	Ch6	Ch7	Ch8	Ch9	Ch10	ค่าเฉลี่ย (±S.D)
Primer 1	62	62	63	64	62	63	62	63	62	62	62	61	62	63	62	65	62	62	61	63	62 ±0.94
Primer 2	63	62	63	65	63	64	63	64	62	63	63	62	63	64	63	-	-	-	-	64	63 ±0.83

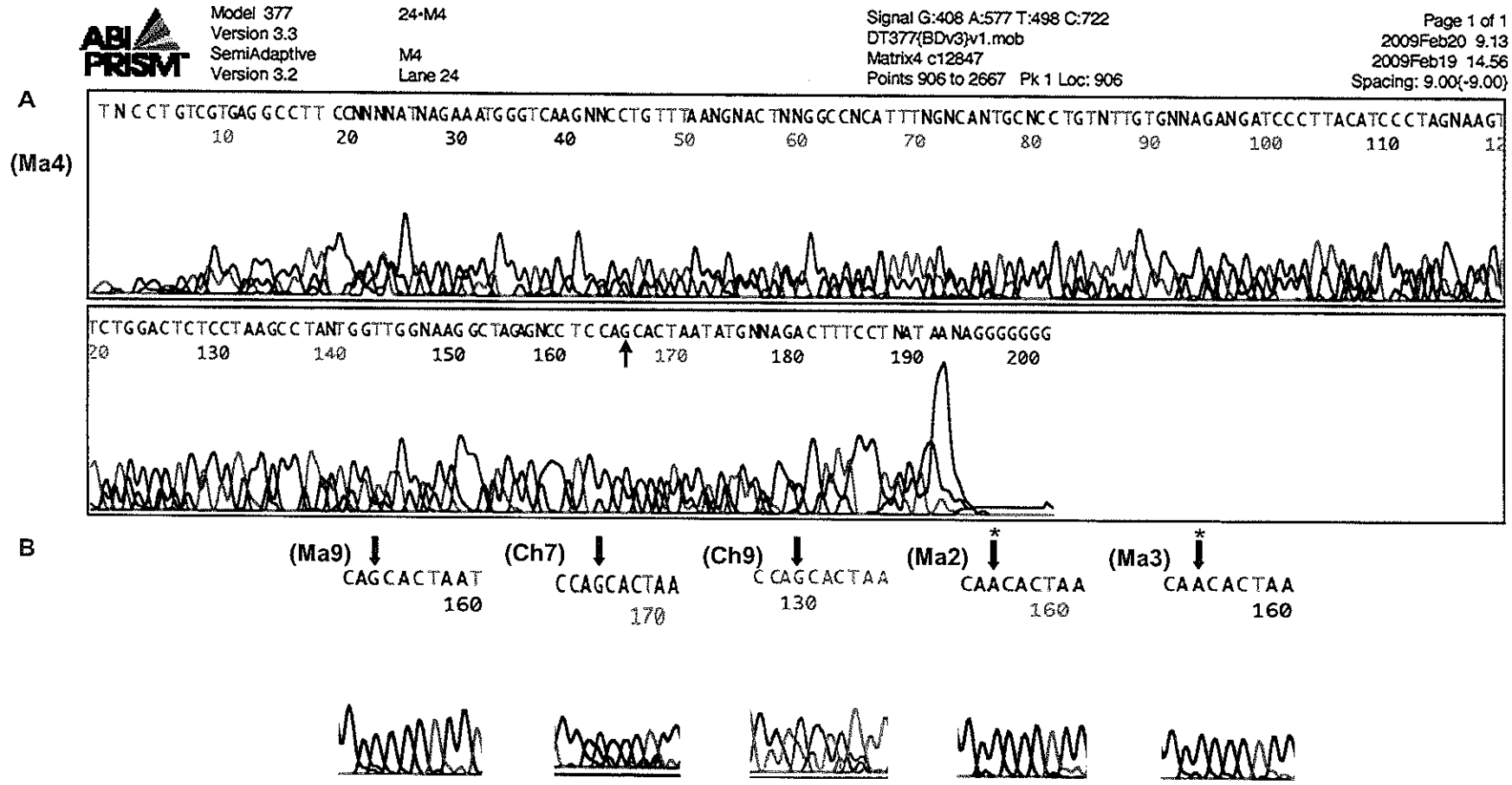
โดยตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ลำดับเบสคือ ตัวอย่างที่คาดว่าเกิดสนิป ได้แก่ Ma2* และ Ma3* และตัวอย่างที่คาดว่าเป็นคนปกติ ได้แก่ Ma4 Ma9 Ch7 และ Ch9

นำผลผลิต PCR ของทั้ง 6 ตัวอย่าง มาแยกใน agaroes gel ย้อมด้วย EtBr (ภาพที่ 3.6) และสกัดแถบดีเอ็นเอด้วย FavorPrep™ GEL/PCR purification kit (Favorgen) และนำไปวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี direct sequencing โดยใช้ reverse primer ด้วยสาเหตุว่าการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี direct sequencing เบสตำแหน่งแรกที่เครื่องจะสามารถวิเคราะห์ลำดับเบสได้จะอยู่ห่างจากตำแหน่ง primer ประมาณ 100 - 200 คู่เบส หากใช้ forward primer ในการวิเคราะห์จะไม่สามารถทราบลำดับเบสในตำแหน่งสนิปได้ เนื่องจากตำแหน่งสนิปจะอยู่ตรงตำแหน่งสุดท้ายของปลาย 3' ของ forward primer



ภาพที่ 3.6 การเตรียมผลผลิต PCR ตำแหน่ง M95 เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบส ใน 0.5% agarose gel ย้อมด้วย 2 µg/ml ethidium bromide (EtBr) ตัวอย่างที่คาดว่ามีสนิป (Ma2* และ Ma3*) เกิดจากการใช้ forward primer 2 (*) และตัวอย่างที่คาดว่าไม่มีสนิป (Ma4 Ma9 Ch7 และ Ch9) เกิดจากการใช้ forward primer 1

จากการทำการทดลองจำนวน 5 ครั้ง อย่างเป็นอิสระต่อกัน ผลปรากฏว่าตัวอย่าง Ma4 Ma9 Ch7 และ Ch9 ซึ่งคาดว่าเป็นคนปกติมีลำดับเบสเหมือนกัน และในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 156 มีเบสเป็น Gaunine ซึ่งเป็นเบสที่พบในคนปกติ ส่วนตัวอย่าง Ma2* และ Ma3* มีลำดับเบสเหมือนกัน และมีลำดับเบสเหมือนกับตัวอย่าง Ma4 Ma9 Ch7 และ Ch9 ยกเว้นในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 156 มีเบสเป็น Adenine ซึ่งเป็นเบสที่พบในคนที่มีสนิป ดังภาพที่ 3.7



ภาพที่ 3.7 **A** ลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากผลผลิต PCR สาย antisense (5'→3') ตำแหน่ง M95 ด้วยวิธี direct sequencing ด้วยการใช้ reverse primer ของตัวอย่าง Ma4 ซึ่งคาดว่าเป็นคนปกติ **B** ลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้ในตัวอย่างที่คาดว่าเป็นคนปกติ (Ma9 Ch7 และ Ch9) จะมีเบสเป็น Gaunine และตัวอย่างที่คาดว่าเกิดสนิป (Ma2 และ Ma3) จะมีเบสเป็น Adenine

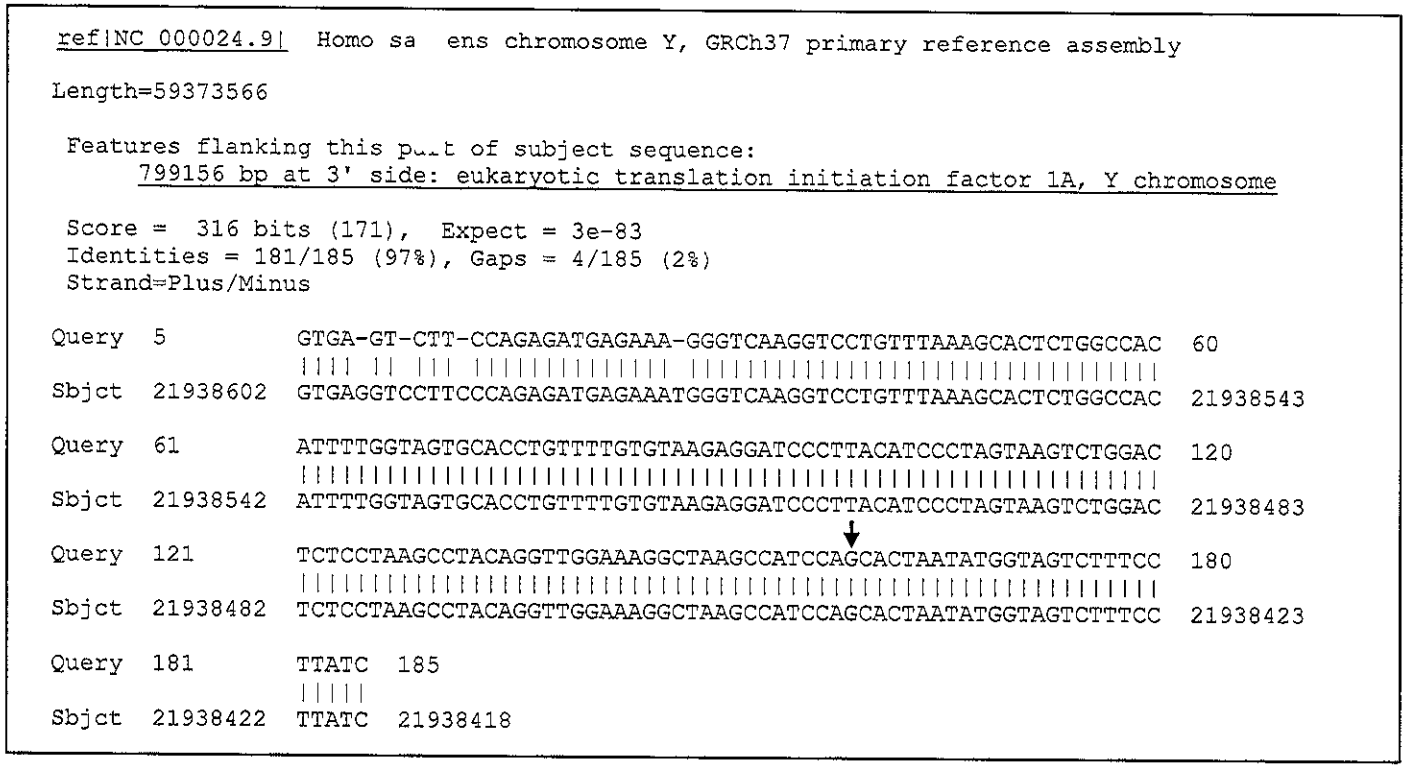
3.1.7 การตรวจสอบความจำเพาะของลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้กับฐานข้อมูล NCBI

ทำการวิเคราะห์ความจำเพาะของลำดับเบสของสาย antisense ที่สังเคราะห์ได้จากวิธี direct sequencing กับฐานข้อมูลของ NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) พบว่าลำดับเบสของสาย antisense ของตัวอย่าง Ma4 Ma9 Ch7 และ Ch9 ซึ่งคาดว่าเป็นคนปกติ ตรงกับลำดับเบสของยีน EIF1AY ที่อยู่บนโครโมโซมวายของมนุษย์ โดยมีเปอร์เซ็นต์ความจำเพาะ 97 98 98 และ 94 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 3.8 -3.11) และลำดับเบสของสาย antisense ของตัวอย่าง Ma2* และ Ma3* ซึ่งคาดว่ามีสนิป ตรงกับลำดับเบสของยีน EIF1AY ที่อยู่บนโครโมโซมวายของมนุษย์ แต่ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 21,938,444 มีการเปลี่ยนเบสจาก Guanine เป็น Adenine โดยมีเปอร์เซ็นต์ความจำเพาะ 98 และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 3.12 และ 3.13)

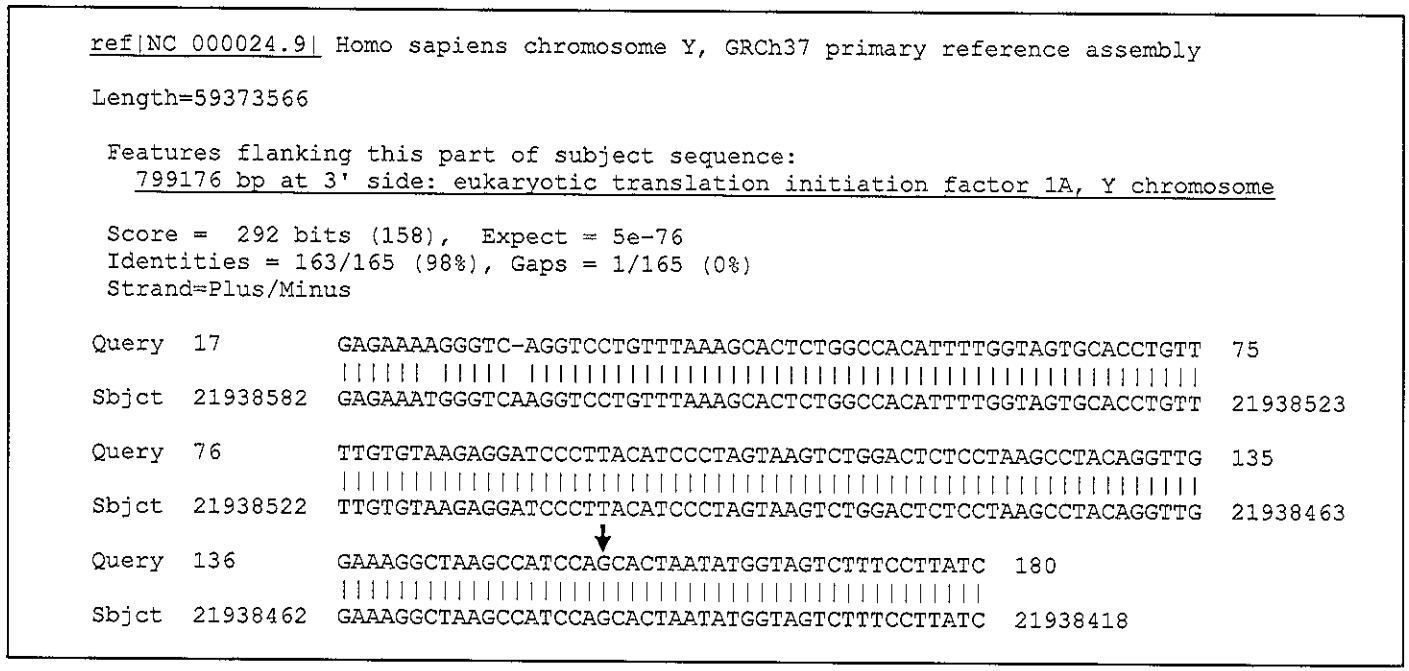
ทำให้สรุปการศึกษาสนิปตำแหน่ง M95 ได้ว่าในผู้ชายกลุ่มชาติพันธุ์มาเลย์ จำนวน 10 คน พบสนิป 2 คน และในผู้ชายกลุ่มชาติพันธุ์จีนไม่พบสนิปเลยทั้ง 10 คน ตารางที่ 3.4 แสดงผลการศึกษาทั้งหมดของตำแหน่ง M95

3.1.8 การวิเคราะห์ความถี่

การวิเคราะห์ความถี่ของการพบสนิปเท่ากับ 0.1 หรือเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ ในประชากรทั้งหมด (n=20) โดยพบสนิปเฉพาะในผู้ชายชาติพันธุ์มาเลย์เท่านั้น คิดเป็นความถี่เท่ากับ 0.2 หรือเท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์ ของกลุ่มประชากรชาติพันธุ์มาเลย์ (n=10)



ภาพที่ 3.8 ผลการตรวจสอบความจำเพาะของลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากตัวอย่าง Ma4 (ตำแหน่ง M95) กับฐานข้อมูล NCBI ตรงกับยีน EIF1AY ลูกศรชี้ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 21,938,444 เป็นเบสปกติ Query คือ ลำดับเบสของสาย antisense ดีเอ็นเอของตัวอย่าง Ma4 ที่ได้จากการทำ direct sequencing Sbjct คือลำดับเบสของยีน EIF1AY ในฐานข้อมูล NCBI ที่ตรง (match) กัน



ref|NC_000024.9| Homo sapiens chromosome Y, GRCh37 primary reference assembly

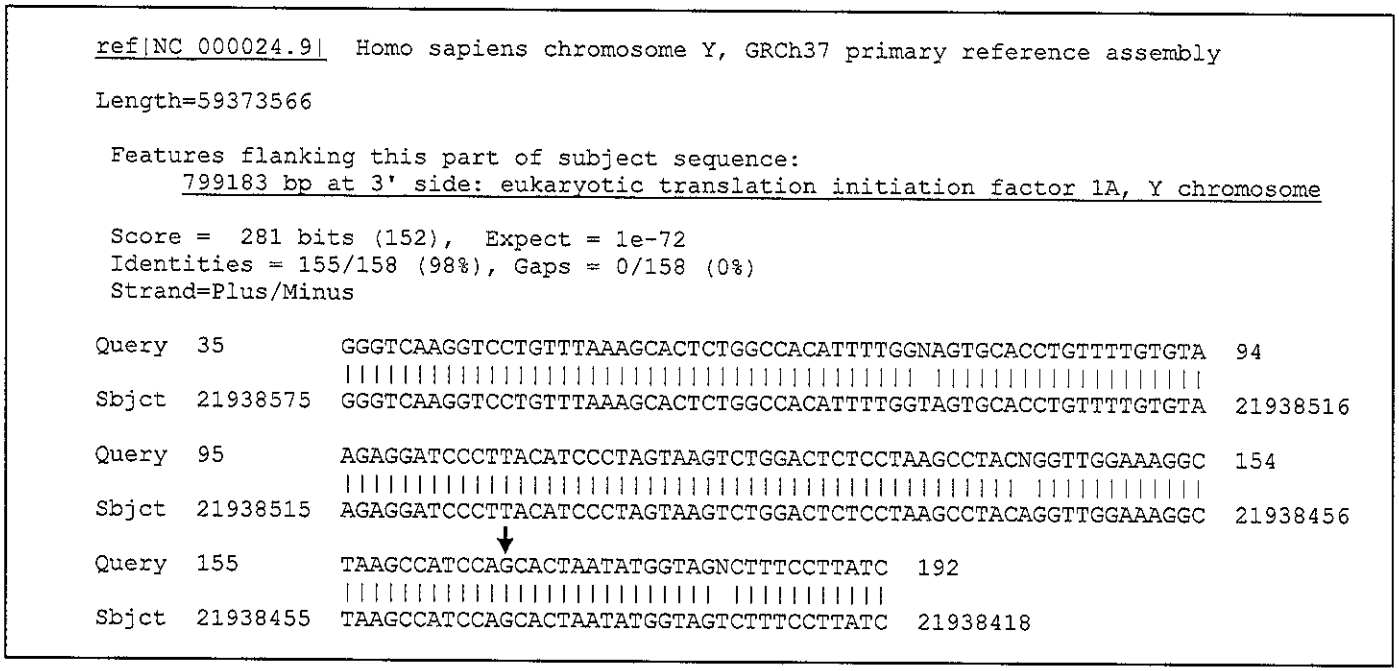
Length=59373566

Features flanking this part of subject sequence:
799176 bp at 3' side: eukaryotic translation initiation factor 1A, Y chromosome

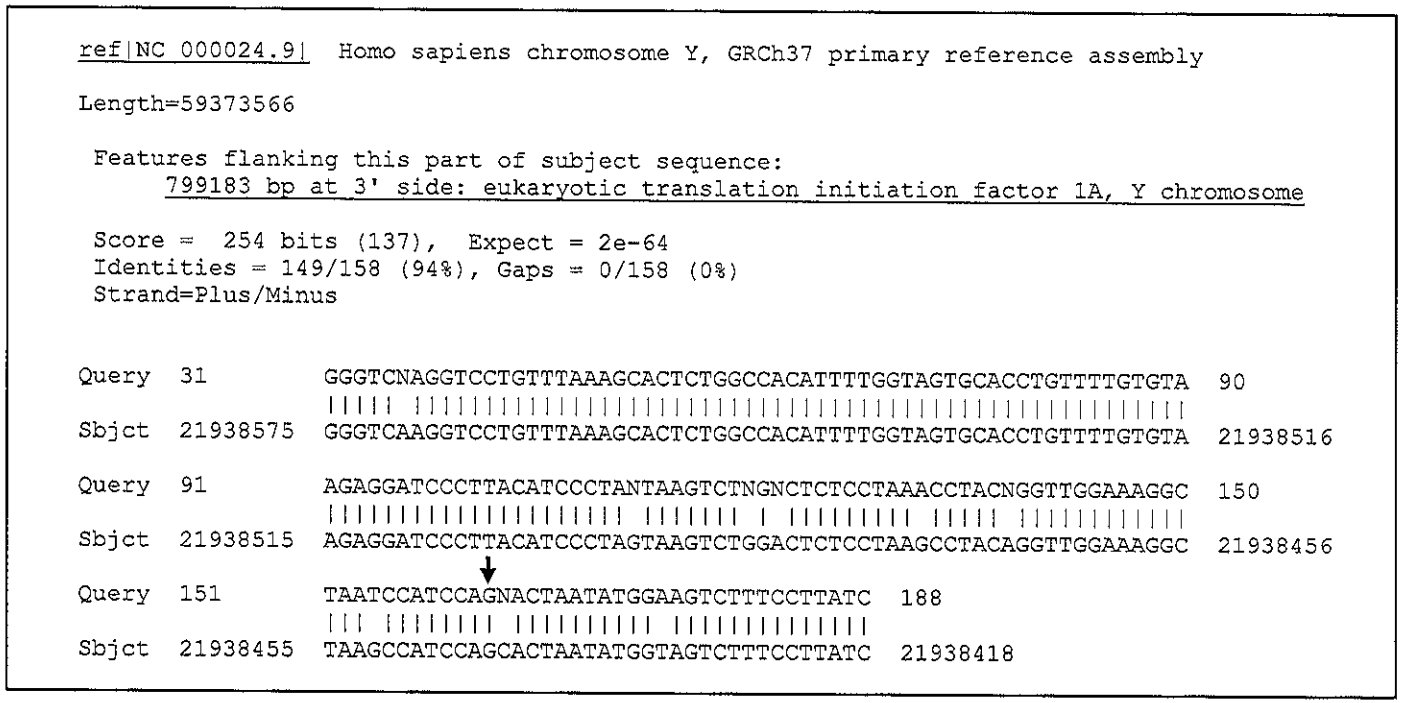
Score = 292 bits (158), Expect = 5e-76
Identities = 163/165 (98%), Gaps = 1/165 (0%)
Strand=Plus/Minus

```
Query  17        GAGAAAAGGGTC-AGGTCCTGTTTAAAGCACTCTGGCCACATTTTGGTAGTGCACCTGTT  75
                 |||||| ||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  21938582  GAGAAATGGGTCAAGGTCCTGTTTAAAGCACTCTGGCCACATTTTGGTAGTGCACCTGTT  21938523

Query  76        TTGTGTAAGAGGATCCCTTACATCCCTAGTAAGTCTGGACTCTCCTAAGCCTACAGGTTG  135
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  21938522  TTGTGTAAGAGGATCCCTTACATCCCTAGTAAGTCTGGACTCTCCTAAGCCTACAGGTTG  21938463

Query  136       GAAAGGCTAAGCCATCCAGCACTAATATGGTAGTCTTTCCTTATC  180
                 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  21938462  GAAAGGCTAAGCCATCCAGCACTAATATGGTAGTCTTTCCTTATC  21938418
```

