การวิเคราะห์ความเป็นพี่ - น้อง จากลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ 15 ตำแหน่ง ของส่วน Short - Tandem - Repeats ในการพิสูจน์บุคคลและประยุกต์ใช้ในทางนิติเวชศาสตร์

โดย

นางอัจฉรา บุญเลิศ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2553

การวิเคราะห์ความเป็นพี่ - น้อง จากลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ 15 ตำแหน่ง ของส่วน Short - Tandem - Repeats ในการพิสูจน์บุคคลและประยุกต์ใช้ในทางนิติเวชศาสตร์

โดย
นางอัจฉรา บุญเลิศ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2553

ANALYSIS OF SIBSHIP FROM DNA FINGERPRINT ON 15 TETRAMERIC STR LOCI TO IDENTIFY HUMAN AND FORENSIC APPLICATION

By
Achara Boonlert

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree
MASTER OF SCIENCE
Program of Forensic Science
Graduate School
SILPAKORN UNIVERSITY
2010

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร อนุมัติให้วิทยานิพนธ์เรื่อง " การวิเคราะห์ความเป็นพี่ - น้อง จากลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ 15 ตำแหน่ง ของส่วน Short - Tandem - Repeats ในการพิสูจน์บุคคลและประยุกต์ใช้ในทางนิติเวชศาสตร์ " เสนอโดย นางอัจฉรา บุญเลิศ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

……..

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปานใจ ธารทัศนวงศ์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่..........เดือน................... พ.ศ...........

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธงชัย เตโชวิศาล
2. รองศาสตราจารย์วัฒนา เกาศัลย์

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ พันตำรวจเอกหญิง ดร.พัชรา สินลอยมา)

............/......................../..............

.... กรรมการ

(พันตำรวจโท กฤษฎา ริบรวมทรัพย์)

............/......................../..............

.... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธงชัย เตโชวิศาล)

............/......................../..............

.... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์วัฒนา เกาศัลย์)

............/......................../..............

50312339 : สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

คำสำคัญ : พิสูจน์ความเป็นพี่น้อง

อัจฉรา บุญเลิศ : การวิเคราะห์ความเป็นพี่ - น้อง จากลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ 15 ตำแหน่ง ของส่วน Short - Tandem - Repeats ในการพิสูจน์บุคคลและประยุกต์ใช้ในทางนิติเวชศาสตร์. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ผศ.ดร.ธงชัย เตโชวิศาล และ รศ.วัฒนา เกาศัลย์. 108 หน้า.

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ allele บน chromosome ของพี่น้องที่เกิดจาก บิดา-มารดาเดียวกัน เพื่อใช้ประโยชน์ในการพิสูจน์บุคคลในกรณีที่บิดา-มารดาไม่สามารถมาตรวจร่วมกันได้ และเพื่อใช้ในการพิสูจน์บุคคลสำหรับงานด้านนิติวิทยาศาสตร์

การศึกษานี้ได้วิเคราะห์ความเหมือนกันของ allele จำนวน 15 ตำแหน่ง ที่ทำการตรวจทางห้องปฏิบัติการ โดยใช้ชุดตรวจ AmpFℓSTR® Identifiler® PCR Amplification Kit และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ABI 3130 xl Genetic Analyzer จากผู้ที่เป็นพี่-น้องที่แท้จริง คือกำเนิดจากบิดา-มารดาเดียวกันจำนวน 100 คู่ และบุคคลที่ไม่มีความเกี่ยวข้องเป็นเครือญาติหรือไม่ใช่พี่น้องกัน 100 คู่เพื่อทดสอบเปรียบเทียบ การวิเคราะห์ข้อมูลใช้สถิติ t-test และ การวิเคราะห์การถดถอยแบบ Logistic Regression

ผลการศึกษาพบว่า 1) ผู้ที่เป็นพี่-น้องที่แท้จริงมี allele ที่มากกว่า 5 คู่ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $\alpha = 0.05$, 2) จากตำแหน่ง allele ที่เหมือนกัน 15 ตำแหน่งที่ได้รับจากบิดา-มารดา พบว่ามี allele ทั้งหมด 10 ตำแหน่ง คือ D8S1179, D7S820, CSF1PO, D16S539, D2S1338, D19S433, TPOX, D18S51, D5S818 และ FGA ที่มีนัยสำคัญสำหรับใช้จำแนกความเป็นพี่-น้อง ซึ่งมีความแม่นยำในการทำนาย 96.5%

สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ปีการศึกษา 2553

ลายมือชื่อนักศึกษา..

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ 1. .... 2. ....

50312339 : MAJOR : FORENSIC SCIENCE
KEY WORD : ANALYSIS/ SIBSHIP/ DNA

ACHARA BOONLURT : ANALYSIS OF SIBSHIP FROM DNA FINGERPRINT ON 15 TETRAMERIC STR LOCI TO IDENTIFY HUMAN AND FORENSIC APPLICATION. THESIS ADVISORS : ASST. PROF. THONGCHAI TAECHOWISAN ,Ph.D. ASSOC. PROF. WATANA KAOSAL. 104 pp.

The objective of this thesis was studying on the relationship of chromosomal allele from sibship, compare to non-sibship and evaluation of sibship relationship in case absent parents or none DNA parentage testing to human identification in forensic science.

The analysis of allele identity was carried out by using AmpFlSTR Identifiler PCR Amplification Kit and analyzed with ABI 3130 xl Genetic Analyzer on 100 pairs of sibship and 100 pairs of non-sibship. The statistic analysis on allele identity of 15 tetrameric STR loci was analyzed by t-test and Logistic Regression Analysis.

The results of statistic analysis on allele identity reveal that 1) sibship relative persons have 6 identical alleles (statistical significant level at $\alpha = 0.05$, t-test), 2) There are 10 identical alleles from 15 alleles have statistic significant which were D8S1179, D7S820, CSF1PO, D16S539, D2S1338, D19S433, TPOX, D18S51, D5S818 and FGA for determination of sibship relative persons which have accuracy for 96.5% prediction.

Program of Forensic Science Graduate School, Silpakorn University Academic Year 2010

Student's signature ....

Thesis Advisors' signature 1. .... 2. ....

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธงชัย เตโชวิศาล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ วัฒนา เกาศัลย์ อาจารย์ปรึกษาร่วม ภาควิชาสถิติ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่ได้เป็นที่ปรึกษา ให้คำแนะนำให้กำลังใจ และข้อคิดเห็นต่างๆ ตรวจแก้ไขข้อบกพร่อง ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ พันตำรวจเอกหญิง ดร.พัชรา สินลอยมา และ พันตำรวจโท กฤษฎา ริบรวมทรัพย์ ที่กรุณาให้ข้อคิดเห็นพร้อมกับคำแนะนำที่มีคุณค่า และสละเวลาเป็นคณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีคุณค่าและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตรจารย์ แพทย์หญิง นันทนา ศิริทรัพย์ หัวหน้าภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อนุญาตให้ใช้สถานที่ในการทำวิจัย และให้คำแนะนำเป็นอย่างดี

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณครอบครัวที่ให้การสนับสนุนช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการศึกษามาโดยตลอด จนวิทยานิพนธ์เล่มนี้ประสบผลสำเร็จไปได้ด้วยดี

สารบัญ

บทที่ หน้า

บทที่ หน้า

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตำแหน่งที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ลำดับเบสซ้ำที่ใช้ทั่วไปของ GeneBank Allelic Ladder และสีที่ใช้ติดฉลาก	36
2	แสดงหลักการถ่ายทอดพันธุกรรมของเมนเดล	43
3	แสดงค่าทางสถิติของ STR 15 ตำแหน่งของประชากรไทย (n = 80)	45
4	โปรแกรมการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ของชุดทดสอบสำเร็จรูป AmpFℓSTR Identifiler®PCR Amplification Kit	56
5	สรุปตำแหน่ง Allele ของคู่พี่น้อง จากกราฟภาพ ที่ 25-28	67
6	สรุปจำนวนตำแหน่ง allele เหมือนกันของคู่พี่น้องและคู่ตัวอย่างที่ไม่ใช่พี่-น้องที่แท้จริง	68
7	การทดสอบจำนวนคู่เหมือนของ allele บน chromosome พี่-น้องโดย t-test	69
8	แสดงจำนวนคู่พี่-น้องที่มีตำแหน่ง allele บน chromosome เหมือนกัน	70
9	ตำแหน่ง Allele ที่สามารถทำนายความเป็นพี่น้องที่แท้จริง	71
10	แสดงค่า P ของ DNA คู่พี่น้องที่แท้จริง จำนวนทั้งหมด 100 คู่	73
11	ค่า P ของ DNA คู่ที่ไม่ใช่พี่ - น้องที่แท้จริง จำนวนทั้งหมด 100 คู่	77
12	ลายพิมพ์ DNA ของคู่พี่น้องที่แท้จริง จำนวนทั้งหมด 100 คู่	92
13	ลายพิมพ์ DNA ของคู่ที่ไม่ได้เป็นพี่น้อง หรือเครือญาติกันเลย จำนวนทั้งหมด 100 คู่.	97
14	Case Processing Summary	101
15	Dependent Variable Encoding	101
16	Classification Table	101
17	Variables in the Equation	101
18	Variables not in the Equation	102
19	Model Summary	102
20	Omnibus Tests of Model Coefficients	103
21	Classification Table	104
22	Variables in the Equation	105

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ปัจจุบันนี้ DNA (Deoxyribonucleic Acid) มีบทบาทสำคัญมากในกระบวนการยุติธรรม และใช้เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่มีความน่าเชื่อถือสูง เป็นตัวช่วยหลักที่ทำให้การพิจารณาคดีในกระบวนการยุติธรรมมีความถูกต้องมากขึ้นดังเช่น การตรวจDNAเพื่อยืนยันตัวผู้กระทำความผิดในคดีต่าง ๆ การตรวจเพื่อพิสูจน์บุคคลในกรณีบุคคลสูญหายหรือ การตรวจยืนยันความสัมพันธ์บิดา-มารดา และบุตรในคดีทางแพ่ง และคดีอาญาซึ่งเป็นตัวอย่างของการนำวิทยาศาสตร์มาประยุกต์ใช้เพื่อกระบวนการยุติธรรม พยานหลักฐานทางด้านชีววิทยา ไม่ว่าจะเป็นคราบโลหิต คราบอสุจิ เส้นผม เส้นขน น้ำลายเนื้อเยื่อ กระดูก และสารคัดหลั่ง ฯลฯ ต่างมีองค์ประกอบหลักเดียวกันนั้นคือ DNA ซึ่งเป็นสารพันธุกรรมในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต DNA จะอยู่ในนิวเคลียส (Nucleus) ของเซลล์ ต่าง ๆ เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์ผิวหนัง เยื่อกระพุ้งแก้ม หรือปลายรากผม เป็นต้น DNA เป็นตัวกำหนดข้อมูลในการสร้างสารชีวโมเลกุล เช่น การสร้างโปรตีนชนิดต่าง ๆ ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงและชั้นต่ำ นอกจากนี้ยังควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ การแบ่งเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงเป็นเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ รวมทั้งเป็นรหัสหรือแบบพิมพ์ในการสร้าง กล่าวคือ ในสิ่งมีชีวิตแต่ละหน่วยหรือแต่ละเซลล์ จะมีชุด DNA ที่เป็นรหัสเฉพาะตัว ซึ่งจะมีความแตกต่างกันออกไปมากบ้างหรือน้อยบ้างแล้วแต่สายพันธุ์ จากความจำเพาะที่มีอยู่ในชุด DNA แต่ละหน่วยนี้เอง ในทางนิติวิทยาศาสตร์จึงได้นำมาเป็นเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจพิสูจน์เพื่อระบุยืนยันตัวบุคคล

มนุษย์มีDNAที่เป็นรหัสจำเพาะบุคคลและถ่ายทอดรหัสจำเพาะนั้นเป็นข้อมูลพันธุกรรมไปสู่รุ่นลูกรุ่นหลาน DNA ที่อยู่ภายในเซลล์ทำหน้าที่ควบคุมลักษณะต่าง ๆ เปรียบเสมือนรหัสกำหนดเอกลักษณ์บุคคล ซึ่งจะแตกต่างจากคนอื่น ๆ รหัส DNA จึงเป็นเสมือนปริศนาที่จะช่วยไขปัญหาให้รู้ว่าคนคนนั้นเป็นใคร มาจากไหน ใครเป็นผู้ให้กำเนิด ดังนั้นลายพิมพ์ DNA หรือ DNA fingerprint จึงมีลักษณะที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะบุคคลไม่เหมือนใคร การตรวจโดยเทคนิค DNA fingerprint เป็นการตรวจเทียบลักษณะของ DNA ที่ตำแหน่งต่างๆ โอกาสที่บุคคลจะมีลายพิมพ์ DNA ตรงกันในทุกตำแหน่งที่ตรวจจะมีน้อยมากหรือแทบจะไม่มีเลยสำหรับในกรณีพี่-น้อง

ที่เกิดจากพ่อแม่เดียวกันลูกที่เกิดมาจะได้รับ DNA มาจากพ่อและแม่คนละ 50 เปอร์เซ็นต์เท่ากัน อย่างไรก็ตามลูกที่เกิดจากพ่อแม่เดียวกันก็ไม่ได้มี DNA เหมือนกันเสียทีเดียวเพราะเมื่อมีการแบ่งตัวของโครโมโซมคู่เหมือนจะเกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วน (Cross over) ในโครโมโซมนี้ เป็นผลให้เกิดการรวมตัวใหม่ของยีน (Gene recombination) เมื่อยีนถูกถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกรุ่นหลานทำให้แต่ละคนมีรหัส DNA ที่แตกต่างกันยกเว้นฝาแฝดเหมือนที่เกิดจากไข่และอสุจิตัวเดียวกันเพราะมีเซลล์ต้นกำเนิดเดียวกัน จะมี DNA ที่เหมือนกันทุกประการ

ลายพิมพ์ DNA นั้นจะมีเบสที่ซ้ำกันต่อเนื่องขนาดสั้น (Short tandem : STR) ที่แสดงด้วยตัว A, C ,T, G อยู่มากมายหลายตำแหน่งบนโครโมโซม ซึ่งอาจจะเรียงสลับต่างกันไปในแต่ละคนแล้ว ยังมีจำนวนซ้ำที่แตกต่างอยู่ด้วย โดยการเรียงโครโมโซมที่ต่างกันที่สลับกันเป็นช่วง ได้รับผสมกันมาจากพ่อส่วนหนึ่งแม่ส่วนหนึ่งจำนวนที่ต่างกัน ซึ่งความแตกต่างกันของจำนวนเบสที่ซ้ำนี้แสดงได้ถึงลักษณะจำเพาะของแต่ละบุคคลเพื่อนำมาสร้างลายพิมพ์ DNA

การใช้เทคนิค DNA fingerprint ได้ถูกนำมาใช้ในการพิสูจน์บุคคลเพื่อไขปัญหาอาชญากรรมในการค้นหาคนร้าย การพิสูจน์ร่องรอยผู้ตาย การพิสูจน์วัตถุพยานในที่เกิดหตุ ตรวจพิสูจน์หลักฐานทางโบราณคดี นอกจากนี้ DNA fingerprint ยังมีประโยชน์อีกหลายด้าน เช่น คดีฆาตกรรม การพิสูจน์โครงกระดูกหรือชิ้นส่วนมนุษย์ รวมถึงการพิสูจน์ DNA ในรายของผู้ติดเชื้อ HIV เป็นต้น

DNA fingerprint สามารถตรวจตัวอย่าง เช่น คราบเลือด คราบอสุจิ ตลอดจนสารคัดหลั่งทุกชนิดในร่างกาย หลักการทางวิทยาศาสตร์ยอมรับว่า DNA เป็นเอกลักษณ์เฉพาะบุคคลจะไม่มีใครที่มีรหัส DNA เหมือนกัน ยกเว้นแฝดแท้ที่เกิดจากไข่ใบเดียวกัน เนื่องจาก DNA มีรหัสอยู่มากถึง 3 พันล้านรหัส ซึ่งในทางปฏิบัติจะไม่ตรวจเทียบรหัสทุกตัว แต่เลือกตรวจเปรียบเทียบบางตำแหน่งที่เด่นๆ 16 ตำแหน่ง ซึ่งทั้ง 16 ตำแหน่งนี้เป็นตำแหน่งที่ได้รับการยอมรับโดยหลักสากลในการใช้พิสูจน์บุคคล ส่วนในการตรวจพิสูจน์ความเป็นพ่อแม่ลูกมีหลักการว่าลูกจะต้องมีลายพิมพ์ DNA ทุกตำแหน่งเหมือนพ่อหรือแม่เท่านั้น หากมีตำแหน่งใดที่ไม่ตรงกับพ่อหรือแม่แสดงว่าลูกคนนี้ไม่ได้เกิดจาก พ่อ หรือแม่ คนดังกล่าว

ส่วนการตรวจพิสูจน์ความเป็นพี่-น้องที่เกิดจาก บิดา มารดา เดียวกันโดยไม่มีบิดา มารดา มาร่วมตรวจพิสูจน์ได้ ในปัจจุบันจะใช้วิธีการตรวจดังนี้

ในกรณี พี่น้องเป็นผู้ชายทั้งคู่จะใช้การตรวจ STR Y chromosome ซึ่งสามารถตอบโจทย์ในการตรวจพิสูจน์ ได้เพียงว่าเกิดจากสายพันธุ์ร่วมพ่อเดียวกันจะระบุตัวบุคคลลงไปไม่ได้ว่าเกิดจากพ่อคนไหน เช่น ปู่, ลุงที่เป็นพี่ชายของพ่อ,พ่อ,ลูกชาย บุคคลดังกล่าวจะมี STR Y chromosome เหมือนกัน

ในกรณีเป็นชาย-หญิง หรือหญิง-หญิงจะใช้ mitochondrial DNA ซึ่งสามารถตอบโจทย์ในการตรวจพิสูจน์ ได้เพียงว่าเกิดจากสายพันธุ์ร่วมของแม่เดียวกัน จะระบุตัวบุคคลลงไปไม่ได้ว่าเกิดจากแม่คนไหน เช่น ยาย, ป้าหรือน้าที่เป็นพี่น้องของแม่,แม่และลูกสาว จะมี mitochondrial DNA ที่เหมือนกัน

ต่างกับการตรวจ DNA fingerprint identification 16 ตำแหน่งในการระบุบุคคลได้มากกว่าด้วยเหตุผลดังกล่าวข้างต้น

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

2.1 เพื่อศึกษาจำนวน allele บน chromosome ที่ได้จากการตรวจ STR Profile 15 ตำแหน่งที่มีความซ้ำกัน ของคู่ตัวอย่างพี่-น้องที่แท้จริงที่เกิดจาก บิดา มารดาเดียวกัน และคู่ตัวอย่างที่ไม่ใช่พี่-น้องที่แท้จริงที่ไม่ได้เกิดจาก บิดา มารดาเดียวกัน โดยไม่ใช้ตำแหน่งการระบุเพศมาคิดคำนวณ

2.2 เพื่อใช้ตำแหน่ง allele บน chromosome ที่เหมือนกัน บอกถึงความสัมพันธ์พี่น้องที่แท้จริง

2.3 เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของ allele บน chromosome ที่จำแนกความเป็นพี่-น้องที่แท้จริง และไม่ใช่พี่-น้องที่แท้จริง

3. สมมติฐานของการวิจัย

3.1 จำนวน allele บน chromosome ของพี่น้องที่มี บิดา มารดา เดียวกัน ควรมีค่าความน่าจะเป็นที่มี allele เหมือนกันอย่างน้อย 25% ซึ่งเป็นผลให้จำนวน allele บน chromosome ที่ได้จากการตรวจ STR Profile 16 ตำแหน่งควรจะเหมือนกันอย่างน้อย25% คือ4 ตำแหน่งเพราะฉะนั้นถ้าเป็นพี่-น้องกันอย่างแท้จริงจำนวน allele บน chromosome ควรจะมีความเหมือนกันในจำนวนหนึ่ง

3.2 ตำแหน่ง allele บน chromosome สามารถบ่งบอกความเป็นพี่น้องที่มี บิดา มารดาเดียวกันได้

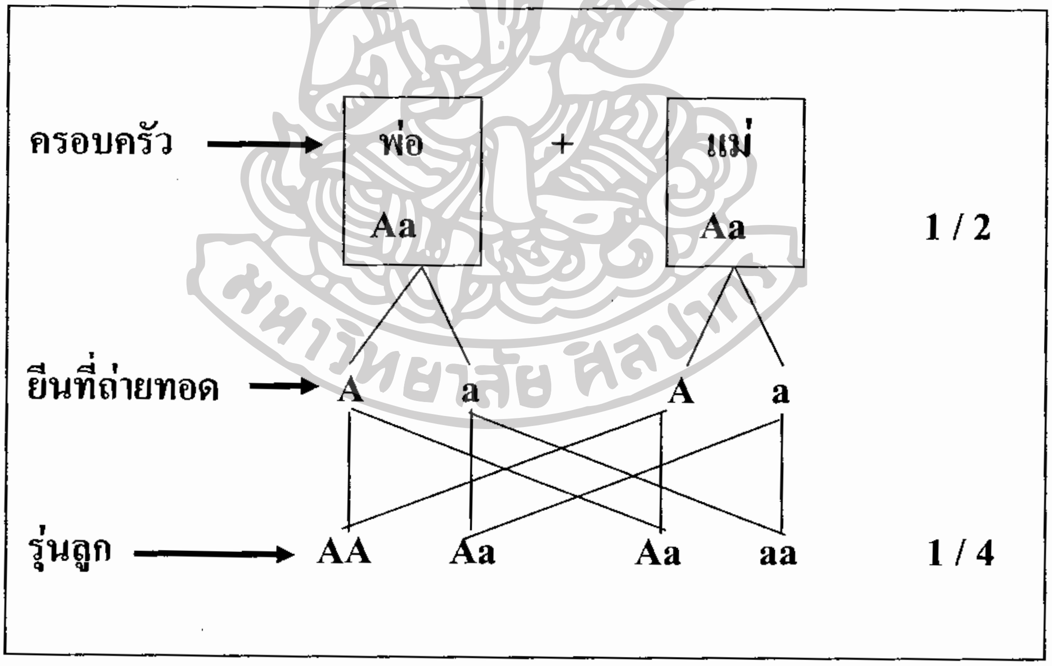
4. กรอบแนวคิดในการวิจัย

ศึกษาจากข้อมูลการตรวจ DNA fingerprint identification 16 ตำแหน่ง ของครอบครัวที่มีลูกมากกว่า 1 คน และเป็นพี่น้อง ที่มาจาก บิดา มารดาเดียวกัน

$$\text{ตัวแปรตาม ความเป็นพี่น้อง}Y = \begin{cases} 1 & \text{เป็นพี่น้องที่แท้จริง} \\ 0 & \text{ไม่เป็นพี่น้องที่แท้จริง} \end{cases}$$

ตัวแปรอิสระที่เป็นตัวแปรเชิงคุณภาพ X คือ allele ทั้ง15 ตัวคือ D8S1179 D21S11 D7S820 CSF1PO D3S1358 TH01 D13S317 D16S539 D2S1338 D19S433 VWA TPOX D18S51 D5S818 FGA โดยกำหนดให้ พี่น้องที่มีตำแหน่ง allele บน chromosome ไม่เหมือนกัน เป็น 0 และเหมือนกัน เป็น 1

$$X = \begin{cases} 1 \text{ allele} & \text{เหมือนกัน} \\ 0 \text{ allele} & \text{ต่างกัน} \end{cases}$$



ภาพที่ 1 การถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรม จากพ่อ แม่ ไปสู่รุ่นลูก

ที่มา : ปรับปรุงจาก วรรณา ทองนพคุณ, ชนินทร์ ลิ่มวงศ์ และ เพทาย เย็นจิตโสมนัส, <u>สาระน่ารู้อณูพันธุศาสตร์</u> (กรุงเทพฯ: เท็กซ์แอนด์เจอร์นัล พับลิเคชั่น, 2548)

พี่น้องที่แท้จริงนั้น ใช้กฎพันธุศาสตร์ ในเรื่องการส่งทอดยีน โดยลูกจะต้องรับสารพันธุกรรมจาก พ่อ มาครึ่งหนึ่ง จากแม่ครึ่งหนึ่ง เป็นกฎตายตัว เพราะฉะนั้นคนที่เป็นพี่น้องที่เกิดจากพ่อ แม่ คนเดียวกัน โอกาสที่จะมียีนที่เหมือนกัน ในตำแหน่งนั้นๆ ความเป็นไปได้คือ1 ใน 4 การวิเคราะห์ allele บน chromosome ที่ได้จากการตรวจ identification 16 ตำแหน่งจำนวน allele บน chromosome ของพี่น้องที่มี บิดา มารดา เดียวกัน ควรมีค่าความน่าจะเป็นที่มี allele ตรงกันอย่างน้อย 25%

5. ขอบเขตของการวิจัย

5.1 ขอบเขตตัวอย่างงานวิจัย

5.1.1 ศึกษาลายพิมพ์ DNA ของบุคคลที่เป็นพี่น้องที่แท้จริง 100 คู่

5.1.2 ศึกษาลายพิมพ์ DNA ของบุคคลที่ไม่เป็นพี่น้องที่แท้จริงและมิได้เกี่ยวข้องเป็นเครือญาติกัน จำนวน 100 คู่

5.2 ขอบเขตด้านช่วงเวลา กำหนดการเก็บข้อมูลในช่วงวันที่ 1 มีนาคม 2551 ถึง3 ธันวาคม พ.ศ. 2551

5.3 สถานที่ทำการวิจัยและเก็บข้อมูล หน่วยนิติเซโรวิทยา ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย

5.4 ทำการสกัดตัวอย่าง DNA ด้วยชุดสกัด DNA IQ Mini Kit และวิเคราะห์ STR Profile Software Gene Mapper ID V 3.2

6. ขั้นตอนของการวิจัย

6.1 ค้นคว้าและเก็บข้อมูลจากเอกสารที่เกี่ยวข้อง

6.2 วางแผนวิธีการทดลอง

6.3 เก็บตัวอย่างประชากรเพื่อนำมาทดลอง

6.4 รวบรวมข้อมูลคำนวณค่าสถิติต่างๆ

6.5 วิเคราะห์และสรุปผล

7. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

7.1 เพื่อนำไปใช้เป็นข้อมูลประกอบในการสืบสวนสอบสวน

7.2 เป็นอีกหนึ่งทางเลือกสำหรับข้อมูลการตัดสินใจในการยืนยันความเป็นพี่น้อง

7.3 ลดค่าใช้จ่ายและเวลาในการตรวจพิสูจน์

8.นิยามคำศัพท์เฉพาะ

allele คือ ยีน 2 ยีนซึ่งอยู่ตำแหน่งเดียวกันบนโครโมโซมคู่เหมือนกันโดยควบคุมลักษณะเดียวกัน ถ้ามี gene เหมือนกันเรียกว่าพันธุ์แท้ (homozygous) ถ้ามี gene ไม่เหมือนอยู่ด้วยกัน เรียกว่าพันธุ์ทาง (heterozygous)

Genotype คือ ชุดของ gene ที่มาเข้าคู่กัน ซึ่งสิ่งมีชีวิตได้รับมาจากพ่อและแม่

Phenotype คือ หมายถึง ลักษณะต่าง ๆ ที่สามารถแสดงออกมาให้เห็นได้ เป็นผลมาจาก genotype และสิ่งแวดล้อม

Chromosome คือโมเลกุล ดีออกซีไรโบนิวคลีโอโปรตีน อยู่ในนิวเคลียสของเซลล์ ในระหว่างการแบ่งเซลล์จะมองเห็นเป็นแท่งติดสีเข้ม ในเชิงพันธุศาสตร์โครโมโซมมีหน้าที่เก็บข้อมูลทางพันธุกรรมไว้ในลักษณะของการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์บน DNA

DNA fingerprint คือ โครโมโซมที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะแต่ละแห่งของแต่ละคน ซึ่งสามารถนำมาวินิจฉัยความเป็นเจ้าของหรือคดีความต่าง ๆ ได้

Gene คือ ส่วนของDNA ที่เป็นหน่วยเก็บข้อมูลต่างๆ เกี่ยวกับการถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่เป็นรหัสควบคุมลักษณะทางพันธุกรรม อยู่บนโครโมโซมในนิวเคลียส รหัสทางพันธุกรรมนี้จะเป็นตัวกำหนดชนิดของโปรตีนที่เซลล์จะสร้างขึ้น

PCR (Polymerase Chain Reaction: PCR) คือ วิธีการที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนDNAโดยไม่ต้องอาศัยการโคลนนิ่ง (cloning) แต่ใช้ปฏิกิริยาทางเคมีแบบลูกโซ่ที่ทำให้เกิดขึ้นในหลอดทดลอง

บทที่ 2

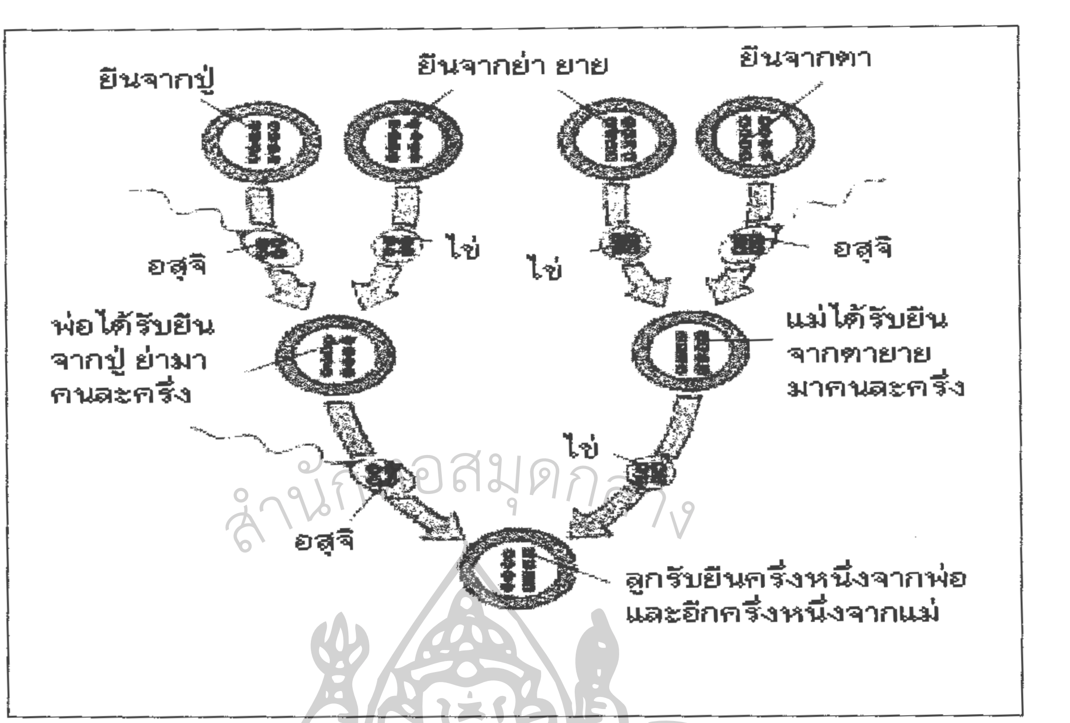
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ มุ่งเน้นศึกษาการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ของบุคคลทางพันธุกรรมโดยวิเคราะห์จากความเหมือนกันของ STR ในกลุ่มตัวอย่างพี่น้องที่แท้จริง ที่ถือกำเนิดจาก บิดา มารดา เดียวกัน เปรียบเทียบกับกลุ่มตัวอย่าง ของบุคคลทั่วไปที่ไม่ได้มีความสัมพันธ์เป็นพี่น้องกัน

1. หลักการทางพันธุศาสตร์

พันธุกรรม หมายถึง ลักษณะของสิ่งมีชีวิตที่ถ่ายทอดจากรุ่นหนึ่งไปยังอีกรุ่นหนึ่ง หรือจากบรรพบุรุษไปสู่ลูกหลาน เช่น จากปู่ย่า ตายาย ไปยัง พ่อแม่ หรือจากพ่อแม่ ไปยังลูก สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดย่อมมีความแตกต่างกัน ความแตกต่างของลักษณะต่าง ๆ มีสาเหตุมาจากพันธุกรรม ที่แตกต่างกัน ซึ่งการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม จะถ่ายทอดลักษณะต่าง ๆ อย่างมีหลักเกณฑ์ จากรุ่นหนึ่งไปยังอีกรุ่นหนึ่ง เราเรียกว่า การถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม

ลักษณะทางพันธุกรรม หมายถึง ลักษณะองค์ประกอบของยีน (gene) ของสิ่งมีชีวิตที่มีการแสดงออกเป็นลักษณะปรากฏที่แตกต่างกัน และสามารถถ่ายทอดจากรุ่นหนึ่งไปยังรุ่นอื่น ๆ ต่อไปได้ โดยการถ่ายทอดยีน ในการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมจะมีหน่วยควบคุมลักษณะ (genetic unit) ควบคุมสิ่งมีชีวิตให้มีรูปร่าง และลักษณะเป็นไปตามเผ่าพันธุ์ของพ่อแม่ เรียกว่า ยีน ดังนั้นยีนจึงทำหน้าที่ควบคุมการถ่ายทอดลักษณะต่าง ๆ จากบรรพบุรุษไปสู่รุ่นหลานลักษณะต่าง ๆ ที่ถ่ายทอดไปนั้นพบว่าบางลักษณะไม่ปรากฏในรุ่นลูก แต่อาจจะปรากฏในรุ่นหลานหรือเหลนก็ได้ จึงมีผลทำให้เกิดความแตกต่างกันของลักษณะทางพันธุกรรมจนมีผลทำให้สิ่งมีชีวิตเกิดความหลากหลาย แต่การสะสมลักษณะทางพันธุกรรมจำนวนมากทำให้เกิดสปีชีส์ต่างๆและสามารถดำรงเผ่าพันธุ์ไว้ได้จนถึงปัจจุบัน



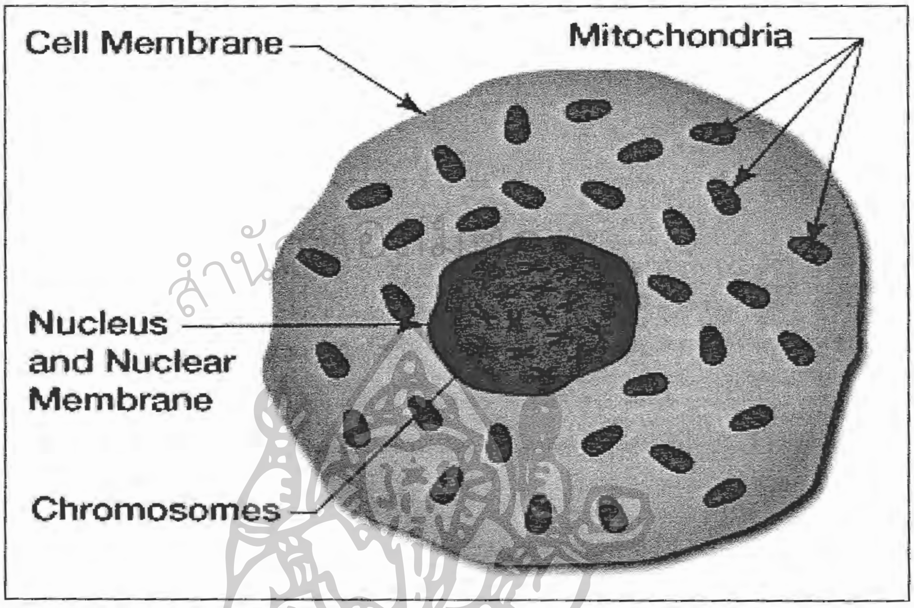
ภาพที่ 2 การถ่ายทอด ลักษณะต่างๆ ของสิ่งมีชีวิตจากรุ่นหนึ่งไปยังอีกรุ่นหนึ่ง
ที่มา: วรรณา นพคุณ,สาระน่ารู้อณูพันธุศาสตร์ [ออนไลน์], เข้าถึงเมื่อ 14 มกราคม 2554.
เข้าถึงได้จาก www.sriyapai.ac.th/wiwisci/y1.html

1.1 เซลล์

เซลล์สิ่งมีชีวิตทั้งหมดประกอบด้วยเซลล์หนึ่งเซลล์หรือมากกว่า เซลล์ทั้งหมดมีกำเนิดมาจากเซลล์ที่มีมาก่อน (preexisting cells) ระบบการทำงานเพื่อความอยู่รอดของสิ่งที่มีชีวิตทั้งหมดเกิดขึ้นภายในเซลล์ และภายในเซลล์ยังประกอบด้วยข้อมูลทางพันธุกรรม (hereditary information) ซึ่งจำเป็นสำหรับการควบคุมการทำงานของเซลล์ และการส่งต่อข้อมูลทางพันธุกรรมไปยังเซลล์รุ่นต่อไป

ในร่างกายของมนุษย์นั้นประกอบไปด้วยเซลล์ (Cells) ต่างๆ จำนวนกว่า 1 แสนล้านเซลล์ ซึ่งในแต่ละเซลล์นั้นมี นิวเครียส (Nucleus) ซึ่งเป็นจุดศูนย์กลางของเซลล์ และมีลักษณะคล้ายเส้นด้ายถักทอเป็นคู่ๆ ของโครโมโซม (Chromosomes) ภายในโครโมโซมเหล่านี้คือคำสั่งและข้อมูลต่างๆ ที่จำเป็นในการสร้างมนุษย์ขึ้นมา ทั้งพ่อและแม่ได้ถ่ายทอดโครโมโซมของตนให้กับแต่ละคู่ของโครโมโซมในทั้งหมด 23 คู่ ในมนุษย์ปกติ และภายในโครโมโซมเหล่านี้สามารถมียีน

(Genes) กว่า 1 แสนคู่อยู่ภายใน ซึ่งเป็นหน่วยพื้นฐานในการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม ในแต่ละยีนนั้นประกอบไปด้วยลักษณะที่แตกต่างกัน แต่จะเหมือนกันในแต่ละคน ยีนเป็นตัวกำหนดลักษณะทางพันธุกรรมต่างๆ เฉพาะแต่ละคน เช่น ตาสีดำ ไม่ใช่ตาสีฟ้า หรือสีน้ำตาล รวมทั้งลักษณะทั่วไปของมนุษย์ เช่น มีสองตา สองแขน สองขา เป็นต้น



ภาพที่ 3 โครงสร้างเซลล์

ที่มา: Openlearn and Creative Commons Licence, DNA [Online], accessed 16 January 2011.Available from http://pvcjirapot.brinkster.net/page41.html

1.2 จีโนมของคนคือ DNA ที่อยู่ในเซลล์ที่มีจำนวนโครโมโซมหนึ่งชุดหรือแฮพลอยด์เซลล์ (haploid cell, n) เรียกว่าจีโนม (genome) จีโนมของคนประกอบด้วยDNAส่วนที่อยู่ในนิวเคลียสและใน mitochondrial dna จีโนมในนิวเคลียสเป็นDNAเส้นยาวเกลียวคู่ขนาด 3000 ล้านเบส กระจายอยู่ในโครโมโซม 23 แท่ง แต่จีโนมใน mitochondrial dna เป็นDNAรูปวงขนาดเล็กเพียง 16,569 เบส DNAเกือบทั้งหมดใน mitochondrial dna ทำหน้าที่เป็นยีนซึ่งจะถูกถอดรหัสเพื่อสร้าง RNAของไรโบโซม (rRNA) และทีRNA (tRNA) หรือแปลรหัสเป็นสาย โพลีเพปไทด์ DNAในนิวเคลียสส่วนใหญ่เป็นลำดับเบสที่ไม่ใช่รหัส (non-coding sequences) ซึ่งมียีนอยู่ประมาณ 50,000-100,000 ยีน (5-10% ของจีโนมทั้งหมด) ขนาดของยีนคนโดยเฉลี่ยประมาณ 5-10 กิโลเบส ซึ่งจะสร้าง

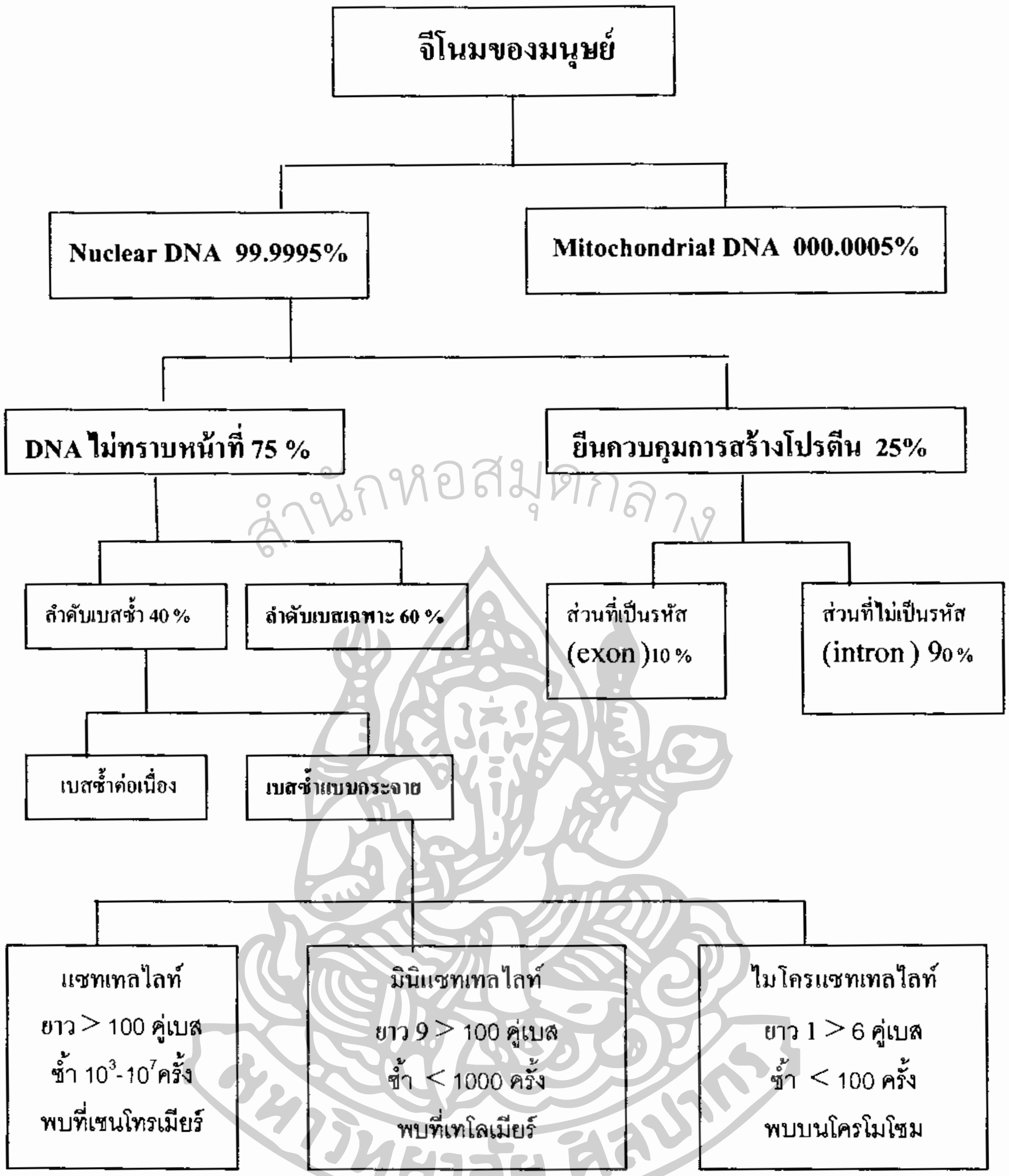
โปรตีนที่มีกรดอะมิโนโดยเฉลี่ยประมาณ 300 ตัว ภายในยีนจะมีลำดับเบสบางส่วนที่ไม่ใช่รหัส และถูกตัดออก เรียกว่า อินทรอน (intron) บางส่วนเป็นรหัสเรียกว่าเอ็กซอน (exon) ส่วนของจีโนมเกือบ 80% ไม่ใช่รหัส และอยู่นอกยีน (extragenic) ซึ่งในบริเวณนี้จะพบลำดับเบสซ้ำ (repetitive sequences) ที่ยังไม่ทราบหน้าที่ชัดเจน DNA ที่เป็นเบสซ้ำ ประมาณ 30% ของDNAในจีโนมของคนประกอบด้วยส่วนที่มีลำดับเบสซ้ำ (repetitive) บางชนิดมีจำนวนซ้ำมากกว่า 100,000 ครั้ง ลำดับเบสซ้ำเหล่านี้มีความแตกต่างกันทั้งขนาดและจำนวนซ้ำ แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่ เบสซ้ำต่อเนื่อง (tandem repeats) และเบสซ้ำกระจาย (interspersed repeats)

เบสซ้ำต่อเนื่อง: คือเบสซ้ำที่มีการเรียงตัวกันเป็นช่วงยาวแบ่งได้ตามจำนวนซ้ำและความยาวได้แก่ แซทเทลไลท์ (satellite) มินิแซทเทลไลท์ (minisatellite) และไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite)

แซทเทลไลท์ เป็นเบสซ้ำขนาด 1-6 เบส หรือหลายร้อยเบส ที่มีจำนวนซ้ำแต่ละตำแหน่งตั้งแต่หนึ่งพันถึงสิบล้านครั้ง จึงจัดเป็น DNA ที่มีการซ้ำของเบสสูงมาก (highly repetitive DNA) มักพบบริเวณเซนโทรเมียร์

มินิแซทเทลไลท์ เป็นเบสซ้ำขนาด 9-100 เบสที่มีจำนวนซ้ำตั้งแต่ 10 ครั้งแต่ไม่เกิน 1000 ครั้ง จัดอยู่ในกลุ่มที่มีการซ้ำของเบสระดับปานกลาง ส่วนใหญ่ของมินิแซทเทลไลต์มีลำดับเบสแกน (core sequence) เดียวกันและมักมีความหลากหลายสูง เนื่องจากความแตกต่างในจำนวนซ้ำจึงอาจเรียกว่า variable number tandem repeat (VNTR) ดร.เจฟฟรีย์ และคณะเป็นกลุ่มแรกที่ค้นพบวิธีการตรวจลายพิมพ์ DNA โดยนำเบสซ้ำนี้มาเป็น DNA ตรวจสอบ (DNA probe)

ไมโครแซทเทลไลท์ เป็นเบสซ้ำขนาด 1-6 เบส โดยที่จำนวนซ้ำแต่ละตำแหน่งไม่เกิน 100 ครั้ง จึงเรียก SSR (simple sequence repeats) เบสซ้ำชนิดนี้มีความหลากหลายของจำนวนซ้ำ จึงนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจลายพิมพ์ DNA ได้ และพบกระจายอยู่ทั่วไปในโครโมโซม จึงมีการนำมาใช้ในการทำแผนที่จีโนม (genome mapping)



ภาพที่ 4 องค์ประกอบของจีโนมนมนุษย์

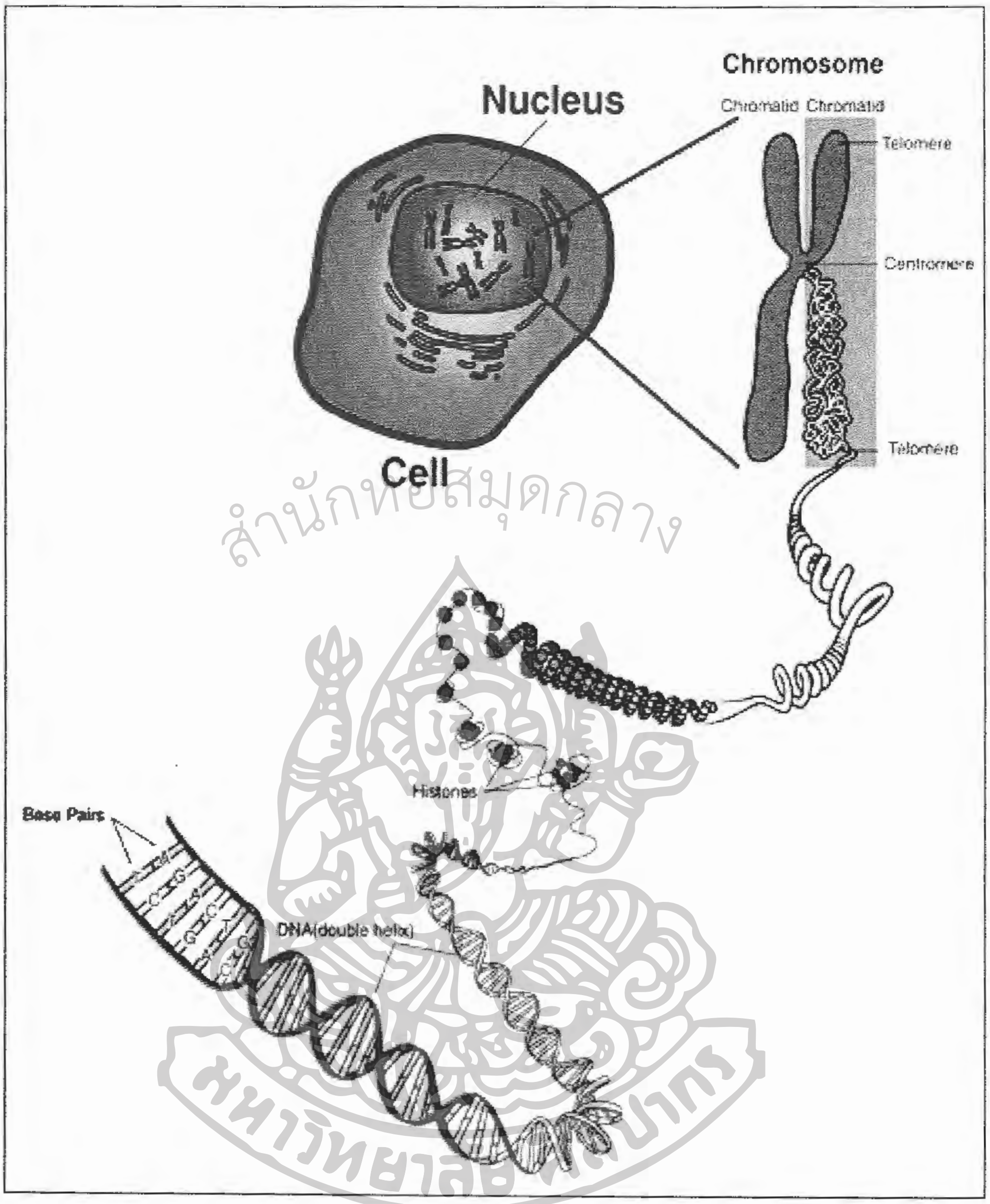
ที่มา : ปรับปรุงจาก วรรณา ทองนพคุณ, ชนินทร์ ลิ่มวงศ์ และ เพทาย เย็นจิตโสมนัส, สาระน่ารู้อณูพันธุศาสตร์ กรุงเทพฯ: เท็กซ์แอนด์เจอร์นัล พับลิเคชั่น, 2548.