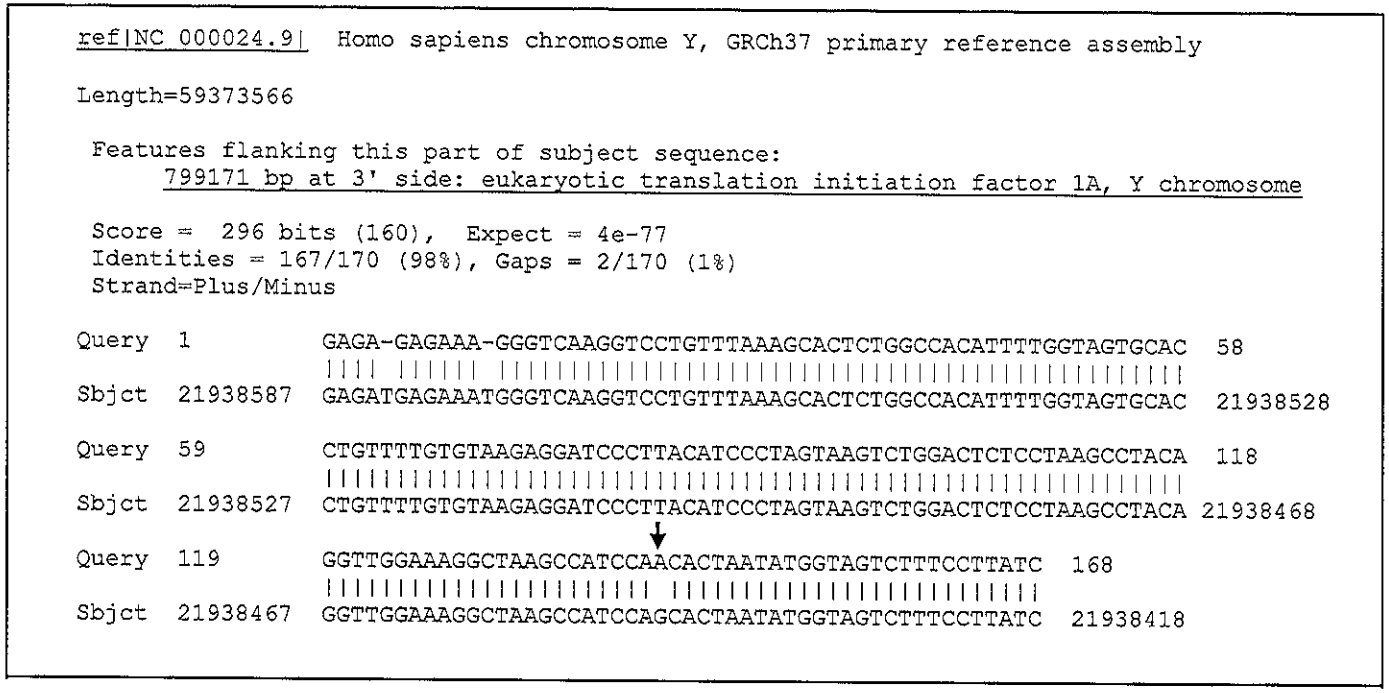
ภาพที่ 3.9 ผลการตรวจสอบความจำเพาะของลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากตัวอย่าง Ma9 (ตำแหน่ง M95) กับฐานข้อมูล NCBI ตรงกับยีน EIF1AY ลูกศรชี้ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 21,938,444 เป็นเบสปกติ Query คือ ลำดับเบสของสาย antisense ดีเอ็นเอของตัวอย่าง Ma9 ที่ได้จากการทำ direct sequencing Sbjct คือลำดับเบสของยีน EIF1AY ในฐานข้อมูล NCBI ที่ตรง (match) กัน



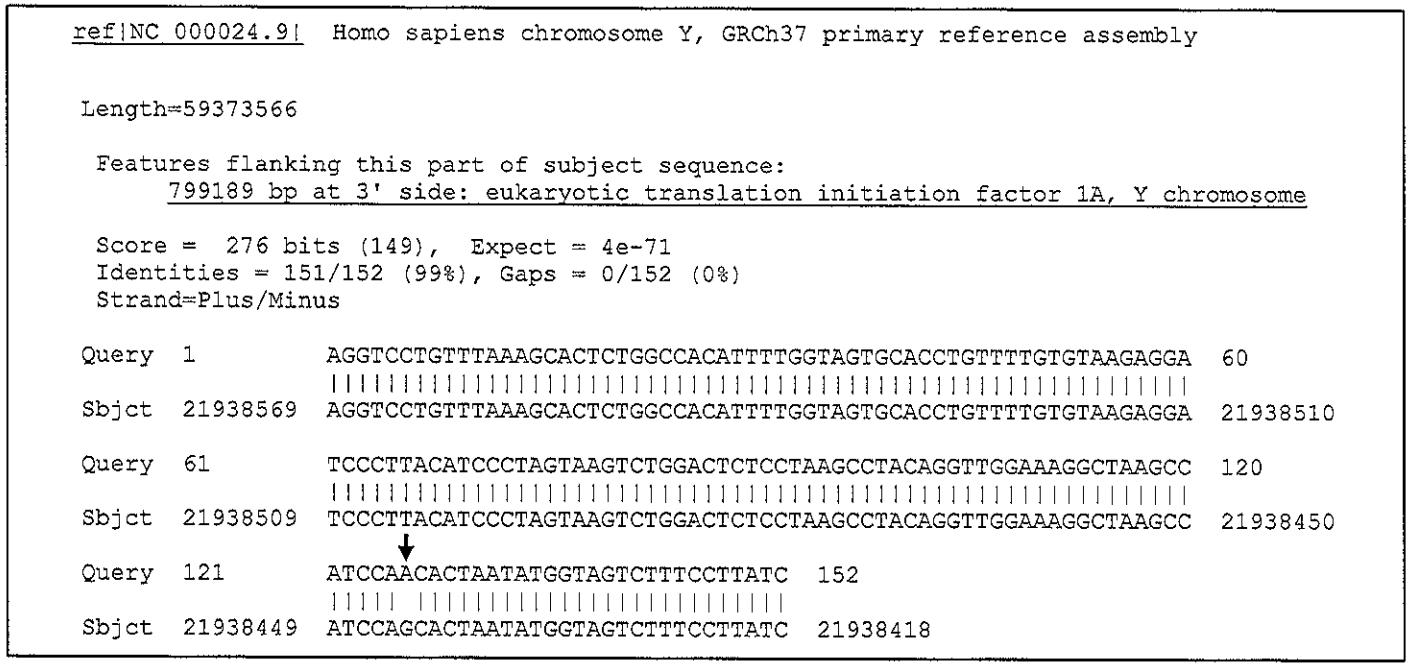
ภาพที่ 3.10 ผลการตรวจสอบความจำเพาะของลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากตัวอย่าง Ch7 (ตำแหน่ง M95) กับฐานข้อมูล NCBI ตรงกับยีน EIF1AY ลูกศรชี้ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 21,938,444 เป็นเบสปกติ Query คือ ลำดับเบสของสาย antisense ดีเอ็นเอของตัวอย่าง Ch7 ที่ได้จากการทำ direct sequencing Sbjct คือลำดับเบสของยีน EIF1AY ในฐานข้อมูล NCBI ที่ตรง (match) กัน



ภาพที่ 3.11 ผลการตรวจสอบความจำเพาะของลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากตัวอย่าง Ch9 (ตำแหน่ง M95) กับฐานข้อมูล NCBI ตรงกับยีน EIF1AY ลูกศรชี้ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 21,938,444 เป็นเบสปกติ Query คือ ลำดับเบสของสาย antisense ดีเอ็นเอของตัวอย่าง Ch9 ที่ได้จากการทำ direct sequencing Sbjct คือลำดับเบสของยีน EIF1AY ในฐานข้อมูล NCBI ที่ตรง (match) กัน



ภาพที่ 3.12 ผลการตรวจสอบความจำเพาะของลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากตัวอย่าง Ma2* (ตำแหน่ง M95) กับฐานข้อมูล NCBI ตรงกับยีน EIF1AY ลูกศรชี้ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 21,938,444 เป็นเบสสนิป Query คือ ลำดับเบสของสาย antisense ดีเอ็นเอของตัวอย่าง Ma2* ที่ได้จากการทำ direct sequencing Sbjct คือลำดับเบสของยีน EIF1AY ในฐานข้อมูล NCBI ที่ตรง (match) กัน



```
ref|NC_000024.9|  Homo sapiens chromosome Y, GRCh37 primary reference assembly

Length=59373566

 Features flanking this part of subject sequence:
     799189 bp at 3' side: eukaryotic translation initiation factor 1A, Y chromosome

 Score =  276 bits (149),  Expect = 4e-71
 Identities = 151/152 (99%), Gaps = 0/152 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query  1         AGGTCCTGTTTAAAGCACTCTGGCCACATTTTGGTAGTGCACCTGTTTTGTGTAAGAGGA  60
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  21938569  AGGTCCTGTTTAAAGCACTCTGGCCACATTTTGGTAGTGCACCTGTTTTGTGTAAGAGGA  21938510

Query  61        TCCCTTACATCCCTAGTAAGTCTGGACTCTCCTAAGCCTACAGGTTGGAAAGGCTAAGCC  120
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  21938509  TCCCTTACATCCCTAGTAAGTCTGGACTCTCCTAAGCCTACAGGTTGGAAAGGCTAAGCC  21938450

Query  121       ATCCAACACTAATATGGTAGTCTTTCCTTATC  152
                 ||||| ||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  21938449  ATCCAGCACTAATATGGTAGTCTTTCCTTATC  21938418
```

ภาพที่ 3.13 ผลการตรวจสอบความจำเพาะของลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากตัวอย่าง Ma3* (ตำแหน่ง M95) กับฐานข้อมูล NCBI ตรงกับยีน EIF1AY ลูกศรชี้ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 21,938,444 เป็นเบสสนิป Query คือ ลำดับเบสของสาย antisense ดีเอ็นเอของตัวอย่าง Ma3* ที่ได้จากการทำ direct sequencing Sbjct คือลำดับเบสของยีน EIF1AY ในฐานข้อมูล NCBI ที่ตรง (match) กัน

ตารางที่ 3.4 สรุปผลการศึกษาสนิปในตำแหน่ง M95 ด้วยวิธี AGE, SSCP และ direct sequencing

ตัวอย่าง	Methodology												
	AGE		SSCP								Direct sequencing		
	P1 (ปกติ)	P2 (สนิป)	P1 (ปกติ)	Mw (kDa)			P2 (สนิป)	Mw (kDa)			จำนวนครั้งของการทดลอง	%match กับยีน EIF1AY	ลำดับเบสบริเวณสนิป (5'→3')
				dsDNA	anti-sense	sense		dsDNA	anti-sense	sense			
ปกติ (Ma4,Ma9, Ch7,Ch9)	++	+	++	76	70	62	+	78	72	63	2	90-98	ATAATCACG
สนิป (Ma2,Ma3)	+	++	+	-	67	62.5	++	76	68.5	62.5	4	93-99	ATAATCACA

หมายเหตุ + แถบผลผลิต PCR มีสีจาง
++ แถบผลผลิต PCR มีสีเข้ม
Ma = อาสาสมัครชาติพันธุ์มาเลย์
AGE = agarose gel electrophoresis
dsDNA = double-stranded DNA
Ch = อาสาสมัครชาติพันธุ์จีน
SSCP = single strand conformation polymorphism
P1 = forward primer 1
Mw = น้ำหนักโมเลกุล
P2 = forward primer 2
- = ไม่พบแถบผลผลิต PCR

3.2 สนิปตำแหน่ง M172

3.2.1 การออกแบบ primer

เนื่องจากไม่พบการรายงานลำดับเบสของ primers ในสนิปตำแหน่ง M172 จึงได้ทำการออกแบบ primer ขึ้นใหม่ ด้วยโปรแกรม Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/) ด้วยเมื่อพิจารณาลำดับเบสบริเวณสนิปแล้ว พบว่าเป็นบริเวณที่มีเบส T มาก ซึ่งตามหลักการออกแบบ primer บริเวณปลาย 3' ของดีเอ็นเอต้นแบบที่จะจับกับ primer ไม่ควรเป็นบริเวณที่มีเบส T หลายตัว และควรหลีกเลี่ยงการลงท้ายด้วยเบส G จึงทำให้ต้องเลือกบริเวณของ primer ให้ห่างจากบริเวณสนิป ทำให้ตำแหน่งสนิปอยู่บริเวณกลางสายของผลผลิต PCR โดยได้ forward primer ที่มีค่า Tm เท่ากับ 57.30 ค่า GC-content เท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ และ reverse primer มีค่า Tm เท่ากับ 55.30 ค่า GC-content เท่ากับ 45 เปอร์เซ็นต์

3.2.2 การตรวจสอบความจำเพาะของ Primer

นำ forward primer และ reverse primer ไปหาความจำเพาะกับฐานข้อมูล Human genome ใน NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) พบว่า primer มีความจำเพาะกับยีน USP9Y (Ubiquitin specific protease 9, Y-linked) บนโครโมโซม Y (ภาพที่ 3.14) ตำแหน่งของ forward primer อยู่ในช่วงนิวคลีโอไทด์ที่ 14,969,522 ถึง 14,969,541 และตำแหน่งของ reverse primer อยู่ในช่วงนิวคลีโอไทด์ที่ 14,969,746 ถึง 14,969,727 ตำแหน่งสนิปอยู่นิวคลีโอไทด์ที่ 14,969,635 เบส ผลผลิต PCR มีขนาด 225 คู่เบส น้ำหนักโมเลกุลของดีเอ็นเอสาย sense เท่ากับ 68,915 Da น้ำหนักโมเลกุลของดีเอ็นเอสาย antisense เท่ากับ 69,956 Da

```
NC_000024.9 Homo sapiens chromosome Y, GRCh37 primary reference assembly

product length = 225

Features associated with this product:
      ubiquitin specific protease 9, Y-linked

Forward primer 1         ATGAGCCCTCTCCATCAGAA 20
Template       14969522  .................... 14969541

Reverse primer 1         TCACTCCATGTTGGTTTGGA 20
Template       14969746  .................... 14969727
```

ภาพที่ 3.14 การตรวจสอบความจำเพาะของ primer ตำแหน่ง M172 กับฐานข้อมูลของ NCBI พบจำเพาะกับยีน USP9Y (Ubiquitin specific protease 9, Y-linked

3.2.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเพื่อหาความเข้มข้นของ PCR master mix และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา PCR ทำโดย

การทดลองที่ 1 ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยเตรียมสารละลาย PCR master mix (1X PCR buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP, 2.5 unit Taq DNA polymerase และ 0.5 µM forward/reverse primers) เหมือนกับที่ใช้ใน ตำแหน่ง M95 และทำปฏิกิริยาทั้งสิ้น 35 รอบ ประกอบด้วย denaturation 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที annealing 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.30 วินาที และ final extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน annealing (annealing temperature) จะต่ำกว่า Tm ของ primer 5 องศาเซลเซียส และนำไปแยกแถบดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis พบแถบผลผลิต PCR ที่ได้มี 2 แถบ โดยแถบบนมีขนาดประมาณ 417 คู่เบส ติดสีเข้มชัดเจน ซึ่งเป็นแถบผลผลิต PCR ที่ไม่ต้องการ (non-specific band) แถบล่างมีขนาดประมาณ 225 คู่เบส ซึ่งเป็นผลผลิต PCR ที่ต้องการ แต่ความเข้มของแถบจางกว่าแถบบน (ภาพที่ 3.15A) แสดงว่า primer ไปจับกับตำแหน่งอื่นได้ดีกว่าตำแหน่งที่ต้องการ ทำให้แถบบนมีสีเข้มกว่าแถบล่าง จึงทำการปรับหาสภาวะใหม่

การทดลองที่ 2 ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ annealing เป็น 57 องศาเซลเซียส (ให้เท่ากับ Tm ของ primer) พบว่าได้แถบผลผลิต PCR จำนวน 1 แถบ มีขนาดประมาณ 225 คู่เบส แต่แถบผลผลิต PCR ปรากฏเพียงจางๆ (ภาพที่ 3.15B) แสดงว่า primer สามารถจับกับตำแหน่งที่ต้องการได้เล็กน้อย จึงทำให้แถบผลผลิต PCR มีสีจาง และไม่จับกับตำแหน่งอื่นเลย จึงทำการปรับหาสภาวะที่ความเหมาะสมของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอีกครั้ง

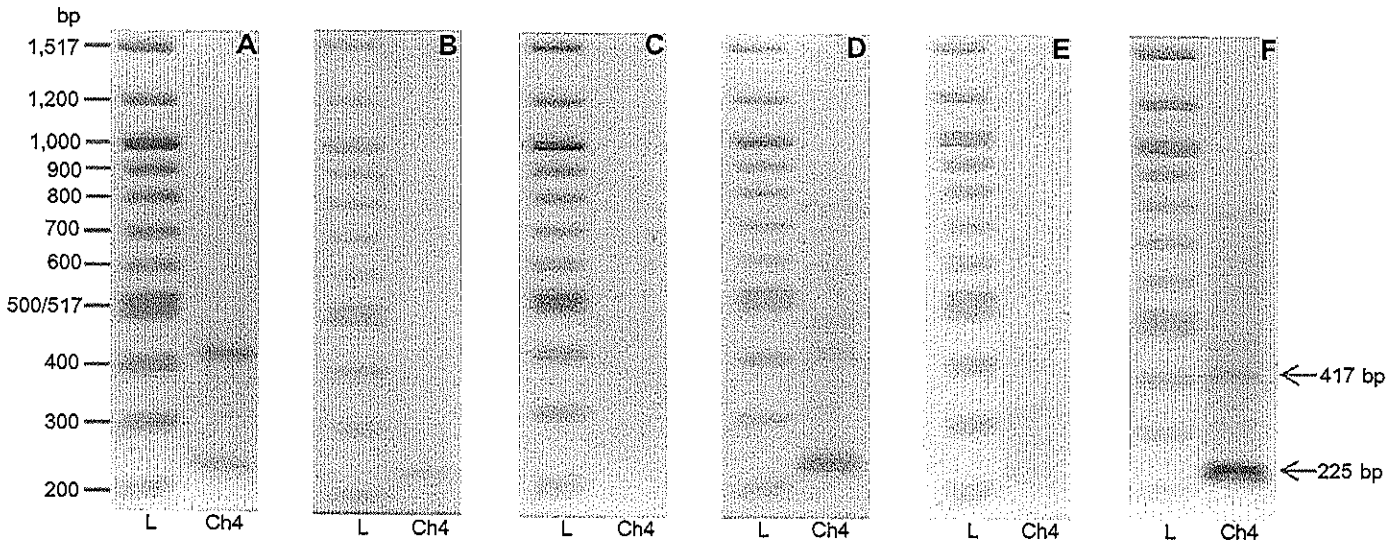
การทดลองที่ 3 ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ annealing เป็น 62 องศาเซลเซียส (ให้สูงกว่า Tm ของ primer) พบว่าไม่ปรากฏแถบผลผลิต PCR เลย (ภาพที่ 3.15C) แสดงว่า primer ไม่สามารถจับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้เลย ทำให้ไม่เกิดผลผลิต PCR จากทั้ง 3 การทดลองที่ผ่านมา ปัญหาที่เกิดขึ้นคาดว่าอาจมีสาเหตุมาจากการทำงานของเอนไซม์ Taq DNA polymerase ซึ่งมีความถูกต้องและความแม่นยำในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอในระดับหนึ่งเท่านั้น การทดลองต่อไปจึงทำการเปลี่ยนไปใช้เอนไซม์ที่มีความจำเพาะมากขึ้น

การทดลองที่ 4 ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยเปลี่ยนเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR เป็น *Pfx50*™DNA polymerase ซึ่งมีความจำเพาะในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสูงและเร็วกว่าเอนไซม์ Taq DNA polymerase ประมาณ 50 เท่า

และมีคุณสมบัติในการแก้ไขการต่อเบสผิดที่บริเวณปลาย 3' ของ primer ทนความร้อนได้สูงและปริมาตรที่ใช้ในปฏิกิริยาต่ำ โดยปรับส่วนผสมสารละลาย PCR master mix เป็น 1X *Pfx* PCR buffer, 0.3 mM dNTP, 5 unit *Pfx50*™DNA polymerase และ 0.3 µM forward/reverse primers นำไปทำปฏิกิริยาจำนวน 35 รอบ โดยปรับอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR เป็น denaturation 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที annealing 57 องศาเซลเซียส (เท่ากับการทดลองที่ 2) เป็นเวลา 30 วินาที extension 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ final extension 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต *Pfx50*™DNA polymerase (Invitrogen) ผลปรากฏว่าพบแถบผลผลิต PCR 2 แถบ โดยแถบบนซึ่งเป็น non-specific band ขนาด 417 คู่เบส ความเข้มของแถบจางกว่าแถบล่าง แถบล่างมีขนาดประมาณ 225 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดที่ต้องการ ติดสีเข้มกว่าแถบบนมาก (ภาพที่ 3.15D) แสดงว่า primer สามารถจับกับตำแหน่งที่ต้องการได้ดีขึ้นและการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอมีความแม่นยำมากขึ้น แต่ผลผลิต PCR ขนาด 225 คู่เบส ที่ได้ยังมีปริมาณไม่มากนัก จึงทำการปรับหาสภาวะที่ความเหมาะสมเพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ ขนาด 225 คู่เบส ได้มากขึ้น

การทดลองที่ 5 ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย *Pfx50*™DNA polymerase และเปลี่ยนอุณหภูมิเป็น annealing 62 องศาเซลเซียส ผลยังคงพบแถบผลผลิต PCR จำนวน 2 แถบ โดยแถบบนเป็น non-specific band ขนาดประมาณ 417 คู่เบส และแถบล่างซึ่งเป็นขนาดที่ต้องการ ขนาดประมาณ 225 คู่เบส โดยแถบผลผลิต PCR ทั้ง 2 แถบ ปรากฏเพียงจางๆ (ภาพที่ 3.15E) แสดงว่าอุณหภูมิที่ใช้ไม่เหมาะสมกับการทำงานของ *Pfx50*™DNA polymerase ทำให้สังเคราะห์สายดีเอ็นเอได้น้อย จึงต้องปรับหาสภาวะที่ความเหมาะสมของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมต่อไป

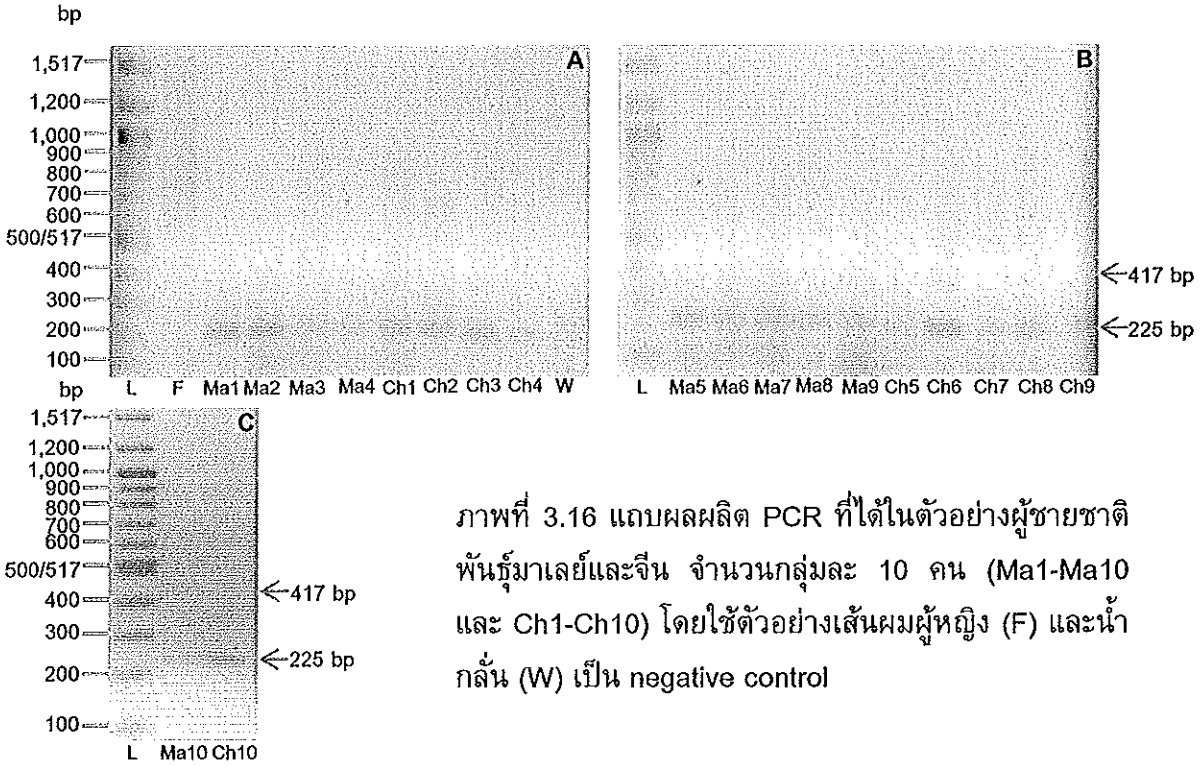
การทดลองที่ 6 ทำการเพิ่มปริมาณสารพันุกรรม โดยเปลี่ยนอุณหภูมิ annealing เป็น 60 องศาเซลเซียส ยังคงพบแถบผลผลิต PCR จำนวน 2 แถบ โดยแถบบนเป็น non-specific band ขนาด 417 คู่เบส ติดสีจางมาก และแถบล่างซึ่งเป็นขนาดที่ต้องการมีขนาดประมาณ 225 คู่เบส ติดสีเข้มชัดเจน (ภาพที่ 3.15F) ซึ่งแสดงว่าผลผลิต PCR ในขนาดที่ต้องการมีปริมาณมากกว่า non-specific band มาก ดังนั้นจึงเลือกใช้สภาวะที่ได้จากการทดลองที่ 6 ในการศึกษาสนิปตำแหน่ง M172 และถึงแม้ว่าในการทดลองนี้ยังปรากฏ non-specific band จางๆ ก็จะไม่มีผลต่อการศึกษาสนิป เนื่องจากมีการสกัดเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่สนใจจากแผ่นเจล (in-gel extraction) ก่อนจะนำไปทำ direct sequencing



ภาพที่ 3.15 แถบผลผลิต PCR ตำแหน่ง M172 จากการหาสภาวะทำ PCR ที่เหมาะสม **A** ในการทดลองที่ 1 ใช้เอนไซม์ Taq DNA polymerase และอุณหภูมิในขั้นตอน annealing 52 องศาเซลเซียส **B** ในการทดลองที่ 2 ใช้เอนไซม์ Taq DNA polymerase และอุณหภูมิในขั้นตอน annealing 57 องศาเซลเซียส **C** ในการทดลองที่ 3 ใช้เอนไซม์ Taq DNA polymerase และอุณหภูมิในขั้นตอน annealing 62 องศาเซลเซียส **D** ในการทดลองที่ 4 ใช้เอนไซม์ *Pfx50*^{TM}DNA polymerase และอุณหภูมิในขั้นตอน annealing 57 องศาเซลเซียส **E** ในการทดลองที่ 5 ใช้เอนไซม์ *Pfx50*^{TM}DNA polymerase และอุณหภูมิในขั้นตอน annealing 62 องศาเซลเซียส **F** แถบผลผลิต PCR ในการทดลองที่ 6 ใช้เอนไซม์ *Pfx50*^{TM}DNA polymerase และอุณหภูมิในขั้นตอน annealing 60 องศาเซลเซียส