1.3 DNA

DNA กลายมาเป็นที่สนใจในวงกว้างมากขึ้นเมื่อ 50 ปีที่แล้วมานี่เอง เมื่อนักวิทยาศาสตร์หนุ่มสองคนในขณะนั้นคือ เจมส์ วัตสัน และ ฟรานซิส คริก ได้ประกาศการค้นพบโครงสร้างDNAว่าเป็นสายคู่ที่บิดพับเป็นเกลียวคล้ายบันไดเวียนแบบที่เรียกว่า ดับเบิลเฮลิกซ์ (double helix) ในวารสารวิทยาศาสตร์ที่เก่าแก่และมีชื่อเสียงฉบับหนึ่งคือ Nature เมื่อวันที่ 25 เมษายน ค.ศ. 2496

ภาพที่ 5 เจมส์ วัตสันและฟรานซิสคริกสองนักวิทยาศาสตร์ ผู้ค้นพบโครงสร้างDNAกับโมเดล DNA

ที่มา: Openlearn and Creative Commons Licence, DNA [Online], accessed 16 January 2011.Available from http://gotoknow.org/file/chiew-buncha/view/69891

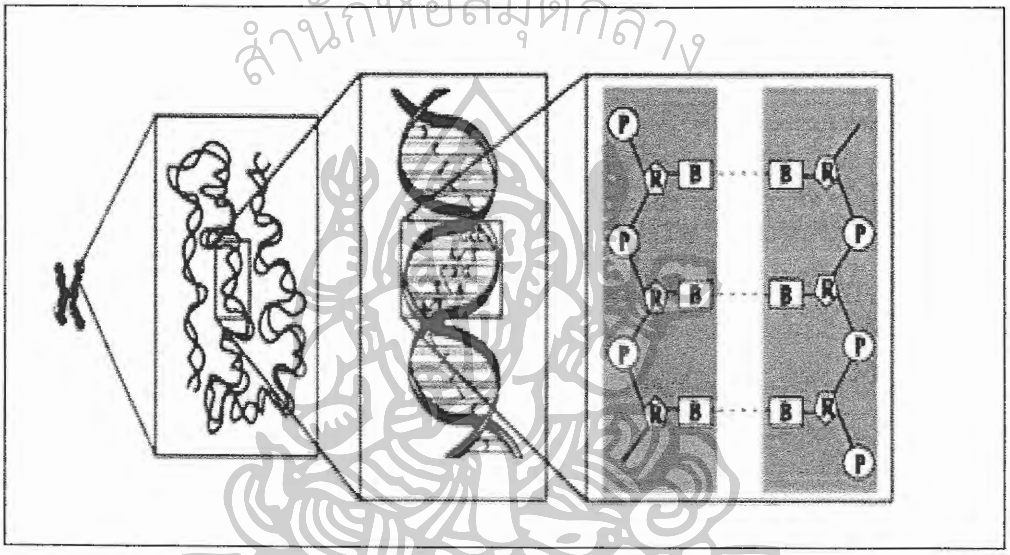


ภาพที่ 6 Pictorial Example of Nuclear DNA Structure

ที่มา: Openlearn and Creative Commons Licence, DNA [Online], accessed 16 January 2011.Available from http:// : image at: 202.143.164.74/.../bio_structure.html

ที่มา gotoknow.org/file/chiew-buncha/view/69891

เนื่องจากโครงสร้างของ DNA ซึ่งเป็นโมเลกุลสายคู่ (Double helix) นิวคลีโอไทด์ซึ่งอยู่คู่กันจึงเชื่อมต่อกันที่ฐานไนโตรจีเนียสโดยมีข้อแม้ว่า "A คู่กับ T" และ "C คู่กับ G" เท่านั้น ดังนั้นลักษณะของการจับคู่ฐานจึงมีเพียง 4 รูปแบบ เท่านั้น คือ {A-T}, {T-A}, {C-G} และ {G-C} เท่านั้น นี่คือตัวอักษรในรหัสพันธุกรรม ภาษาพันธุกรรมมีความคล้ายคลึงกับภาษามนุษย์ "คำ" ที่ใช้ในรหัสพันธุกรรมเรียกว่า "โคดอน" (Codon) หนึ่งโคดอนประกอบด้วย กลุ่มลำดับฐาน ซึ่งอ่านครั้งละ 3 ตัวอักษร เช่น [{A-T}, {C-G}, {T-A}] ดังตัวอย่างในภาพที่ 6 ดังนั้นกลุ่มของลำดับฐานจึงมี 64 กลุ่ม ที่แตกต่างกัน ถ้อยคำเหล่านี้จัดเรียงต่อกันคำต่อคำ เป็นประโยคข้อมูลตลอดความยาวของสาย DNA



ภาพที่ 7 โครงสร้าง DNA
ที่มา: Openlearn and Creative Commons Licence, DNA [Online], accessed 16 January 2011.Available from http://gotoknow.org/file/chiew-buncha/view/69891

DNA เป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ประกอบด้วยนิวคลีโอ ไทด์ (nucleotide) เรียงต่อกันมากมาย นิวคลีโอไทด์ มี 4 ชนิดคือ 1. นิวคลีโอไทด์ที่มีเบสอะดีนีน (adenine) 2. นิวคลีโอไทด์ทีมีเบสไทมีน (thymine) 3. นิวคลีโอไทด์ที่มีเบสไซโทซีน (cytosine) 4. นิวคลีโอไทด์ที่มีเบสกวานีน (guanine)

ปริมาณของอะดีนีน = ปริมาณของไทมีนเสมอ

ปริมาณของไซโทซีน = ปริมาณของกวานีนเสมอ

ส่วนประกอบของ DNA กลุ่มฟอสเฟต น้ำตาลดีออกซีไรโบส เบสไซโทซีนเบสอะดีนีน เบสกวานีน เบสไทมีน

ใน DNA ที่สมบูรณ์นั้นจะประกอบไปด้วยสองขาของทั้ง 4 แบบนี้ ในสองขาของ DNA นั้น A จะอยู่ตรงข้ามคู่กับ T อยู่เสมอ และ G จะอยู่ตรงข้ามคู่กับ C อยู่เสมอเช่นกัน ซึ่งแบบคู่ๆ เหล่านี้เป็นหน่วยวัดในการกำหนดขนาดของแต่ละส่วนของ DNA โครงสร้างนี้แสดงให้เห็นถึงกลจักรทางธรรมชาติในการทำซ้ำหรือลอกเลียนแบบของโมเลกุล DNA ซึ่งก็ปรากฏอยู่ในระหว่างการแบ่งเซลล์ โดยคู่ๆ เหล่านี้ถูกนำมาต่อกันกับขาทั้งสองของ DNA รวมกันเป็นปมและขั้นบันไดวน ซึ่งขั้นบันไดวนเหล่านี้หรือที่เรียกว่า ดับเบิ้ลฮีลิก (Double Helix) คือ รูปแบบธรรมชาติของ DNA ที่เราพบในนิวเครียสของเซลล์

1.4 ยีน คือ หน่วยพันธุกรรม ทำหน้าที่เป็นหน่วยของการถ่ายทอด และ ควบคุมลักษณะทางพันธุกรรม ลักษณะต่างๆ ที่สิ่งมีชีวิตถ่ายทอด จากพ่อแม่ไปสู่ลูกหลาน ยีน ตั้งอยู่ใน "โครโมโซม" โครโมโซม แท่งหนึ่ง ๆ จะมียีนอยู่จำนวนมาก และเนื่องจากโครโมโซมอยู่กันเป็นคู่ ยีนที่อยู่บนโครโมโซมจึงมีเป็นคู่ด้วยเช่นกัน ยีนควบคุมลักษณะที่สามารถสังเกตได้ง่าย เช่น ความสูง สีตา สีผิว สีผม และผมหยิก หรือตรง การที่คนบนโลกหน้าตาไม่เหมือนกัน เพราะมียีนที่ต่างกันนั่นเอง และการที่ ฝาแฝดแท้ มีหน้าตาเหมือนกันทุกประการยีนที่ควบคุมลักษณะพันธุกรรมบางอย่าง มี 2 ชนิด คือ ยีนเด่น และยีนด้อย

ยีน อยู่ในเซลล์ซึ่งเป็นส่วนย่อยของสิ่งมีชีวิต สิ่งมีชีวิตจะมียีนอยู่เป็นจำนวนมากขึ้นอยู่กับความสลับซับซ้อนของสิ่งมีชีวิตนั้น ยีน เป็นสารเคมีที่ เรียกว่า DNA (DNA-Deoxyribonucleic acid) ซึ่งการเรียงตัวของหน่วยย่อยนี้เป็นตัวกำหนดลักษณะทางพันธุกรรม ที่สามารถถ่ายถอดไปยังลูกหลานได้ เรียกว่า เบส เราคงเคยได้ยินบ่อยครั้งว่ายีนคือ หน่วยพันธุกรรม ที่ถ่ายทอดจากพ่อแม่ ไปสู่ลูกหลานได้ ยีนเป็นส่วนหนึ่งของ DNA ที่มีส่วนประกอบของเบสสี่ตัวเรียงราย กันอยู่ อาจอยู่บนโครโมโซม หรือส่วนอื่นใดของเซลล์ก็ได้ สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด จะมีมวลสาร DNA และจำนวนยีนแตกต่างกัน เช่น แบคทีเรีย มียีนประมาณ 4,000 ยีน แมลงหวี่ 20,000 ยีน พืชชั้นสูง 30,000-50,000 ยีน และ มนุษย์ประมาณ 100,000 ยีน เป็นต้น มวลสาร DNA และจำนวนยีนจึงเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต แต่ละชนิดพันธุ์ (species) ซึ่งเรียกกันทางวิชาการว่า จีโนม (genome) ดังนั้นจีโนมข้าวจึงเล็กกว่า จีโนมของมนุษย์ ยีนในสิ่งมีชีวิตอาจจัดเป็นสามกลุ่ม

1.4.1 ทำหน้าที่สร้างโปรตีน ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในโครงสร้าง และการทำปฏิกิริยาทางเคมี

1.4.2 ทำหน้าที่ กำกับ การทำงานของยีนตัวอื่น ที่จะกำหนดให้ทำหน้าที่ตรง ไหน และเมื่อใด (regulatory genes)

1.4.3 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุม ให้การใช้ ข้อมูลซึ่งเก็บอยู่ ใน DNA นั้น ได้ถูกใช้อย่างถูกต้อง

ยีนเด่น (Dominant) คือ ยีนที่สามารถแสดงลักษณะนั้นออกมาได้ แม้มียีนเพียงยีนเดียว เช่นยีนผมหยิกอยู่คู่กับยีนผมเหยียดแต่แสดงลักษณะผมหยิกออกมาแสดงว่ายีนผมหยิกเป็นยีนเด่น

ยีนด้อย (Recessive) คือ ยีนที่สามารถแสดงลักษณะให้ปรากฏออกมาได้ก็ต่อเมื่อบนคู่ของโครโมโซมนั้น ปรากฏแต่ยีนด้อย เช่น การแสดงออกของลักษณะผมเหยียด จะต้องมียีนผมเหยียดบนโครโมโซม

1.5 โครโมโซม (Chromosome)

โครโมโซม คือโครงสร้างที่พบอยู่ในนิวเคลียสของเซลล์แต่ละเซลล์ ในโครโมโซมมีโมเลกุลของข้อมูลที่จำเป็นต่อการสร้างโปรตีนชนิดหนึ่งที่ใช้ในการสร้าง และ ควบคุมเซลล์ ในสภาพปกติ โครโมโซมจะมีลักษณะเป็นเส้นยาว ๆ เล็ก ๆ ขดไปมา อยู่ในนิวเคลียส แต่เมื่อเซลล์จะเกิดการแบ่งตัวเพื่อสร้างเซลล์ใหม่ โครโมโซม จะหดตัวสั้นเข้าจนมีลักษณะเป็นแท่ง และอยู่กันเป็นคู่ ๆ โดยโครโมโซมแต่ละคู่จะมีขนาดและรูปร่างเหมือนกันบนโครโมโซมจะมี ยีน ซึ่งทำหน้าที่ถ่ายทอดและควบคุมลักษณะทางพันธุกรรมอยู่ ซึ่งโครโมโซม แท่งหนึ่ง ๆ จะมียีนอยู่จำนวนมาก และเนื่องจากโครโมโซมอยู่กันเป็นคู่ ยีนที่อยู่บนโครโมโซมจึงมีเป็นคู่ด้วยเช่นกัน

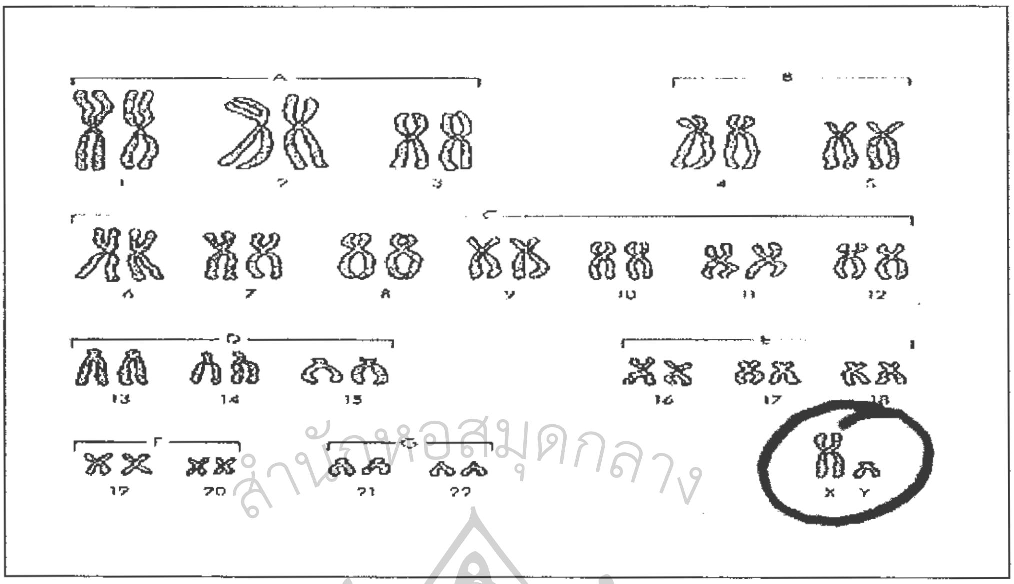
ในเซลล์สืบพันธุ์ของคนเราจะมีการลดจำนวนโครโมโซมลงครึ่งหนึ่ง ซึ่งเป็นกลไกหนึ่ง ที่ช่วยให้จำนวนชุดของโครโมโซมในเซลล์ต่างๆ คงที่ ไม่ว่าจะในพ่อ แม่ ลูก หลาน เหลน สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด จะมีจำนวนโครโมโซมแตกต่างกันไป จำนวนโครโมโซมนี้ต้องเป็นจำนวนที่แน่นอนและคงที่ เมื่อเซลล์ไข่ (n) กับสเปิร์ม (n) มาผสมกัน โครโมโซมจากเซลล์ทั้งสองจะมาจับกันเป็นคู่ และมีจำนวน 23 คู่ (2n) เหมือนเดิม (23 แท่ง+23 แท่ง = 46 แท่ง (23 คู่) นั่นคือเซลล์ใหม่ที่เกิดมาจะมีจำนวนโครโมโซมเท่าโครโมโซมของเซลล์ในร่างกายทั่วไป (2n) ถ้าไม่มีการลดโครโมโซมลงให้เหลือครึ่งหนึ่ง เซลล์ใหม่ที่ได้จะกลายเป็นเซลล์ที่มีจำนวนโครโมโซม 46 คู่ หรือ 92 แท่ง หากเป็นเช่นนี้ต่อไปในรุ่นลูก หลาน เหลน จำนวนชุดของโครโมโซมก็จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โครโมโซมในแต่ละรุ่นก็จะไม่เท่ากัน ซึ่งธรรมชาติไม่ยอมให้เป็นเช่นนั้น และทำไมต้องเป็นหญิง-

ชาย ต้องมาพิจารณาที่โครโมโซมอีกในจำนวนโครโมโซมทั้งหมด 23 คู่ ประกอบด้วยโครโมโซมร่างกายที่เรียกว่า ออโตโซม (autosome) 22 คู่ และโครโมโซมเพศ (sex chromosome)

1 คู่ โครโมโซมร่างกาย เป็นตัวบันทึกข้อมูลเอาไว้ แต่ในที่นี้ จะสนใจโครโมโซมร่างกาย คู่สุดท้ายที่เรียกว่า โครโมโซมเพศ ซึ่งเป็นโครโมโซมที่กำหนดความเป็นชายหรือหญิงในผู้ชาย โครโมโซมเพศ 1 คู่นั้น มีรูปร่างลักษณะและขนาดต่างกัน คือ X และ Y ให้สัญลักษณ์ XY เราจะเห็นว่า โครโมโซม Y คือ โครโมโซมที่มีขนาดเล็กที่สุด เมื่อเทียบกับโครโมโซมอื่น และมียีนอยู่จำนวนน้อย เช่น ยีนที่ควบคุมลักษณะเพศชาย ลักษณะที่มีขนอยู่บนใบหู เป็นต้น เดิมนักวิทยาศาสตร์เชื่อกันว่า โครโมโซม Y ไม่มีความสำคัญอะไรมาก ประกอบด้วยยีนจำนวนเพียงเล็กน้อยแค่ 40 ยีนเท่านั้น แต่จากการวิจัยเมื่อเร็วๆ นี้กลับพบว่าโครโมโซม Y มีศักยภาพมากกว่าที่นักวิทยาศาสตร์ประเมินไว้ อีกทั้งมียีนอยู่บนแท่งโคโมโซมถึง 78 ยีนด้วยกัน ในผู้หญิง โครโมโซมเพศ 1 คู่ มีรูปร่างลักษณะและขนาดเท่ากัน คือ X และ X ให้สัญลักษณ์ XX โครโมโซม X มีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซม Y มียีนจำนวนมากที่ควบคุมลักษณะของเพศหญิง

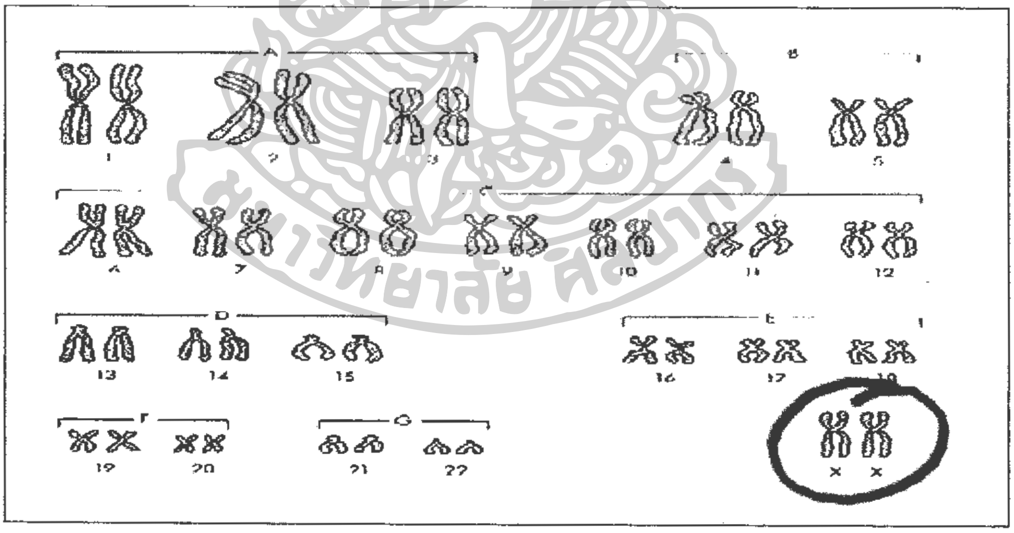
ในเพศชายสเปิร์มมีโครโมโซมเพศแท่งเดียว (n) คือ ไม่เป็น X ก็เป็น Y ดังนั้นเพศชายจึงสามารถสร้างสเปิร์มที่มีโครโมโซมได้ 2 แบบ สเปิร์มที่มีโครโมโซม X มีขนาดตัวอ้วนใหญ่หัวเป็นรูปไข่ เคลื่อนไหวได้ช้า แต่จะทนต่อสภาวะเป็นกรดในช่องคลอด ขณะที่สเปิร์ม Y มีขนาดตัวเล็กกว่า หัวกลม เคลื่อนไหวแหวกว่ายได้รวดเร็วกว่าแต่อายุสั้นและมีความทนทานน้อยกว่า คือจะตายเมื่อในช่องคลอดมีสภาวะเป็นกรด โดยทั่วไป ในการหลั่งน้ำอสุจิจะมีสเปิร์มทั้ง 2 ชนิดรวมกันประมาณ 200-400 ล้านตัว โดยมีสเปิร์ม Y มากกว่าสเปิร์ม X ประมาณ 2 เท่า ในเพศหญิงเซลล์ไข่มีโครโมโซมเพศแบบเดียวกันคือ X เท่านั้น เซลล์ไข่นี้ผลิตมาจากรังไข่ ในแต่ละรอบเดือนจะมีเซลล์ไข่จำนวนหลายเซลล์พัฒนาขึ้นพร้อมๆกัน แต่มีเพียงเซลล์เดี่ยวเท่านั้นที่หลุดออกจากรังไข่ข้างใดข้างหนึ่งซึ่งเราเรียกว่า "การตกไข่" ปัจจุบันเรายังไม่ทราบว่าทำไมการตกไข่จึงเกิดขึ้นเพียงครั้งละฟองเดียว เซลล์ไข่ที่หลุดออกมาจากรังไข่จะเดินทางสู่ท่อนำไข่เพื่อไปปฏิสนธิกับอสุจิต่อไป และหากไม่มีการปฏิสนธิเกิดขึ้น เซลล์ไข่ก็จะสลายตัวไปภายใน 24-36 ชั่วโมง

เมื่อสเปิร์มสามารถวิ่งไปถึงไข่ที่ปล่อยออกจากรังไข่ได้ก็จะเกิดการปฏิสนธิ (การที่จะทำให้สเปิร์ม X หรือ Y วิ่งไปถึงไข่นั้นก็จะขึ้นอยู่กับสภาวะสิ่งแวดล้อมและจังหวะโอกาสในช่วงของการมีเพศสัมพันธ์) โครโมโซมร่างกายแต่ละแท่งตั้งแต่ 1-22 ทั้งในไข่และสเปิร์มจะวิ่งจับคู่ของตนเองและโครโมโซมเพศก็จะจับคู่กันด้วย ถ้าสเปิร์ม Y ผสมกับเซลล์ไข่ X ทารกที่เกิดมาจะเป็นเพศชาย (เพราะเกิดจาก X+Y=XY) ลักษณะแตกต่างกันระหว่างเพศหญิงและเพศชาย มีออโตโซม 44 เส้นกับโครโมโซม x และโครโมโซม y คือ 22 + x กับ 22 + y



ภาพที่ 8 โครโมโซมเพศชาย

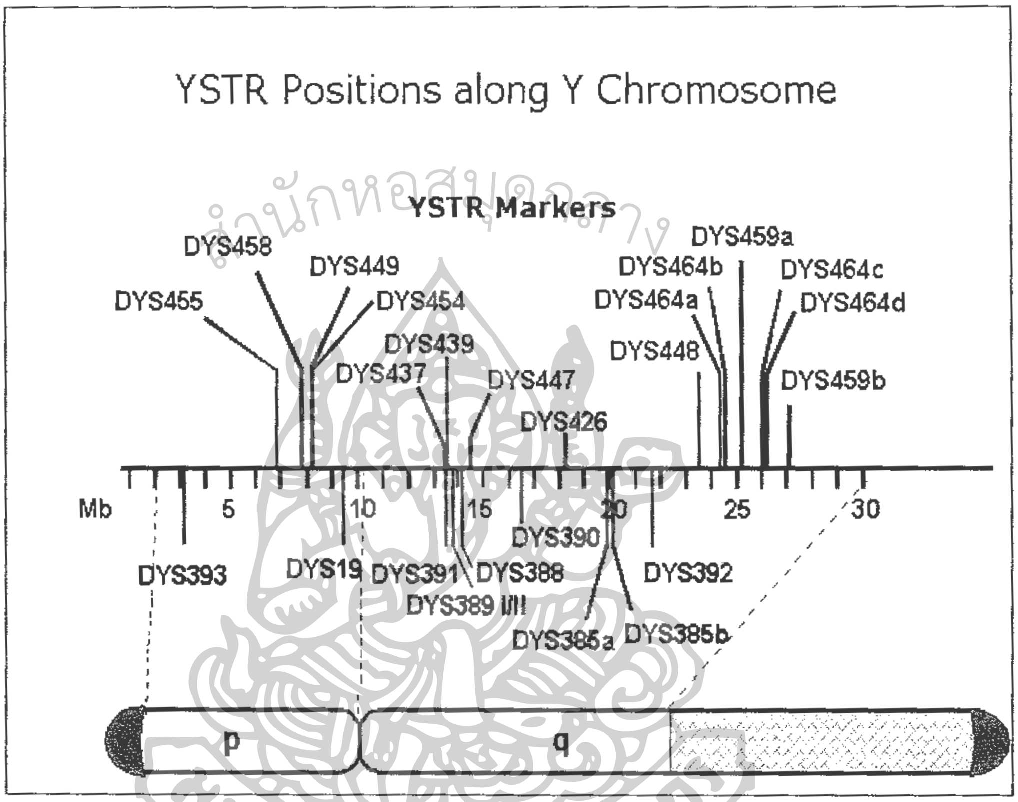
ที่มา: Openlearn and Creative Commons Licence, DNA [Online], Accessed 16 January 2011.Available from http:// :pvcjirapot.brinkster.net/page41.html



ภาพที่ 9 โครโมโซมเพศหญิง

ที่มา: Openlearn and Creative Commons Licence, DNA [Online], Accessed 16 January 2011.Available from http:// : pvcjirapot.brinkster.net/page41.html

เพศหญิง มีออโตโซม 44 เส้น กับโครโมโซม x อีกคู่หนึ่ง คือ 22 + x ถ้าสเปิร์ม X ผสมกับเซลล์ไข่ X ทารกที่เกิดมาจะกลายเป็นเพศหญิง (เพราะเกิดจาก X+X=XX) เพศหญิง มีออโตโซม 44 เส้น กับโครโมโซม x อีกคู่หนึ่ง คือ 22 + x จะเห็นได้ว่า การที่ลูกจะเป็นชายหรือหญิงนั้นขึ้นอยู่กับโครโมโซมเพศที่ได้รับจากพ่อ เนื่องจาก แม่ให้ได้เฉพาะโครโมโซม X ถ้าลูกได้รับโครโมโซม Y จากพ่อก็จะเป็นลูกชาย ถ้าได้รับโครโมโซม X จากพ่อก็จะเป็นลูกสาว