3.2.4 การศึกษาสนิปด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา PCR ตำแหน่ง M172 ในตัวอย่างผู้ชายไทยชาติพันธุ์มาเลย์และจีน ทั้ง 20 คน ด้วย *Pfx50*™DNA polymerase และใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing เท่ากับ 60 องศาเซลเซียส นำแถบผลผลิต PCR มาแยกด้วย agarose gel electrophoresis ย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide และถ่ายภาพแถบผลผลิต PCR ภายใต้แสง UV ด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล เมื่อนำภาพที่ได้มาสังเกตลักษณะของแถบดีเอ็นเอ พบแถบผลผลิต PCR ขนาด 225 คู่เบส ในผู้ชายชาติพันธุ์มาเลย์และจีน คล้ายทั้ง 20 คน และพบแถบผลผลิต PCR ขนาด 417 คู่เบส ติดสีจางมาก (ภาพที่ 3.16)

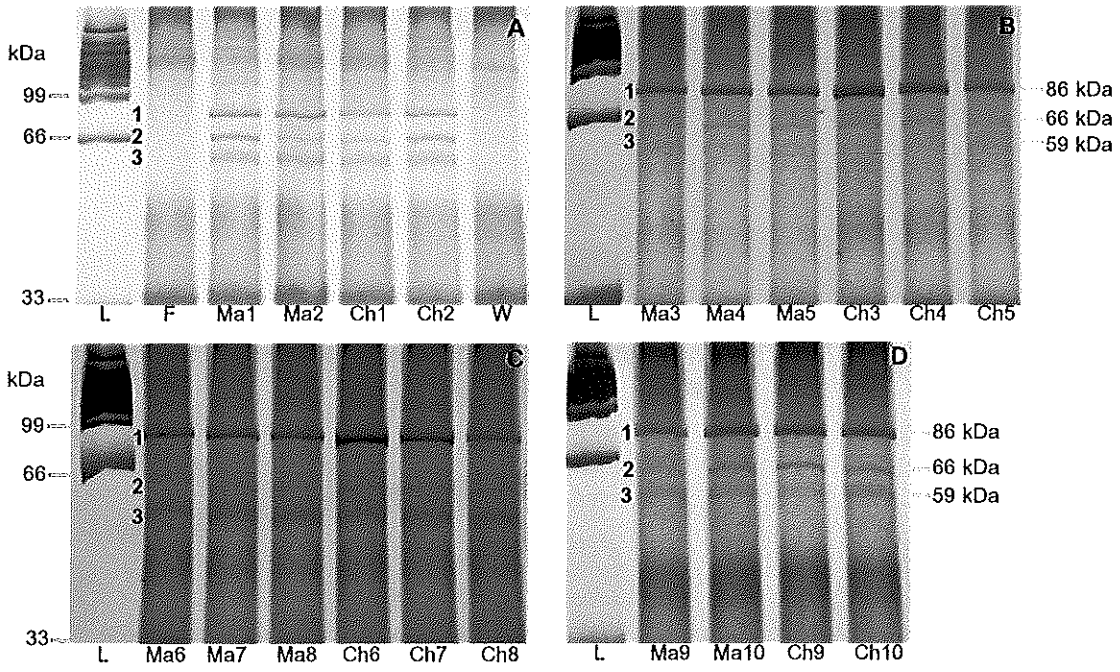


ภาพที่ 3.16 แถบผลผลิต PCR ที่ได้ในตัวอย่างผู้ชายชาติพันธุ์มาเลย์และจีน จำนวนกลุ่มละ 10 คน (Ma1-Ma10 และ Ch1-Ch10) โดยใช้ตัวอย่างเส้นผมผู้หญิง (F) และน้ำกลั่น (W) เป็น negative control

3.2.5 การศึกษาสนิปด้วยวิธี Single strand conformation polymorphism (SSCP)

เมื่อนำผลผลิต PCR ของอาสาสมัครเพศชายชาติพันธุ์มาเลย์และจีน ทั้ง 20 คน มาต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แยกแถบดีเอ็นเอด้วย polyacrylamide gel electrophoresis ย้อมแผ่นเจลด้วยสารละลาย silver nitrate และนำไปถ่ายภาพพบว่า แต่ละตัวอย่างปรากฏแถบผลผลิต PCR จำนวน 3 แถบ (ภาพที่

3.17) โดยน้ำหนักโมเลกุลของแถบผลผลิต PCR ของทุกตัวอย่าง ได้สรุปไว้ดังตารางที่ 3.5 - 3.7 ซึ่งแถบที่ 1 ของผลผลิต PCR มีขนาดเฉลี่ยเทียบเท่านิวคลีโอไทด์ 260 คู่เบส หรือน้ำ หนักโมเลกุลเฉลี่ย 86 kDa ซึ่งคาดว่าเป็นชิ้น double-stranded DNA (dsDNA) ที่เหลือหลังการต้ม ส่วนแถบที่ 2 มีขนาดเฉลี่ยเทียบเท่านิวคลีโอไทด์ 200 คู่เบส หรือน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 66 kDa คาดว่าเป็นสาย antisense (ssDNA) ที่เกิดขึ้นหลังจากการต้ม โดยตัวอย่าง Ma6, Ch4, Ch6 และ Ch9 อยู่ในตำแหน่งที่สูงกว่าตัวอย่างอื่นๆ เล็กน้อย จึงคาดว่าอาจเป็นตัวอย่างที่เกิดสนิป และแถบที่ 3 มีขนาดเฉลี่ยเทียบเท่านิวคลีโอไทด์ 178 คู่เบส หรือน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 59 kDa ซึ่งคาดว่าเป็นสาย sense (ssDNA) นอกจากนี้บริเวณที่ต่ำกว่าแถบผลผลิต PCR แถบที่ 3 จะพบ background noise ที่เกิดจากการย้อมด้วยสารละลาย silver nitrate ซึ่งน่าจะเกิดจากการทำปฏิกิริยาของ PCR master mix เนื่องจากปรากฏในทุกตัวอย่าง รวมทั้ง negative control โดย background noise ที่เกิดขึ้นไม่มีผลต่อการศึกษาเนื่องจากไม่ใช่ผลผลิตของสายดีเอ็นเอที่แท้จริง และจะไม่สามารถปนเปื้อนกับผลผลิต PCR ที่จะนำไปตรวจในขั้นตอน direct sequencing

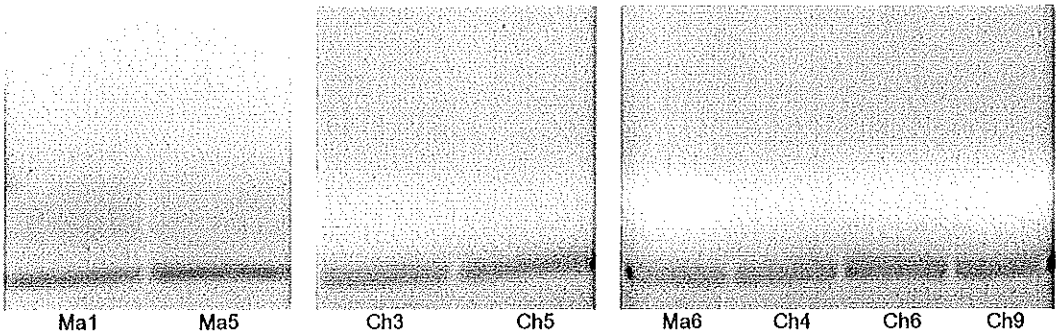


ภาพที่ 3.17 แถบผลผลิต PCR ที่ผ่านการต้มและแยกใน 12% polyacrylamide gel ในตัวอย่างผู้ชายที่มีชาติพันธุ์มาเลย์ (Ma) และจีน (Ch) จำนวนกลุ่มละ 10 คน โดยใช้ตัวอย่างเส้นผมผู้หญิง (F) และน้ำกลั่น (W) เป็น negative control แต่ละตัวอย่างปรากฏแถบผลผลิต PCR จำนวน 3 แถบ มีขนาดเทียบเท่านิวคลีโอไทด์ที่ 260, 200 และ 178 คู่เบสโดยประมาณ หรือมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 86, 66 และ 59 kDa ตามลำดับ

3.2.6 การศึกษาสนิปด้วยวิธี Direct sequencing

เนื่องจากการตรวจสอบสนิปด้วยวิธี SSCP พบว่าแถบผลผลิต PCR ที่ 2 ตัวอย่าง Ma6, Ch4, Ch6 และ Ch9 อยู่ในตำแหน่งสูงกว่าแถบผลผลิต PCR ของตัวอย่างอื่นๆ เล็กน้อย จึงคาดว่าเป็นตัวอย่างที่เกิดสนิป จึงทำการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี direct sequencing เพื่อเป็นการยืนยันการเกิดสนิป โดยตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ลำดับเบส คือ ตัวอย่างที่คาดว่าเกิดสนิป ได้แก่ Ma6, Ch4, Ch6 และ Ch9 และตัวอย่างที่คาดว่าเป็นคนปกติ ได้แก่ Ma1 Ma5 Ch3 และ Ch5

นำผลผลิต PCR ของทั้ง 8 ตัวอย่าง มาแยกใน agaroes gel ย้อมด้วย EtBr (ภาพที่ 3.18) และสกัดแถบดีเอ็นเอด้วย FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit (Favorgen) และนำไปวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี direct sequencing โดยใช้ forward primer เนื่องจากตำแหน่งสนิปอยู่บริเวณตรงกลางของสายผลผลิต PCR



ภาพที่ 3.18 แถบผลผลิต PCR ใน 0.5% agarose gel ย้อมด้วย 2 µg/ml ethidium bromide (EtBr) ตัวอย่างที่คาดว่ามีสนิป (Ma6, Ch4, Ch6 และ Ch9) และตัวอย่างที่คาดว่าไม่มีสนิป (Ma1 Ma5 Ch3 และ Ch5)

จากการทำการทดลองจำนวน 3 ครั้ง อย่างเป็นอิสระต่อกัน ผลปรากฏว่าทุกตัวอย่าง (Ma1 Ma5 Ma6 Ch3 Ch4 Ch5 Ch6 และ Ch9) มีลำดับเบสเหมือนกัน และในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 74 มีเบสเป็น Adenine ซึ่งเป็นเบสที่พบในคนปกติ ดังภาพที่ 3.19

ตารางที่ 3.5 ขนาดของแถบผลผลิต PCR แถบที่ 1 (dsDNA) ตำแหน่ง M172 ที่ผ่านการดัมที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

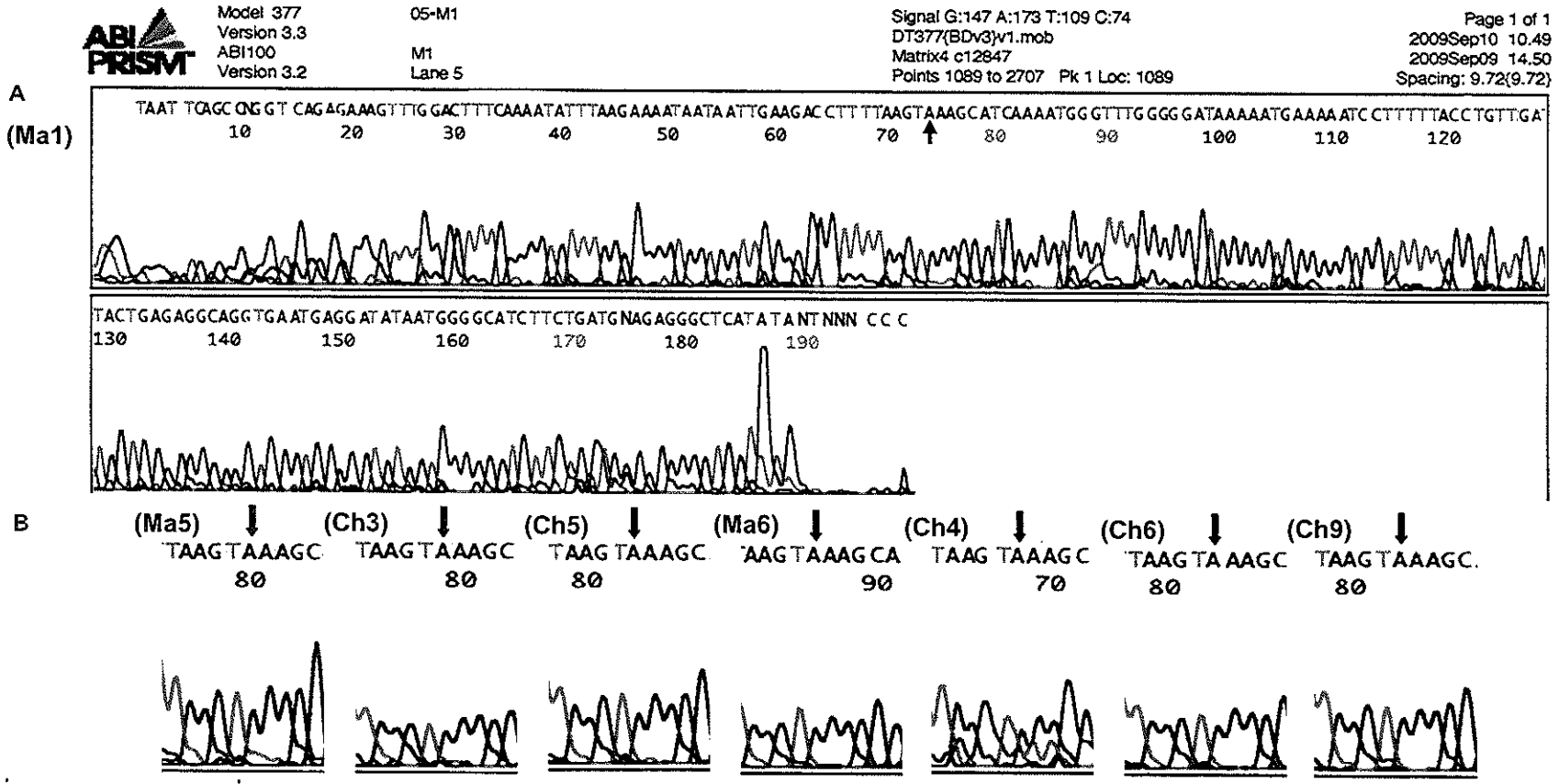
ขนาดของดีเอ็นเอสายคู่ (dsDNA) (kDa)																				
M172	Ma1	Ma2	Ma3	Ma4	Ma5	Ma6	Ma7	Ma8	Ma9	Ma10	Ch1	Ch2	Ch3	Ch4	Ch5	Ch6	Ch7	Ch8	Ch9	Ch10	ค่าเฉลี่ย (±S.D)
Mw	85	85	92	92	90	89	86	86	82	82	85	85	89	92	92	83	86	86	82	82	86 ±3.61

ตารางที่ 3.6 ขนาดของแถบผลผลิต PCR แถบที่ 2 (สาย antisense) ตำแหน่ง M172 ที่ผ่านการดัมที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

ขนาดของดีเอ็นเอสาย antisense (kDa)																				
M172	Ma1	Ma2	Ma3	Ma4	Ma5	Ma6	Ma7	Ma8	Ma9	Ma10	Ch1	Ch2	Ch3	Ch4	Ch5	Ch6	Ch7	Ch8	Ch9	Ch10	ค่าเฉลี่ย (±S.D)
Mw	71	71	69	69	69	62	62	62	64	64	71	71	69	69	69	62	62	62	65	64	66 ±3.70

ตารางที่ 3.7 ขนาดของแถบผลผลิต PCR แถบที่ 3 (สาย sense) ตำแหน่ง M172 ที่ผ่านการดัมที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

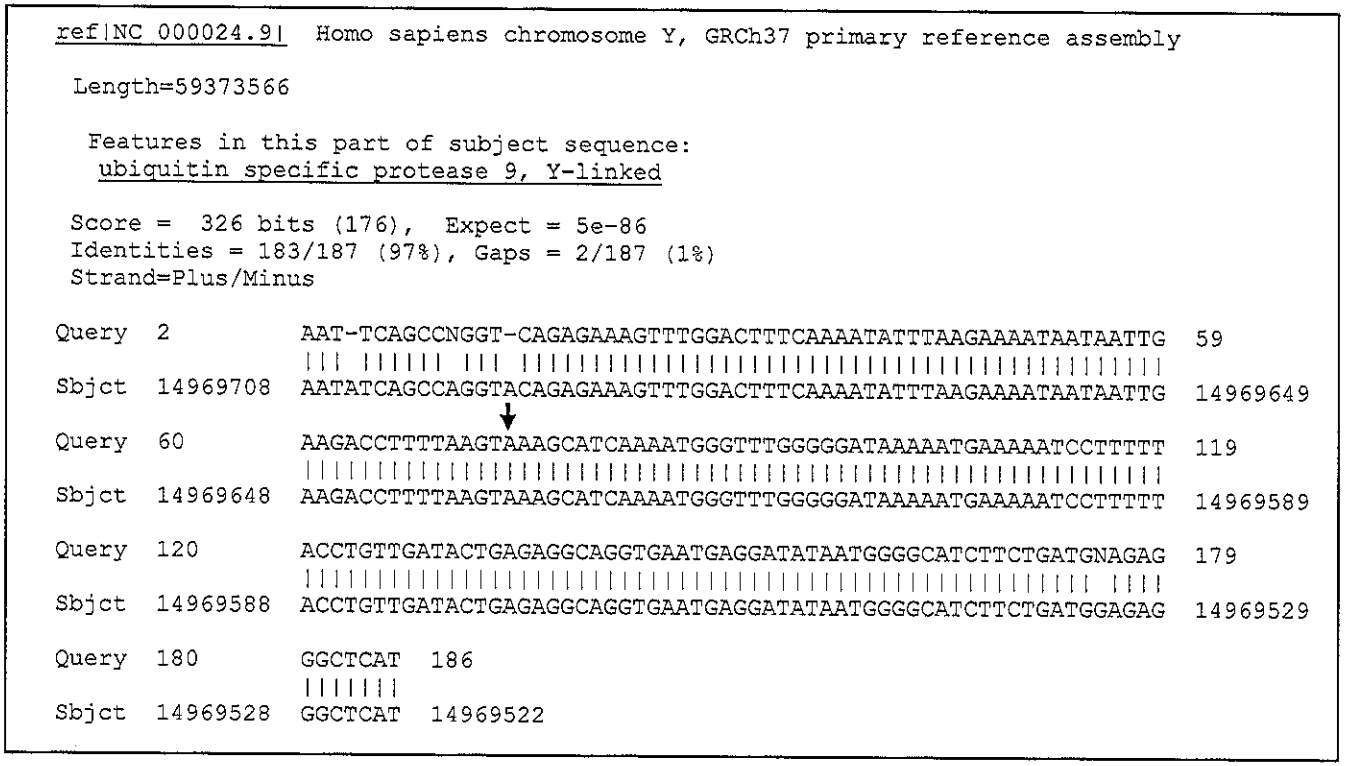
ขนาดของดีเอ็นเอสาย sense (kDa)																				
M172	Ma1	Ma2	Ma3	Ma4	Ma5	Ma6	Ma7	Ma8	Ma9	Ma10	Ch1	Ch2	Ch3	Ch4	Ch5	Ch6	Ch7	Ch8	Ch9	Ch10	ค่าเฉลี่ย (±S.D)
Mw	62	62	61	61	61	57	57	57	59	59	62	62	61	61	61	57	57	57	61	59	59 ±2.02



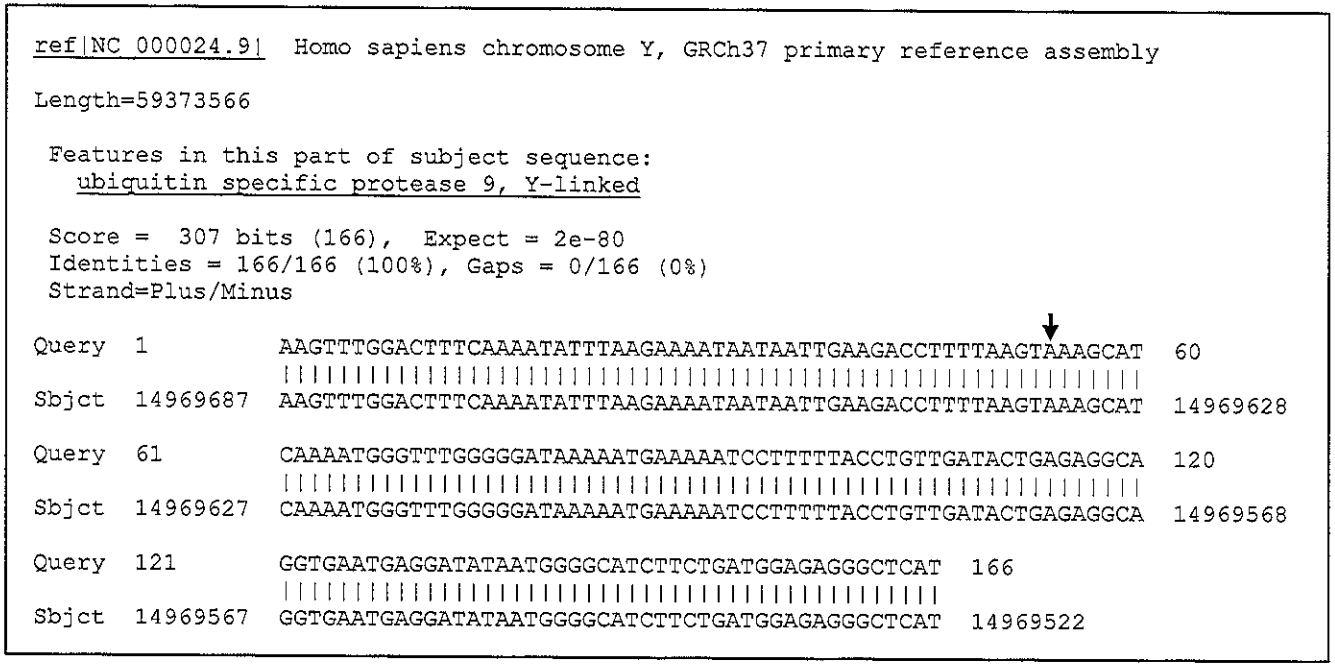
ภาพที่ 3.19 **A** ลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากผลผลิต PCR สาย antisense (5'→3') ตำแหน่ง M172 ด้วยวิธี direct sequencing ด้วยการใช้ forward primer ของตัวอย่าง Ma1 ซึ่งคาดว่าเป็นคนปกติ **B** ลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากผลผลิต PCR สาย antisense ด้วยการใช้ forward primer แสดงเฉพาะบริเวณสนิปในตัวอย่างที่คาดว่าเป็นคนปกติ (Ma5 Ch3 และ Ch5) และตัวอย่างที่คาดว่าเกิดสนิป (Ma6 Ch4 Ch6 และ Ch9) พบเบสเป็น Adenine (ปกติ) ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 83

3.2.7 การตรวจสอบความจำเพาะของลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้กับฐานข้อมูล NCBI