ภาพที่ 10 Y-Chromosome

ที่มา: Openlearn and Creative Commons Licence, DNA [Online], accessed 16 January 2011.Available from www.bio.psu.edu/People/Faculty/Nei/Lab/software.htm

ในการทำความเข้าใจการตรวจพิสูจน์DNAแบบง่ายๆ นั้น อาจเปรียบเทียบได้กับการที่ข้อมูลทางพันธุกรรมได้ถูกจัดเก็บไว้ในDNAในลักษณะที่เหมือนกันกับข้อมูลที่ถูกพิมพ์ไว้ในหนังสือ มาตัดออกเป็นประโยคและพันทั้งหมดต่อหัวต่อหางกันไปเรื่อยๆ ก็จะได้ข้อมูลเท่าๆ กันกับที่มีอยู่ในDNAทั้งหมดรวมกันจากแต่ละเซลล์ในร่างกาย โดยข้อมูลในDNAนั้นถูกจัดเก็บเป็น

ระบบ ซึ่งทางคณะกรรมการการจัดแผนที่ยีนมนุษย์ (Human Gene Mapping Committee) ได้กำหนดระบบการเรียกชื่อยีนมนุษย์ขึ้น ตัวอย่างเช่น ข้อมูลในรายงานทางพันธุกรรมว่าเป็นตำแหน่งที่ D4S139 ก็สามารถบอกได้ทันทีว่า เป็นโครโมโซมตัวที่ 4 และเป็น DNA ตัวที่ 139 ส่วนข้อแตกต่างระหว่างข้อมูลที่ถูกจัดเก็บในเซลล์กับในหนังสือ คือในเซลล์นั้นมีข้อมูลที่เหมือนกันอยู่ 2 ชุดด้วยกัน ชุดหนึ่งได้มาจากแม่ ส่วนอีกชุดหนึ่งได้มาจากพ่อ ซึ่งข้อมูลทั้งสองชุดนี้ได้มาตั้งแต่ตอนปฏิสนธิระหว่างน้ำอสุจิกับไข่ ดังนั้นเซลล์ทุกๆ เซลล์ในตัวเด็กจึงเจริญเติบโตมาจากเซลล์ปฏิสนธิ ซึ่งครึ่งหนึ่งได้มาจากแม่และอีกครึ่งหนึ่งได้มาจากพ่อ ดังนั้นจึงทำให้สามารถพิสูจน์ที่มาของพ่อและแม่ของมนุษย์ได้จากการตรวจ DNA ในการตรวจ DNA นั้นสามารถทำได้ 2 วิธีด้วยกัน กล่าวคือ เทคนิค อาร์แอลเอฟพี (RFLP) ซึ่งค้นพบโดย เอ็ดเวิร์ด เซาร์เทอน (Edward Southern)

นักเคมีชีวภาพ ชาวสก็อตแลนด์ ในช่วงทศวรรษที่ 1970 และเทคนิค PCR ซึ่งค้นพบโดย แครี่ มัลลิส (Karry Mullis) ในขณะที่ทำงานให้กับ บริษัท แคลิฟอเนียร์ ไบโอเทคโนโลยี ในช่วงทศวรรษที่ 1980 ทั้งสองเทคนิคใช้วิธีการแยกลำดับ DNA ที่แตกต่างกัน และบันทึกไว้ในแบบที่สามารถมองเห็นได้ ซึ่งเทคนิค RLFP จะสามารถแสดงผลได้ชัดเจนกว่า เทคนิค PCR แต่ว่าต้องใช้จำนวนตัวอย่างมากกว่า และใช้ระยะเวลานานกว่ามาก ซึ่งเทคนิค RLFP ใช้ตัวอย่างถึง 20–50 นาโนกรัม และใช้ระยะเวลานานหลายสัปดาห์ ในขณะที่เทคนิค PCR ใช้ตัวอย่างเพียง 2 นาโนกรัม และใช้ระยะเวลาไม่นาน ทั้งนี้การกำหนดว่าจะใช้เทคนิคใดขึ้นอยู่กับตัวอย่างที่ได้มา ถ้าหากเป็นตัวอย่างที่คุณภาพดีและใหม่ ผู้วิจัยมักจะใช้เทคนิค RLFP ซึ่งจะได้ผลที่ชัดเจนแน่นอนกว่า ในการแปลและวิเคราะห์ข้อมูลของ DNA นั้นจำเป็นต้องใช้วิธีการทางสถิติ พันธุกรรมประชากร และทฤษฎีความน่าจะเป็นมาประยุกต์ใช้กับผลการวิเคราะห์ที่ได้จากห้องทดลอง โดยหลักการแล้วนักวิจัยจะทดสอบว่าตัวอย่างที่ได้จากคนที่ 1 กับ คนที่ 2 ซึ่งอาจจะเป็นพ่อกับลูกกันมาเปรียบเทียบโดยการสุ่มตัวอย่างกับประชากรทั่วไป ซึ่งโดยหน่วยวัดโดยทั่วไปแล้วจะแสดงให้เห็นถึง 1 ต่อ 5,000,000 คน ซึ่งหมายความว่า ในจำนวนคน 5,000,000 คน มีเพียงสองตัวอย่างนี้เท่านั้นที่มีลักษณะทางพันธุกรรม DNA เหมือนกัน ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้ว่ามีโอกาสเป็นพ่อ-ลูกกัน ซึ่งในขณะที่การตรวจพิสูจน์โดยตัวอย่างเลือดที่ทำกันโดยทั่วไปนั้นสามารถบอกได้เพียงหน่วย 1 ต่อ 200 เท่านั้น โดยสรุปแล้วการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ของบุคคลทางพันธุกรรม DNA นั้น เป็นวิธีการทางวิทยาศาสตร์ที่ได้รับการยอมรับอย่างแพร่หลายทั่วโลก ซึ่งเป็นวิธีการตรวจหาความจริงอย่างมีหลักการและขั้นตอนที่รัดกุม จึงสามารถอ้างได้ว่าเป็นหลักฐานแบบหนึ่งซึ่งสามารถยืนยันถึงความสัมพันธ์ของบุคคลได้เป็นอย่างดี

2. ความรู้พื้นฐานเรื่องการตรวจพิสูจน์ DNA

2.1 เนื้อเยื่ออวัยวะของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด จะประกอบด้วยเซลล์มากมาย ในร่างกายมนุษย์นั้น มีเซลล์รวมกันถึง 300 ล้านเซลล์

2.2 เซลล์ทุกเซลล์ในร่างกายมนุษย์ ประกอบด้วยนิวเคลียสและไซโตพลาสซึม ยกเว้นแต่เม็ดเลือดแดง ที่ไม่มีนิวเคลียส

2.3 ในนิวเคลียสมีโครงสร้างสำคัญซึ่งบรรจุสารพันธุกรรมเรียกว่า โครโมโซม มนุษย์จะมี โครโมโซม 46 อัน อยู่เป็นคู่ๆ รวม 23 คู่ แยกเป็นโครโมโซมร่างกาย 22 คู่ (Autosome) และเป็น โครโมโซมเพศ 1 คู่ (Sex chromosome)

2.4 โครโมโซมในเซลของร่างการมนุษย์เกิดจากการผสมกัน ระหว่างไข่จากแม่ ซึ่งจะพาโครโมโซมมา 23 อัน เมื่อผสมกันเป็นตัวอ่อน ก็จะรวมกันเป็น โครโมโซม 23 คู่

2.5 โครโมโซมมีส่วนประกอบของสารพันธุกรรม DNA ขดจับตัวกับโปรตีน โดย DNA จะมีโครงสร้าง พื้นฐาน เป็นเส้นคู่ บิดเป็นเกลียว

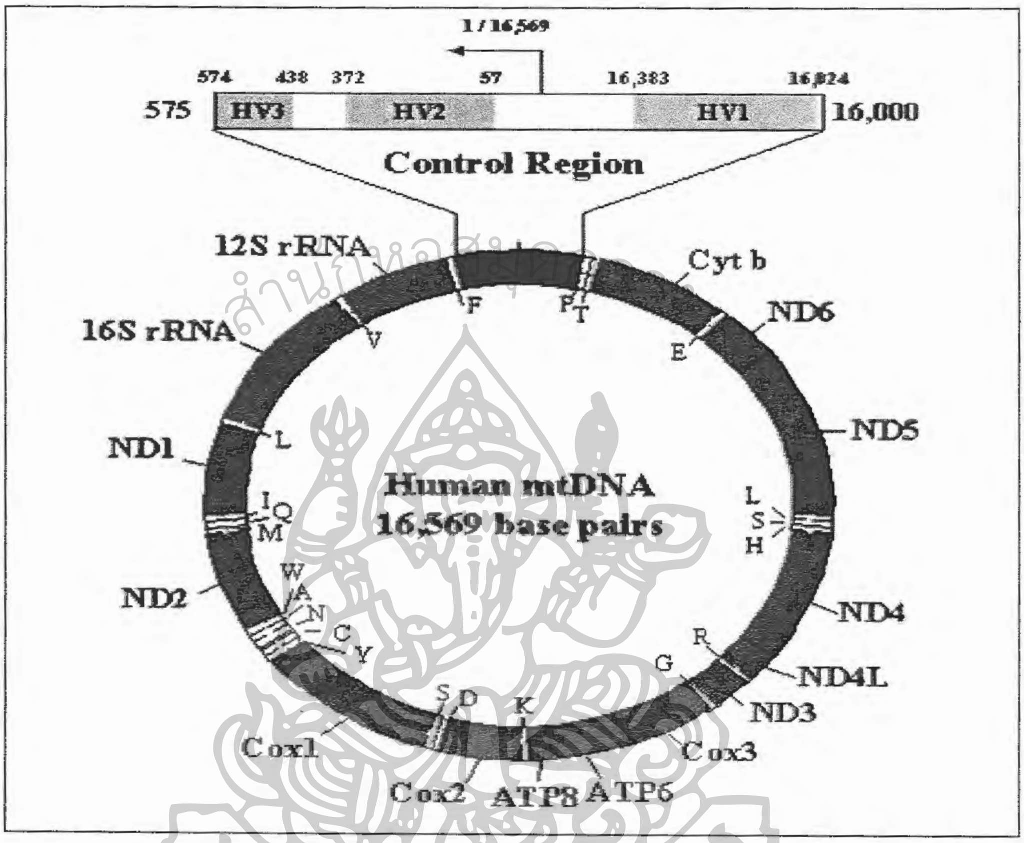
2.6 สารพันธุกรรม DNA ประกอบด้วยการจับตัวของสารประกอบทางเคมี 4 ชนิด การเรียงตัว ของเบส (Base) เบสเหล่านี้ เปรียบเสมือนเป็นรหัสข้อมูลภายในเซลล์

2.7 สารพันธุกรรมที่มีในโครโมโซมจะเป็นสองส่วน ส่วนแรกทำหน้าที่ควบคุม การทำงาน ในการสร้างโปรตีน เพื่อนำไปใช้ในการทำงานของเซลล์ต่าง ๆ ในอวัยวะของร่างกาย ส่วนนี้เรียกว่า ยีน (Gene) ซึ่งจะมีอยู่เพียง 10% ของจำนวน DNA ในนิวเคลียสส่วนที่สองไม่ได้ทำหน้าที่อะไรเป็นพิเศษ แต่มีมากถึง 90% เรียกว่า (Stutters) ส่วนนี้ มีความ หลากหลาย ของการเรียงตัวของเบส นักวิทยาศาสตร์ค้นพบว่า การเรียงตัวของเบสในร่างการของมนุษย์แต่ละคนนั้น จะเรียงตัวไม่ซ้ำกัน เราจึงเอาคุณสมบัติข้อนี้มาพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล ส่วนการเรียงตัวกันของเบสในส่วนที่เป็นยีนนั้น อาจจะซ้ำกันได้ เพราะเป็นส่วนที่ควบคุม หน้าที่ต่าง ๆ ของอวัยวะในร่างกาย ซึ่งมีไม่มากนัก เช่น ยีนควบคุมสีตา ทำให้ตามีสีน้ำตาล สีฟ้า เป็นต้น การเรียงตัว ของเบสเหล่านี้ จึงไม่สามารถนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลได้

2.8 สารพันธุกรรม DNA ในส่วน Stutters เปรียบเสมือนลายเซ็นต์ ซึ่งต่างก็มี ลักษณะเฉพาะตัว โอกาสที่เบส Stutters จะซ้ำกันได้มีเพียงหนึ่งในพันล้านคนเท่านั้น

ในเซลล์ของมนุษย์มี DNA อยู่สองส่วนคือ อยู่ในโครโมโซมในนิวเคลียส ซึ่งถ่ายทอด มาจาก พ่อและแม่ อย่างละครึ่ง อีกส่วนอยู่ในโครงสร้างที่เรียกว่า ไมโตคอนเดรีย ซึ่งอยู่ในไซโตพลาสซึม DNA ส่วนนี้ถ่ายทอด มาจากแม่ ร้อยเปอร์เซ็นต์ เราจึงใช้ DNA ส่วนนี้ พิสูจน์บุคคลว่า มีสายพันธุ์ทางมารดาเดียวกัน

ตัวอย่างเช่น ครอบครัวนาย ก กับนาง ข มีลูกสาวหนึ่ง ลูกชายหนึ่งคน มีหลานจากลูกสาวหนึ่งคน และหลานจากลูกชายหนึ่งคน DNA ในไมโตคอนเดรีย ของนาง ข ลูกชาย ลูกสาว หลานชาย หญิงที่เกิดจากลูกสาว จะเหมือนกันทุกประการ ขณะที่หลานชาย หญิง ที่เกิดจากลูกชายจะมี DNA ในไมโตคอนเดรียเหมือนกับภรรยาของลูกชาย



ภาพที่11 โครงสร้าง Mitochonrion

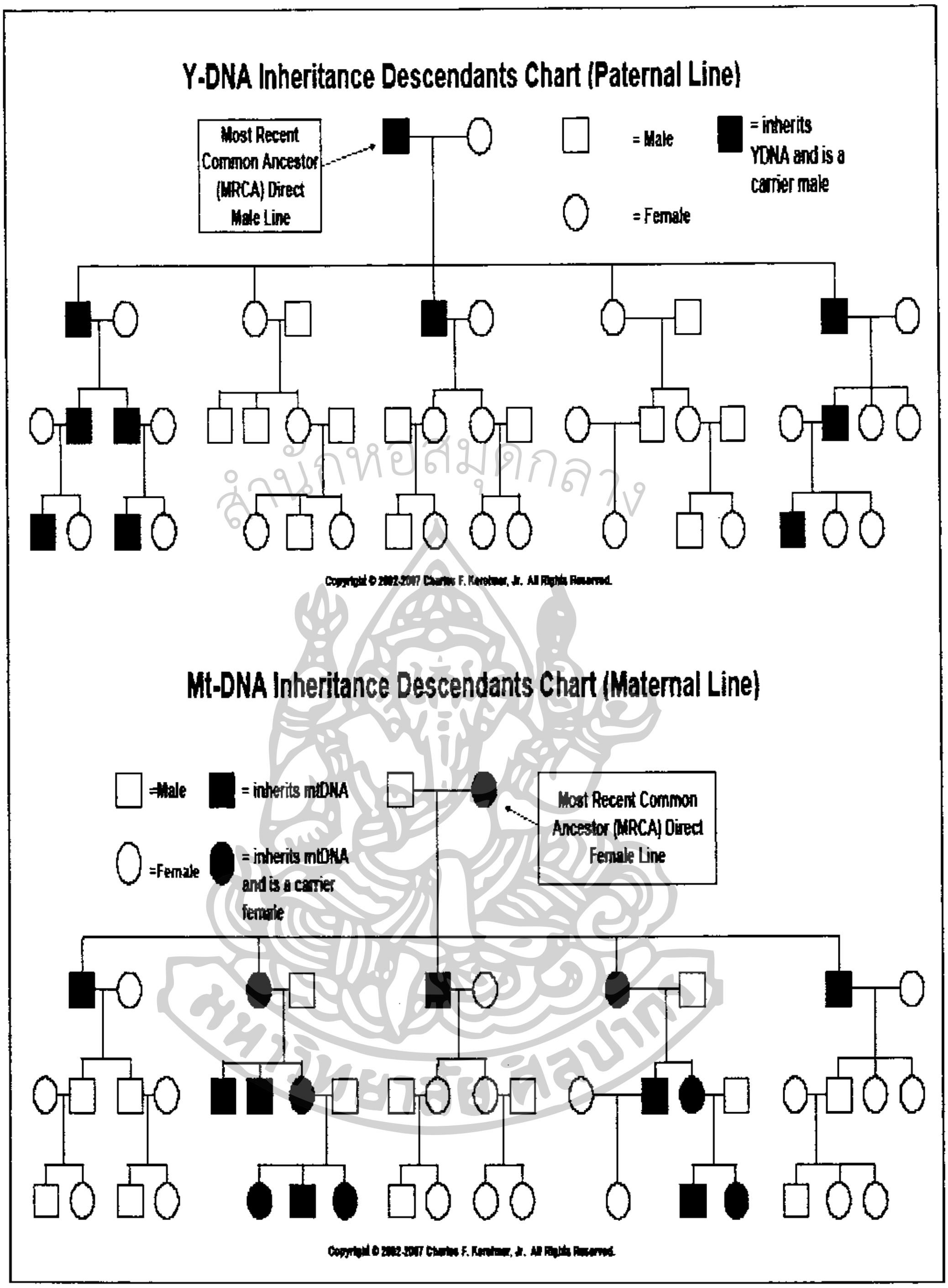
ที่มา: Charles F.and Kerchner, Jr. All Rights Reserved [Online], accessed 16 January 2011.Available from www.bio.psu.edu/People/Faculty/Nei/Lab/software.htm

MtDNA ในเซลล์เพศหญิงในระยะเต็มวัยจะพบจำนวน มากกว่า 50,000 โมเลกุลและมีมากกว่า 100 ในสเปอร์มของเพศชาย ในคดีที่เกี่ยวกับนิติเวช mtDNA เพียง 5,000โมเลกุลก็สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ได้

การที่มีจำนวนของ mtDNA มากจะส่งผลดีต่อการตรวจพิสูจน์ ตัวอย่างที่มีการเสื่อมสลายของDNAมาก่อนแล้ว mtDNA ที่พบในเซลล์จะได้รับมาจากมารดาเท่านั้น การตรวจวิเคราะห์ mtDNA จึงเป็นการตรวจพิสูจน์สายพันธุ์ มารดาเท่านั้น

บุคคลที่กำเนิดจากสายพันธุ์มารดาเดียวกันจะมี mtDNA ที่เหมือนกันจากการค้นพบตัวอย่างของเซลล์ที่มีการเสื่อมสลายของ DNAไปบ้างแล้วทำให้ซึ่งมีปริมาณ DNA ที่มีอยู่จำนวนน้อย ส่วนในเซลล์สเปริมส์ DNA จาก mtDNA จะสลายตัวไปทันทีที่มีการเข้าผสมกับไข่ของสเปริมส์ ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ไม่สามารถตรวจพบ mtDNA ของเพศชายหลังจากที่เซลล์ไข่ได้รับการผสมแล้ว ด้วยเหตุผลดังกล่าวนี้ทำให้เราสามารถตรวจได้เฉพาะสายพันธ์ทางมารดาในชีววัตถุ เลือด กระดูก เนื้อเยื่อต่างๆ เส้นผม ที่ได้มา และการตรวจจากชีววัตถุเหล่านี้นำไปสู่การสืบค้นบุคคลที่มีความสัมพันธ์ครอบครัวเดียวกันหรือมารดาเดียวกัน จนมาถึงรุ่นปัจจุบันจากผู้มีชีวิตอยู่ไปเชื่อมโยงกับผู้ตายไปแล้ว ช่วงของตำแหน่ง DNA ที่นำมาศึกษา คือตำแหน่ง D Loop HV1, HV2, HV3 นำตำแหน่งที่พบอ่านเทียบกับ Anderson reference sequence

สารพันธุกรรม DNA ในโครโมโซมส่วนที่เป็น Stutters นั้น เป็นคุณสมบัติเฉพาะบุคคล เราจึงใช้ส่วนนี้ในการพิสูจน์บุคคลได้แม่นยำที่สุด ดังนั้นประโยชน์ที่จะได้จากการตรวจ DNA fingerprint ของโครโมโซม และไมโตคอนเดรีย จึงมีวัตถุประสงค์ไม่เหมือนกัน



ภาพที่12 รูปแบบการรับสารพันธุ์กรรมของ mtDNA และ Y-Chromosome

ที่มา : Charles F.and Kerchner, Jr. All Rights Reserved., accessed 16 January 2011.Available from www.bio.psu.edu/People/Faculty/Nei/Lab/software.htm

3. กระบวนและขั้นตอนในการตรวจพิสูจน์ DNA จากวัตถุพยานเทคนิคพื้นฐานทางอณูชีววิทยา

การสกัด DNA (DNA Extraction) คือการสกัดเอา DNA ซึ่งส่วนใหญ่ร้อยละ 99% อยู่ภายใน nucleus ของเซลล์ออกมา เพื่อนำมาใช้ศึกษาในสิ่งที่ต้องการต่อไป เราสามารถจะสกัดสารพันธุกรรม (DNA) ได้จากตัวอย่างเนื้อเยื่อหรือเซลล์ทุกชนิด แต่จะต้องเป็นเซลล์ที่มี nucleus เท่านั้น โดยทั่วไปนิยมสกัด DNA จากตัวอย่างเลือด (5-10 ml) หรือจากเนื้อเยื่อที่ต้องการตรวจอื่นๆ เช่น กล้ามเนื้อ, ผิวหนัง เป็นต้น

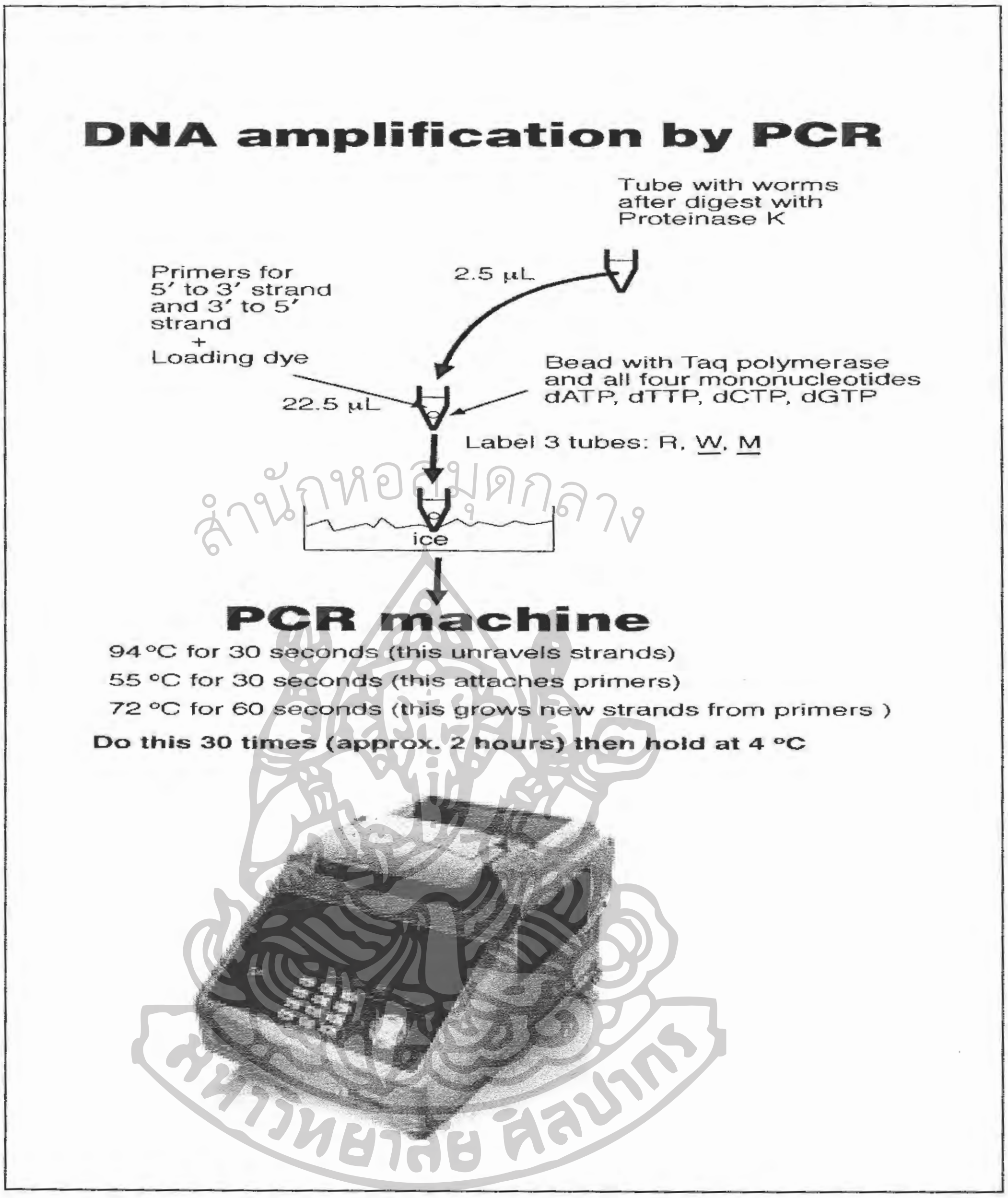
การสกัด DNA ของเซลล์ทำได้โดยนำเนื้อเยื่อนั้นมาตัดให้เป็นชิ้นที่เล็กที่สุดเท่าที่จะทำได้ จากนั้นนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ proteinase K และ sodium dodecyl sulfate (SDS) ซึ่งทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ และเยื่อหุ้ม nucleus แตกออก DNA จะถูกปล่อยออกจาก nucleus มาอยู่ในสารละลายนั้น จากนั้นนำสารละลายมาปั่น เพื่อแยกเอาเศษของเซลล์ออก DNA จะละลายอยู่ในส่วนน้ำ หลังจากนั้นจึงนำมาตกตะกอนด้วยเกลือและ alcohol ต่อไป

3.1 เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction หรือ (PCR) เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณDNAโดยอาศัยหลักการ DNA Replication ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สาย DNA สายใหม่ จาก DNA ต้นแบบในหลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้นและได้ DNA สายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่า เทคนิคนี้พัฒนาขึ้นเมื่อปี พ.ศ. 2528 โดย Kary Mullis และคณะแห่งบริษัท CetusCorporation จุดเด่นของเทคนิค PCR คือ สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้อย่างเฉพาะเจาะจงโดยมีขั้นตอนการทำงานน้อยและใช้เวลาน้อย จนถึงปัจจุบันนี้เทคนิค PCR ได้รับการปรับปรุงและพัฒนาในหลาย ๆ ด้านจนกระทั่งได้รับการยอมรับว่าเป็นเทคโนโลยีที่สำคัญมากต่องานด้านอณูชีวโมเลกุล สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งกับงานวิจัยทางชีวโมเลกุลและพันธุวิศวกรรม เช่น การเพิ่มปริมาณยีน (gene cloning) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน(gene sequencing) การสร้าง DNA ติดตาม (DNA probe) และการวิจัยประยุกต์

เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA (PCR machine)

เครื่อง Thermal cycler หรือ PCR machine เป็นเครื่องที่จำเป็นในการทำ PCR ซึ่งเครื่องนี้มีอยู่หลายแบบและหลายระบบขึ้นกับการออกแบบและการคิดค้นของบริษัทผู้ผลิต ข้อสำคัญคือต้องสามารถปรับเปลี่ยนอุณหภูมิได้เป็นขั้นตอนตามที่ตั้งไว้และทำงานหมุนเวียนกันหลาย ๆ รอบได้ตั้งโปรแกรมการทำงานได้และการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ในแต่ละขั้นตอนใช้ระยะเวลาไม่นานนัก ระยะเวลาที่ใช้แต่ละขั้นคือ denaturing annealing และ extension อยู่ในช่วง 15 วินาที ถึง 10 นาที ดังนั้นการเพิ่มปริมาณ DNA โดยวิธี PCR 25-40 รอบ จะใช้เวลาประมาณ 1.5-5 ชั่วโมง



ภาพที่ 13 PCR System: ระบบ Applied Biosystems PCR

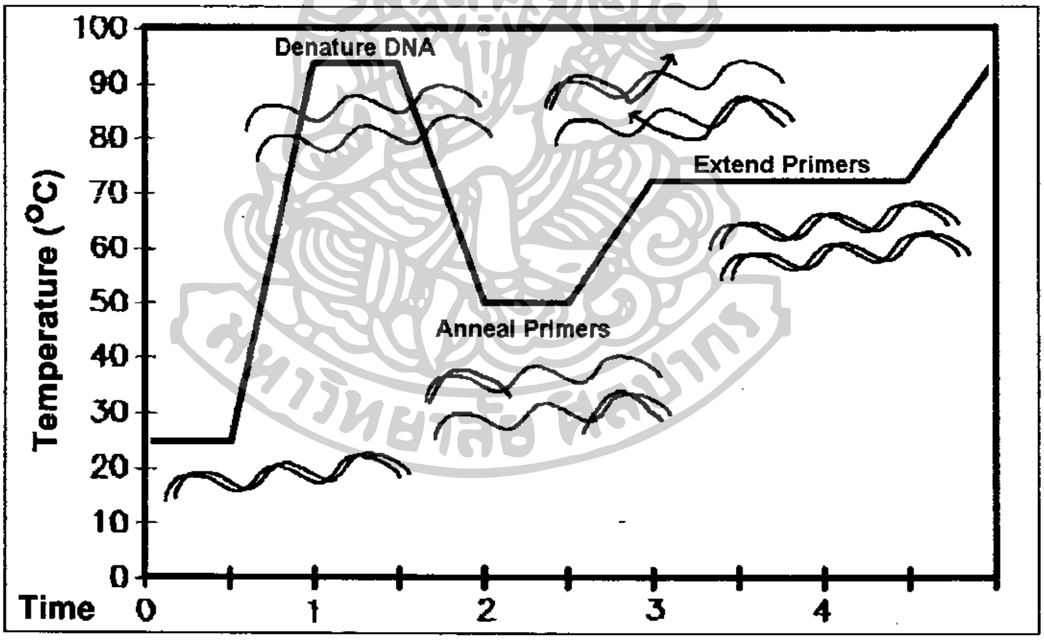
ที่มา Charles F.and Kerchner, Jr. All Rights Reserved. accessed 16 January 2011.Available from, http://www.wormclassroom.org/ce/Kahn/DNA%20amplification%20by%20PCR.jpg

GeneAmp (R) PCR System 9700: หลักของคุณภาพและความมีประสิทธิภาพ ที่เริ่มต้นด้วยวงจรความร้อน TC1 เครื่องแรกของแอพพลายด์ ไบโอซิสเต็มส์ในปี พ.ศ. 2531 นั้น ยังคงความ

ต่อเนื่องด้วย GeneAmp (R) PCR System 9700 ที่สามารถไว้วางใจได้ เทคโนโลยี GeneAmp (R) PCR System 9700 ได้รับการออกแบบที่เฉพาะเจาะจงสำหรับการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม (amplification of nucleic acids) ระบบที่สมบูรณ์แบบดังกล่าวจะประกอบด้วยโมดุลพื้นฐานชุดหนึ่งและหนึ่งในโมดุล sample block จำนวนมากที่สามารถแลกเปลี่ยนระหว่างกันได้ เทคโนโลยี 96-well GeneAmp (R) PCR System 9700 ได้รับการออกแบบสำหรับใช้กับท่อที่ทำให้เกิดปฏิกริยา (reaction tube) ขนาด 0.2 ml หรือจานทำปฏิกริยา (reaction plate) แบบ 96-well สำหรับแอพพลิเคชั่น PCR ประจำทั้งหมด

3.2 หลักการของ PCR

ใช้หลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์DNA สายใหม่จากสายDNA ที่เป็นต้นแบบหนึ่งสายด้วยเอนไซม์ DNA poloymerase ซึ่งใช้กันอยู่ทั่วไปในการติดฉลากDNA และการศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบส แต่ PCR สามารถสังเคราะห์DNAได้คราวละ 2 สายพร้อมกัน โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) 1 คู่ ปฏิกิริยา PCR มี 3 ขั้นตอน และหมุนเวียน ต่อเนื่องกันไป ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน



ภาพที่ 14 PCR System

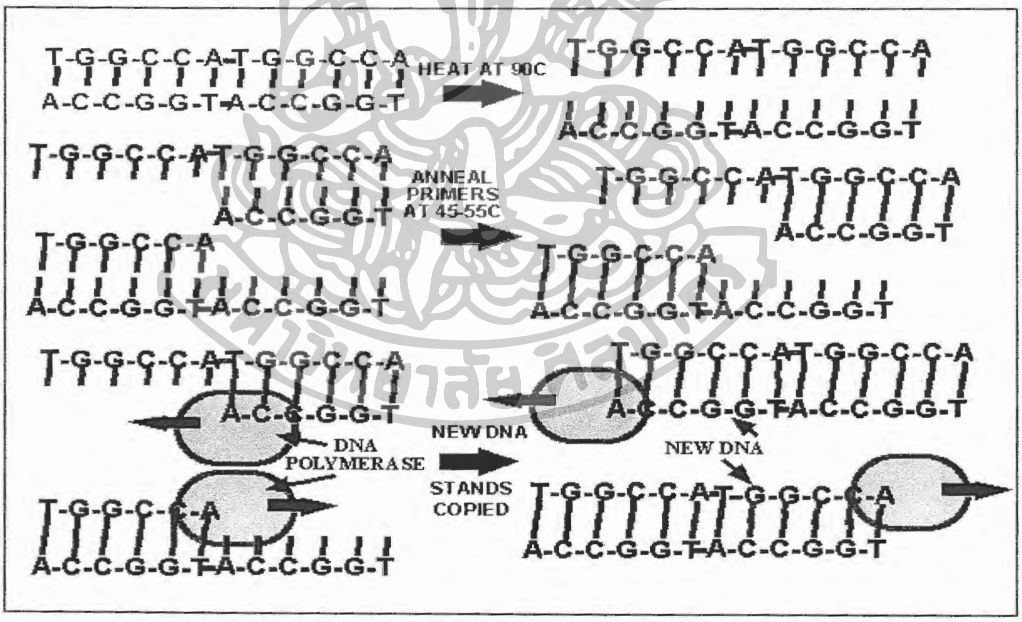
ที่มา : Charles F.and Kerchner, Jr. All Rights Reserved, accessed 20 January 2011.Available from, http://www.wormclassroom.org/ce/Kahn/DNA%20amplification%20by%20PCR.jpg

ขั้นแรก เรียกว่า denaturing เป็นการแยกสาย DNA ที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูง 92-95°C

ขั้นที่สอง เรียกว่า annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงและจัดให้ไพรเมอร์ ซึ่งเป็นดี เอ็นเอ สายสั้น ๆ (ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ จำนวน 14-13 เบส) ที่มีลำดับ เบสเป็นคู่สมกับ DNA ที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน ซึ่งนิยมใช้อุณหภูมิในช่วง 37-60 °C

ขั้นที่ 3 เรียกว่า extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์DNAสายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 5 ของไพรเมอร์ ตามข้อมูลบน DNA ที่เป็นต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของเอ็นไซม์ DNA โพลิเมอร์เรส (DNA polymerase) ซึ่งเอ็นไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72-75 °C เอนไซม์ DNA โพลิเมอเรสที่ใช้ควรจะคง คุณสมบัติอยู่ได้ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยา ตลอดทั้งสามขั้นตอน

จากขั้นตอนที่ 1-3 ซึ่งนับเป็นจำนวน 1 รอบ (one cycle) จะให้ผลผลิตเป็น DNA สายคู่ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับ DNA ที่เป็นต้นแบบเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า เมื่อจัดให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่จากขั้นที่ 1 ถึง 3 หมุนเวียนไปอีกหลาย ๆ รอบจะเพิ่มปริมาณDNAได้ โดยปฏิกิริยา 20 รอบ สามารถเพิ่มปริมาณสาร DNA ไม่ได้น้อยกว่า 100,000 เท่า



ภาพที่ 15 แสดงการเพิ่มปริมาณDNA ระบบ PCR System

ที่มา : Charles F.and Kerchner, Jr. All Rights Reserved. accessed 20 January 2011.Available from, http://www.wormclassroom.org/ce/Kahn/DNA%20amplification%20by%20PCR.jpg

สารเคมีที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยา PCR

เนื่องจากการทำ PCR เป็นการสร้างสายDNA สายใหม่ในหลอดทดลอง จึงต้องมีการเติมสารเคมีและสารตั้งต้นที่เกี่ยวข้อง เพื่อใช้ในการนำมาสร้างเป็นDNAสายใหม่ สารเคมีที่ต้องใช้ปฏิกิริยา PCR มีดังต่อไปนี้

1. Deoxynucleotides (dNTPs) เป็นนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นหน่วยย่อยสำหรับนำไปสังเคราะห์DNAสายใหม่

2. DNA polymerase เป็นเอนไซม์สำหรับสังเคราะห์DNAให้ช่วยเร่งปฏิกิริยาเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์ใหม่เข้ากับไพรเมอร์

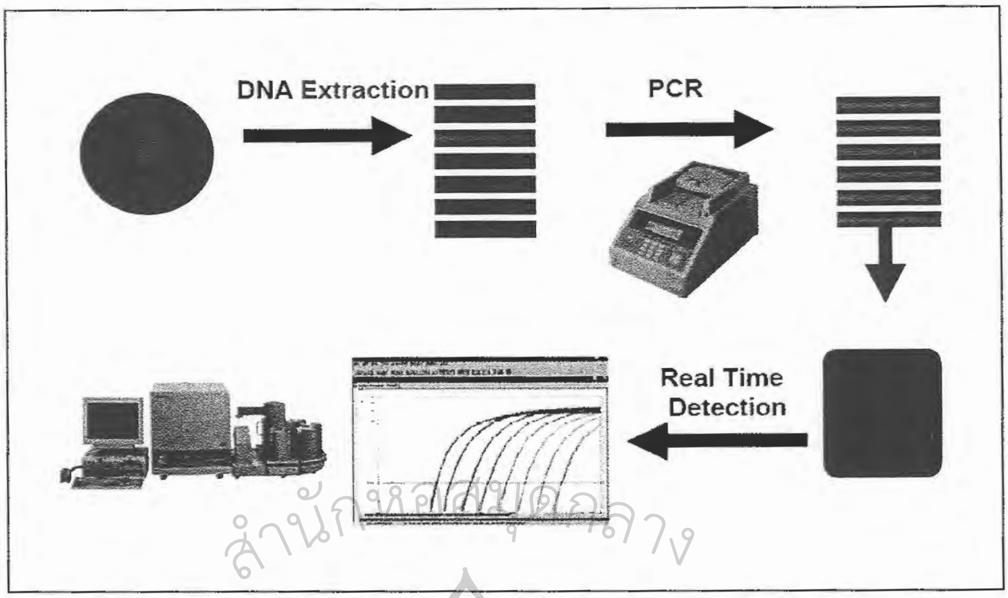
3. Primer เป็นDNAเริ่มต้นสายสั้น ๆ ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับDNAที่เป็นต้นแบบของการสังเคราะห์ ในการทำ PCR จึงต้องทราบลำดับเบสของDNAที่ต้องการจะเพิ่มจำนวน เพื่อใช้ในการสร้างไพเมอร์จำเพาะ

4. PCR buffer เป็นสารละลายที่ควบคุมสภาวะของการทำปฏิกิริยาให้เหมาะสม เช่น pH และเกลือต่าง ๆ ซึ่งจะต้องมีอนุมูลแมกนีเซียม (Mg^{++}) อยู่ด้วย

5. Template คือDNAต้นแบบหรือยีนส่วนที่ต้องการเพิ่มปริมาณ หรือเป็นตัวอย่างDNA ที่ต้องการนำมาตรวจหาDNAจำเพาะ

สารเคมีที่เป็นส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR จะผสมกันไว้ในหลอดทดลองเล็กปริมาตรสาร 20-100 ไมโครลิตร เมื่อนำหลอดส่วนผสมไปใส่ไว้ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่เรียกว่า DNA thermal cycler (นิยมเรียกว่าเครื่อง PCR) ที่ปรับอุณหภูมิได้ตามโปรแกรมที่กำหนด จะเกิดการสังเคราะห์DNAสายใหม่ขึ้นในหลอด เมื่อเกิดปฏิกิริยาจนครบรอบและระยะ เวลาที่กำหนดจะได้ผลผลิตDNA ขนาดที่ต้องการเป็นจำนวนมาก

System เป็นแพลตฟอร์มรวมสำหรับการตรวจหาและการประเมินปริมาณของการจัดเรียงลำดับสารพันธุกรรม ระบบ Real-time PCR จะรวมวงจรความร้อน, การตรวจหาด้วยแสงฟลูโอเรสเซนส์ และซอฟท์แวร์ที่เฉพาะเจาะจงกับแอพพลิเคชั่น เพื่อที่จะประเมินการเพิ่มขึ้นแบบวงจรต่อวงจรของผลิตภัณฑ์ PCR ในการทำปฏิกิริยาที่คล้ายคลึงกันในท่อเดี่ยว การทำงานของ Real-time PCR จะเสร็จสมบูรณ์ในช่วงเวลาไม่ถึง 2 ชั่วโมง และจะทราบผลเชิงปริมาณได้ในทันทีเมื่อเสร็จสิ้นการทำงานของ PCR โดยไม่จำเป็นต้องใช้เจล ไม่ต้องทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR มีความบริสุทธิ์ หรือไม่ต้องดำเนินการควบคุมหลังกระบวนการ PCR



ภาพที่ 16 ขั้นตอนการตรวจ DNA

ที่มา : Charles F.and Kerchner, Jr. All Rights Reserved, accessed 20 January 2011.Available from, http://www.wormclassroom.org/ce/Kahn/DNA%20amplification%20by%20PCR.jpg

ภาพที่ 17 7500 Real-Time PCR System: ระบบ Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR

ที่มา : Charles F.and Kerchner, Jr. All Rights Reserved, accessed 20 January 2011.Available from, http://www.wormclassroom.org/ce/Kahn/DNA%20amplification%20by% 20PCR.jpg

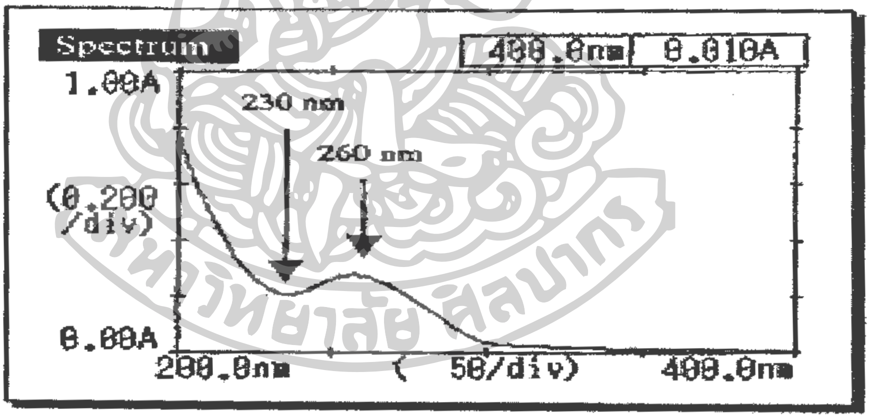
Real-time PCR เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มและตรวจสอบปริมาณ DNA ได้พร้อมกัน โดยใช้ probe ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงชนิดต่างๆ ทำให้ทราบปริมาณ DNA ที่เพิ่มขึ้นได้ในเวลาหลังจากกระบวนการ PCR ในเวลาอันรวดเร็ว ซึ่งเร็วกว่าเทคนิค PCR แบบดั้งเดิมมาก และยังสามารถ

ตรวจสอบปริมาณ DNA เริ่มต้นได้อีกด้วยเทคนิค PCR ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวางในงานวิจัย และการตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการ เทคนิคนี้ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณ DNA ในหลอดทดลองได้หลายเท่า (อาจเพิ่มได้เป็นแสนหรือล้านโมเลกุล) ทำให้สามารถตรวจสอบตัวอย่างที่มี DNA ปริมาณน้อยได้ อย่างไรก็ดีเทคนิค PCR แบบดั้งเดิม (Conventional PCR) ยังมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ไม่สามารถตรวจสอบปริมาณ DNA เริ่มต้น และต้องรอให้กระบวนการเสร็จก่อนจึงจะสามารถตรวจสอบการเพิ่มปริมาณ DNAได้ ปัจจุบันจึงมีการพัฒนาเทคโนโลยี PCR ขึ้นไปอีกระดับหนึ่งชื่อว่า Real-Time PCR ซึ่งสามารถแก้ไขข้อจำกัดต่างๆเหล่านี้ได้ โดยสามารถตรวจสอบปริมาณสารพันธุกรรมได้ด้วยการใช้ SYBR Green I Dyc และตรวจสอบด้วย probe ที่ติดฉลากด้วย Fluorochrome ทำให้ทราบปริมาณสารพันธุกรรมที่เพิ่มขึ้นได้ในเวลาหลังจากกระบวนการ

3.3 การตรวจวัดปริมาณDNA (DNA Quantification)

การตรวจวัดปริมาณDNA โดยการใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตรมิเตอร์ วัดสารละลายDNA ที่ความยาวคลื่น 260 nm โดยทั่วไปความเข้มข้นของ Double strand DNA 50 ug/ml จะดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm (A260) = 1 หรืออาจจะนำสารละลายDNAมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นมาทำ standard curve เพื่อใช้ในการหาปริมาณDNA ที่ต้องการ

ตัวอย่างสเปกตรัมที่ได้จากการวัดปริมาณDNAด้วย UV Biospec-1601



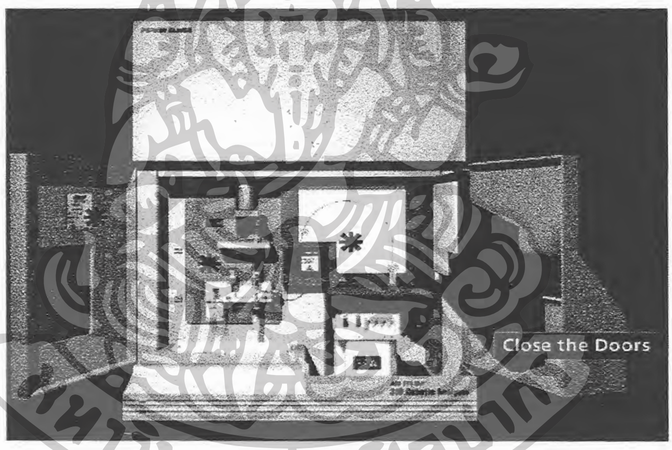
ภาพที่ 18 การวัดปริมาณDNAด้วย UV Biospec-1601

ที่มา: Openlearn and Creative Commons Licence, DNA [Online], accessed 16 January 2011.Available from www.bio.psu.edu/People/Faculty/Nei/Lab/software.htm 20 January

การเรียงลำดับเบสในโมเลกุล DNA เปรียบเหมือนการเรียงลำดับตัวอักษรของคำในภาษาต่างๆ ถ้าเรียงสลับกันหรือมีอักษรขาดหรือเกิน ก็อาจได้อีกความหมายหนึ่ง หรือไม่ก็อ่านไม่รู้เรื่องเลย ในทำนองเดียวกัน ถ้าลำดับเบสในโมเลกุล DNA ผิดไปจากเดิม โปรตีนที่สร้างขึ้นจาก DNA แม่แบบนี้ก็จะมีโครงสร้างผิดปกติไป ทำให้ไม่สามารถ function ได้ อันเป็นสาเหตุของโรคทางพันธุกรรมต่างๆ

ปัจจุบันวิธีการหาลำดับเบสพัฒนาไปมากโดยใช้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติและโปรแกรมคอมพิวเตอร์ อย่างไรก็ตาม ก็ยังคงยึดหลักการของวิธีดั้งเดิมคือวิธีของ Sanger (Sanger method) ตั้งตามผู้คิดค้น ชื่อ Fredrick Sanger ซึ่งเป็นเจ้าของ 2 รางวัลโนเบลจากการรายงานโครงสร้างของฮอร์โมน insulin (ปี1958) และลำดับเบสของ RNA virus (ปี 1980) วิธีของ Sanger นี้มีชื่อที่เรียกอย่างอื่นอีก คือ Dideoxy method หรือ Chain-termination method

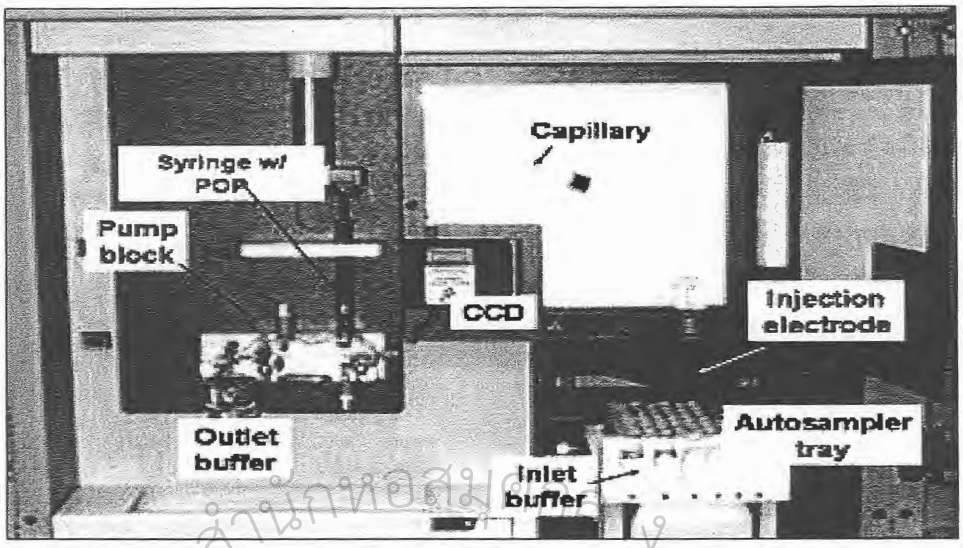
DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis



ภาพที่ 19 DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis

ที่มา Openlearn and Creative Commons Licence, DNA [Online], accessed 16 January 2011.Available from www.bio.psu.edu/People/Faculty/Nei/Lab/software.htm

3130xl Genetic Analyzers: ระบบ 3130 Series Systems ข้อมูลด้านลักษณะโครโมโซมที่มีคุณภาพสูงขึ้นระบบอัตโนมัติที่ได้รับการปรับปรุง แอพพลิเคชั่นทั้งหมดของการจัดเรียงลำดับ การปรับเปลี่ยนลำดับ ของยีนบน โครโมโซม



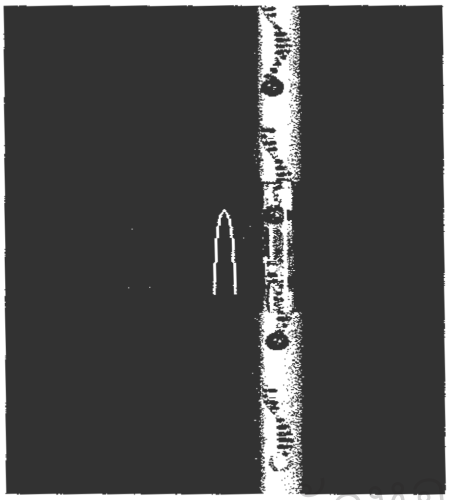
ภาพที่ 20 ระบบการทำงานเครื่องวิเคราะห์ตำแหน่ง DNA โดย Capillary Electrophoresis