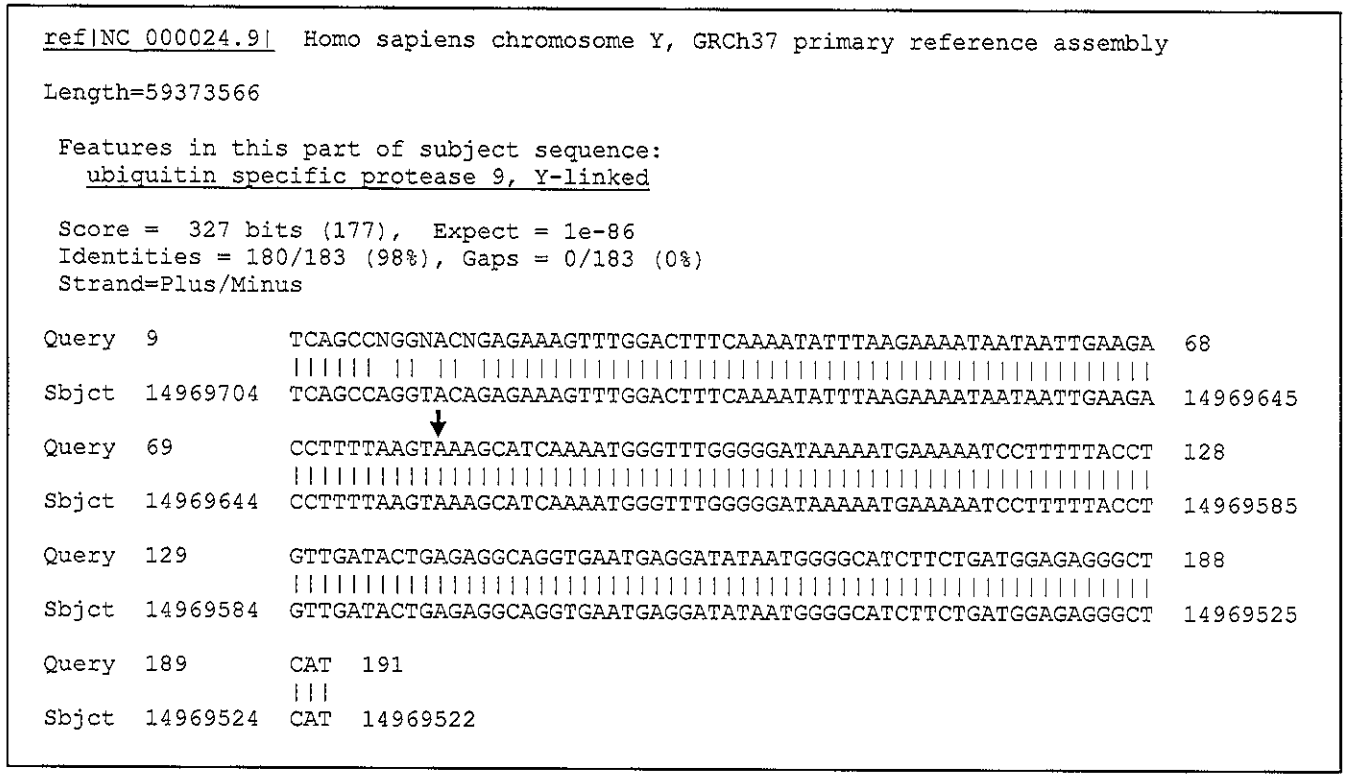
ทำการวิเคราะห์ความจำเพาะของลำดับเบสของสาย antisense ที่สังเคราะห์ได้จากวิธี direct sequencing กับฐานข้อมูลของ NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) พบว่าลำดับเบสของสาย antisense ของตัวอย่าง Ma1 Ma5 Ma6 Ch3 Ch4 Ch5 Ch6 และ Ch9 จำเพาะกับลำดับเบสของยีน USP9Y ที่อยู่บนโครโมโซมวายของมนุษย์ 97 100 98 98 99 94 99 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 3.20 - 3.27) ตำแหน่งสนิปซึ่งตรงกับนิวคลีโอไทด์ที่ 14,969,635 มีแบสเป็น Adenine ซึ่งเป็นเบสปกติ ทำให้สรุปการศึกษาสนิปตำแหน่ง M172 ได้ว่าในผู้ชายกลุ่มชาติพันธุ์มาเลย์และจีนไม่พบสนิปเลยทั้ง 20 คน ตารางที่ 3.8 แสดงผลการศึกษาทั้งหมดของตำแหน่ง M172



ภาพที่ 3.20 ผลการตรวจสอบความจำเพาะของลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากตัวอย่าง Ma1 (ตำแหน่ง M172) กับฐานข้อมูล NCBI ตรงกับยีน USP9Y ลูกศรชี้ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 14,969,635 เป็นเบสปกติ Query คือ ลำดับเบสของสาย antisense ดีเอ็นเอของตัวอย่าง Ma1 ที่ได้จากการทำ direct sequencing Sbjct คือลำดับเบสของยีน USP9Y ในฐานข้อมูล NCBI ที่ตรง (match) กัน

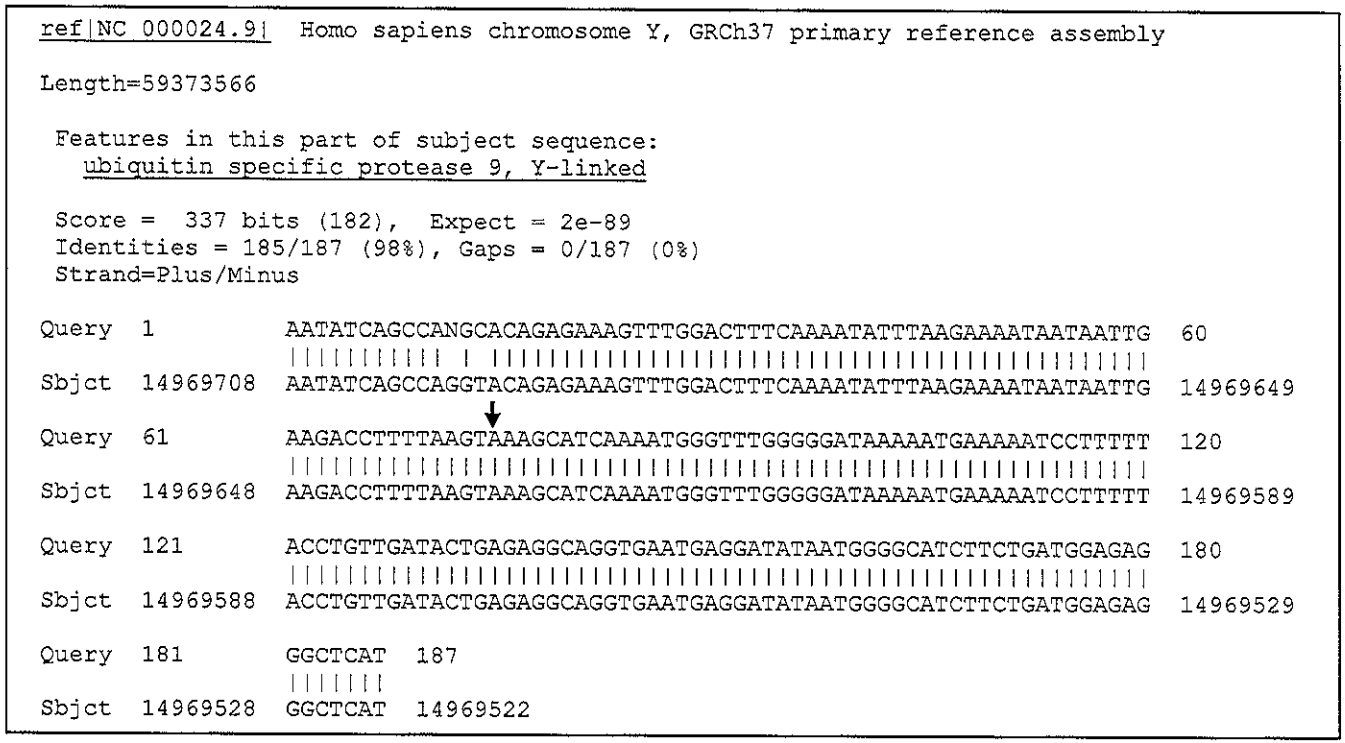


ภาพที่ 3.21 ผลการตรวจสอบความจำเพาะของลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากตัวอย่าง Ma5 (ตำแหน่ง M172) กับฐานข้อมูล NCBI ตรงกับยีน USP9Y ลูกศรชี้ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 14,969,635 เป็นเบสปกติ Query คือ ลำดับเบสของสาย antisense ดีเอ็นเอของตัวอย่าง Ma5 ที่ได้จากการทำ direct sequencing Sbjct คือลำดับเบสของยีน USP9Y ในฐานข้อมูล NCBI ที่ตรง (match) กัน



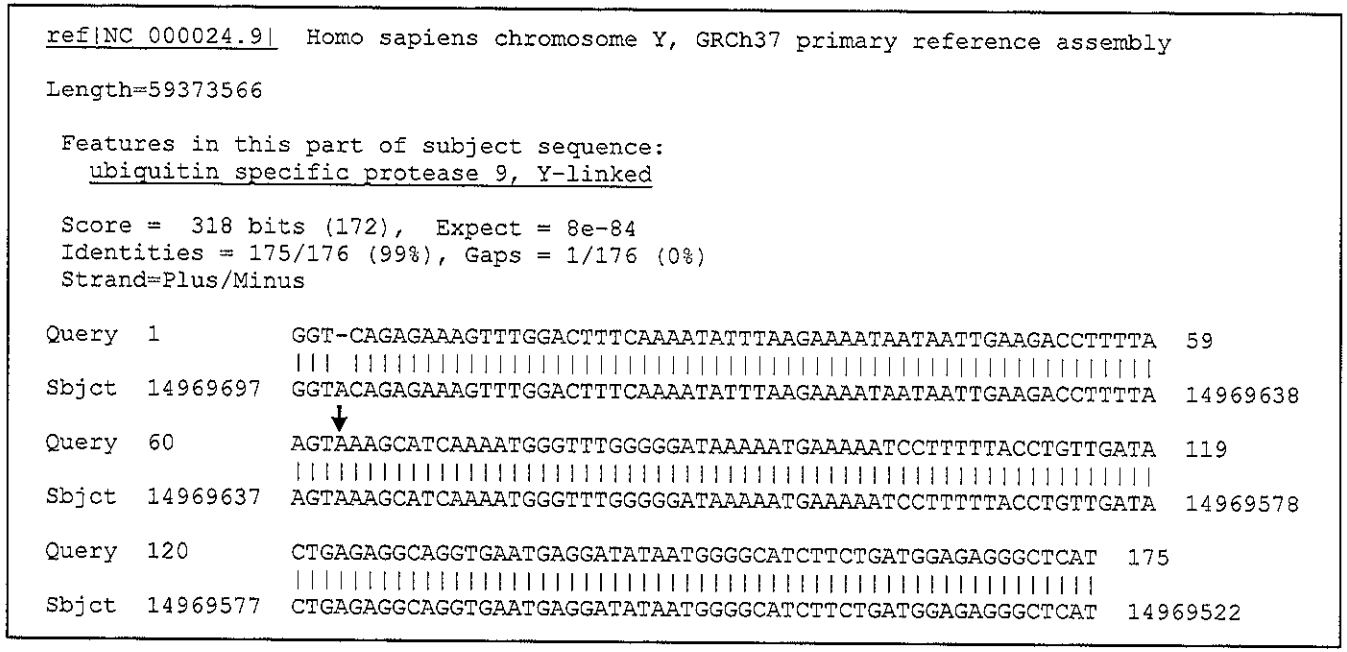
```
ref|NC_000024.9|  Homo sapiens chromosome Y, GRCh37 primary reference assembly

Length=59373566

 Features in this part of subject sequence:
   ubiquitin specific protease 9, Y-linked

 Score =  327 bits (177),  Expect = 1e-86
 Identities = 180/183 (98%), Gaps = 0/183 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query  9         TCAGCCNGGNACNGAGAAAGTTTGGACTTTCAAAATATTTAAGAAAATAATAATTGAAGA  68
                 |||||| || || ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14969704  TCAGCCAGGTACAGAGAAAGTTTGGACTTTCAAAATATTTAAGAAAATAATAATTGAAGA  14969645

Query  69        CCTTTTAAGTAAAGCATCAAAATGGGTTTGGGGGATAAAAATGAAAAATCCTTTTTACCT  128
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14969644  CCTTTTAAGTAAAGCATCAAAATGGGTTTGGGGGATAAAAATGAAAAATCCTTTTTACCT  14969585

Query  129       GTTGATACTGAGAGGCAGGTGAATGAGGATATAATGGGGCATCTTCTGATGGAGAGGGCT  188
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14969584  GTTGATACTGAGAGGCAGGTGAATGAGGATATAATGGGGCATCTTCTGATGGAGAGGGCT  14969525

Query  189       CAT  191
                 |||
Sbjct  14969524  CAT  14969522
```

ภาพที่ 3.22 ผลการตรวจสอบความจำเพาะของลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากตัวอย่าง Ch3 (ตำแหน่ง M172) กับฐานข้อมูล NCBI ตรงกับยีน USP9Y ลูกศรชี้ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 14,969,635 เป็นเบสปกติ Query คือ ลำดับเบสของสาย antisense ดีเอ็นเอของตัวอย่าง Ch3 ที่ได้จากการทำ direct sequencing Sbjct คือลำดับเบสของยีน USP9Y ในฐานข้อมูล NCBI ที่ตรง (match) กัน



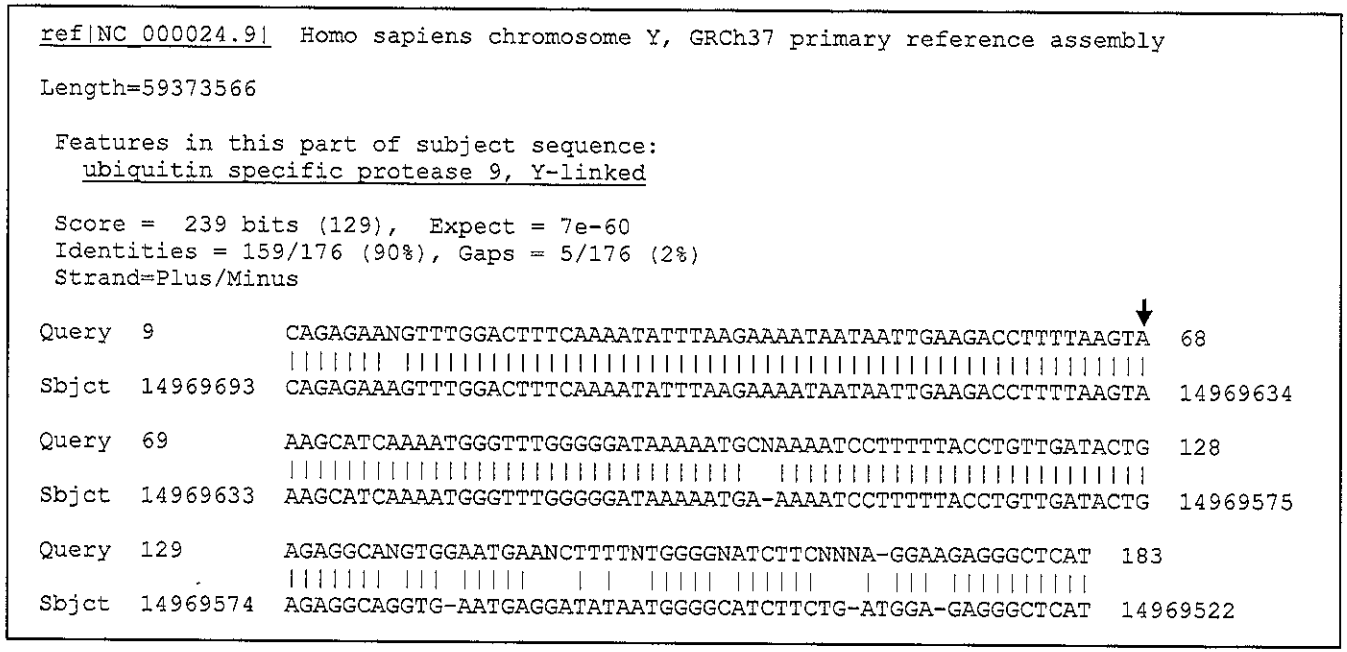
```
ref|NC_000024.9|  Homo sapiens chromosome Y, GRCh37 primary reference assembly

Length=59373566

 Features in this part of subject sequence:
   ubiquitin specific protease 9, Y-linked

 Score =  337 bits (182),  Expect = 2e-89
 Identities = 185/187 (98%), Gaps = 0/187 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query  1         AATATCAGCCANGCACAGAGAAAGTTTGGACTTTCAAAATATTTAAGAAAATAATAATTG  60
                 |||||||||||  | ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14969708  AATATCAGCCAGGTACAGAGAAAGTTTGGACTTTCAAAATATTTAAGAAAATAATAATTG  14969649

Query  61        AAGACCTTTTAAGTAAAGCATCAAAATGGGTTTGGGGGATAAAAATGAAAAATCCTTTTT  120
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14969648  AAGACCTTTTAAGTAAAGCATCAAAATGGGTTTGGGGGATAAAAATGAAAAATCCTTTTT  14969589

Query  121       ACCTGTTGATACTGAGAGGCAGGTGAATGAGGATATAATGGGGCATCTTCTGATGGAGAG  180
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14969588  ACCTGTTGATACTGAGAGGCAGGTGAATGAGGATATAATGGGGCATCTTCTGATGGAGAG  14969529

Query  181       GGCTCAT  187
                 |||||||
Sbjct  14969528  GGCTCAT  14969522
```

ภาพที่ 3.23 ผลการตรวจสอบความจำเพาะของลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากตัวอย่าง Ch5 (ตำแหน่ง M172) กับฐานข้อมูล NCBI ตรงกับยีน USP9Y ลูกศรชี้ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 14,969,635 เป็นเบสปกติ Query คือ ลำดับเบสของสาย antisense ดีเอ็นเอของตัวอย่าง Ch5 ที่ได้จากการทำ direct sequencing Sbjct คือลำดับเบสของยีน USP9Y ในฐานข้อมูล NCBI ที่ตรง (match) กัน

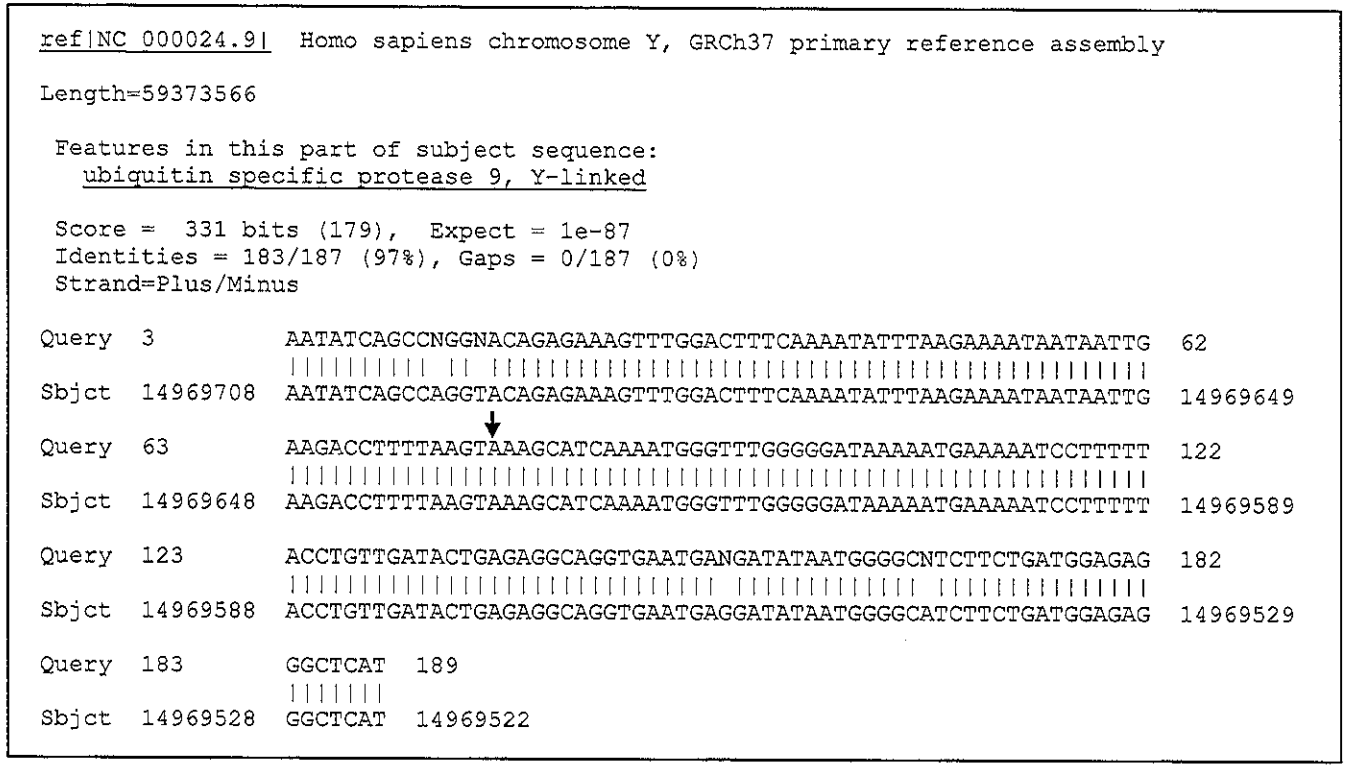


```
ref|NC_000024.9|  Homo sapiens chromosome Y, GRCh37 primary reference assembly

Length=59373566

 Features in this part of subject sequence:
   ubiquitin specific protease 9, Y-linked

 Score =  318 bits (172),  Expect = 8e-84
 Identities = 175/176 (99%), Gaps = 1/176 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query  1         GGT-CAGAGAAAGTTTGGACTTTCAAAATATTTAAGAAAATAATAATTGAAGACCTTTTA  59
                 ||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14969697  GGTACAGAGAAAGTTTGGACTTTCAAAATATTTAAGAAAATAATAATTGAAGACCTTTTA  14969638

Query  60        AGTAAAGCATCAAAATGGGTTTGGGGGATAAAAATGAAAAATCCTTTTTACCTGTTGATA  119
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14969637  AGTAAAGCATCAAAATGGGTTTGGGGGATAAAAATGAAAAATCCTTTTTACCTGTTGATA  14969578

Query  120       CTGAGAGGCAGGTGAATGAGGATATAATGGGGCATCTTCTGATGGAGAGGGCTCAT  175
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14969577  CTGAGAGGCAGGTGAATGAGGATATAATGGGGCATCTTCTGATGGAGAGGGCTCAT  14969522
```

ภาพที่ 3.24 ผลการตรวจสอบความจำเพาะของลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากตัวอย่าง Ma6 (ตำแหน่ง M172) กับฐานข้อมูล NCBI ตรงกับยีน USP9Y ลูกศรชี้ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 14,969,635 เป็นเบสปกติ Query คือ ลำดับเบสของสาย antisense ดีเอ็นเอของตัวอย่าง Ma6 ที่ได้จากการทำ direct sequencing Sbjct คือลำดับเบสของยีน USP9Y ในฐานข้อมูล NCBI ที่ตรง (match) กัน

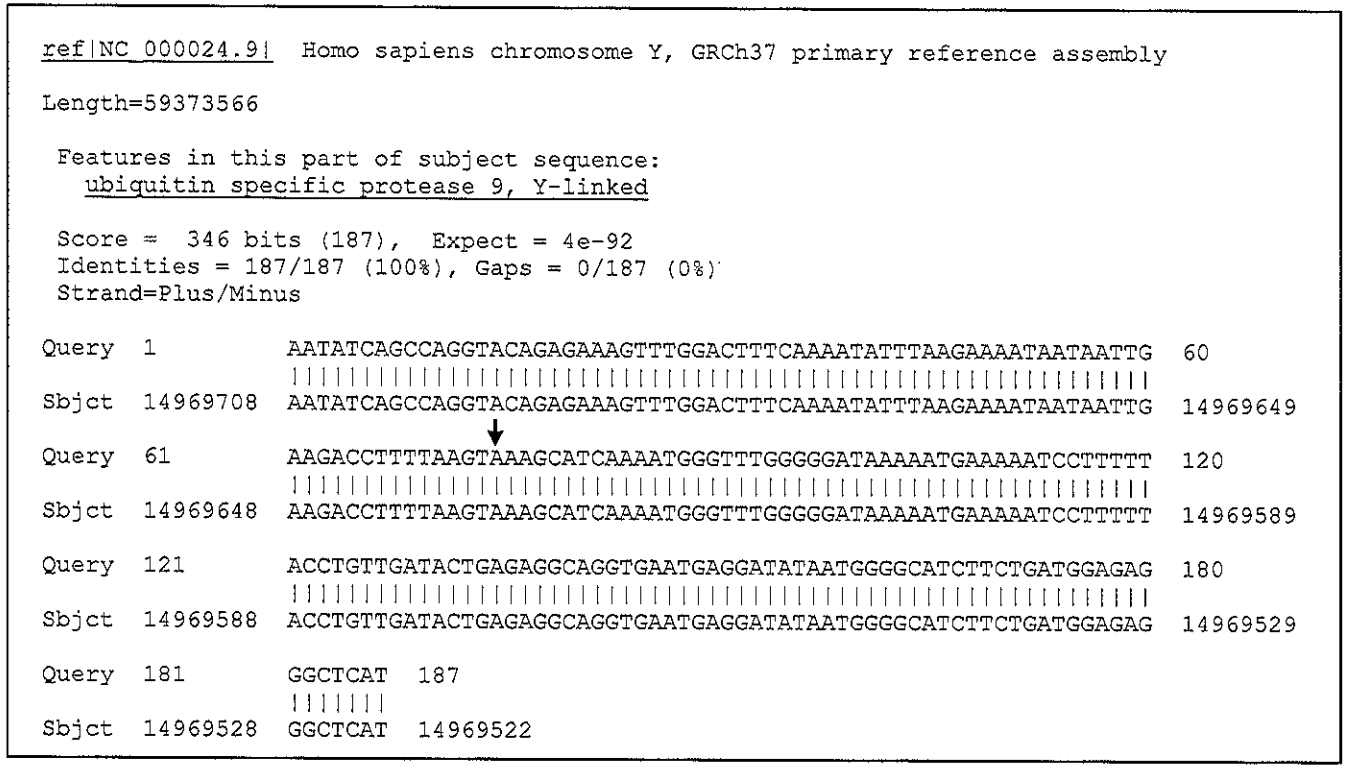


ภาพที่ 3.25 ผลการตรวจสอบความจำเพาะของลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากตัวอย่าง Ch4 (ตำแหน่ง M172) กับฐานข้อมูล NCBI ตรงกับยีน USP9Y ลูกศรชี้ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 14,969,635 เป็นเบสปกติ Query คือ ลำดับเบสของสาย antisense ดีเอ็นเอของตัวอย่าง Ch4 ที่ได้จากการทำ direct sequencing Sbjct คือลำดับเบสของยีน USP9Y ในฐานข้อมูล NCBI ที่ตรง (match) กัน



```
ref|NC_000024.9|  Homo sapiens chromosome Y, GRCh37 primary reference assembly

Length=59373566

 Features in this part of subject sequence:
   ubiquitin specific protease 9, Y-linked

 Score =  331 bits (179),  Expect = 1e-87
 Identities = 183/187 (97%), Gaps = 0/187 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query  3         AATATCAGCCNGGNACAGAGAAAGTTTGGACTTTCAAAATATTTAAGAAAATAATAATTG  62
                 |||||||||| || ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14969708  AATATCAGCCAGGTACAGAGAAAGTTTGGACTTTCAAAATATTTAAGAAAATAATAATTG  14969649

Query  63        AAGACCTTTTAAGTAAAGCATCAAAATGGGTTTGGGGGATAAAAATGAAAAATCCTTTTT  122
                 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14969648  AAGACCTTTTAAGTAAAGCATCAAAATGGGTTTGGGGGATAAAAATGAAAAATCCTTTTT  14969589

Query  123       ACCTGTTGATACTGAGAGGCAGGTGAATGANGATATAATGGGGCNTCTTCTGATGGAGAG  182
                 |||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||| |||||||||||||||
Sbjct  14969588  ACCTGTTGATACTGAGAGGCAGGTGAATGAGGATATAATGGGGCATCTTCTGATGGAGAG  14969529

Query  183       GGCTCAT  189
                 |||||||
Sbjct  14969528  GGCTCAT  14969522
```