ที่มา: Openlearn and Creative Commons Licence, DNA [Online], accessed 16 January 2011.Available from www.bio.psu.edu/People/Faculty/Nei/Lab/software.htm

1. Capillary และ electrode จุ่มลงไปในตัวอย่าง
2. ดูดตัวอย่างเข้าไปใน Capillary
3. โดย DNA ที่มีประจุลบ วิ่งผ่านเส้น Capillary ไปยังขั้ว electrode
4. โดยใช้สารละลาย บั๊ปเฟอร์เป็นตัวกลาง

ภาพที่ 21 ขั้นตอนการนำตัวอย่างเข้า Electrophoresis capillary

ที่มา: Openlearn and Creative Commons Licence, DNA [Online], accessed 16 January 2011.Available from www.bio.psu.edu/People/Faculty/Nei/Lab/software.htm



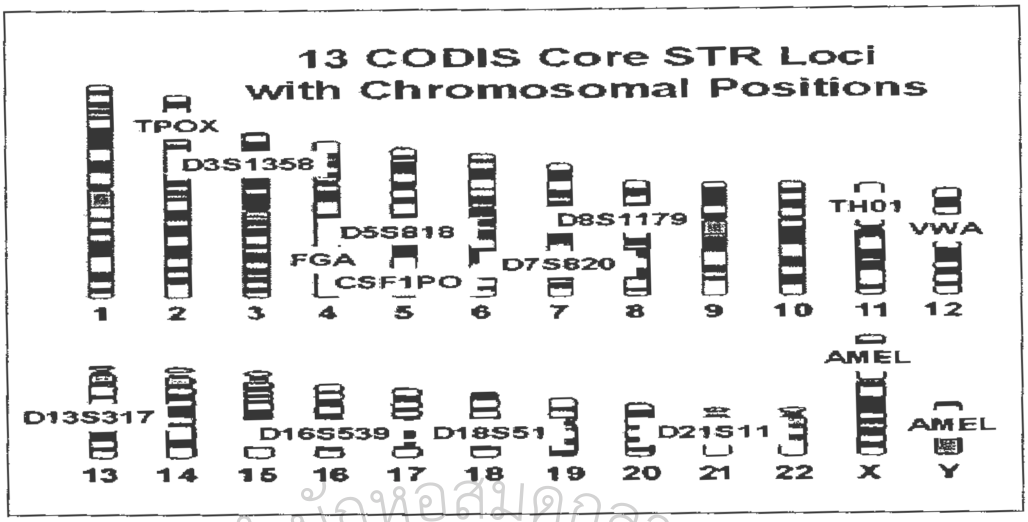
การเคลื่อนที่ของ DNA ผ่านตัวทำละลาย โดยกำหนดตำแหน่ง marker สีต่างๆ ไว้ เมื่อ DNA เคลื่อนที่ผ่าน CCD camera. จะทำการอ่านค่าตำแหน่ง (fragments labeled)

ภาพที่ 22 แสง Fluorescence อ่านค่าตำแหน่ง DNA

ที่มา: Openlearn and Creative Commons Licence, DNA [Online], accessed 16 January 2011.Available from www.bio.psu.edu/People/Faculty/Nei/Lab/software.htm

3.4 ชุดทดสอบสำเร็จรูป AmpFlSTR® IdentifilerTM PCR Amplification Kit

ชุดทดสอบสำเร็จรูป AmpFlSTR® IdentifilerTM PCR Amplification Kit เป็นชุดน้ำยาที่ใช้ในการตรวจลายพิมพ์DNAสำหรับการประยุกต์ใช้ตรวจพิสูจน์บุคคลที่มีความน่าเชื่อถือมีประสิทธิภาพและแสดงเอกลักษณ์ความจำเพาะบุคคลได้ดี โดยใช้หลักการของ multiplex PCRในการเพิ่มปริมาณDNA16ตำแหน่งด้วยเทคนิค PCR เพียงครั้งเดียว ซึ่งทั้ง 16 ตำแหน่งประกอบด้วยตำแหน่งที่ชุดเบส 4 ตัวเรียงซ้ำกัน (tetranucleotide repeat) 15 ตำแหน่งและตำแหน่ง amelogenin ที่ใช้ในการระบุเพศอีกหนึ่งตำแหน่ง ตำแหน่งที่ใช้ในการทดสอบดังแสดงในภาพที่ 23 โดย 16 ตำแหน่งที่ใช้ทดสอบนี้มี 13 ตำแหน่งอยู่ในระบบ CODIS (Combined DNA Index System)ซึ่งเป็นระบบฐานข้อมูลลายพิมพ์DNAของประเทศสหรัฐอเมริกาด้วยได้แก่ ตำแหน่ง CSF1PO,D7S820 D8S1179,D21S11,D3S1358,D13S317,D16S539,TH01,D18S51, TPOX,vWA,D5S818 และ FGA



ภาพที่ 23 ตำแหน่งที่ใช้ในการตรวจลายพิมพ์DNAบนโครโมโซมทั้ง 13 ตำแหน่งที่อยู่ในระบบ CODIS (Combined DNA Index System)

ที่มา : ปรับปรุงจาก Applied Biosystems, AmpFlSTR® Identifiler® PCR Amplification Kit: User's Manual,California : 2006.

ขั้นตอนการตรวจลายพิมพ์ DNA โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป AmpFlSTR® Identifiler™ PCR Amplification Kit เริ่มจากการผสมสารที่มาพร้อมกับชุดเข้าด้วยกัน ได้แก่ น้ำยาAmpFlSTR® PCR Reaction Mix ที่ประกอบด้วย $MgCl_2$,dNTPและ bovine serum albuminน้ำยา AmpFlSTR Identifiler Primer Set ที่ประกอบด้วยไพรเมอร์ 16 ตำแหน่งและน้ำยา AmpliTag Gold® DNA polymerase แล้วเติมสารละลายDNAที่สกัดได้จากสิ่งส่งตรวจผสมให้เข้ากัน นำเข้าเครื่อง เพื่อเพิ่มปริมาณDNAด้วยเทคนิคPCRตามโปรแกรมที่กำหนด จากนั้นนำเข้าเครื่องวิเคราะห์ลายพิมพ์DNA แบบอัตโนมัติ DNAที่เพิ่มจำนวนขึ้นมานี้จำเป็นต้องมี allelic ladder เป็น marker เพื่อทราบขนาด DNAที่เพิ่มจำนวนขึ้น เนื่องจากเป็นการเพิ่มจำนวนหลายๆบริเวณ แต่ละบริเวณอาจมี 2 อัลลีลที่มีขนาดต่างกัน (heterozygote) หรืออาจมี 2 อัลลีลที่มีขนาดต่างกัน (homozygote) เพื่อความสะดวกในการตรวจหาและแยกแยะแต่ละองค์ประกอบของDNAที่เพิ่มจำนวนขึ้นมานั้น จึงจำเป็นต้องติดฉลาก (label) ไพรเมอร์ด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์ที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 1 ตำแหน่งที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณDNA ลำดับเบสซ้ำที่ใช้ทั่วไปของ GeneBank Allelic Ladder และสีที่ใช้ติดฉลาก

ชื่อตำแหน่ง	ตำแหน่งบนโครโมโซม	ลำดับเบสซ้ำ GeneBank	Allelic Ladder	Dye Label
D8S1179	8	[TATC]top strand [ATAG]bottom strand	8,9,10,11,12,13,14,15,16 ,17,18,19	6-FAM
D21S11	21q11.2-q21	[TCTA], [TCTG]top strand	24,24.2,25,26,27,28,28.2 ,29,29.2,30,30.2,31,31.2 ,32,32.2,33,33.2,34,34.2 ,35,35.2,36,37,38	
D7S820	7q11.21-22	[GATA]top strand [TCTA]bottom strand	6,7,8,9,10,11,12,13,14,15	
CSF1P0	5q33.3-34	[AGAT]top strand [CTAT]bottom strand	6,7,8,9,10,11,12,13,14,15	
D3S1358	3p	[AGAT], [CTTA]bottom strand	12,13,14,15,16,17,18,19	VIC
TH01	11p15.5	[TCAT]top strand [AATG]bottom strand	4,5,6,7,8,9,9.3,10,11,13.3	
D13S317	13q22-31	[TATC]top strand [GATA]bottom strand	8,9,10,11,12,13,14,15	
D16S539	16q24	[GATA]top strand [TATC]bottom strand	5,8,9,10,11,12,13,14,15	
D2S1338	2q35-37.1	$[TGCC]_n[TTCC]_n$	15,16,17,18,19,20,21,22 ,23,24,25,26,27,28	
D19S433	19q12-13.1	(AAGG)(AAAG) (AAGG)(TAGG) $[AAGG]_n$	9,10,11,12,12.2,13,13.2 ,14,14.2,15,15.2,16,16.2 ,17,17.2	NED
vWA	12p12	[TCTA]top strand [ATAG]bottom strand	11,12,13,14,15,16,17,18, 19,20,21,22,23,2417,18	

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชื่อตำแหน่ง	ตำแหน่งบนโครโมโซม	ลำดับเบสซ้ำ GeneBank	Allelic Ladder	Dye Label
TPOX	2p23	[AATG]top strand [CATT]bottom strand	6,7,8,9,10,11,12,13	NED
D18S51	18q21.3	[GAAA]top strand [CTTT]bottom strand	7,9,10,10.2,11,12,13,13.2,14,14.2,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27	
Amelogenin	X: p22.1-22.3 Y: p11.2		X,Y	PET
D5S818	5q21-31	[AGAT]top strand [TATC]bottom strand	7,8,9,10,11,12,13,14,15,16	
FGA	4q28	Complex tetranucleotide repeat; $[TTTC]_3$ TTTTTTCT $[CTTT]_n[TTCC]_2$ top strand	17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,26.2,27,28,29,30,30.2,31.2,32.2,33.2,42.2,43.2,44.2,45.2,46.2,47.2,48.2,50.2,51.2	

ที่มา : Applied Biosystems, AmpFlSTR® Identifiler® PCR Amplification Kit: User's Manual,California : n.p.,2006.

ในชุดสำเร็จรูปนี้ใช้สีย้อมฟลูออเรสเซนส์ 5 สีที่มีความยาวคลื่นสูงสุดแตกต่างกันติดฉลากที่บริเวณปลาย 5'ของไพรเมอร์ ได้แก่ สีย้อมเรืองแสงที่ความยาวคลื่นสั้นที่ 520 nm ให้แสงสีน้ำเงิน สีย้อม VIC เรืองแสงที่ความยาวคลื่น 550 nm ให้แสงสีเขียว สีย้อม NED เรืองแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm ให้แสงสีเหลือง สีย้อม PET เรืองแสงที่ความยาวคลื่น 590 nm ให้แสงสีแดง และสีย้อม LIZ ที่ใช้ติดฉลากกับตัวควบคุมขนาดมาตรฐานจะเรืองแสงที่ความยาวคลื่น 650 nm ให้แสงสีส้ม ซึ่งไพรเมอร์แต่ละตำแหน่ง
จะติดฉลากด้วยสีต่างกันดังตารางที่ 1 การติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนส์ ทำให้สามารถบอกความแตกต่างระหว่างผลผลิต PCR ในแต่ละตำแหน่งจึงสะดวกในการแปรผลและมีความถูกต้องแม่นยำ

4. การตรวจลายพิมพ์DNA

หลังจากการทำปฏิกิริยาPCRแล้วจะต้องนำผลผลิต DNAที่เพิ่มปริมาณได้ (PCR product) มาทำการวิเคราะห์ โดยทำได้ 2 วิธีคือ

1. วิธีเจลอิเลคโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) คือการแยก DNAในวุ้นอะกาโรส (agarose gel)หรือในวุ้นอะคิลาไมด์ (acrylamide gel) ด้วยกระแสไฟฟ้า เป็นการแยกDNA โดยอาศัยขนาด โครงรูป และประจุของ DNA เมื่อเคลื่อนที่บนสนามไฟฟ้า จากนั้นนำแผ่นวุ้นนี้ไปย้อมให้เห็นแถบ DNA ด้วยวิธีต่างๆ เช่น การติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี การย้อมDNA ด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) แล้วตรวจดูด้วยแสงอุลตราไวโอเลต การย้อมด้วย silver stain การติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนส์หรือติดฉลากด้วยระบบเอนไซม์ร่วมกับการทำให้เกิดสี เป็นต้น เพื่อประเมินขนาดและปริมาณของแถบ DNA ในวุ้นตัวกลางโดยเปรียบเทียบขนาดกับ DNA ขนาดมาตรฐาน (DNA marker)

2. วิธี capillary electrophoresis (CE) โดยมักใช้ในการตรวจวิเคราะห์ DNA ทางนิติวิทยาศาสตร์ เป็นเทคนิคที่ใช้สำหรับการแยกสารประกอบ โดยการทำให้สารประกอบเหล่านั้นเคลื่อนที่ผ่านสนามไฟฟ้าที่ออกแบบให้มีท่อขนาดเล็กอยู่ตามระยะทางการเคลื่อนที่ ทำให้แยกสารประกอบออกจากกันได้ และแปรข้อมูลเป็นกราฟ เรียกว่าอิเลคโทรฟีโลแกรม (electropherogram)

4.1 การแปลผลการตรวจลายพิมพ์DNA

รูปแบบลายพิมพ์DNAมี 2 แบบคือ แบบบาร์โค้ดที่ได้จากการตรวจด้วยวิธี manual จะอ่านผลผลโดยการเปรียบเทียบแถบDNA (band) ในแต่ละตำแหน่ง และแบบกราฟ (peak) ที่ได้จากการตรวจด้วยเครื่องอัตโนมัติ จะอ่านผลโดยการสังเกตหมายเลขใต้เส้นกราฟที่ละตำแหน่งของ marker จากนั้นจึงแปรผลการตรวจลายพิมพ์DNA ซึ่งสามารถสรุปได้ 3 แบบ ดังนี้

4.1.1 ผลการตรวจลายพิมพ์DNAที่สามารถสรุปผลได้โดยไม่มีข้อขัดแย้งตามมาตรฐานสากลเรียกว่า conclusive หมายถึงลายพิมพ์DNAให้ผลตรงกันทุกตำแหน่งที่ใช้ตรวจ เช่น กรณีการพิสูจน์ความสัมพันธ์พ่อแม่ลูก พบว่าลายพิมพ์DNAของลูกทั้ง16 ตำแหน่งตรงกับของพ่อและแม่คนละครึ่ง (ตามลักษณะการถ่ายทอดของเมนเดล) หรือกรณีการตรวจหาผู้กระทำความผิด ผลการตรวจลายพิมพ์DNAของผู้ต้องหากับตัวอย่างDNAที่เก็บได้จากวัตถุพยานตรงกันทุกตำแหน่ง

4.1.2 ผลการตรวจลายพิมพ์DNAที่มีข้อขัดแย้งกันเรียกว่าexclusive หมายถึงลายพิมพ์DNAที่ได้มีผลไม่ตรงกันอย่างน้อย 1 ตำแหน่งขึ้นไป อย่างไรก็ตามหากผลการตรวจลายพิมพ์

DNAของพ่อแม่ลูกมีความแตกต่างเพียง 1 ตำแหน่ง อาจมีสาเหตุจากการกลายพันธุ์(mutation) ดังนั้นจึงควรมีการพิสูจน์เพิ่มเติมต่อไปนี้

4.1.2.1 กรณีผลตรวจของพ่อกับลูกชายไม่ตรงกันจะตรวจเพิ่มในโครโมโซมY

4.1.2.2 กรณีผลตรวจของพ่อกับลูกสาวไม่ตรงกันจะตรวจเพิ่มในโครโมโซมX

4.1.2.3 กรณีผลตรวจของแม่กับลูกชายหรือแม่กับลูกสาวไม่ตรงกันจะต้องตรวจเพิ่มใน mitochondrial DNAซึ่งถ้าผลตรวจลายพิมพ์DNAเหมือนกัน จึงกล่าวยืนยันได้ว่าเป็นพ่อกับลูก หรือแม่กับลูกที่แท้จริง และตำแหน่งที่ไม่ตรงกันนั้นเกิดจากการกลายพันธุ์ แต่ถ้าผลการตรวจใน ตำแหน่งดังกล่าวไม่ตรงกัน แสดงว่าไม่ใช่พ่อกับลูก หรือแม่กับลูกที่แท้จริง

ผลการตรวจที่ยังไม่สามารถสรุปผลได้เรียกว่า inconclusive หมายถึงการตรวจลายพิมพ์DNAที่ไม่สามารถทำได้ครบทุกตำแหน่ง เนื่องจากมีการเสื่อมสลายของวัตถุพยานการปนเปื้อนของDNAในขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่ง หรือการตรวจมีความผิดพลาดจากเครื่องมือหรือจากผู้ทำการตรวจ เช่น น้ำยาหมดอายุ เป็นต้น

4.2 ประโยชน์ของการตรวจลายพิมพ์DNA

ในปัจจุบันการตรวจลายพิมพ์DNA สามารถทำได้หลายรูปแบบ ไม่ว่าจะเป็นการตรวจลายพิมพ์DNAจากนิวเคลียส การตรวจจากโครโมโซม X การตรวจจากโครโมโซมY หรือการตรวจจากmitochondrial dna ดังนั้นจึงเป็นเทคโนโลยีที่มีความสำคัญ และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในหลายด้าน ไม่ว่าจะเป็น ทางด้านนิติเวช ทางการแพทย์ ทางโบราณคดี และทางด้านเกษตรกรรม ดังต่อไปนี้

4.2.1 ใช้พิสูจน์บุคคลที่กระทำความผิด โดยการเชื่อมโยงผู้ต้องสงสัยกับวัตถุพยานที่อยู่ในสถานที่เกิดเหตุ และ/หรือวัตถุพยานที่เก็บได้จากผู้เสียหายหรือผู้ตาย เช่น การตรวจในคดีข่มขืนกระทำชำเรา เพื่อพิสูจน์หาบุคคลที่ได้กระทำชำเรา โดยตรวจลายพิมพ์ DNA จากคราบอสุจิรากของเส้นขนที่หัวเหน่า หรือน้ำลายซึ่งอาจมีเยื่อบุกระพุ้งแก้มและคราบเลือด นอกจากนี้ผู้ต้องหาอาจฝากรอยกัดไว้บนร่างกายของผู้เสียหายหรือผู้ตาย ซึ่งสามารถพิสูจน์ได้ด้วยการตรวจรอยพิมพ์ฟันหรือ DNA จากเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มได้ หรือการตรวจลายพิมพ์ DNA ในกรณีที่คนไข้ตั้งครรภ์จากการถูกข่มขืนแล้วมาทำแท้ง โดยสามารถทำการตรวจลายพิมพ์ DNA จากรกเทียบกับเลือดแม่เปรียบเทียบกับลายพิมพ์ DNA ของผู้ต้องสงสัย ซึ่งถ้าหากได้ผลตรงกันก็สามารถนำไปดำเนินคดีได้ ในปัจจุบันได้มีการจัดทำฐานข้อมูลลายพิมพ์ DNA ของผู้กระทำความผิดทางอาชญากรรม เพื่อให้การสืบค้นและเปรียบเทียบข้อมูลกระทำได้อย่างรวดเร็วมากขึ้น

4.2.2 ใช้พิสูจน์บุคคลทางสายสัมพันธ์ เช่น บิดา มารดา และบุตร เป็นการตรวจพิสูจน์ยืนยันว่าเป็นบุตรที่แท้จริงของบิดา หรือเป็นบุตรที่แท้จริงของมารดาหรือไม่ คดีส่วนใหญ่มักเป็นการฟ้องร้องเพื่อเรียกร้องค่าเลี้ยงดูบุตรของฝ่ายหญิงเมื่อถูกฝ่ายชายทอดทิ้งหรือไม่ยอมรับว่ามีความสัมพันธ์และมีบุตรด้วยกันจริง จึงต้องมีการพิสูจน์เปรียบเทียบลายพิมพ์ DNA ของฝ่ายชาย หากผลการเปรียบเทียบพบว่าตรงกับของเด็ก แสดงว่ามีความสัมพันธ์เป็นบุตรที่แท้จริง ส่วนฝ่ายมารดามักเป็นเรื่องการคลอดบุตรที่โรงพยาบาลแล้วเกรงว่าจะเกิดการสลับตัวเด็กขึ้น นอกจากนั้นยังใช้ในการตรวจพิสูจน์ในคดีที่เกี่ยวกับมรดก เนื่องจากมีผู้แอบอ้างเป็นบุตรนอกสมรสจึงต้องตรวจหาผู้รับมรดกที่แท้จริง

4.2.3 ใช้พิสูจน์บุคคลในเหตุการณ์ภัยพิบัติ วินาศภัย และสงคราม เช่น เครื่องบินตก ไฟไหม้ เรือล่ม แผ่นดินไหว สึนามิ เป็นต้น ในเหตุการณ์เหล่านี้มักพบวัตถุพยานในลักษณะเป็นโครงกระดูก ชิ้นส่วนอวัยวะ ศพที่ไหม้เกรียม หรือศพที่ไม่สามารถระบุตัวบุคคลจากลักษณะภายนอก กรณีนี้จะต้องเลือกส่วนที่จะนำมาทดสอบอย่างระมัดระวังที่สุด เพื่อให้ได้ปริมาณDNAที่เพียงพอต่อการนำมาตรวจวิเคราะห์เพื่อพิสูจน์ทราบว่าผู้ตายเป็นใคร โดยเปรียบเทียบกับลายพิมพ์ DNA ที่ได้ถูกเก็บไว้ก่อนหน้านี้ในแฟ้มประวัติ หรือจากแฟ้มเก็บตัวอย่างลายพิมพ์ DNA เพื่อใช้ในการตรวจสอบโดยเฉพาะ ทำให้สามารถบ่งบอกได้ว่ามีใครเสียชีวิตในเหตุการณ์นั้น เพื่อประโยชน์ในการติดตามหาญาติพี่น้องต่อไป

4.2.4 ใช้ในการติดตามผลการปลูกถ่ายไขกระดูก โดยการเปรียบเทียบลายพิมพ์ DNAของผู้รับและผู้ให้ว่ามีลักษณะตรงกันหรือไม่ ในรายที่การปลูกถ่ายไขกระดูกทำสำเร็จผลการตรวจลายพิมพ์ DNA ของผู้รับจะตรงกันกับผู้ให้ทุกตำแหน่ง ส่วนการปลูกถ่ายไขกระดูกที่ล้มเหลวลายพิมพ์DNAของผู้รับจะมีผสมกันระหว่างของตนเองกับผู้ให้

4.2.5 ใช้ในการตรวจพิสูจน์การติดเชื้อไวรัส HIV เนื่องจากไวรัส HIV มีลายพิมพ์ DNA ที่มีลักษณะเฉพาะ คือ ผู้รับเชื้อกับผู้ให้เชื้อจะมีเชื้อ HIV ที่มีลายพิมพ์ DNA เหมือนกัน จึงสามารถนำผลการตรวจนี้ไปเรียกร้องค่าเสียหายจากคนที่ให้เชื้อ HIVได้

4.2.6 ใช้ในการค้นคว้าทางประวัติศาสตร์และโบราณคดี เพื่อศึกษาวิวัฒนาการความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อชาติ สืบหาบรรพบุรุษ และเส้นทางอพยพย้ายถิ่นฐานและตั้งถิ่นฐานของมนุษย์ในอดีต ในการวิจัยมักใช้ DNAจาก mitochondrial dna เนื่องจากมีจำนวนชุดซ้ำมากและอยู่ในสภาพที่คงทนมากกว่า จากนั้นจึงเชื่อมโยงผลลายพิมพ์ DNA เข้ากับข้อมูลทางด้านโบราณคดี มานุษยวิทยาพันธุกรรม (Genetic Anthropology) และมานุษยวิทยาภาษาศาสตร์ (Linguistic) ดังเช่นในประเทศไทยได้มีการวิจัยลายพิมพ์ DNA จากโครงกระดูกมนุษย์ยุคโบราณที่เคยตั้งถิ่นฐานอยู่ใน

ชุมชนโบราณบริเวณลุ่มแม่น้ำมูลตอนต้นจำนวน 2 แห่ง คือ แหล่งโบราณคดีบ้านหลุมขาว และแหล่งโบราณคดีเนินอุโลก ในเขตอำเภอโนนสูง จังหวัดนครราชสีมา พบว่ามีความสัมพันธ์ทางเครือญาติต่อเนื่องกันมาตลอดช่วงระยะเวลาของการตั้งถิ่นฐานเป็นเวลานับพัน ๆ ปี เป็นต้น

4.2.7 ใช้ประโยชน์ทางด้านเกษตรกรรม ได้แก่ การตรวจสอบพันธุ์พืชและสัตว์เศรษฐกิจ ในกรณีการละเมิดลิขสิทธ์ การขโมยพืชหรือสัตว์ที่มีราคา เป็นต้นนอกจากนี้ยังสามารถตรวจลายพิมพ์DNAจากพืชหรือสัตว์เพื่อเป็นวัตถุพยานเชื่อมโยงกับคดีอาชญากรรมได้ด้วย