ภาพที่ 3.26 ผลการตรวจสอบความจำเพาะของลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากตัวอย่าง Ch6 (ตำแหน่ง M172) กับฐานข้อมูล NCBI ตรงกับยีน USP9Y ลูกศรชี้ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 14,969,635 เป็นเบสปกติ Query คือ ลำดับเบสของสาย antisense ดีเอ็นเอของตัวอย่าง Ch6 ที่ได้จากการทำ direct sequencing Sbjct คือลำดับเบสของยีน USP9Y ในฐานข้อมูล NCBI ที่ตรง (match) กัน



ภาพที่ 3.27 ผลการตรวจสอบความจำเพาะของลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากตัวอย่าง Ch9 (ตำแหน่ง M172) กับฐานข้อมูล NCBI ตรงกับยีน USP9Y ลูกศรชี้ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 14,969,635 เป็นเบสปกติ Query คือ ลำดับเบสของสาย antisense ดีเอ็นเอของตัวอย่าง Ch6 ที่ได้จากการทำ direct sequencing Sbjct คือลำดับเบสของยีน USP9Y ในฐานข้อมูล NCBI ที่ตรง (match) กัน

ตารางที่ 3.8 สรุปผลการศึกษาสนิปในตำแหน่ง M172 ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis, SSCP และ direct sequencing

ตัวอย่าง	Methodology						
	AGE	SSCP			Direct sequencing		
		Mw (kDa)			จำนวนครั้งของการทดลอง	%match กับยีน USP9Y	ลำดับเบสบริเวณสนิป (5'→3')
		dsDNA	antise-nse	sense			
ปกติ (Ma1, Ma5, Ma6, Ch3, Ch4, Ch5, Ch9)	พบแถบผลผลิต PCR ขนาด 225 คู่เบส	86	66	59	3	90-100	CTACGAAAT

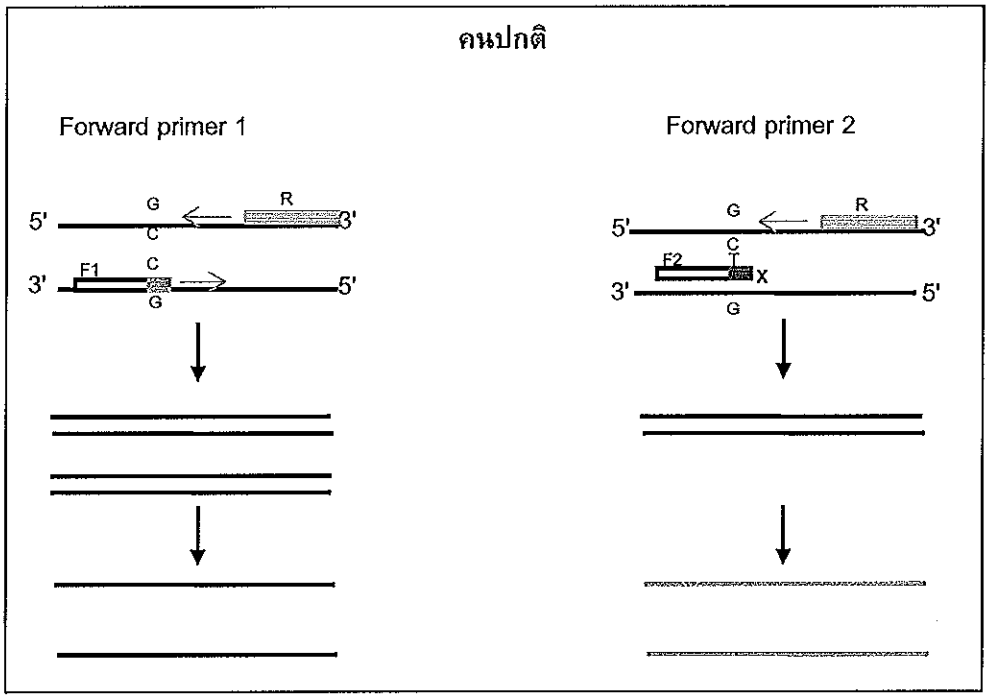
หมายเหตุ AGE = agarose gel electrophoresis SSCP = single strand conformation polymorphism
dsDNA = double-stranded DNA Ma = อาสาสมัครชาติพันธุ์มาเลย์ Ch = อาสาสมัครชาติพันธุ์จีน
Mw = น้ำหนักโมเลกุล

บทที่ 4
อภิปรายและสรุปผลการศึกษา

เนื่องจากผู้ต้องสงสัยหรือผู้กระทำผิดที่ถูกจับกุมในคดีก่อความไม่สงบในเขต 3 จังหวัดชายแดนภาคใต้เป็นชาติพันธุ์มาเลย์แทบทั้งสิ้น และส่วนใหญ่เป็นกลุ่มผู้ชายที่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือดหรือเป็นเครือญาติกัน ดังนั้นการสามารถจำแนกทางพันธุกรรมของบุคคลต่างชาติพันธุ์จากวัตถุพยานจากที่เกิดเหตุจึงมีประโยชน์ต่อการคลี่คลายคดี ในกรณีที่ไม่สามารถตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอของวัตถุพยานด้วยวิธี conventional STR ตามปกติได้ การศึกษาหาความแตกต่างของสนิปส์บนโครโมโซมวายจึงมีประโยชน์ในกรณีเช่นนี้ เนื่องจาก สนิปส์สามารถใช้ในการแยกแยะกลุ่มคนที่มีเชื้อชาติและชาติพันธุ์ที่ต่างกันได้ วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้จึงทำเพื่อศึกษาความจำเพาะของ Y-SNPs ในตำแหน่ง M95 และ M172 ต่อผู้ชายไทยชาติพันธุ์มาเลย์และจีน ประชากรที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นกลุ่มประชากรที่ผ่านการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นผมมาแล้ว และพบลักษณะจำเพาะของเส้นผมที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มชาติพันธุ์ทั้งสอง (ทวีภรณ์ 2553) การวิเคราะห์สนิปส์ทำโดยสกัดดีเอ็นเอจากรากผมของอาสาสมัครเพศชายชาติพันธุ์มาเลย์และจีน จำนวนชาติพันธุ์ละ 10 คน ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา PCR และศึกษาสนิปด้วยวิธี agarose gel electrophoresis และ SSCP ร่วมกับ direct sequencing

4.1 สนิปตำแหน่ง M95 (Haplogroup O2a)

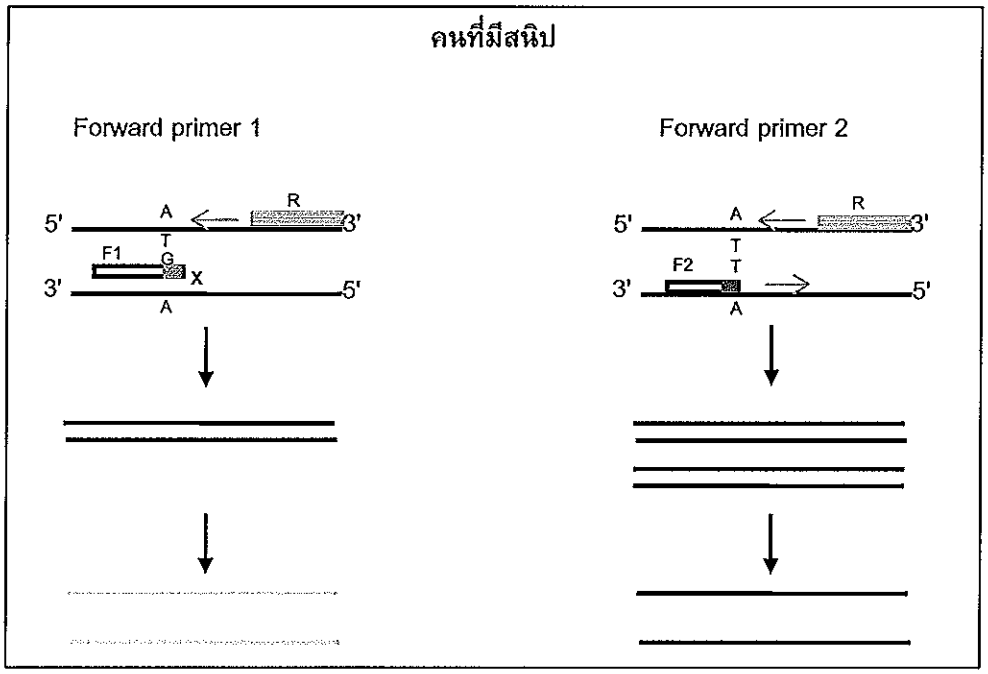
ในการศึกษาสนิปตำแหน่ง M95 ได้ใช้ forward primer จำนวน 2 ชนิด คือ forward primer 1 มีเบสตำแหน่งสุดท้ายของปลาย 3' เป็นเบสที่พบในคนปกติ (เบส C) และ forward primer 2 มีเบสตำแหน่งสุดท้ายของปลาย 3' เป็นเบสที่พบในคนที่มีการเกิดสนิป (เบส T) ส่วน reverse primer จะมีลำดับเบสที่สามารถจับกับดีเอ็นเอปกติได้ ในดีเอ็นเอคนปกติ หากทำปฏิกิริยา PCR ด้วย primers ชุดนี้แล้วผลที่ได้ก็คือ primers ทั้ง 2 จะให้ปริมาณผลผลิต PCR ที่ไม่เท่ากัน เนื่องจาก forward primer 1 จะสามารถจับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสปกติได้ ทำให้ปฏิกิริยา PCR เกิดได้อย่างสมบูรณ์ และได้ผลผลิต PCR จำนวนมาก ส่วน forward primer 2 จะไม่สามารถจับกับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสปกติได้ ทำให้ปฏิกิริยา PCR เกิดได้เพียงจาก reverse primer เท่านั้น จึงทำให้ได้ผลผลิต PCR จำนวนน้อยกว่ามาก (ภาพที่ 4.1)



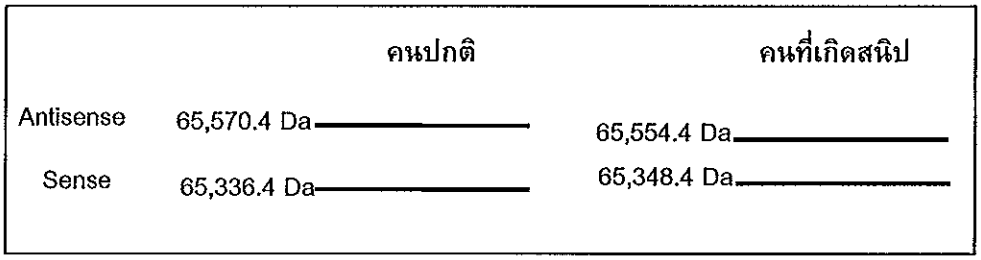
ภาพที่ 4.1 ทฤษฎีปฏิกิริยา PCR ในตำแหน่ง M95 ที่เกิดขึ้นในคนปกติ โดยการใช้ forward primer 1 จะให้ผลผลิต PCR ปริมาณมาก ส่วนการใช้ forward primer 2 จะให้ผลผลิต PCR ปริมาณน้อยกว่า

ในทางตรงกันข้าม ในดีเอ็นเอของคนที่มีสนิป หากทำปฏิกิริยา PCR ด้วย primers ชุดนี้แล้ว ผลที่ได้ก็คือ primers ทั้ง 2 จะให้ปริมาณผลผลิต PCR ที่ไม่เท่ากันเช่นกัน เนื่องจาก forward primer 2 จะสามารถจับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสสนิปได้ ทำให้ปฏิกิริยา PCR เกิดได้อย่างสมบูรณ์ และได้ผลผลิต PCR จำนวนมาก ส่วน forward primer 1 จะไม่สามารถจับกับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสสนิปได้ ทำให้ปฏิกิริยา PCR เกิดได้เพียงจาก reverse primer เท่านั้น และทำให้ได้ผลผลิต PCR จำนวนน้อยกว่ามาก (ภาพที่ 4.2)

เนื่องจากน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นดีเอ็นเอตำแหน่ง M95 ในคนปกติ ดีเอ็นเอสาย sense จะเท่ากับ 65,336.4 Da และสาย antisense จะเท่ากับ 65,570.4 Da ส่วนในคนที่เกิดสนิปลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงไปจะส่งผลให้น้ำหนักโมเลกุลของสาย sense และ antisense เปลี่ยนแปลงไปด้วย โดยในคนที่เกิดสนิป ดีเอ็นเอสาย sense มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 65,348.4 Da สาย antisense มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 65,554.4 Da หากนำมาแยกด้วยวิธี SSCP ในคนปกติช่วงห่างของแถบผลผลิต PCR สาย sense และ antisense ควรจะกว้างกว่าของคนที่เกิดสนิป (ภาพที่ 4.3)



ภาพที่ 4.2 ทฤษฎีปฏิกิริยา PCR ในตำแหน่ง M95 ที่เกิดขึ้นในคนที่มีสนิป โดยการใช้ forward primer 2 จะให้ผลผลิต PCR จำนวนมาก ส่วนการใช้ forward primer 1 จะให้ผลผลิต PCR จำนวนน้อยกว่า



ภาพที่ 4.3 ตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอ ตำแหน่ง M95 ที่คาดว่าจะปรากฏบน polyacrylamide gel ด้วยวิธี SSCP ความกว้างระหว่างแถบดีเอ็นเอสาย sense และ antisense ที่เกิดในคนปกติจะกว้างกว่าของคนที่มีสนิป เนื่องจากในคนปกติมีความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลอยู่เท่ากับ 234 Da ส่วนในคนที่มีสนิปมีความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลอยู่เท่ากับ 206 Da

ซึ่งผลการศึกษาสนิปในงานวิจัยนี้สอดคล้องกับทฤษฎีดังกล่าวข้างต้น โดยแถบผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 212 คู่เบส จากการใช้ forward primer 1 ในตัวอย่างที่คาดว่าเป็นคนปกติติดสีเข้มชัดเจน ส่วนแถบผลผลิต PCR จากการใช้ forward primer 2 ปรากฏเพียง

จางๆ ทั้งด้วยวิธี AGE และ SSCP (แบบไม่ต้ม) โดยสามารถแยกกลุ่มคนที่คาดว่าเป็นคนปกติได้ 18 คน และ คนที่คาดว่ามีสนิปได้ 2 คน และเมื่อนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยวิธี direct sequencing จาก reverse primer ได้ดีเอ็นเอสายใหม่ที่สังเคราะห์ขึ้นมีลำดับเบสเหมือนของสาย antisense ซึ่งพบว่าในคนที่คาดว่าปกติทุกตัวอย่างที่ตรวจสอบ ในตำแหน่งของสนิปมีเบสเป็น Guanine ส่วนในคนที่คาดว่าเกิดสนิป เบสในตำแหน่งของสนิปมีการเปลี่ยนแปลงจาก Guanine ไปเป็น Adenine นั่นคือสาย sense เบสมีการเปลี่ยนจาก Cytosine เป็น Thymine ซึ่งสอดคล้องตามที่ได้รายงานไว้ก่อนหน้านี้ (Su *et al.*, 1999; Butler, 2003; Vallone and Butler, 2004b)

นอกจากนี้ผลการศึกษาสนิปด้วยวิธี SSCP (แบบต้ม) ยังพบว่า แถบดีเอ็นเอสาย antisense มีขนาด 72 kDa และแถบดีเอ็นเอสาย sense มีขนาด 62 kDa ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลตามทฤษฎี สาย antisense มีน้ำหนักโมเลกุลคลาดเคลื่อนไปประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ และสาย sense มีน้ำหนักโมเลกุลคลาดเคลื่อนไปประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสาเหตุน่าจะเกิดจากข้อจำกัดทางด้านเทคนิคของ gel electrophoresis กับ DNA ladder โดยเมื่อเปรียบเทียบระยะห่างของแถบ DNA ladder ที่น้ำหนักโมเลกุล 33 66 และ 99 kDa พบว่าระยะห่างของแถบ DNA ladder ที่น้ำหนักโมเลกุล 66 และ 99 kDa แคบกว่าระยะห่างของแถบ DNA ladder ที่น้ำหนักโมเลกุล 33 และ 66 kDa แสดงว่าความละเอียดในการแยกความแตกต่างของมวลโมเลกุลที่อยู่ระหว่าง 33 และ 66 kDa มีมากกว่ามวลโมเลกุลที่อยู่ระหว่าง 66 และ 99 kDa จึงทำให้สังเกตเห็นความแตกต่างของแถบผลผลิต PCR ที่อยู่ระหว่าง 66 และ 99 kDa ได้ยาก และส่งผลให้น้ำหนักโมเลกุลของสาย antisense คลาดเคลื่อนจากน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐานมากกว่าสาย sense

และการที่แถบผลผลิต PCR ที่เกิดจากการใช้ forward primer 2 อยู่ในตำแหน่งที่สูงกว่าแถบผลผลิต PCR ที่เกิดจากการใช้ forward primer 1 ทุกตัวอย่างทั้งในคนปกติและคนที่เป็นสนิปนั้น สามารถอธิบายได้ว่าขณะเกิดปฏิกิริยา PCR reverse primer จะสามารถจับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้ไม่ว่าดีเอ็นเอนั้นจะมาจากคนปกติหรือคนที่มีสนิปก็ตาม ทำให้การเติมเบสที่ปลาย 3' ของ reverse primer จะเกิดไปเรื่อยๆ จนกระทั่งถูกหยุดปฏิกิริยา elongation ในขณะที่ forward primer 1 หรือ 2 จะสามารถจับกับดีเอ็นเอของคนปกติ หรือคนที่มีสนิปเท่านั้น ในกรณีที่ forward primer สามารถจับกับสายดีเอ็นเอต้นแบบได้ จะทำให้ผลผลิต PCR ถูกจำกัดความยาวจากทั้ง forward และ reverse primers ได้เป็นผลผลิตขนาด 212 คู่เบส แต่ในกรณีที่ reverse primer จะสามารถจับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้เพียงสายเดียว จะทำให้ขนาดของผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นมีขนาดใหญ่กว่า 212 คู่เบส ทำให้เมื่อแยกด้วยวิธี SSCP แถบผลผลิต PCR ของ forward primer 2 อยู่ในตำแหน่งที่สูงกว่าแถบผลผลิต PCR ของ forward primer 1

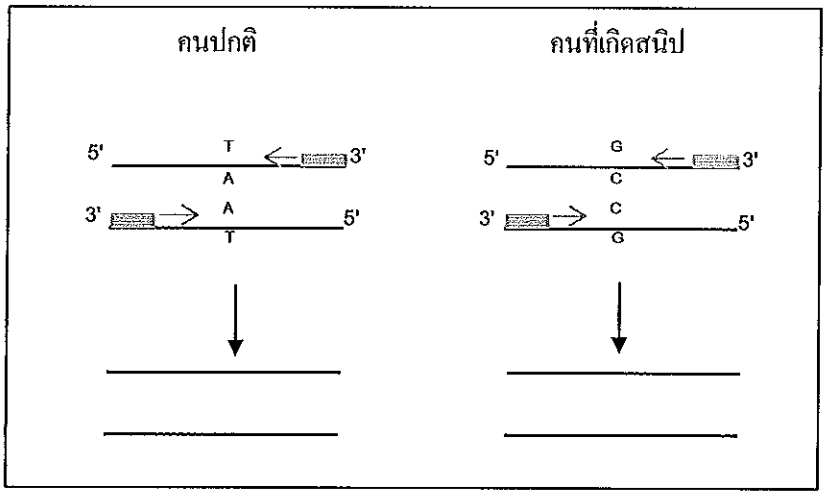
ตารางที่ 4.1 ความถี่ของสนิปตำแหน่ง M95 ในการศึกษาครั้งนี้ และในการศึกษาอื่นๆ

เปอร์เซ็นต์ความถี่ที่พบในกลุ่มชาติพันธุ์ต่างๆ								
การศึกษาครั้งนี้		การศึกษาอื่นๆ						
ไทย-มาเลย์	ไทย-จีน	ไทย	มาเลเซีย	อินเดีย	เอเชียตะวันออกเฉียงใต้	จีน	กัมพูชา	อื่นๆ
20%	0%	- 45% (Su *et al.*, 1999; Yuehai *et al.*, 2001)	- 34.37% (Karafet *et al.*, 2005) - 7.7% (Su *et al.*, 1999) - 23.1% (Yuehai *et al.*, 2001)	- 22.4% (Karafet *et al.*, 2005) - 1.16% (Shi *et al.*, 2005) -78.57% (Thangaraj *et al.*, 2002) - 77% (Sahoo *et al.*, 2006)	- 13.1% (Karafet *et al.*, 2005) - 6.3% (Hammer *et al.*,2006)	- 11.7% (Karafet *et al.*, 2005) - 3.6% (Su *et al.*, 1999)	- 23.1% (Su *et al.*, 1999) - 23.1% (Yuehai *et al.*, 2001)	- Batak (เกาะสุมาตรา อินโดนีเซีย) = 27.8% (Su *et al.*, 1999) - เอเชียใต้ = 7.9% (Hammer *et al.*, 2006) - ชาวเอเชียที่อาศัยอยู่ในสหรัฐอเมริกา (Asian-Americans) = 6.5% (Hammer *et al.*,2006) - ชนเผ่า Naxi (อาศัยอยู่ทางตะวันตกเฉียงเหนือของยูนนานในประเทศจีน) = 47.5% (Bo *et al.*, 2004) - ชนเผ่า Bai (อาศัยอยู่ทางตะวันตกเฉียงเหนือ ของยูนนานในประเทศจีน) = 12.0% (Bo *et al.*, 2004)

สนิปตำแหน่ง M95 พบได้มากในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อินเดีย และจีน ซึ่งความถี่ที่พบในประชากรดังกล่าวแสดงไว้ดังตารางที่ 4.1 และพบในประชากรไทยได้ถึง 45% (Su *et al.*,1999; Yuehai *et al.*, 2001) แต่ยังไม่เคยมีรายงานความถี่ที่พบในชาติพันธุ์ไทยกลุ่มต่างๆ มาก่อน ผลของงานวิจัยนี้พบว่าสนิปตำแหน่ง M95 พบในประชากรไทยชาติพันธุ์มาเลย์ในความถี่เท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์ (n=10) แต่ไม่พบในประชากรไทยชาติพันธุ์จีนเลย สอดคล้องกับการศึกษาสนิปก่อนหน้านี้ที่พบสนิปตำแหน่ง M95 ในประชากรชาวมาเลเซียในความถี่ 7 - 34 % (Su *et al.*, 1999; Yuehai *et al.*, 2001; Karafet *et al.*, 2005) และพบในประชากรชาวจีนในความถี่ 3 - 11 % (Su *et al.*, 1999; Karafet *et al.*, 2005) ซึ่งบ่งบอกว่าสนิปตำแหน่ง M95 มีความสัมพันธ์กับชาวไทยชาติพันธุ์มาเลย์มากกว่าชาวไทยชาติพันธุ์จีน

4.2 สนิปตำแหน่ง M172 (Haplogroup J2)

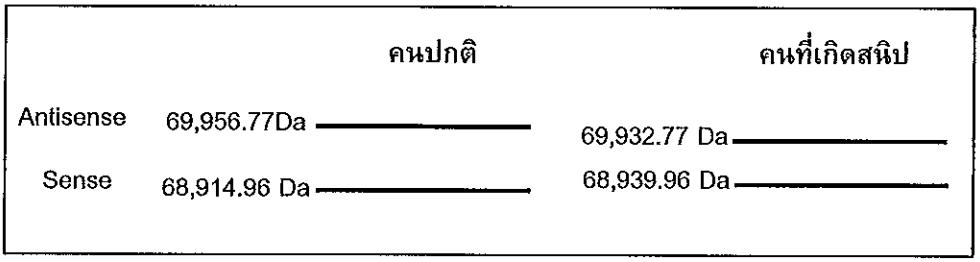
จากการออกแบบ primer ด้วยโปรแกรม Primer 3 ทำให้ตำแหน่งสนิปอยู่บริเวณกลางสายของผลผลิต PCR ซึ่งในกรณีนี้ forward primer และ reverse primer จะสามารถจับกับดีเอ็นเอในคนปกติและคนที่เกิดสนิปได้เหมือนกัน ดังนั้นจึงทำให้ได้ผลผลิต PCR ที่ได้มีขนาดเท่ากัน (ภาพที่ 4.4)



ภาพที่ 4.4 ทฤษฎีปฏิกิริยา PCR ในตำแหน่ง M172 ที่เกิดขึ้นในคนปกติและคนที่มีสนิป จะได้ผลผลิต PCR ปริมาณเท่ากัน

เนื่องจากน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นดีเอ็นเอตำแหน่ง M172 ในคนปกติมีดีเอ็นเอสาย sense เท่ากับ 68,914.96 Da และสาย antisense เท่ากับ 69,956.77 Da ส่วนในคนที่เกิดสนิปลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงไปจะส่งผลให้น้ำหนักโมเลกุลของสาย sense และ antisense

เปลี่ยนแปลงไปคือ ดีเอ็นเอสาย sense จะมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 68,939.96 Da และสาย antisense จะมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 69,932.77 Da ซึ่งหากนำมาแยกด้วยเทคนิค SSCP ในคนปกติช่วงห่างของแถบผลผลิต PCR สาย sense และ antisense ควรจะกว้างกว่าของคนที่เกิดสนิป (ภาพที่ 4.5)



ภาพที่ 4.5 ตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอ ตำแหน่ง M172 ที่คาดว่าจะปรากฏบน polyacrylamide gel ด้วยวิธี SSCP ความกว้างระหว่างแถบดีเอ็นเอสาย sense และ antisense ที่เกิดในคนปกติจะกว้างกว่าของคนที่มีสนิป เนื่องจากในคนปกติมีความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลอยู่เท่ากับ 1,014.81 Da ส่วนในคนที่มีสนิปมีความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลอยู่เท่ากับ 992.81 Da

ซึ่งจากผลการศึกษาสนิปตำแหน่งนี้พบว่า สอดคล้องกับทฤษฎีดังกล่าวข้างต้น โดยการแยกด้วยวิธี AGE แถบผลผลิต PCR ของทุกตัวอย่างมีขนาดประมาณ 225 คู่เบส คล้ายกัน ทำให้ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างคนปกติและคนที่มีสนิปได้ เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี SSCP (แบบตัม) พบตัวอย่างที่คาดว่ามีสนิปได้ 4 ตัวอย่าง เนื่องจากพบแถบผลผลิต PCR ของทั้ง 4 ตัวอย่างดังกล่าวอยู่ในตำแหน่งที่สูงกว่าแถบผลผลิต PCR ในตัวอย่างอื่นๆ เล็กน้อย แต่เมื่อนำดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี direct sequencing พบว่าทั้งในคนที่คาดว่าปกติและคนที่คาดว่ามีสนิป ในตำแหน่งของสนิปมีเบสเป็น Adenine ซึ่งเป็นเบสที่พบในคนปกติ แสดงว่าในตำแหน่งนี้ไม่พบคนที่มีสนิปเลย

นอกจากนี้ผลการศึกษาสนิปด้วยวิธี SSCP (แบบตัม) ยังพบว่า แถบดีเอ็นเอสาย antisense มีขนาด 66 kDa และแถบดีเอ็นเอสาย sense มีขนาด 59 kDa ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลตามทฤษฎี สาย antisense มีน้ำหนักโมเลกุลคลาดเคลื่อนไปประมาณ 14 เปอร์เซ็นต์ และสาย sense มีน้ำหนักโมเลกุลคลาดเคลื่อนไปประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสาเหตุน่าจะเกิดจากข้อจำกัดทางด้านเทคนิคของ gel electrophoresis กับ DNA ladder ด้วยเหตุผลเดียวกับที่ได้อภิปรายไว้ในสนิปตำแหน่ง M95

ถึงแม้ว่าสนิปตำแหน่ง M172 พบได้มากในชาวยุโรปในความถี่ 4.65 – 19% (Volgyi *et al.*, 2008; Brion *et al.*, 2004; Nascimento *et al.*, 2009; Sao-Bento *al.*, 2009; Ferri *et*

al., 2006; Onofri *et al.*, 2008) และชาวอเมริกาในความถี่ 1.5% (Hammer *et al.*, 2006) แต่ก็พบได้ในชาวมาเลเซียชาติพันธุ์อินเดีย (3.17%) และชาวมาเลเซียชาติพันธุ์มาเลย์ (0.59%) ด้วยเช่นกัน (Chang *et al.*, 2007) ดังแสดงไว้ดังตารางที่ 4.2 โดยเมื่อ 7,500 ปีที่ผ่านมา สนิปตำแหน่ง M172 พบอยู่บริเวณเอเชียกลาง ประเทศอินเดีย และประเทศในแถบเมดิเตอร์เรเนียน (Nebel *et al.*, 2001) และคาดว่าประชากรไทยชาติพันธุ์มาเลย์อาจได้รับการสืบทอดสนิปในตำแหน่ง M172 มาจากบรรพบุรุษที่อพยพมาจากประเทศอินเดีย แต่ยังไม่มีรายงานการพบสนิปตำแหน่ง M172 ในชาติพันธุ์ไทยกลุ่มใดมาก่อน ด้วยเหตุนี้จึงศึกษาสนิปตำแหน่ง M172 ในประชากรไทยชาติพันธุ์มาเลย์และจีน แม้ว่าผลของงานวิจัยในครั้งนี้จะยังไม่พบสนิปตำแหน่ง M172 ทั้งในประชากรไทยชาติพันธุ์มาเลย์และจีนเลยก็ตาม ทั้งนี้ก็ไม่ได้เกินความคาดหมาย เพราะจากผลการศึกษาของ Chang *et al.*(2007) ก็พบสนิปในตำแหน่ง M172 ในประชากรมาเลเซียชาติพันธุ์มาเลย์ในความถี่เพียง 0.59% ประกอบกับการศึกษานี้ทำในกลุ่มประชากรขนาดเล็กเท่านั้น จึงทำให้ยังไม่สามารถระบุความสัมพันธ์ของสนิปตำแหน่ง M172 กับชายไทยชาติพันธุ์มาเลย์หรือจีนได้

แม้ว่าในการศึกษาครั้งนี้จะทำการศึกษาด้วยเทคนิค AGE และ SSCP ซึ่งเป็นเทคนิค conventional ที่มีวิธีปฏิบัติไม่ซับซ้อนและมีต้นทุนไม่สูงมากนัก (Guilliatt, 2002) แต่ก็สามารถพบการเกิดสนิปได้ อย่างไรก็ตามเทคนิค AGE มีข้อเสียคือ ไม่สามารถแยกชิ้นดีเอ็นเอที่มีการเปลี่ยนแปลงเบสเพียง 1 ตำแหน่งได้ เนื่องจากโครงสร้างของ agarose gel มีช่องว่าง (pore size) ขนาดค่อนข้างใหญ่ ส่วนเทคนิค SSCP เป็นเทคนิคที่มีความไวในการวิเคราะห์สนิปมากกว่า AGE เพราะสามารถวิเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างแม้เพียง 1 เบสได้ (สุรางค์ และเผด็จ, 2546; Fujita and Silver, 1994) แต่ก็มีความยุ่งยากในขั้นตอนปฏิบัติ เช่น แผ่นเจลจะต้องไม่หนาจนเกินไป และความเข้มข้นของผลผลิต PCR ต้องไม่สูงจนเกินไป และผลการวิเคราะห์มีความคลาดเคลื่อนได้มาก (Kalvatchev and Draganov, 2005) วิธีที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์สนิปส์ในปัจจุบันมีหลายเทคนิค อาทิเช่น LightCycler (Lareu *et al.*, 2001) microarray (Ellonen *et al.*, 2004; Divne and Allen., 2005) MALDI-TOF MS (Lessig *et al.*, 2005; Hou *et al.*, 2006) SNaPshot (Inagaki *et al.*, 2002; Shanchez *et al.*, 2003; Quintans *et al.*, 2004; Schell *et al.*, 2006) ASPE และ ASH (Vallone and Butler., 2004a) ซึ่งเทคนิคเหล่านี้แม้ว่าจะสามารถวิเคราะห์สนิปส์ได้แม่นยำกว่า แต่มีค่าใช้จ่ายสูงหากต้องวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมาก จึงขอเสนอว่า การใช้เทคนิค AGE และ/หรือ SSCP ในการตรวจสอบสนิปส์ก่อนในเบื้องต้น เพื่อคัดกรองเอาตัวอย่างที่ไม่พบสนิปส์ออกไป ร่วมกับการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เหลือด้วยวิธีการ sequencing อื่นๆ ก็จะเป็นประโยชน์ในการลดต้นทุนการศึกษาสนิปส์ในกลุ่มประชากรขนาดใหญ่ลงได้มาก

ตารางที่ 4.2 ความถี่ของสนิปตำแหน่ง M172 ในการศึกษาครั้งนี้ และในการศึกษาอื่นๆ

เปอร์เซ็นต์ความถี่ที่พบในกลุ่มชาติพันธุ์ต่างๆ								
การศึกษาครั้งนี้		การศึกษาอื่นๆ						
ไทย-มาเลย์	ไทย-จีน	มาเลเซีย ชาติพันธุ์ อินเดีย	มาเลเซีย ชาติพันธุ์ มาเลย์	สเปน	อิตาลี	ฮังการี	บราซิล	อื่นๆ
0%	0%	- 3.17% (Chang *et al.*, 2007)	- 0.59% (Chang *et al.*, 2007)	- 11.33% (Brion *et al.*, 2004)	- 19% (Onofri *et al.*, 2008)	- 4.65% (Volgyi *et al.*, 2008)	- 7% (Nascimento *et al.*, 2009) - 12.35% (Sao-Bento *et al.*, 2009)	- Rimini (ชนที่อาศัยอยู่ทางตอนเหนือของประเทศอิตาลี) = 17.35% (Ferri *et al.*, 2006) - Valmarecchia (ชนที่อาศัยอยู่ทางตอนเหนือของประเทศอิตาลี) = 15.38% (Ferri *et al.*, 2006) - ชาวสหรัฐอเมริกา = 1.51% (Hammer *et al.*, 2006) - ชาวสเปนที่อาศัยอยู่ในสหรัฐอเมริกา = 4.2% (Hammer *et al.*, 2006)

สรุปผลการศึกษา

การศึกษา Y-SNPs (n = 20) ด้วยวิธี AGE และ SSCP ร่วมกับ direct sequencing พบว่า สนิปตำแหน่ง M95 มี haplotype M95C → T น่าจะมีความจำเพาะกับกลุ่มชาติพันธุ์มาเลย์มากกว่ากลุ่มชาติพันธุ์จีน โดยพบความถี่ 20% (n = 10) ในผู้ชายไทยชาติพันธุ์มาเลย์แต่ไม่พบในผู้ชายไทยชาติพันธุ์จีนเลย ส่วนสนิปในตำแหน่ง M172 ยังไม่สามารถระบุได้ว่ามีความจำเพาะกับกลุ่มชาติพันธุ์ใดมากกว่ากันระหว่างกลุ่มชาติพันธุ์มาเลย์และกลุ่มชาติพันธุ์จีน เนื่องจากยังตรวจไม่พบสนิปตำแหน่ง M172 ในประชากรกลุ่มนี้

การศึกษาครั้งนี้จะเป็นประโยชน์อย่างมากในการศึกษา Y-SNPs ในตำแหน่ง M95 และ M172 ในกลุ่มประชากรที่มีขนาดใหญ่ขึ้น เพื่อนำไปสู่การสร้าง Y-SNP markers ที่มีความจำเพาะต่อการจำแนกชาติพันธุ์ที่ต้องการ เช่น ชาติพันธุ์มาเลย์ เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการคลี่คลายคดีความไม่สงบที่เกิดขึ้นในเขตชายแดนภาคใต้ ในกรณีที่การตรวจ STR ตามปกติไม่สามารถทำได้ และเป็นการสร้างมาตรฐานการศึกษาด้านพันธุศาสตร์ประชากรให้กับนิติวิทยาศาสตร์ของประเทศไทย

รายการเอกสารอ้างอิง

จรัญ มะลูลีม. 2546. ปัญหาความไม่สงบในจังหวัดชายแดนภาคใต้: ข้อเสนอแนะในการแก้ไขปัญหา [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก: http://www.pattanitoday.com/modules.php?name=News&file=article&sid=139. (วันที่สืบค้น 25 เมษายน 2551).

ทวีภรณ์ คีรีคช. 2553. การเปรียบเทียบลักษณะจำเพาะของเส้นผมระหว่างผู้ชายไทย ชาติพันธุ์มาเลย์และผู้ชายไทยชาติพันธุ์จีน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา.

วรพรรณ สิทธิถาวร. 2549. เทคโนโลยีไมโครแอเรย์ของดีเอ็นเอ.ไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ. 1(2): 139-145.

สุทธิดา เมธากิจวรุณ. 2546. ความแตกต่างทางพันธุกรรมและการตรวจหา ใน: จดหมายข่าวศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพด้านการแพทย์และสาธารณสุข. ฉบับที่ 6. หน้า 5-6.

สุราง นุชประยูร และ เผด็จ สิริยะเสถียร. 2546. เทคนิคทางอณูชีววิทยา (Basic Molecular Biology Techniques) ใน: เวชศาสตร์โมเลกุล. สุรางค์ นุชประยูร, จินตนา จิรถาวร และณัฏฐิยา หิรัญกาญจน์, บรรณาธิการ. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์เท็กซ์แอนด์เจอร์นัลพับลิเคชั่น: กรุงเทพฯ. หน้า 47.

อมรา คัมภิรานนท์. 2542. เทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุลและการประยุกต์ใช้ด้านเวชพันธุศาสตร์ ใน: พันธุศาสตร์มนุษย์. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์เท็กซ์แอนด์เจอร์นัลพับลิเคชั่น: กรุงเทพฯ. หน้า 193.

เอกวิทย์ ณ ถลาง. 2540. สังคมและวัฒนธรรมของกลุ่มชนหลายชาติพันธุ์ในภาคใต้. รูสมิแล. 18 (1-2): 3-9.

Applied Biosystem. 2005. Using the SNaPshot® Multiplex System with the POP-7™ Polymer on Applied Biosystems 3730/3730*x*l DNA Analyzers and 3130/3130*x*l Genetic Analyzers. http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/general documents/cms_042107.pdf (accessed 21/06/09).

Asari, M., Watanabe, S., Matsubara, K., Shiono, H. and Shimisu, K. 2009. Single nucleotide polymorphism genetyping by mini-primer allele-specific amplication with universal reporter primers for identification of degraded DNA. Analytical Biochemistry. 386: 85-90.

Bender, K., Stradmann-Bellinghausen, B., Rittner, C. and Schneider, P.M. 2003. Comparative analysis of short tandem repeats and single nucleotide polymorphisms on the Y-chromosome in Germans, Chinese and Thais. Journal of Legal Medicine. 5: S164–S168.

Bianchi, N.O. 2009. Y-chromosome structural and functional changes in human malignant diseases. Mutation Research. 682: 21–27.

Biesecker, L.G., Bailey-Wilson, J.E., Ballantrne, J., Baum, H., Bieber, F.R., Brenner, C., Budowle, B., Butler, J.M., Carmody, G., Conneally, P.M., Duceman, B., Eisenberg, A., Forman, L., Kidd, K.K., Leclair, B., Niezgoda, S., Parsons, T., Pugh, E., Shaler, R., Sherry, S.T., Sozer, A. and Walsh, A. 2005. DNA identifications After the 9/11 World Trade Center Attack. Science. 310: 1122-1123.

Blanco-Verea, A., Brion, M., Ramos-Luis, E., Lareu, M.V. and Carracedo, A. 2008. Forensic validation and implementation of Y-chromosome SNP multiplexes. Forensic Science International: Genetics (Supplement Series). 1: 1-3.

Bo, W., Hong, S., Ling, R., Huifeng, X., Kaiyuan, L., Wenyi, Z., Bing, S., Shiheng, S., Li, J. and Chunjie, X. 2004. The origin of Mosuo people as revealed by mtDNA and Y chromosome variation. Science in China (Series C) Life Sciences. 47(1): 1-10.

Brion, M., Blanco- Verea, A., Lareu, V. and Carracedo, A. 2004. 29 Y-chromosome SNP analysis in European population. International Congress Series. 1261: 73-75.

Brion, M., Dupuy, B.M., Heinrich, M., Hohoff, C., Hoste, B., Ludes, B., Mevag, B., Morling, N., Niederstatter, H., Parson, W., Sanchez, J., Bender, K., Siebert, N., Thacker, C., Vide, C. and Carracedo, A. 2005. A collaborative study of the EDNAP group regarding Y-chromosome binary polymorphism analysis. Forensic Science International. 153: 103-108.

Brion, M., Sanchez, J.J., Balogh, K., Thacker, C., Blanco-Verea, A., Borsting, C., Stradmann-Bellinghausen, B., Bogus, M., Syndercombe-Court, D., Schneider, P.M., Carracedo, A. and Morling, N. 2006. Analysis of 29 Y-chromosome SNPs in a single multiplex useful to predict the geographic origin of male lineages. International Congress Series. 1288: 13-15.

Brito, P., Carvalho, M., Bento, A.M., Costa, H.A., Serra, A., Lopes, V., Balsa, F., Andrade, L., Batista, L., Oliveira, C., Anjos, M.J. and Corte-Real, F. 2009. Forensic application of Y-chromosome SNPs in inconclusive cases. Forensic Science International: Genetics (Supplement Series). 2: 206-207.

Butler, J. M. 2003. Recent Developments in Y-Short Tandem Repeat and Y-Single Nucleotide Polymorphism Analysis. Forensic Science Review. 15(2): 92-111.

Butler, J.M., Coble, M.D. and Vallone, P.M. 2007. STRs vs. SNPs: thoughts on the future of forensic DNA testing. Forensic Science Medicine Pathology. 3: 200–205.

Butler, J.M., Kline, M.C. and Decker, A.E. 2008. Addressing Y-chromosome Short Tandem Repeat Allele Nomenclature. Journal of Genetic Genealogy. 4(2): 125-148.

Chang, Y.M., Perumal, R., Keat, P.Y., Yong, R.Y.Y., Kuehn, D.L.C. and Burgoyne, L. 2007. A distinct Y-STR haplotype for Amelogenin negative males characterized by a large Yp11.2 (DYS458-MSY1-AMEL-Y) deletion. Forensic Science International. 166: 115-120.

Divne, A-M. and Allen, M. 2005. A DNA microarray system for forensic SNP analysis. Forensic Science International 154: 111–121.

Ellonen, P., Levander, M., Ulmanen, I. and Lukka, M. 2004. Development of SNP microarray for supplementary paternity testing. International Congress Series. 1261: 12–14.

Ferri, G., Ceccardi, S., Lugaresi, F., Ingravallo, F., Bini, C., Cicognani, A. and Pelotti, S. 2006. The distribution of Y-chromosomal haplotypes and haplogroup in two population samples from the Romagna region (Nort Italy): Differences between urban (Rimini) and rural area (Valmarecchia). International Congress Series. 1288: 262-264.

Fujita, K. and Silver, J. 1994. Single-strand conformational polymorphism. Genome Reserch. 4: S137-S140.

Giardina, E., Predazzi, I., Pietrangeli, I., Asili, P., Marsala, P., Gabriele, L., Pipolo, C., Ricci, O., Martone, C., Spinella, A., and Novelli, G. 2007. Frequency assessment of SNPs for forensic identification in different populations. Forensic Science International: Genetics. 1: 1-3.

Guilliatt, A.M. 2002. Agarose and Polyacrylamide Gel Electrophoresis: Methods in Molecular Biology: PCR Mutation Detection Protocals (Theophilus, B.D.M. and Rapley, R.). Humana Press. 187: 1.

Hammer, M.F., Chamberlain, V.F., Kearney, V.F., Stover, D., Zhang, G., Karafet, T., Walsh, B. and Redd, A.J. 2006. Population structure of Y chromosome SNP haplogroups in the United States and forensic implications for constructing Y chromosome STR databases. Forensic Science International. 164: 45-55.

Hammer, M.F., Karafet, T.M., Park, H., Omoto, K., Harihara, S., Stoneking, M. and Horai, S. 2006. Dual origins of the Japanese: common ground for hunter-gatherer and farmer Y chromosome. Journal of Human Genetics. 51: 47-58.

Hou, Y.P., Shi, M.S., Liao, L.C., Yan, J., Zhang, J., Wu, J. and Li, Y.B. 2006. Y-SNP typing with the matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. International Congress Series. 1288: 16-18.

Huynh, T., Mollard, R. and Trounson, A. 2002. Selected genetic factors associated with male infertility. Human Reproduction. 8(2): 183-198.

Inagaki, S., Yamamoto, Y., Doi, Y., Takata, T., Ishikawa, T., Yoshitome, K., Miyaishi, S. and Ishizu, H. 2002. Typing of Y chromosome single nucleotide polymorphisms in a Japanese population by a multiplexed single nucleotide primer extension reaction. Journal of Legal Medicine. 4(3): 202-206.

Jobling, M.A. and Tyler-Smith, C. 2003. The human Y chromosome: an evolutionary markercomes of age. Nature Reviews Genetics. (4): 598-612.

Kalvatchev, Z. and Draganov, P. 2005. Single-strand conforamation polymorphism (SSCP) analysis: a rapid and sensitive method for detection for detection of genetic of genetic diversity among virus population. Biotechnology & Biotechnological Equipment. 9-14.

Karafet, T.M., Lansing, J.S., Redd, A.J., Watkins, J.C., Surata, S.P.K., Arthawiguna, W.A., Mayer, L., Bamshad, M., Jorde, L.B. and Hammer, M.F. 2005. Balinese Y-Chromosome Perspective on the Peopling of Indonesia: Genetic Contributions from Pre-Neolithic Hunter-Gatherers, Austronesian Farmers, and Indian Traders. Human Biology. 77(1): 93-113.

Karafet, T.M., Mendez, F.L., Meilerman, M.B., Underhill, P.A., Zegura, S.L. and Hammer, M.F.2008. New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosomal haplogroup tree. Genome Research. 18:830–838.

Kayser, M., Brauer, S., Weiss, G., Underhill, P.A., Roewer, L., Schiefenhövel, W. and Stoneking, M. 2000. Melanesian origin of Polynesian Y chromosomes. Current Biology.10 (20): 1237-1246.

Kidd, K.K., Pakstis, A.J., Speed, W.C., Grigorenko, E.L., Kajuna, S.L.B., Karoma, N.J., Kungulilo, S., Kim, J.J, Lu, R.B., Odunsi, A., Okonofua, F., Parnas, J., Schulz, L.O., Zhukova, O.V. and Kidd, J.R. 2006. Developing a SNP panel for forensic identification of individuals. Forensic Science International. 164: 20–32.

Kleiman, S.E., Yogev, L., Hauser, R., Botchan, A., Maymon, B.B.S., Paz, G. and Yavetz, H. 2007. Expression profile of AZF genes in testicular biopsies of azoospermic men. Human Reproduction. 22(1): 151–158.

Lareu, M., Puente, J., Sobrino, B., Quintans, B., Brion, M. and Carracedo, A. 2001. The use of the LightCycler for the detection of Y chromosome SNPs. Forensic Science International. 118: 163-168.

Layman, L.C. 2002. Human gene mutations causing infertility. Journal of Medical Genetics. 39: 153-161.

Lessig, R., Zoledziewska, M., Fahr, K., Edelmann, J., Kostrzewa, M., Dobosz, T. and Kleemann, W.J. 2005. Y-SNP-genotyping-a new approach in forensic analysis. Forensic Science International. 154: 128-136.

Lessig, R, Edelmann, J., Thiele, K., Kozhemyako, V., Jonkisz, A. and Dobosz, T. 2008. Results of Y-SNP typing in three different populations. Forensic Science International: Genetics (Supplement Series). Article in press.

Nascimento, E., Cerqueira, E., Azevedo, E., Freitas, V. and Azevedo, D. 2009. The Africa male lineages of Bahia's people-Northeast Brazil: Apreliminary SNPs study. Forensic Science International: Genetics (Supplement Series). 2: 349-350.

Nebel, A., Filon, D., Brinkmann, B., Majumder, P.P., Faerman, M. and Oppenheim, A. 2001. The Y Chromosome Pool of Jews as Part of the Genetic Landscape of the Middle East. American Journal of Human Genetics. 69:1095–1112.

Onofri, V., Tagliabracci, A., Boschi, I., Brisighelli, F., Scarnicci, F., Pascali, V. L., Ferri, G., Pelotti, S. and Capelli, C. 2008. Y chromosome J2 subtyping in an Italian sample: Population and forensic implications. Forensic Science International: Genetics (Supplement Series). 1: 233-234.

Petkovski, E., Keyser-Tracqui, C., Crubezy, E., Hienne, R. and Ludes, B. 2006. MALDI-TOF MS analysis of Y-SNPs in ancient samples. International Congress Series. 1288: 16-18.

Quintana-Murci, L., Krausz, C. and McElreavey, K. 2001. The human Y-chromosome: function, evolution and disease. Forensic Science International. 118: 169-181.

Quintans, B., Alvarez-Iglesias, V., Salas, A., Phillips, C., Lareu, M.V. and Carracedo, A. 2004. Typing of mitochondrial DNA coding region SNPs of forensic and anthropological interest using SNaPshot minisequencing. Forensic Science International. 140: 251-257.