4.3 DNA paternity testing

การตรวจ DNA เพื่อพิสูจน์ความเป็นบิดา หรือที่เรียกว่า DNA paternity testing เป็นเทคนิคการตรวจ DNA ชนิดหนึ่ง ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน จุดประสงค์หลักเพื่อพิสูจน์ความเป็นพ่อ-ลูก ในกรณีที่เกิดปัญหาขึ้น และต้องการหลักฐานทางพันธุกรรมเข้ามาพิสูจน์ทางวิทยาศาสตร์ การตรวจ DNA เพื่อพิสูจน์ความเป็นบิดา อาศัยหลักการที่ว่า DNA ซึ่งเป็นสารพันธุกรรมของลูก ครึ่งหนึ่งจะมาจากพ่อ และอีกครึ่งหนึ่งมาจากแม่การตรวจ DNA เพื่อพิสูจน์ความเป็นบิดา อาจใช้วิธีตรวจจากเลือด หรือตรวจจากเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มก็ได้ โดยนำสิ่งส่งตรวจไปที่ห้องปฏิบัติการ เพื่อทำการสกัด DNA ผ่านขั้นตอนกระบวนกรรมวิธีทำให้ DNA เป็นสารบริสุทธิ์ จากนั้นเตรียม DNA ที่สกัดได้ นำมาทำการทดสอบกับชุดทดสอบที่เรียกว่า DNA markers จำนวน 16 ชุด ผลที่ได้จะเป็นแบบแผนสารพันธุกรรมของสิ่งส่งตรวจ เมื่อนำแบบแผนสารพันธุกรรมของสิ่งส่งตรวจทั้งหมดมาเปรียบเทียบกันแล้ว ทางห้องปฏิบัติการสามารถใช้การวิเคราะห์ทางสถิติคำนวณความน่าจะเป็น ซึ่งเรียกว่า probability of paternity

4.4 ความแม่นยำของการตรวจ DNA

การตรวจ DNAในห้องปฏิบัติการที่ได้มาตรฐานทุกแห่ง พบว่ามีความแม่นยำมากถึงร้อยละ 100 ในทางปฏิบัติจะพิจารณาความแม่นยำของการทดสอบ ร่วมกับปัจจัยทางชีวภาพ ความสัมพันธ์ระหว่างบุคคลที่เกี่ยวข้อง ทำให้ผลการทดสอบมีความแม่นยำและความน่าเชื่อถือสูงมาก ในบางห้องปฏิบัติการอาจมีการทดสอบแบบแผนสารพันธุกรรมจากสิ่งส่งตรวจของบุคคลที่สามเพิ่มเติม แต่ในปัจจุบันไม่เป็นที่นิยมแล้ว การตรวจ DNA เพื่อพิสูจน์ความเป็นบิดาอาจไม่ได้ตรวจเพียงวิธีเดียว เช่นเดียวกับหลักการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการทั่วไป ในกรณีที่ต้องการทดสอบความเป็นพี่น้องหรือลูกหลานเว้นชั่วอายุคน พบว่าด้วยเทคนิคดังกล่าวจะความแม่นยำประมาณร้อยละ 90 ในทางปฏิบัติ การแปลผลการตรวจ DNA เพื่อพิสูจน์ความเป็นบิดา ไม่ยุ่งยาก

แต่อย่างใด ในกรณีที่ Probability of Paternity เป็นศูนย์ ก็แสดงว่าเด็กคนนั้นไม่ใช่ลูก และในกรณีที่ Probability of Paternity เท่ากับร้อยละ 99.9 แสดงว่าเด็กคนนั้นเป็นลูกแน่นอน

การแปลผลการทดสอบ ประกอบไปด้วยข้อมูล 3 ส่วนที่สำคัญ

เป็นแบบแผนสารพันธุกรรม หรือที่เรียกว่า DNA profile

เป็นค่าความน่าจะเป็น เรียกว่า Probability of Paternity

เป็นดัชนีทางสถิติ เรียกว่า Combined Paternity Index (CPI)

5. การศึกษาค่าทางสถิติที่ใช้ในนิติวิทยาศาสตร์

การศึกษาความถี่ของอัลลีลและค่าทางสถิติที่ใช้ในนิติวิทยาศาสตร์ เพื่อประกอบการแปลผลการตรวจลายพิมพ์ DNA ทางนิติวิทยาศาสตร์ต้องการเหตุผลทางวิทยาศาสตร์ในการที่จะประมาณโอกาสของคนๆหนึ่งที่อาจมีรูปแบบ DNA สอดคล้องกับรูปแบบ DNA จากวัตถุพยานโดยบังเอิญ ประมาณโอกาสรูปแบบ DNA ของลูกกับของบิดานั้นตรงกันและประมาณโอกาสในการยืนยันตัวบุคคลว่าเป็นผู้นั้นจริงหรือไม่ โดยวิธีการคำนวณทางสถิติซึ่งจะเป็นตัวบ่งชี้ ทำให้ผลการพิสูจน์นั้นน่าเชื่อถือและเป็นที่ยอมรับ และเป็นประโยชน์ต่อผู้พิพากษาจะได้ใช้ประกอบการพิจารณาคดีว่าจะให้น้ำหนักแก่หลักฐานชิ้นนั้นมากน้อยเพียงใด

5.1 กฎของฮาร์ดีและไวน์เบอร์ก(Hardy-Weinberg Law)

ในปีพ.ศ.2451 G.H.Hardy นักคณิตศาสตร์ชาวอังกฤษและ W.Weinberg นายแพทย์ชาวเยอรมันต่างก็ได้เสนอ กฎที่เกี่ยวข้องกับอัตราส่วนของยีนในประชากร กฎดังกล่าวนี้เรียกกันว่า กฎของฮาร์ดี และไวน์เบอร์ก และจัดได้ว่าเป็นแม่บทของวิชาการสาขาพันธุศาสตร์ประชากรในปัจจุบัน กฎนี้กล่าวว่าในประชากรที่มีขนาดใหญ่นั้นถ้ามีการผสมพันธุ์การสืบพันธุ์และการถ่ายทอดพันธุกรรมระหว่างสมาชิกอย่างสุ่มและปราศจากอิทธิพลภายนอกที่จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอันได้แก่มิวเตชั่น (mutation) การคัดเลือก (selection) และการอพยพเข้าออกของสมาชิก (migration) และการขาดช่วงของการถ่ายทอดกรรมพันธุ์ (genetic drift) เข้ามาทำให้อัตราส่วนของยีนเปลี่ยนแปลงแล้ว อัตราส่วนของยีนและอัตราส่วนของจีโนไทป์ของประชากรนี้จะคงที่ตลอดไปทุกๆชั่ว ประชากรที่มีอัตราส่วนของยีนและจีโนไทป์คงที่นี้เรียกว่าเป็นประชากรที่มีความสมดุล (equilibrium population)

ในความเป็นจริงประชากรทั่วไปย่อมมีปรากฏการณ์การกลายพันธุ์ การคัดเลือกตามธรรมชาติ รวมทั้งการอพยพเกิดขึ้นเสมอมากบ้างน้อยบ้างแล้วแต่สภาวะแวดล้อมของประชากรอย่างไรก็ตามประชากรบางแห่งอาจไม่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างองค์ประกอบทางพันธุกรรม

ทั้งนี้เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงความถี่อัลลีลโดยปัจจัยต่างๆเข้าสู่สภาวะสมดุล ก่อนที่จะนำเอาหลักการของฮาร์ดีและไวน์เบอร์กมาใช้คำนวณหาค่าความถี่อัลลีลและความถี่จีโนไทป์ในประชากรนั้น รากฐานของกฎฮาร์ดีและไวน์เบอร์กอาจกล่าวได้ดังนี้

สมมติว่ามีจีโนไทป์ซึ่งมีเพียง 2 อัลลีล คือ A และ a มีความถี่ของอัลลีลเป็น p และ q ตามลำดับเนื่องจากมีจีโนไทป์เพียง 2 อัลลีลคือ A และ a เท่านั้น ดังนั้น $p + q = 1$ การผสมกันอย่างสุ่มของประชากรหมายถึง การผสมอย่างสุ่มของหน่วยสืบพันธุ์ คือหน่วยสืบพันธุ์ของพ่อมีโอกาสที่จะเข้าผสมกับหน่วยสืบพันธุ์ของแม่ได้เท่ากัน ดังนั้นความถี่ของจีโนไทป์ในชั่วลูกก็ได้จากการคูณกันระหว่างความถี่ของหน่วยสืบพันธุ์ของพ่อแม่ ตามหลักการถ่ายทอดกรรมพันธุ์ของเมนเดล ดังนี้

ตารางที่ 2 แสดงหลักการถ่ายทอดพันธุกรรมของเมนเดล

เซลล์สืบพันธุ์แม่(ความถี่)	เซลล์สืบพันธุ์พ่อ(ความถี่)	
	A(p)	a(q)
A(p)	AA(p^2)	Aa(pq)
a(q)	Aa(pq)	Aa(q^2)

ที่มา : ปรับปรุงจาก วรรณา ทองนพคุณ, ชนินทร์ ลิ่มวงศ์ และ เพทาย เย็นจิตโสมนัส, <u>สาระน่ารู้ อณูพันธุศาสตร์</u> (กรุงเทพฯ: เท็กซ์แอนด์เจอร์นัล พับลิเคชั่น, 2548).

สังเกตได้ว่าโอกาสที่จะได้ไซโกตที่มีจีโนไทป์ AA ขึ้นอยู่กับโอกาสของเซลล์สืบพันธุ์ที่มียีน A (ความถี่ = p) จะมารวมกันซึ่งโอกาสเช่นนี้จะมีค่าเท่ากับ p x p หรือ p^2 ส่วนจีโนไทป์ Aa อาจเกิดขึ้นได้ 2 ทางคือ เซลล์สืบพันธุ์ A จากพ่อรวมกับเซลล์สืบพันธุ์ a จากแม่ ซึ่งโอกาสที่จะเกิดขึ้นเช่นนี้เท่ากับ p x q หรือในทางตรงกันข้ามเซลล์สืบพันธุ์ A จากแม่รวมกับเซลล์สืบพันธุ์ a จากพ่อ ซึ่งจะมีโอกาสเท่ากับ p x q เช่นเดียวกัน ดังนั้นโอกาสที่จะได้ลูกที่มีจีโนไทป์Aa มีค่าเท่ากับ $pq + pq = 2pq$ ความถี่จีโนไทป์ของลูกรุ่นแรกรวมกันจะมีค่าเท่ากับ $p^2(AA) + 2pq(Aa) + q^2(aa) = 1$ เพราะค่าความถี่ทั้งหมดรวมกันเท่ากับ 1 ในทางคณิตศาสตร์มีสูตรดังนี้ $[p + q]^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1$ โดยแบบแผนการถ่ายทอดจะเป็นเช่นนี้เสมอ ไม่ว่าการสืบพันธุ์และการถ่ายทอดกรรมพันธุ์จะผ่านไปกี่รุ่นก็ตาม

อย่างเช่นการตรวจลายพิมพ์ DNA ของบุคคลหนึ่งมีจีโนไทป์ในตำแหน่ง TPOX เป็น 11,11 แสดงว่าทั้งพ่อและแม่ได้ถ่ายทอดอัลลีลที่มีจำนวนซ้ำ 11 ชุดให้จึงมีลักษณะเป็น homozygote ในขณะที่อีกบุคคลหนึ่งมีจีโนไทป์ในตำแหน่งนี้เป็น 8,9 คือมีลักษณะเป็น heterozygote โอกาสที่จะได้รับการถ่ายทอดอัลลีลจึงอาจเกิดขึ้นได้ 2 แบบ แบบแรกคืออัลลีลที่มีจำนวนซ้ำ 8 ชุดอาจได้รับมาจากพ่อและอัลลีลที่มีจำนวนซ้ำ 9 ชุดอาจได้รับมาจากแม่ หรืออีกแบบหนึ่ง คืออัลลีลที่มีจำนวนซ้ำ 8 ชุดอาจได้รับมาจากแม่และอัลลีลที่มีจำนวนซ้ำ 9 ชุดอาจได้รับมาจากพ่อ ถ้ากำหนดให้P(A) เท่ากับโอกาสที่จะพบอัลลีลAและP(a) เท่ากับโอกาสที่ที่จะพบอัลลีล a ดังนั้นโอกาสที่จะพบจีโนไทป์แบบ homozygote โดยบังเอิญจะเท่ากับP(11) x P(11) หรือ $P(11)^2$ ในขณะที่โอกาสที่จะพบจีโนไทป์แบบ heterozygote โดยบังเอิญจะเท่ากับ 2 x P(8) x P(9)

ในทางปฏิบัติการตรวจลายพิมพ์DNAจะตรวจพร้อมกันหลายตำแหน่งเนื่องจากพ่อและแม่ไม่มีความเกี่ยวข้องกันทางสายเลือด จึงเป็นการผสมกันแบบสุ่ม ดังนั้นการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมในแต่ละตำแหน่งจึงเป็นอิสระต่อกัน ซึ่งเป็นไปตามกฎของฮาร์ดีและไวน์เบอร์ก

5.2 ผลการคำนวณค่าทางสถิติที่ใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์

การคำนวณค่าทางสถิติของ STR ทั้ง 15 ตำแหน่ง ดังแสดงในตาราง พบว่าประชากรทั้งหมดมีค่า expected heterozygosity (H_{exp}) ซึ่งเป็นค่าตามทฤษฎีที่กลุ่มประชากรน่าจะมีอัลลีลแบบ heterozygous อยู่ในช่วงระหว่าง 0.618 (TPOX) ถึง 0.871 (FGA) แต่เมื่อคำนวณค่าที่ได้จากการทดลองพบว่ากลุ่มประชากรมีอัลลีลแบบ heterozygous (observed heterozygosity , H_{obs}) อยู่ระหว่าง 0.587 (CSF1P0 และYPOX) ถึง 0.900 (D13S317 และ FGA)

ตารางที่ 3 แสดงค่าทางสถิติของ STR 15 ตำแหน่งของประชากรไทย (n = 80)

Alleles	Alleles obs.	H_{exp}	H_{obs}	PM	PD	PIC	PE	PI_{Ty}	P	S.E.
D8S1179	8	0.870	0.837	0.046	0.954	0.84	0.670	3.08	0.228	0.011
D21S11	11	0.837	0.825	0.059	0.941	0.81	0.646	2.86	0.275	0.023
D7S820	8	0.814	0.837	0.071	0.929	0.78	0.670	3.08	0.896	0.007
CSF1PO	7	0.704	0.587	0.147	0.853	0.64	0.276	1.21	0.080	0.004
D3S1358	6	0.749	0.700	0.128	0.873	0.70	0.428	1.67	0.096	0.007
TH01	7	0.735	0.750	0.117	0.883	0.69	0.510	2.00	0.584	0.014
D13S317	7	0.793	0.900	0.103	0.897	0.75	0.795	5.00	0.088	0.009
D16S539	6	0.768	0.725	0.110	0.890	0.72	0.468	1.82	0.084	0.006
D2S1338	11	0.867	0.862	0.041	0.959	0.84	0.720	3.64	0.953	0.007
D19S433	11	0.812	0.856	0.049	0.951	0.83	0.622	2.67	0.263	0.020
vWA	8	0.806	0.750	0.075	0.075	0.77	0.510	2.00	0.518	0.016
TPOX	5	0.618	0.587	0.221	0.221	0.55	0.276	1.21	0.399	0.016
D18S51	12	0.869	0.887	0.046	0.046	0.84	0.770	4.44	0.616	0.025
D5S818	8	0.800	0.762	0.081	0.081	0.76	0.531	2.11	0.120	0.016
FGA	15	0.871	0.900	0.042	0.042	0.85	0.795	5.00	0.983	0.006

ที่มา: พิมพ์รัตน์ ชาญปรีชญา. "ค่าทางสถิติของ STR 15 ตำแหน่งของประชากรไทย" วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร,2551

ค่า probability of match (PM) คือค่าที่บ่งบอกถึงโอกาสที่แต่ละบุคคลจะมีลักษณะ DNAเหมือนกัน พบว่าประชากรทั้งหมดมีค่า PM อยู่ระหว่าง 0.041 (D2S1338) ถึง 0.221 (TPOX) ส่วนค่า power of discrimination (PD) คือค่ากำลังการแยกแยะ บ่งบอกถึงประสิทธิภาพของการสามารถแยกแยะแต่ละบุคคลออกจากกัน พบว่าประชากรทั้งหมดมีค่า PD อยู่ระหว่าง 0.779 (TPOX) ถึง 0.959 (D2S1338) จะสังเกตได้ว่าค่า PM มีความสัมพันธ์ผกผันกับค่า PD นั่นคือหากตำแหน่งใดมีค่า PM น้อย ก็จะมีค่า PD มาก หมายความว่าตำแหน่งนั้นมีโอกาสน้อยที่แต่ละบุคคลจะมี DNAเหมือนกัน และมีประสิทธิภาพในการแยกแยะบุคคลออกจากกันได้มากดังเช่นตำแหน่ง D2S1338 ในทางกลับกันหากตำแหน่งใดมีค่าPM มากก็จะมีค่า PD น้อย หมายความว่าตำแหน่งนั้น

มีโอกาสที่แต่ละบุคคลจะมี DNA เหมือนกันได้มาก และมีประสิทธิภาพในการแยกแยะบุคคลออกจากกันได้น้อยดังเช่นตำแหน่ง TPOX นั่นเอง ดังนั้นค่า PM และค่า PD จึงเป็นค่าที่มีประโยชน์สำหรับงานตรวจพิสูจน์ DNA เนื่องจากช่วยสร้างความเชื่อมั่นในผลการตรวจพิสูจน์ยืนยันตัวบุคคล หากใช้ตำแหน่งในการตรวจ DNA เพิ่มขึ้น ค่า PM จะน้อยลง โอกาสที่ลายพิมพ์ DNA ของแต่ละบุคคลจะเหมือนกันยิ่งน้อยลงเท่านั้น

ค่า polymorphism information content (PIC) คือค่าที่แสดงความหลากหลายของข้อมูลในตำแหน่งที่ศึกษา ซึ่งตำแหน่งที่มีความหลากหลายน้อยที่สุดคือ ตำแหน่ง TPOX มีค่าเท่ากับ 0.55 ส่วนตำแหน่งที่มีความหลากหลายมากที่สุดคือ ตำแหน่ง FGA มีค่าเท่ากับ 0.85 ดังนั้นตำแหน่ง FGA จึงมีความเหมาะสมที่สุดในการนำมาตรวจพิสูจน์บุคคล ในขณะที่ตำแหน่ง TPOX มีความเหมาะสมน้อยที่สุดในการนำมาใช้ในการตรวจพิสูจน์บุคคล

สำหรับค่าที่ใช้ในการตรวจความสัมพันธ์ทางสายเลือดได้แก่ค่า power of exclusion (PE) คือค่ากำลังการคัดออก บ่งชี้ถึงประสิทธิภาพในการตรวจในกรณีของการตรวจพิสูจน์บุตร สามารถใช้คัดคนที่ไม่ใช่พ่อหรือแม่ออกไปได้ พบว่าประชากรทั้งหมดมีค่า PE อยู่ระหว่าง 0.276 (CSF1P0 และTPOX) ถึง 0.795 (D13S317 และ FGA) ส่วนค่า typical paternity index (PI_{Ty}) คือค่าที่ใช้ในการคัดกรองบุคคลที่เป็นพ่อที่แท้จริง พบว่าประชากรมีค่า PI_{Ty} อยู่ระหว่าง 1.21(CSF1P0 และ TPOX) ถึง 5.00 (D13S317 และFGA) สังเกตได้ว่าตำแหน่งที่มีค่า PE และ PI_{Ty} น้อยที่สุดและมากที่สุดเป็นตำแหน่งเดียวกัน แสดงว่าค่าทั้งสองมีความสัมพันธ์กัน ดังนั้นตำแหน่งที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการตรวจความสัมพันธ์ทางสายเลือดน้อยที่สุดคือตำแหน่ง CSF1P0 และ TPOX ส่วนตำแหน่ง D13S317 และ FGA เป็นตำแหน่งที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการตรวจความสัมพันธ์ทางสายเลือดมากที่สุด

เมื่อคำนวณค่า combined power of discrimination ของทั้ง 15 ตำแหน่ง พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.999999999999999975 หมายความว่ามีโอกาสน้อยมากที่จะพบบุคคลที่มีDNAเหมือนกัน บ่งบอกถึงประสิทธิภาพในการนำมาใช้ตรวจพิสูจน์ตัวบุคคลได้ ส่วนค่า combined power of exclusion ของทั้ง 15 ตำแหน่งมีค่าเท่ากับ 0.999999292 แสดงว่าโอกาสการคัดบุคคลที่ไม่ใช่พ่อหรือแม่ออกไปมีค่าสูงมาก จึงมีประสิทธิภาพมากพอในการใช้ตรวจพิสูจน์ความเป็นพ่อแม่ลูกได้เป็นอย่างดี

สำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ตามกฎของฮาร์ดีและไวน์เบอร์กโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Genepop เวอร์ชั่น 3.4 จาก http//genepop.curtin.edu.au/genepop_op 1.html ซึ่งได้คำนวณหาค่า exact test ของ P-value (P) ด้วยวิธี Markov chain method พบว่าข้อมูลประชากรเป็นไปตามกฎของฮาร์ดีและไวน์เบอร์กที่ $P > 0.05$ ในทุกตำแหน่ง โดยมีค่า standard error (S.E.)

น้อยกว่า 0.03 ดังนั้นข้อมูลลายพิมพ์DNAที่พบในประชากรนี้จึงมีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะใช้เป็นตัวแทนของประชากรในประเทศไทยได้

6. การวิเคราะห์ความถดถอยโลจิสติค (Logistic Regression Analysis)

การวิเคราะห์ความถดถอยโลจิสติค เป็นพื้นฐานเทคนิคการวิเคราะห์ถดถอย ทีนำมาประยุกต์ใช้กับตัวแปรจำแนกประเภท ซึ่งถือว่าเป็นตัวแปรเชิงพหุ (Multivariate Analysis) เพื่อใช้ทำนายค่าความน่าจะเป็น ของการเกิดเหตุการณ์ ที่มีค่าของผลลัพธ์เพียง 2 ค่า (Dichotomous Variable) และเป็นข้อมูลที่มีค่าของตัวแปรไม่ต่อเนื่อง เช่น การพบหรือไม่พบ ตายหรือไม่ตายเจ็บป่วยหรือไม่เจ็บป่วยในการวิเคราะห์สมการเส้นถดถอยจะใช้วิธีกำลังน้อยที่สุดในการประมาณค่าพารามิเตอร์ ส่วนการวิเคราะห์ความถดถอยโลจิสติค จะทำการประมาณค่า Oddsโดยแปลงค่า Odds ให้เป็น Logitic แล้วจึงประมาณค่าสัมประสิทธิ์ของตัวแบบ โดยใช้ Maximum Likelihoodซึ่งค่าสัมประสิทธิ์เหล่านี้จะถูกนำไปใช้ในการคำนวณหาความน่าจะเป็นของเหตุการณ์ที่สนใจ ด้วยการคำนวณหาผลต่างหรือการเปลี่ยนแปลงระหว่าง log odds ของตัวแปรตามเมื่อตัวแปรอิสระแต่ละตัวเปลี่ยนแปลงไป 1 หน่วยวิธีการวิเคราะห์โดยใช้ การวิเคราะห์ความถดถอยโลจิสติค นี้ไม่มีข้อกำหนดเกี่ยวกับตัวแปรตามและค่าความคาดเคลื่อนที่ต้องมีการแจกแจงแบบปกติ ไม่มีข้อกำหนดของความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างตัวแปรอิสระและตัวแปรตามแต่จะต้องมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างตัวแปรอิสระที่เป็นContinuous กับค่า Logit นอกจากนี้การวิเคราะห์ความถดถอยโลจิสติคยังสามารถใช้วิเคราะห์ข้อมูลได้ทุกระดับการวัดอีกด้วย ซึ่งเทคนิคทางสถิติของการวิเคราะห์ความถดถอยโลจิสติค ยังได้นำมาใช้ในการวิเคราะห์ปัจจัยเสี่ยง และได้ถูกพัฒนาเพื่อไปใช้ในการศึกษาทางด้านแพทย์

6.1 เหตุผลในการใช้ การวิเคราะห์ความถดถอยโลจิสติกแทนการวิเคราะห์ความถดถอยแบบปกติ

6.1.1 เมื่อ Z มีได้เพียง 2 ค่า ทำให้ค่าประมาณของ Z เป็นโอกาสที่เหตุการณ์ที่สนใจจะเกิด ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 0 ถึง 1 ถ้าใช้สมการความถดถอยเชิงเส้นปกติ คือ $Z = \beta_0 + \beta_1 x + e$ ค่า Z ที่ได้อาจจะไม่ได้อยู่ในช่วง 0 ถึง 1 หรืออาจมีค่าน้อยกว่า 0 หรือมากกว่า 1

6.1.2 ในการวิเคราะห์ความถดถอยทั่วไป มีเงื่อนไขว่า “ค่าความคลาดเคลื่อนต้องมีการแจกแจงแบบปกติ”แต่เมื่อ Z มีค่าได้เพียง 2 ค่าคือ 0 กับ 1 จะทำให้ค่าคลาดเคลื่อน e มีได้ 2 ค่าด้วย ซึ่งเป็นไปไม่ได้ที่ e จะมีการแจกแจงแบบปกติ จึงทำให้ไม่สามารถใช้การวิเคราะห์ความถดถอยแบบปกติได้

การวิเคราะห์ความถดถอยโลจิสติคเป็นเทคนิคการวิเคราะห์ตัวแปรเชิงพหุประเภทหนึ่งที่ใช้ในการประมาณค่าหรือทำนายความน่าจะเป็นของการเกิดหรือไม่เกิดเหตุการณ์ที่เราสนใจ โดยตัวแบบถดถอยโลจิสติค จะมีข้อกำหนดในการใช้งานน้อยกว่าการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์จำแนกประเภท (Discriminant Analysis) และต้องใช้วิธีกำลังน้อยที่สุด (Ordinary Least Square; OLS)

การวิเคราะห์ความถดถอยโลจิสติคที่มีตัวแปรอิสระมากกว่า 1 ตัว ในรูปทั่วไปกำหนดให้ มี P ตัวคือ X1, X2,...XP ส่วนตัวแปรตามYยังคงมีค่าได้2 ค่า คือ

$$Y = \begin{cases} 1 \text{ ถ้าเกิดเหตุการณ์} \\ 0 \text{ ถ้าไม่เกิดเหตุการณ์} \end{cases}$$