Ronaghi, M. 2003. Pyrosequencing for SNP Genotyping: Single Nucleotide Polymorphism Methods and Protocols (Kwok, P.) Humana Press. 212: 189-195.

Sahoo, S., Singh, A., Himabindu, G., Banerjee, J., Sitalaximi, T., Gaikwad, S., Trivedi, R., Endicott, P., Kivisild, T., Metspalu, M., Villems, R. and Kashyap, V. K. 2006. A prehistory of Indian Y chromosomes: Evaluating demic diffusion scenarios. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America. 103(4): 843-848.

Sanchez, J., Borsting, C., Hallenberg, C., Buchard, A., Hernandez, A. and Morling, N. 2003. Multiplex PCR and minisequencing of SNPs – a model with 35-Y Chromosome SNPs. Forensic Science International. 137: 74-84.

Sanqoor, S.H., Hadi, S. and Goowin, W. 2008. The study of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in Arab population-A tool for the analysis of degraded DNA. Forensic Science International: Genetics (Supplement Series). 1: 484-486.

Sao-Bento, M., Carvallho, M., Bento, A.M., Andrade, L., Lopes, V., Serra, A. and Balsa, F. 2009. Y-chromosome SNP analysis in the Brazilian population of Sao Paulo state (Ribeirao Preto). Forensic Science International: Genetics (Supplement Series). 2: 427-428.

Schell, D., Klein, R., Miltner, E.and Wiegand, P. 2006. Multiplex typing with 5 Y-chromosomal SNPs. International Congress Series. 1288: 22–24.

Shi, H., Dong, Y., Wen, B., Xiao, C.J., Underhill, P.A., Shen, P., Chakraborty, R., Jin, L. and Su, B. 2005. Y-Chromosome Evidence of Southern Origin of the East Asian–Specific Haplogroup O3-M122. American Journal of Human Genetics. 77: 408-419.

Silva, M.R., Serra, S., Ribeiro, T.and Geada, H. 2006. Characterization of Y-chromosome SNP duplications. International Congress Series. 1288: 19– 21.

Skaletsky, H., Kuroda-Kawaguchi, T., Minx, P.J., Cordum, H.S., Hillier, L., Brown, L.G., Repping, S., Pyntikova, T., Ali, J., Bieri, T., Chinwalla, A., Delehaunty, A., Delehaunty, K., Du, H., Fewell, G., Fulton, L., Fulton, R., Graves, T., Hou, S.F., Latrielle, P., Leonard, S., Mardis, E., Maupin, R., McPherson, J., Miner, T., Nash, W., Nguyen, C., Ozersky, P., Pepin, K., Rock, S., Rohlfing, T., Scott, K., Schultz, B., Strong, C., Tin-Wollam, A., Yang, S.P., Waterston, R.H., Wilson, R.K., Rozen, S. and Page, D.C. 2003. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. Nature. 423: 825-837.

Sobrino, B., Brion, M. and Carracedo, A. 2005. SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. Forensic Science International. 154: 181-194.

Sripichai, O. and Fucharoen, S. 2007. Genetic Polymorphisms and Implicationsfor Human Diseases. Journal of The Medical Association of Thailand. 90 (2): 394-8.

Su, B., Xiao, J., Underhill, P., Deka, R., Zhang, W., Akey, J., Huang, W., Shen, D., Lu, D., Luo, J., Chu, J., Tan, J., Shen, P., Davis, R., Cavalli-Sforza, L., Chakraborty, R., Xiong, M., Du, Ruofu., Oefner, P., Chen, Z. and Jin, L. 1999. Y-Chromosome Evidence for a Northward Migration of Modern Humans in to Eastern Asia during the Last Ice Age. American Journal of Human Genetics. 65:1718–1724.

Thangaraj, K., Singh, L., Reddy, A.G., Rao, V.R., Sehgal, S.C., Underhill, P.A., Pierson, M., Frame, Ian G. and Hagelberg, E. 2002. Genetic Affinities of the Andaman Islanders, a Vanishing Human Population. Current Biology. 1-13.

Tilford, C.A., Kuroda-Kawaguchi, T., Skaletsky, H., Rozen, S., Brown, L.G., Rosenberg, M., McPherson, J.D., Wylie, K., Sekhon, M., Kucaba, T.A., Waterston, R.H. and Page, D.C. 2001. A physical map of the human Y chromosome. Nature. 409: 943-945.

Vallone, P.M. and Butler, J.M. 2004a. Multiplexed assays for evaluation of Y-SNP markers in US population. International Congress Series. 1261: 85-87.

Vallone, P.M. and Butler, J.M. 2004b. Y-SNP Typing of U.S. African American and Caucasian Samples Using Allele-Specific Hybridization and primer Extension. Journal of Forensic Science. 49(4): 723-732.

Volgyi, A., Zalan, A., Szvetnik, E. and Pamjav, H. 2008. Hungarian population data for 11 Y-STR and 49 Y-SNP markers. Forensic Science International: Genetics. 3: e27- e28.

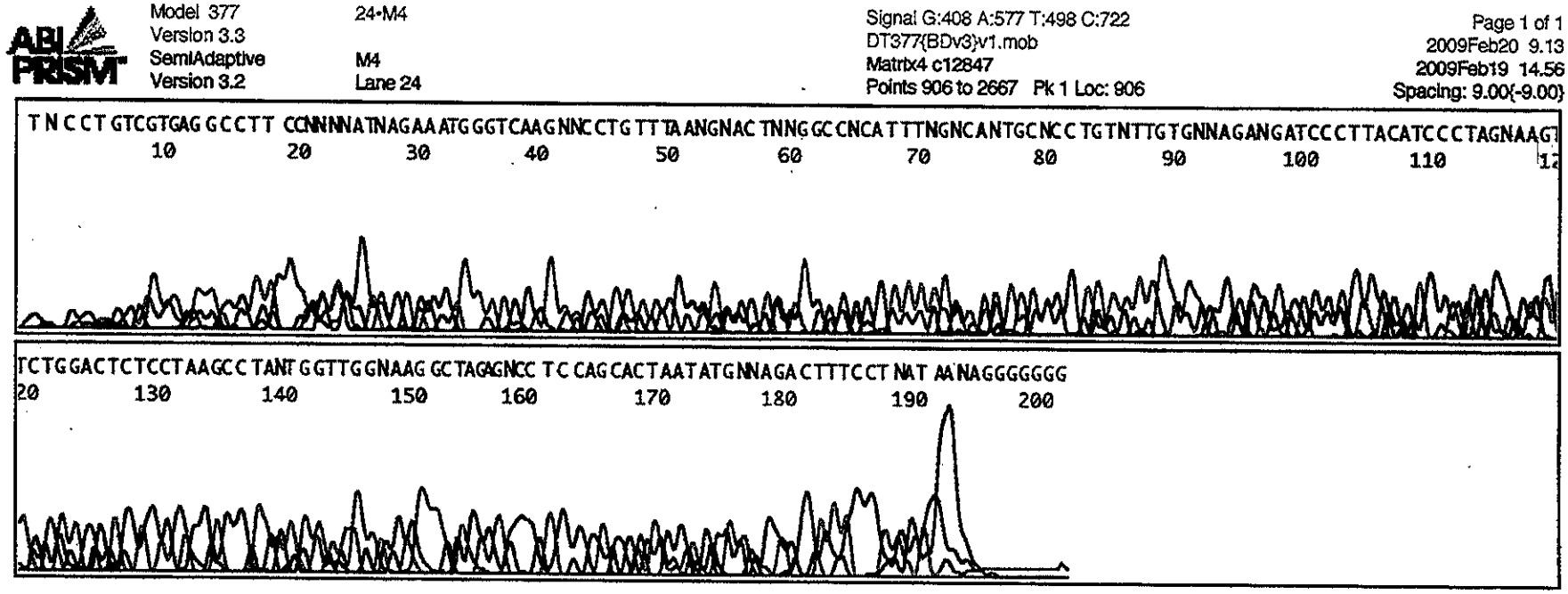
Ya-jun, Y., Li-zhe, A., Xiao-dong, X. and Jiu-jin, X. 2008. Genetic analysis of Y-chromosomes in five ethnic groups from Northwest China. Journal of LanzhouUniversity (Natural Sciences). 44(2): 47-52.

Yoshida, Y. and Kubo, S. 2008. Y-SNP and Y-STR analysis in a Japanese population. Journal of Legal Medicine. 10: 1-9.

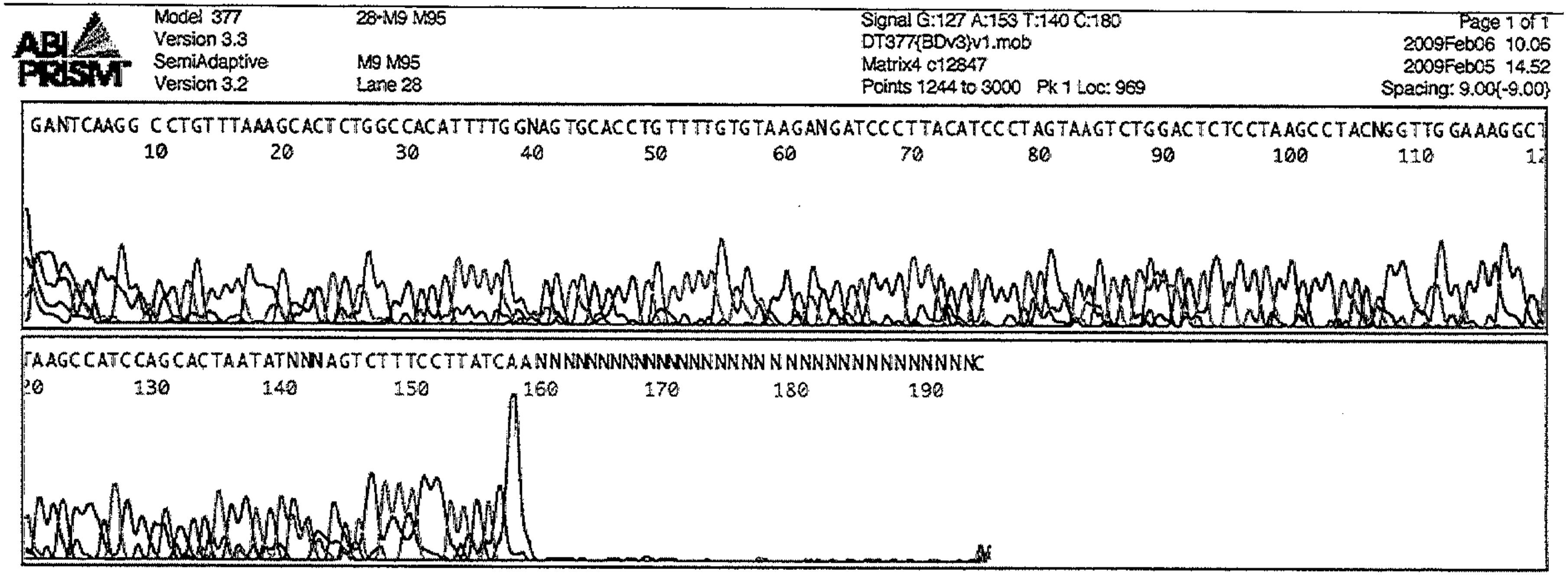
Yuehai, K., Bing, S., Junhua, X., Hua, C., Wei, H., Zhu, C., Jiayou, C., Jiazhen, T., Li, J. and Daru, L. 2001. Y-chromosome haplotype distribution in Han Chinese populations and modern human origin in East Asians. Science in China (series C). 40(3): 225-232.

ภาคผนวก ก

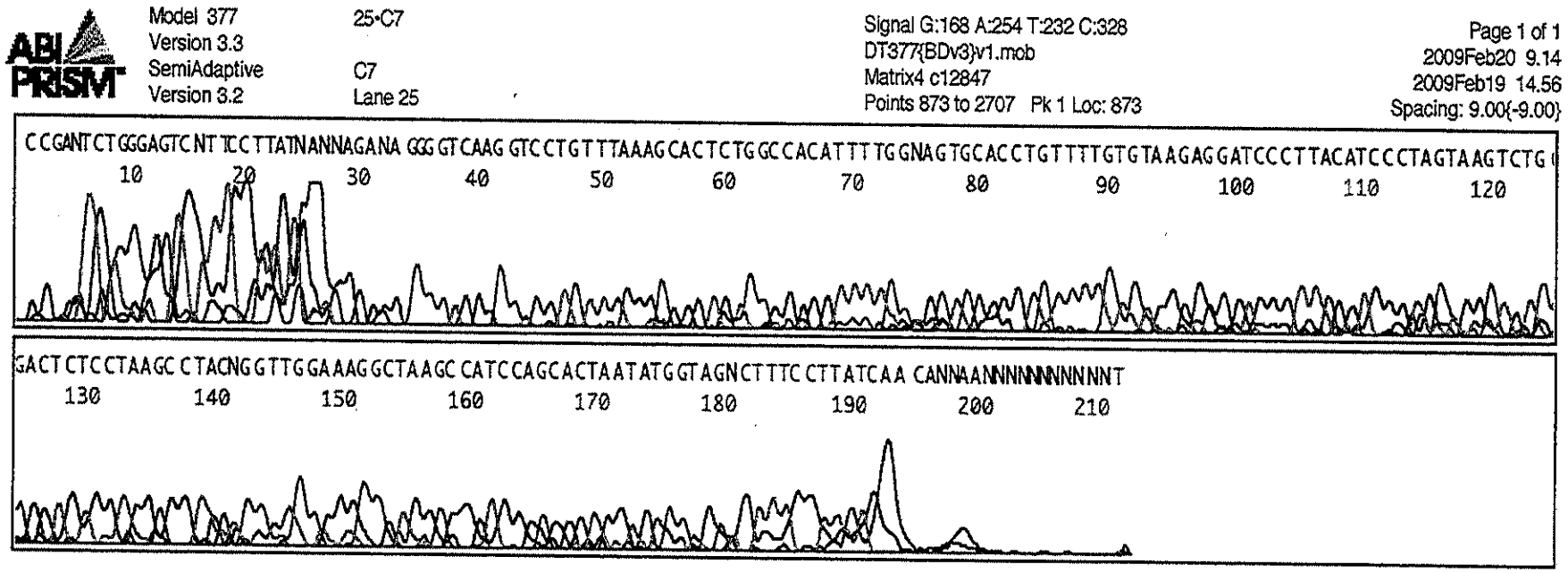
ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี direct sequencing ของสนิปตำแหน่ง M95



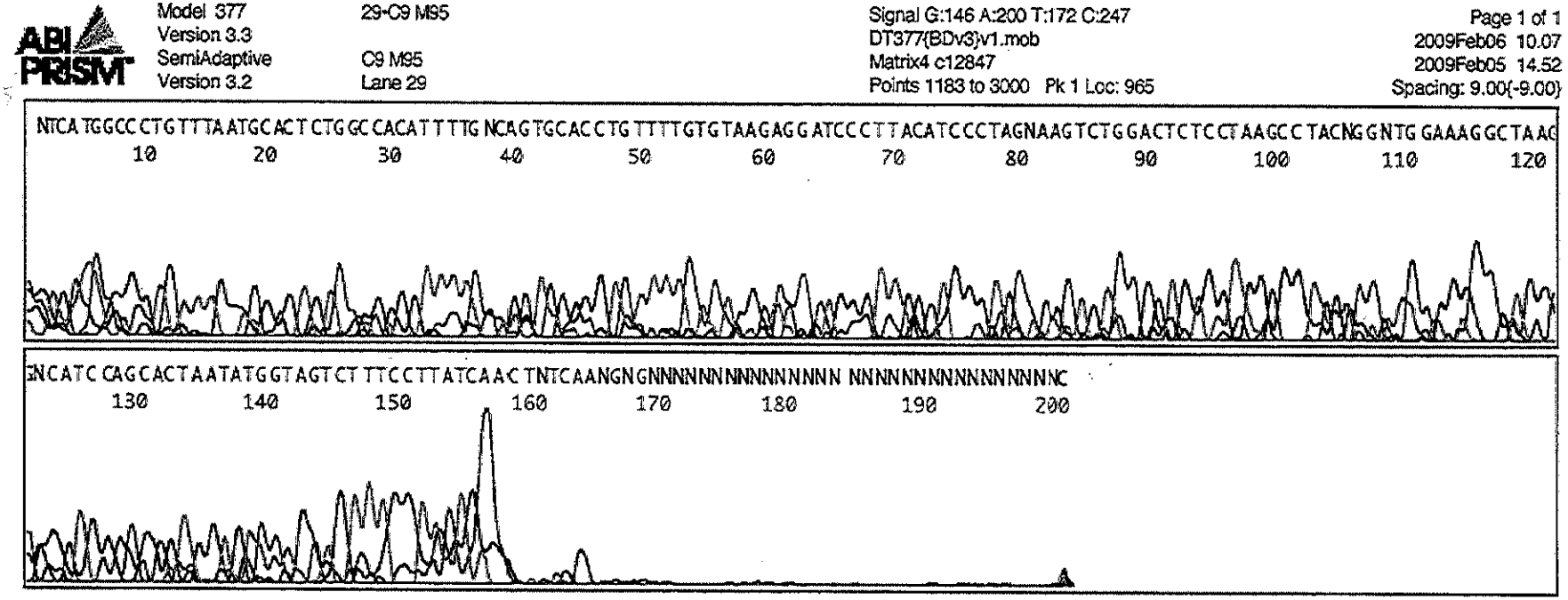
ภาพภาคผนวกที่ 1 ลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากผลผลิต PCR สาย antisense (5'→3') ด้วยการใช้ reverse primer ของตัวอย่าง Ma4 ซึ่งคาดว่าเป็นคนปกติ



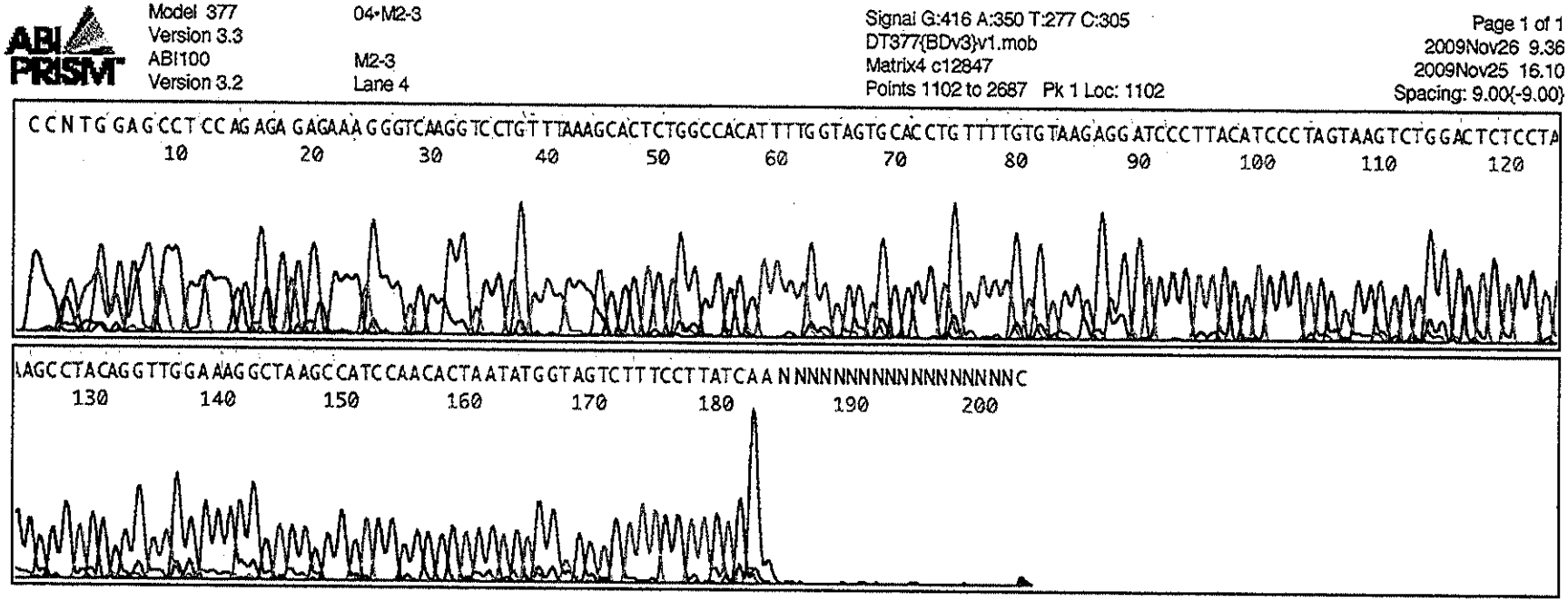
ภาพภาคผนวกที่ 2 ลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากผลผลิต PCR สาย antisense (5'→3') ด้วยการใช้ reverse primer ของตัวอย่าง Ma9 ซึ่งคาดว่าเป็นคนปกติ



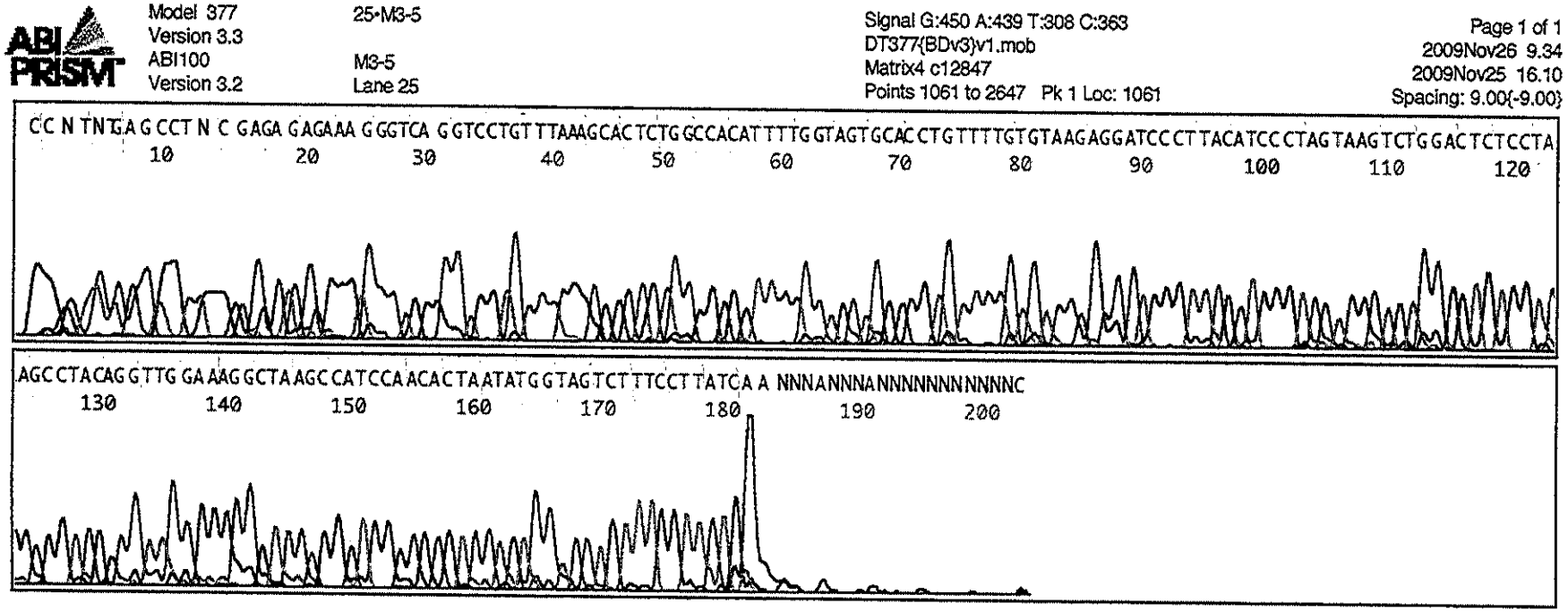
ภาพภาคผนวกที่ 3 ลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากผลผลิต PCR สาย antisense (5'→3') ด้วยการใช้ reverse primer ของตัวอย่าง Ch7 ซึ่งคาดว่าเป็นคนปกติ



ภาพภาคผนวกที่ 4 ลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากผลผลิต PCR สาย antisense (5'→3') ด้วยการใช้ reverse primer ของตัวอย่าง Ch9 ซึ่งคาดว่าเป็นคนปกติ



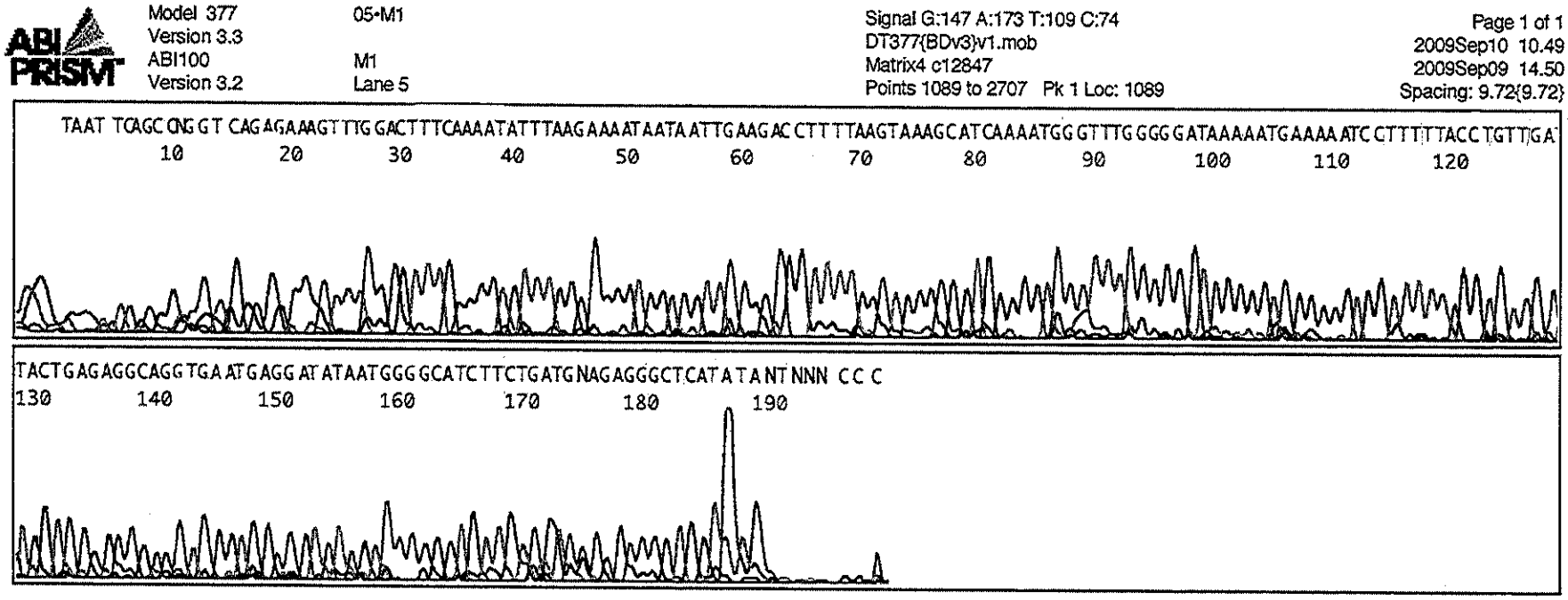
ภาพภาคผนวกที่ 5 ลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากผลผลิต PCR สาย antisense (5'→3') ด้วยการใช้ reverse primer ของตัวอย่าง Ma2 ซึ่งคาดว่าเป็นคนที่มีสนิป



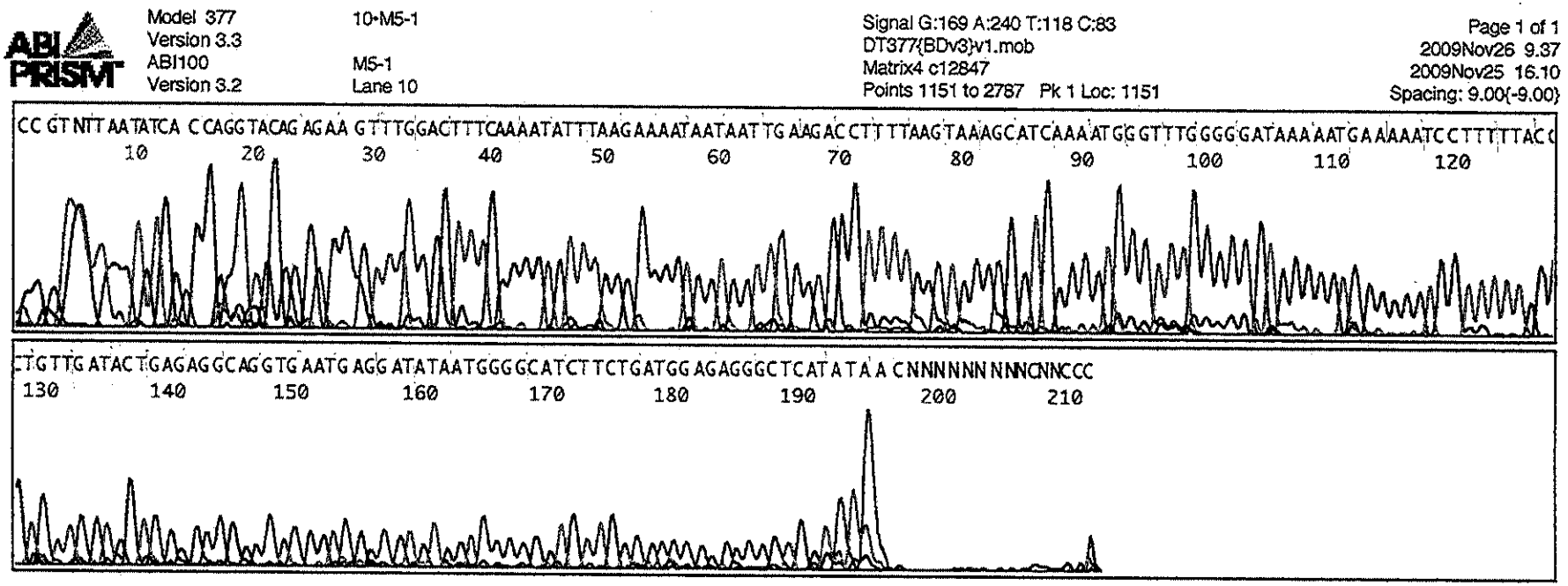
ภาพภาคผนวกที่ 6 ลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากผลผลิต PCR สาย antisense (5'→3') ด้วยการใช้ reverse primer ของตัวอย่าง Ma3 ซึ่งคาดว่าเป็นคนที่มีสนิป

ภาคผนวก ข

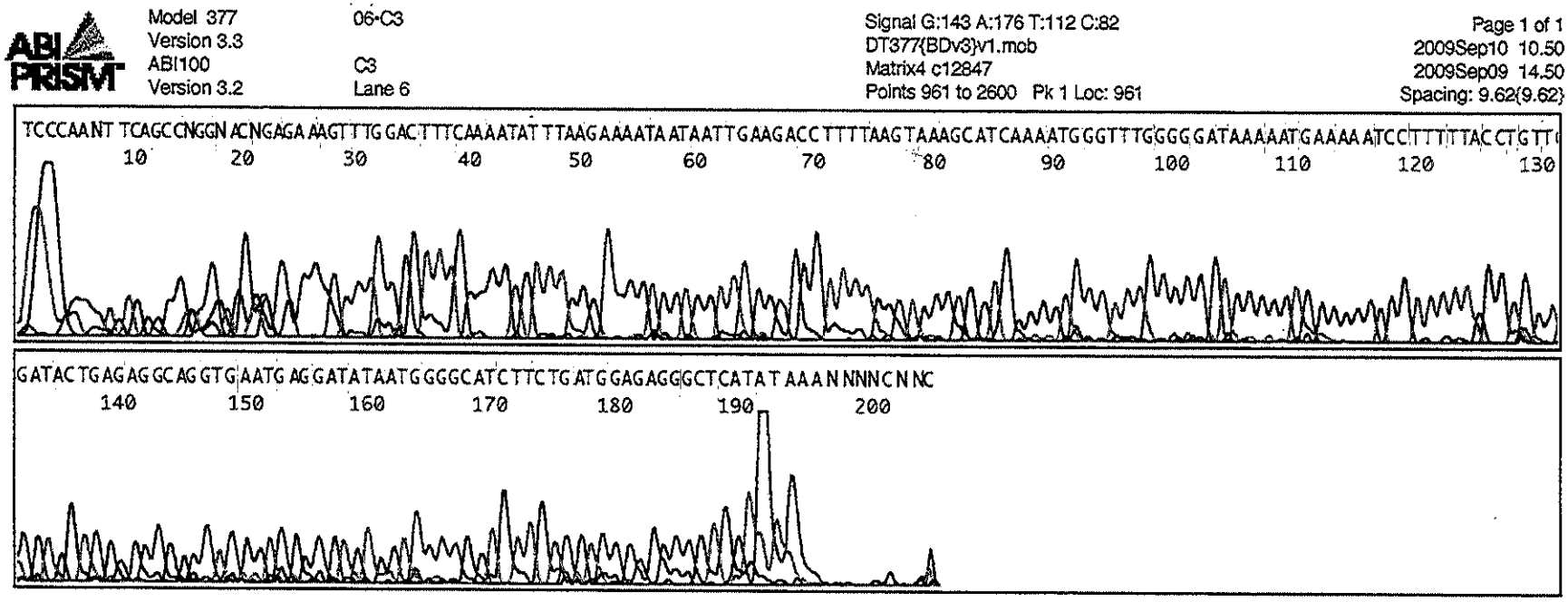
ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี direct sequencing ของสนิปตำแหน่ง M172



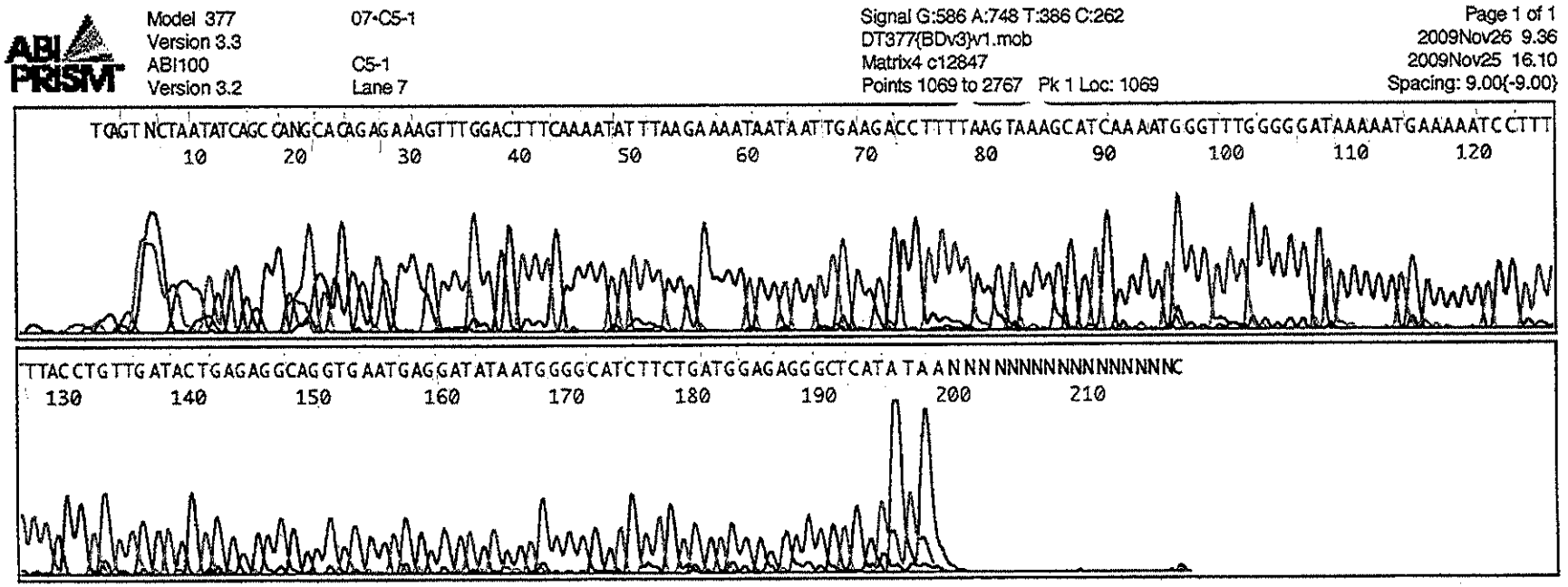
ภาพภาคผนวกที่ 1 ลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากผลผลิต PCR สาย antisense (5'→3') ด้วยการใช้ forward primer ของตัวอย่าง Ma1 ซึ่งคาดว่าเป็นคนปกติ



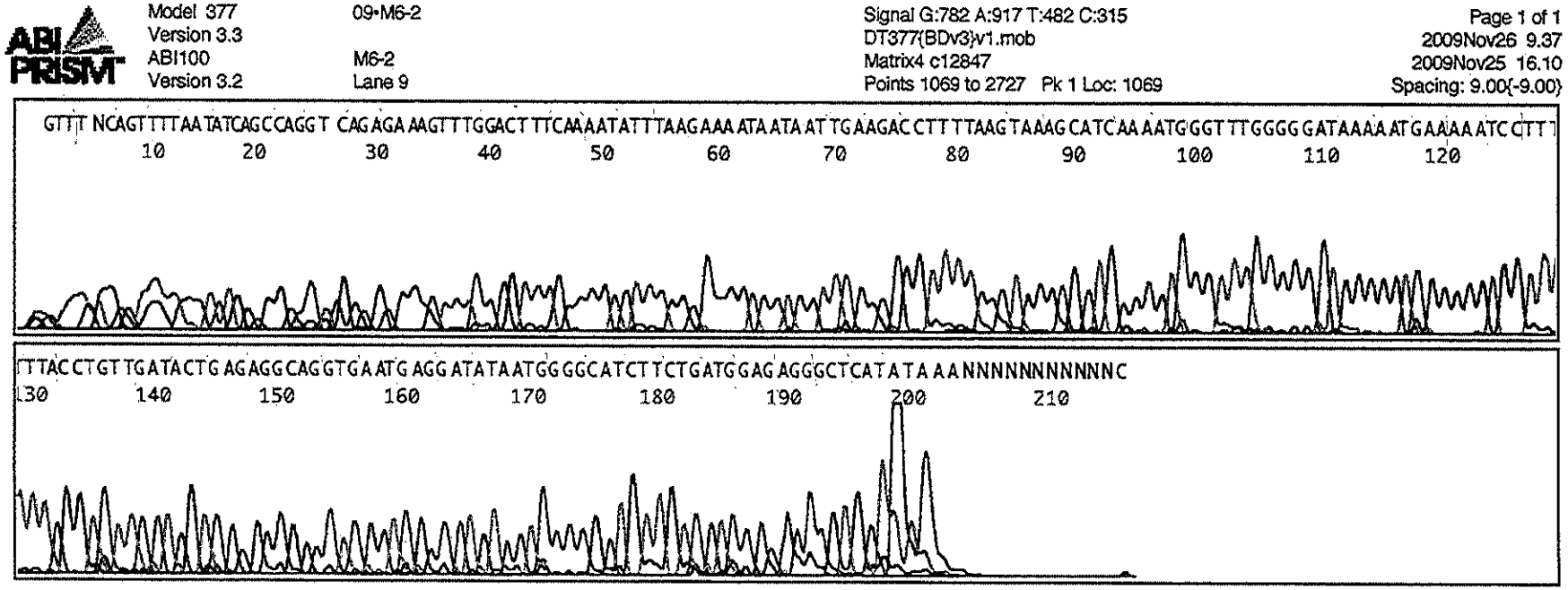
ภาพภาคผนวกที่ 2 ลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากผลผลิต PCR สาย antisense (5'→3') ด้วยการใช้ forward primer ของตัวอย่าง Ma5 ซึ่งคาดว่าเป็นคนปกติ



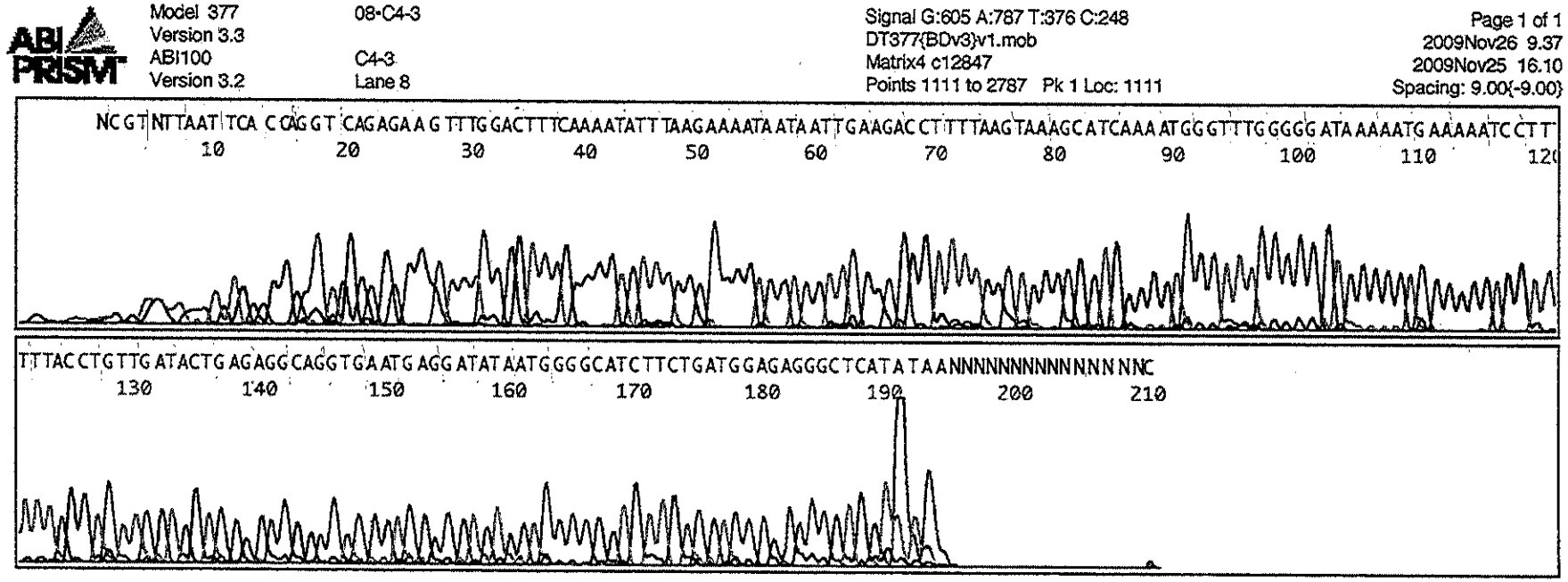
ภาพภาคผนวกที่ 3 ลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากผลผลิต PCR สาย antisense (5'→3') ด้วยการใช้ forward primer ของตัวอย่าง Ch3 ซึ่งคาดว่าเป็นคนปกติ



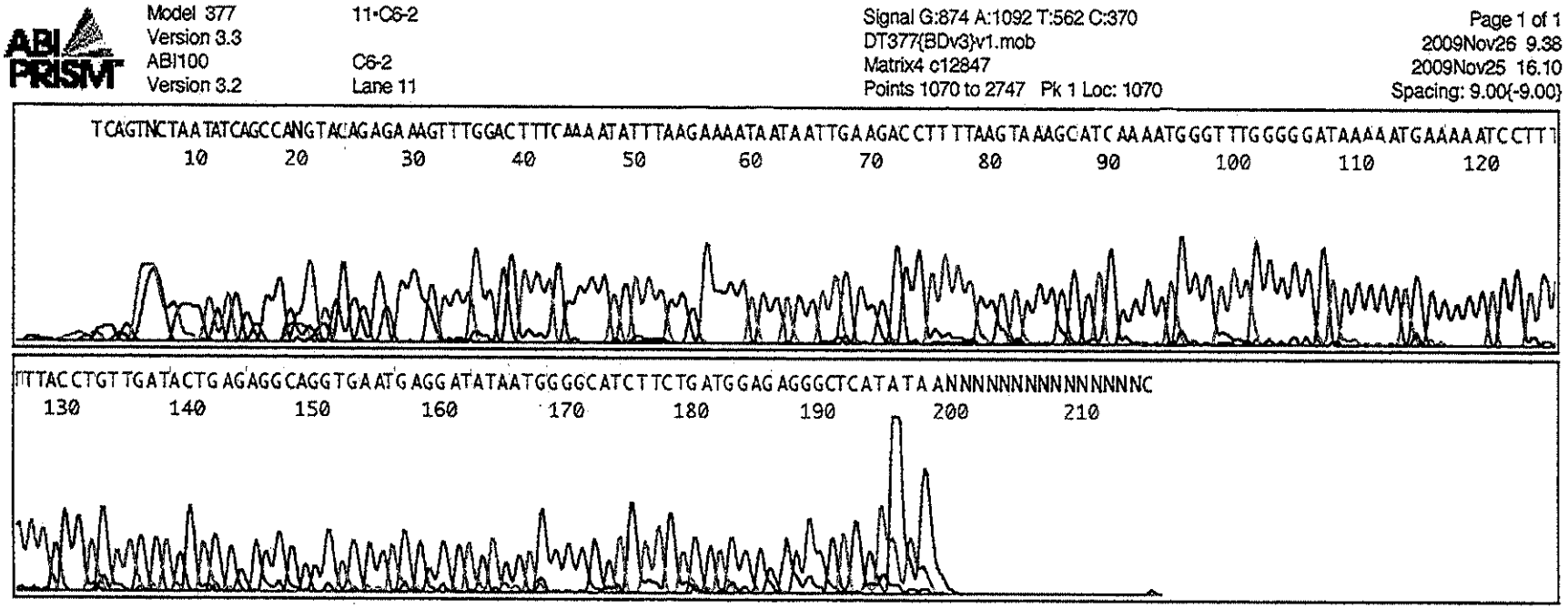
ภาพภาคผนวกที่ 4 ลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากผลผลิต PCR สาย antisense (5'→3') ด้วยการใช้ forward primer ของตัวอย่าง Ch5 ซึ่งคาดว่าเป็นคนปกติ



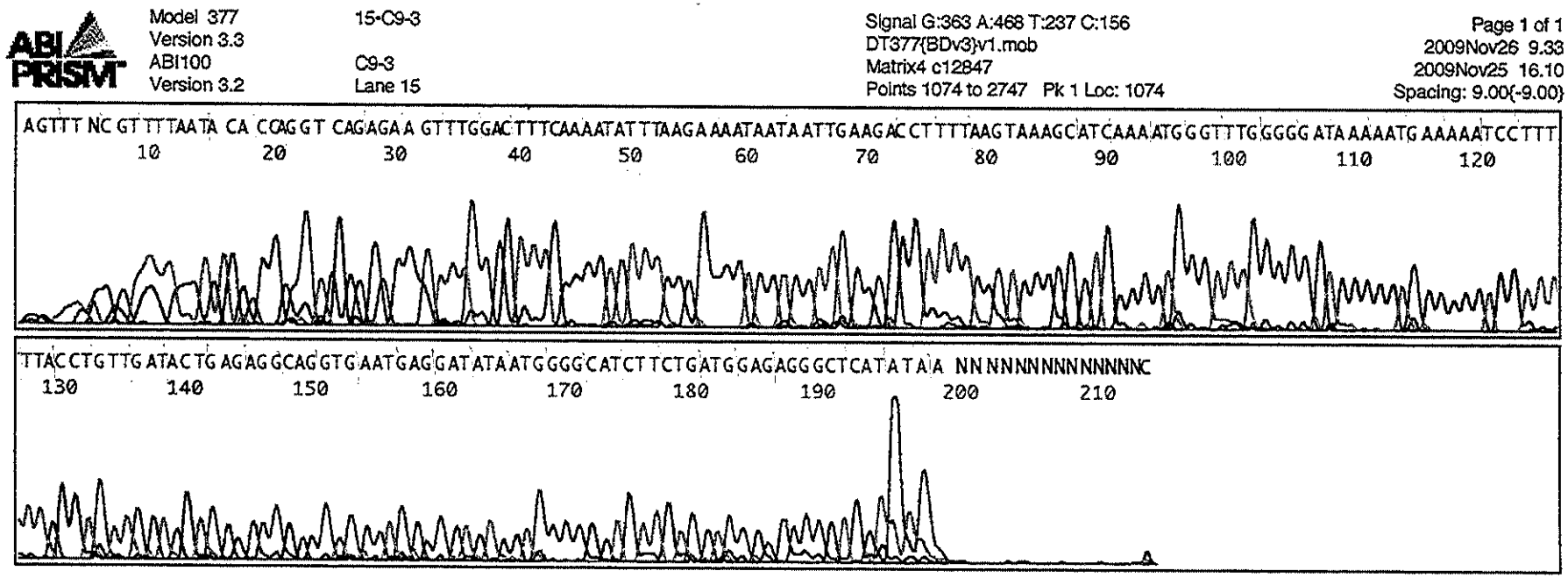
ภาพภาคผนวกที่ 5 ลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากผลผลิต PCR สาย antisense (5'→3') ด้วยการใช้ forward primer ของตัวอย่าง Ma6 ซึ่งคาดว่าเป็นคนที่มีสนิป



ภาพภาคผนวกที่ 6 ลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากผลผลิต PCR สาย antisense (5'→3') ด้วยการใช้ forward primer ของตัวอย่าง Ch4 ซึ่งคาดว่าเป็นคนที่มีสนิป



ภาพภาคผนวกที่ 7 ลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากผลผลิต PCR สาย antisense (5'→3') ด้วยการใช้ forward primer ของตัวอย่าง Ch6 ซึ่งคาดว่าเป็นคนที่มีสนิป



ภาพภาคผนวกที่ 8 ลำดับเบสที่สังเคราะห์ได้จากผลผลิต PCR สาย antisense (5'→3') ด้วยการใช้ forward primer ของตัวอย่าง Ch9 ซึ่งคาดว่าเป็นคนที่มีสนิป

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวมนฤดี ธนบัตร

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5010220097

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่	2549

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

มนฤดี ธนบัตร และ วราภรณ์ พรหมวิกร. 2553. การแยกแถบดีเอ็นเอบนแผ่นวุ้นอะกาโรส: วิธีอย่างง่ายในการตรวจสอบสนิป. การประชุมวิชาการสมาคมกายวิภาคศาสตร์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 33. วันที่ 28-30 เมษายน พ.ศ. 2553. หน้า 103-104.