และY ยังคงมีการแจกแจงแบบเบอร์นูลี ที่มีความน่าจะเป็น P

$$P = E(Y) = P\{Y=1\} = \frac{e^{\beta o+\beta 1X1+\cdots+\beta pXp}}{1+e^{\beta o+\beta 1X1+\cdots+\beta pXp}}$$

หรือ P{เกิดเหตุการณ์} $= P\{Y=1\} = \frac{1}{1+e^{-(\beta o+\beta 1X1+\cdots+\beta pXp)}}$

และPไม่เกิดเหตุการณ์ $= P\{Y=0\} = 1 - P\{Y=1\} = 1 - P$

$$= \frac{1}{1+e^{\beta o+\beta 1X1+\cdots+\beta pXp}}$$

$$\text{Odd Ratio} = OR = \frac{P}{1-P} = e^{\beta o+\beta_1 X_1+\ldots+\beta_p X_p}$$

ฟังชั่นตอบสนองโลจิทคือ

$$\text{Log}_e(\text{OR}) = \ln(\text{OR}) = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \ldots + \beta_p x_p$$

หรือกรณีที่ใช้สมการ

$$\text{Log}_e(\hat{\text{OR}}) = b0 + b1X1 + b2X2 + \ldots + bpXp$$

6.2 การนำการวิเคราะห์ความถดถอยโลจิสติคไปประยุกต์ใช้

การวิเคราะห์ความถดถอยโลจิสติคนั้น ตัวแปรตาม()จะมีการแจกแจงแบบเบอร์นูลี คือ มีค่าได้ 2 ค่าคือ 0 กับ 1 โดย “1” หรือ Y = 1 จะหมายถึง ได้สิ่งที่สนใจหรือเกิดเหตุการณ์ที่สนใจ ในขณะที่ Y = 0 จะหมายถึงไม่เกิดเหตุการณ์ที่สนใจ ดั้งนั้นเมื่อเก็บข้อมูลตัวอย่างจะต้องทราบมาก่อนว่าแต่ละหน่วยอยู่กลุ่มใด หรือหน่วยที่ i(Yi) มีค่าเป็น0 หรือ 1 เช่น การศึกษาสาเหตุที่ทำให้เป็นโรคหัวใจ เมื่อเก็บรวบรวมคนไข้มา 100 คน จะต้องทราบหรือให้แพทย์ตรวจก่อนว่าคนไข้แต่ละคนเป็นโรคหัวใจหรือไม่ นั่นคือ ต้องทราบค่าตัวแปรตามมาก่อน พร้อมกันทั้งจะศึกษาตัวแปรอิสระที่คาดว่าส่งผลต่อการเป็นโรคหัวใจ เช่น อายุ น้ำหนัก การเป็นกรรมพันธุ์ ฯลฯ นำมาสร้างสมการความถดถอยโลจิสติคโดยการใช้วิธีของความควรจะเป็นสูงสุดในการประมาณค่าพารามิเตอร์ β_0. β_2.... β_p เพื่อศึกษาว่าตัวแปรอิสระใดบ้างส่งผลต่อการเป็นโรคหัวใจ เมื่อทำการตรวจสอบแล้ว จะนำสมการที่สร้างไปพยากรณ์โอกาสที่คนไข้คนใหม่ว่าจะเป็นโรคหัวใจหรือไม่ หรือพยากรณ์โอกาสที่ลูกค้าจะซื้อหรือไม่ซื้อสินค้า เช่น

$$P\{Y=1\} = P\{\text{ซื้อสินค้า}\} = \frac{e^{b0+b1x1+b2x2+\cdots+bpxp}}{1+e^{b0+b1x1+b2x2+\cdots+bpxp}}$$

$$P\{Y=0\} = P\{\text{ไม่ซื้อสินค้า}\} = 1 - P\{\text{ซื้อสินค้า}\}$$

ค่าที่พยากรณ์ คือ P{Y=1} และ P{Y=0} จะมีค่าระหว่าง 0 ถึง1 ดั้งนั้นจึงต้องมีการกำหนดค่าความน่าจะเป็นที่ใช้ตัดสินใจว่าลูกค้าจะซื้อหรือไม่

ถ้ากำหนดให้ $\mathbf{Y_c}$ เป็นค่าวิกฤติที่ใช้ตัดสินใจ โดยที่ $0 < \mathbf{Y_c} < 1$

ถ้ากำหนด $\mathbf{Y_c} = 0.5$ และนายจตุพล เป็นลูกค้ารายหนึ่ง คำนวณ P {นายจตุพลจะซื้อ}

ถ้า P {นายจตุพลจะซื้อสินค้า} > 0.5 จะพยากรณ์ว่า นายจตุพลจะซื้อสินค้าหรืออยู่ในกลุ่มลูกค้าที่ไม่ซื้อสินค้า

แต่ถ้า P {นายจตุพลจะซื้อสินค้า} ≤ 0.5 จะพยากรณ์ว่า นายจตุพลจะไม่ซื้อสินค้า หรืออยู่ในกลุ่มลูกค้าที่ไม่ซื้อสินค้า

อย่างไรก็ตามผู้ศึกษาจะเป็นผู้กำหนดค่า $\mathbf{Y_c}$ ซึ่งอาจจะมากกว่า 0.5 หรือน้อยกว่า 0.5 ก็ได้ตามความเหมาะสม

กรณีที่นำเทคนิคการวิเคราะห์ความถดถอยโลจิสติคไปใช้เพื่อพยากรณ์ลูกค้าว่าจะซื้อหรือไม่ หรือ พยากรณ์โอกาสคนไข้ว่าจะเป็นโรคหัวใจหรือไม่ ลูกค้าที่มาขอกู้จะเป็นลูกหนี้ที่ดีหรือไม่นั้นจะต้องมีความมั่นใจในความถูกต้อง หรือความเชื่อถือได้ของสมการความถดถอยโลจิสติค ที่สร้างขึ้น ดังนั้นก่อนที่จะนำสมการที่สร้างขึ้นไปพยากรณ์ควรจะตรวจสอบหรือประเมินความเชื่อถือได้หรือความเหมาะสมของฟังชันหรือสมการที่สร้างขึ้น

7. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาลายพิมพ์DNA

งานวิจัยของ วิมลธรา คำศรี (2548) ที่ทำการศึกษาความถี่ของอัลลีล 15 ตำแหน่งโดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป AmpFℓSTR® Identifiler™ PCR Amplification Kit ซึ่งประกอบด้วยตำแหน่ง CSF1P0 , D7S820 , D8S1179 , D21S11 , D2S1338 , D3S1358 , D13S317 , D16S539 , TH01, D18S51 , D19S433 , TPOX , vWA , D5S818 และ FGA จากตัวอย่างประชากรไทย 258 คน พบว่ามีความสอดคล้องกับกฎของฮาร์ดีและไวน์เบอร์ก จากการคำนวณค่า PE และPD รวมทุกตำแหน่งพบว่ามีค่าสูงถึง 0.999999229 และ 0.99999999999999987 ตามลำดับ งานวิจัยนี้นับเป็นครั้งแรกที่มีการศึกษาความถี่ของอัลลีลในตำแหน่ง D16S539,D2S1338 และD19S433 ในประชากรไทย

บุษบา ฤกษ์อำนวยโชคและคณะ(2549) ได้เก็บข้อมูลลายพิมพ์DNA 15 ตำแหน่งในประชากรไทย โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป AmpFℓSTR® Identifiler™ PCR Amplification Kit เช่นเดียวกัน โดยเก็บตัวอย่างจากประชากรไทยจำนวน 210 คน พบว่าค่า PD และ PE รวมทุกตำแหน่งเท่ากับ 7.01×10^{-18} และ 0.999999545 ตามลำดับ โดยตำแหน่ง TPOX มีค่า PD ค่าPIC และค่า PE ต่ำที่สุด และเป็นตำแหน่งเดียวที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกฎฮาร์ดีและไวน์เบอร์ก

ธานินทร์ ภู่พัฒน์และคณะ(2549) ได้ศึกษา STR 3 ตำแหน่ง คือ D10S2325, D16S539 และD19S253 ในประชากรไทยที่อาศัยในภาคเหนือจำนวน 203 คน โดยการเพิ่มปริมาณPCRด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบขึ้นใหม่ จากนั้นตรวจผลด้วย polyacrylamide gel electrophoresis เมื่อคำนวณค่าทางสถิติพบว่าค่าPDของทั้งสามตำแหน่งมีค่า 0.954,0.923และ 0.632 ตามลำดับ เมื่อคำนวณค่า PD และPE ทุกตำแหน่งรวมกันได้ค่า 0.99972 และ 0.9478 ตามลำดับ ทุกตำแหน่งที่ทดสอบเป็นไปตามกฎของฮาร์ดีและไวน์เบอร์ก ตำแหน่งที่ใช้ทดสอบนี้มีตำแหน่ง D16S539 เท่านั้นที่มีอยู่ใน

ฐานข้อมูลCODIS ส่วนอีกสองตำแหน่งเป็นการออกแบบและสังเคราะห์ไพรเมอร์ใหม่ เพื่อเพิ่มจำนวนตำแหน่งที่ใช้ทดสอบในห้องปฏิบัติการเพิ่มเติมจากการตรวจเพียง 15 ตำแหน่ง เป็นการช่วยพัฒนางานด้านการตรวจลายพิมพ์DNA ทำให้มีความน่าเชื่อถือในการยืนยันตัวบุคคลเพิ่มมากขึ้น

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. กลุ่มตัวอย่าง

ศึกษาจากข้อมูลการตรวจ DNA Identification 15 ตำแหน่ง ของครอบครัวที่มีลูกมากกว่า 1 คนและศึกษาจากข้อมูลการตรวจ DNA Identification 15 ตำแหน่ง ของพี่น้อง ที่เป็น บิดา มารดาเดียวกัน และพี่น้องที่ไม่ได้เกิดจากบิดา มารดาเดียวกัน ช่วงเวลาเก็บตัวอย่างวันที่ 1 มีนาคม พ.ศ.2551 ถึง 31 ธันวาคม พ.ศ. 2551 สถานที่ทำการวิจัยและเก็บข้อมูล หน่วยนิติเซโรวิทยา ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเก็บตัวอย่างใช้ตัวอย่างเลือดที่เจาะจากเส้นเลือดดำที่แขนของผู้ขอรับบริการ ใส่หลอดเลือดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA ซึ่งเก็บจากตัวอย่างผู้ใช้บริการ แยกเป็น 2 กลุ่ม คือ

1.1 กลุ่มผู้ใช้บริการที่เป็นน้องแท้จริง จำนวน 100 คู่ 200 คน

1.2 กลุ่มผู้ใช้บริการที่ไม่ได้เป็นน้องแท้จริง จำนวน 100 คู่ 200 คน

เมื่อได้ตัวอย่างดังกล่าวมา เข้าขบวนการสกัดตัวอย่าง DNA ด้วยชุดสกัด DNA IQ Mini Kit และเพิ่มปริมาณ DNA และทำการวิเคราะห์ DNAด้วยเครื่อง ABI 3130 XL Genetic Analyzer วิเคราะห์ STR Profile Software Gene Mapper ID V 3.2

2. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

2.1 วัสดุอุปกรณ์

2.1.1 Microcentrifuge tubeขนาด1.5 ml

2.1.2 Centrifuge tube

2.1.3 Autopipette ขนาด 20 µl 100 µl, 200µl,1000 µl

2.1.4 Beakers ขนาด 25 ml ,50 ml

2.1.5 Pipette tip

2.1.6 EDTA blood test tube จำนวน 200 หลอด

2.1.7 Centrifuge

2.1.8 Vortex

2.1.9 mixer

2.1.10 Refrigerator

2.1.11 Rack

2.1.12 Incubator

2.1.13 ถุงมือยาง

2.2 สารเคมีสำหรับสกัด DNA จากตัวอย่างเลือด

2.2.1 Ethanol 95-100% 35 ml

2.2.2 Isopropyl alcohol 35 ml

2.2.3 DNA IQ Mini Kit ประกอบด้วย

2.2.3.1 Lysis buffer

2.2.3.2 1MDTT

2.2.3.3 Magnetic stand

2.2.3.4 Resin

2.2.3.5 Elution buffer

2.3 สารเคมีสำหรับการตรวจวัดคุณภาพ DNA ด้วยวิธี gel electrophoresis

2.3.1 1% agarose 60 g

2.3.2 1X TBE 6000 ml

2.3.3 Loading dye 120 μl

2.3.4 Sterile water

2.3.5 Ethidium bromide 1200 μl

2.4 สารเคมีสำหรับเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี PCR

2.4.1 10X PCR buffer

2.4.2 10X dNTP mixed(dATP,dCTP,dTTP,dGTP)

2.4.3 Taq DNA polymerase 5 unit/μl,เก็บที่ -20°C

2.5 สารเคมีสำหรับการทำ agarose gel electrophoresis

2.5.1 3% Agarose gel ใน ½ X TBA

2.5.2 10X TBE stock solution

2.5.3 ½ X TBE working solution

2.5.4 Gel loading buffer

2.5.5 5 mg% Ethidium bromide stock solution

2.5.6 DNA Marker

3. วิธีการสกัดตัวอย่างเลือดด้วย DNA IQ

3.1 คำนวณปริมาตร Lysis buffer ที่ต้องใช้ในปฏิกิริยาสำหรับเตรียมเป็นWorking lysis solution โดย Lysis buffer 100 µl +1MDTT 1 µl เป็น Working lysis และ1 sampleใช้ Working lysis buffer 200 µl

3.2 Pipet resin 7 µl ลงในหลอดที่เขียนLabelไว้แล้วทุกหลอด (mix resin ก่อนpipet)

3.3 Pipet WLB ลงในหลอดที่เติมResinไว้หลอดละ 93 µl (mix WLB ก่อน pipet)

3.4 Pipet whole blood ลงในหลอดตามชื่อ Sampleที่ Labelไว้15-20 µl (Vortex blood ก่อน)

3.5 เมื่อนำ 2+3+4 ครบแล้วนำไป Vortex 3 วินาทีแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

3.6 นำมา Vortex 2 วินาทีแล้วนำไปวางบนแท่งแม่เหล็กโดยใช้สายต่อฝา Capหันเข้าด้านใน เปิดฝาCap ออกเพื่อดูด Supernatant ทิ้ง

3.7 เติม WLB ทุกหลอดๆละ100 µl นำไป Vortex 2 วินาทีนำไปวางบน Magnetic stand ดูด Supernatant ทิ้ง

3.8 เติม 1X Wash 100 µl นำไป Vortex 2 วินาทีนำไปวางบน Magnetic stand ดูด Supernatant ทิ้ง ทำซ้ำ 3 ครั้ง โดยครั้งสุดท้ายดูด Supernatant ออกให้หมด

3.9 เปิดฝาทิ้งไว้นาน 5 นาที (ห้ามนานเกิน 20 นาที)

3.10 เติมElution buffer 100 µl ปิดฝานำไป Vortex 2 วินาทีเสร็จแล้วนำไปวางใน Incubator ที่อุณหภูมิ 65°C นาน 5 นาที

3.11 นำหลอดออกจาก Incubator นำไป Vortex ทันที 2 วินาทีเสร็จแล้ววางบนMagnetic stand ดูดเอาส่วนใสไปทำ DNA ต่อไป

4. การเพิ่มปริมาณDNAด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ชุด AmpFℓSTR® Identifiler® PCR Amplification Kit

ส่วนประกอบของ PCR reaction mixture ประกอบด้วย

DNA	2 µl
PCR mixed	5.25 µl
Primer set	2.75 µl
AmpliTaq gold (5U/µl.)	0.25 µl
DW	3 µl

4.1 นับจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่จะทดสอบรวมทั้งตัวอย่างควบคุม positive control และ negative control

4.2 นำสารในชุดทดสอบมาเขย่าโดยใช้เครื่อง vortex เป็นเวลา 5 วินาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงเล็กน้อยให้หยดน้ำที่ฝาหลอดตกลงมา

4.3 เตรียม master mix ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ซึ่งประกอบด้วย

จำนวนตัวอย่าง x AmpFℓSTR® PCR Reaction Mix ปริมาตร 10.5 µl

จำนวนตัวอย่าง x AmpliTag Gold® DNA polymerase ปริมาตร 0.5 µl

จำนวนตัวอย่าง x AmpFℓSTR® Identifiler Primer Set ปริมาตร 5.5 µl

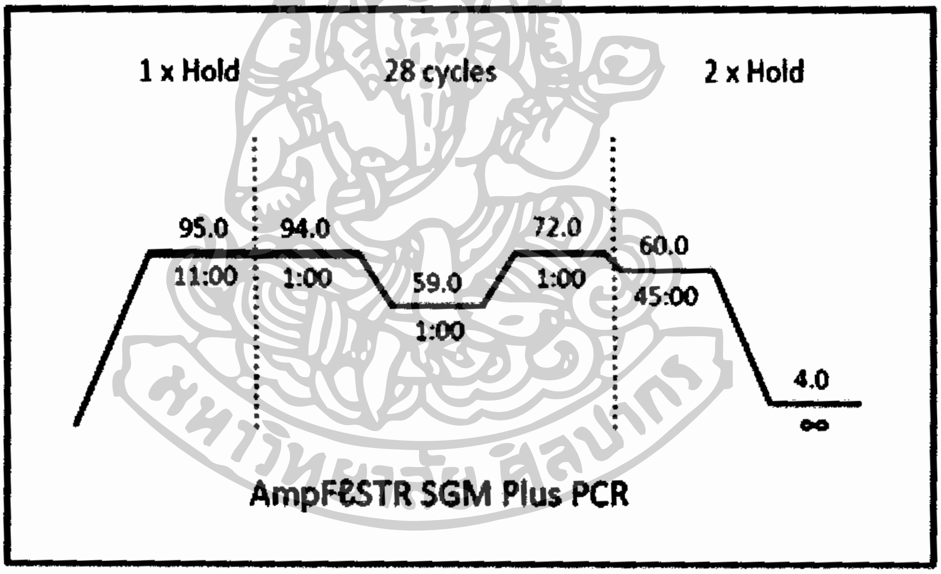
4.4 ผสมสารให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex เป็นเวลา 5 วินาที จากนั้นดูด master mix 15 µl ใส่ลงใน PCR tube เท่ากับจำนวนตัวอย่าง

4.5 ปริมาตรสุดท้ายในแต่ละหลอด PCR tube คือ 25 µl ดังนั้นในหลอดทดลองจะต้องเติมตัวอย่างDNA 1-5 µl (0.05-0.125 ng/µl) ในหลอด positive controlเติม AmpFℓSTR control DNA 99474 (0.01 ng/µl) 5 µl และในหลอด negative controlเติมบัฟเฟอร์ TE 5 µl จากนั้นนำPCR tube ที่ได้ใส่ในเครื่อง thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมดังตารางที่ 5 และ นำ Reaction mixture ที่ได้เข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรม ดัง ภาพที่

ตารางที่ 4 โปรแกรมการเพิ่มปริมาณDNAด้วยเทคนิคPCRของชุดทดสอบสำเร็จรูป AmpFℓSTR Identifiler® PCR Amplification Kit

Initial Incubation Step	Denature	Anneal	Extend	Final Extension	Final Step
Hold	Cycle (28 รอบ)			Hold	Hold
95°C 11 นาที	94°C 1 นาที	59°C 1 นาที	72°C 1 นาที	60°C 45 นาที	4°C (forever)

ที่มา : Applied Biosystems, AmpFlSTR® Identifiler® PCR Amplification Kit: User'sManual, California: n.p., 2006.



ภาพที่ 24 Thermal cycler

ที่มา : Applied Biosystems, AmpFlSTR® Identifiler® PCR Amplification Kit: User'sManual, California: n.p., 2006.

เมื่อเสร็จสิ้นโปรแกรม นำผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15 ถึง -25 องศาเซลเซียส จะสามารถเก็บรักษาตัวอย่างได้นาน 2 สัปดาห์

5. การวิเคราะห์ DNA ด้วยเครื่อง ABI PRISM™ 3130xl Genetic Analyzer

เมื่อได้ผลิตผลจากปฏิกิริยาPCRแล้ว ให้เก็บหลอดไว้ในน้ำแข็งแล้วนำส่งตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ABI PRISM™ 3130xl Genetic Analyzer ที่หน่วยนิติเซโรวิทยา ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

5.1 ส่วนประกอบของ add sample to run ประกอบด้วย

5.1.1 Hi-di formamide	13.5 μl
5.1.2 Size standard	0.5 μl
5.1.3 PCR reaction mix	1 μl
5.1.4 Allelic Ladder	15 μl

5.2 เตรียม master mix ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ซึ่งประกอบด้วย

(จำนวนตัวอย่าง +2) x formamide 13.5 μl

(จำนวนตัวอย่าง +2) x GeneScan™ -500LIZ™ size standard 0.5 μl

5.3 ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเล็กน้อย

5.4 เติมสารผสมของ formamide/Genescan-500LIZ solution 14 μl ลงใน Genetic Analyzer sample plate ขนาด 96 well

5.5 เติมตัวอย่างDNAที่เพิ่มปริมาณแล้ว หรือเติม AmpFℓSTR® Identifiler™ Allelic Ladder จำนวน 1 μl ลงในหลอดที่เตรียมไว้ ผสมให้เข้ากันโดยการดูดขึ้นลงหลายๆครั้งแล้วปิดฝาด้วย septa

5.6 นำไปใส่ใน heating box ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 นาทีเพื่อให้ตัวอย่างเกิดการ denature

5.7 ทำให้เย็นบนน้ำแข็งเป็นเวลา 3 นาทีแล้วนำไปใส่ในเครื่องเครื่อง ABI PRISM™ 3130xl Genetic Analyzer เริ่มดำเนินการวิเคราะห์และแปรผลด้วย software

6. การคำนวณค่าทางสถิติ

นำข้อมูลลายพิมพ์ DNA ที่อยู่ในรูปของกราฟเล็กโตรฟีกโครแกรม 15 ตำแหน่ง จากทั้งหมด 16 ตำแหน่ง โดยตัดตำแหน่งของเพศ ออกไปไม่นำเป็นข้อมูลประกอบการวิจัย และนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณค่าสถิติต่างๆ ได้แก่

6.1 การศึกษาจำนวน allele บน chromosome ที่ได้จากการตรวจ STR Profile 15 ตำแหน่งที่มีความซ้ำกัน ของคู่ตัวอย่างพี่-น้องที่แท้จริงที่เกิดจาก บิดา มารดาเดียวกัน และคู่ตัวอย่างที่ไม่ใช่พี่-น้องที่แท้จริงที่ไม่ได้เกิดจาก บิดา มารดาเดียวกัน โดยใช้ผลรวมของตำแหน่งที่ซ้ำกันของ allele บน chromosome เพื่อใช้จำนวน allele บน chromosome ยืนยันความเป็นพี่ - น้องที่แท้จริง โดยใช้ t-Test

6.2 เพื่อศึกษาตำแหน่ง allele บน chromosome ที่เหมือนกันของคู่ตัวอย่างพี่-น้องที่แท้จริงและไม่ใช่คู่พี่ - น้อง สามารถบ่งบอกความเป็นพี่ - น้องที่แท้จริง

6.3 เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของ allele บน chromosome ที่จำแนกความเป็นพี่-น้องที่แท้จริงไม่ใช่พี่-น้องที่แท้จริง โดยใช้ ค่าสถิติ Logistic Regression ซึ่งตัวแปรหรือปัจจัยหลักคือ พันธุกรรม ที่คนพี่-น้องกันย่อม ต้องได้รับสารพันธุกรรมมาจากบิดา-มารดาเดียวกัน

การใช้เทคนิคทางสถิติ Logistic Regression Analysis ทำนายค่าความน่าจะเป็นความเป็นพี่-น้องที่แท้จริงจากตำแหน่ง allele ที่เหมือนกัน จาก allele 15 ตำแหน่งที่ได้รับจากบิดา-มารดา คือ D8S1179 D21S11 D7S820 CSF1PO D3S1358 TH01 D13S317 D16S539 D2S1338 VWA TPOX D18S51 D5S818 FGA

$$\text{ตัวแปรตาม ความเป็นพี่น้อง}Y = \begin{cases} 1 & \text{เป็นพี่น้องที่แท้จริง} \\ 0 & \text{ไม่เป็นพี่น้องที่แท้จริง} \end{cases}$$

$$P\{\text{เป็นพี่น้องที่แท้จริง}\} = \{Y=1\} = \frac{e^{\beta_0 + \beta_1 x_1 + \ldots + \beta_p x_p}}{1 + e^{\beta_0 + \beta_1 x_1 + \ldots + \beta_p x_p}}$$

$$P\{\text{ไม่เป็นพี่น้องที่แท้จริง}\} = \{Y=0\} = \frac{1}{1 + e^{\beta_0 + \beta_1 x_1 + \ldots + \beta_p x_p}}$$

ในที่ตัวแปรอิสระที่เป็นตัวแปรเชิงคุณภาพ X คือ allele ทั้ง15 ตัวคือ D8S1179 D21S11 D7S820 CSF1PO D3S1358 TH01 D13S317 D16S539 D2S1338 VWA TPOX D18S51 D5S818 FGA โดยกำหนดให้ พี่น้องที่มีตำแหน่ง allele บน chromosome ต่างกัน เป็น 0 และเหมือนกัน เป็น 1

$$X = \begin{cases} 1 & \text{allele เหมือนกัน} \\ 0 & \text{allele ต่างกัน} \end{cases}$$

$$P\ \{\text{เป็นพี่น้องที่แท้จริง}\} = \frac{1}{1+e^{-W}}$$

$$P = e^{\beta 0} + e^{\beta_1 x_1}\ e^{\beta_2 x_2} + e^{\beta_1 x_1} + e^{\beta_3 x_3} + \ldots + e^{\beta_{15} x_{15}}$$

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. รูปแบบลายพิมพ์ DNA ที่ใช้วิเคราะห์ข้อมูลสำหรับงานวิจัย

ผลการวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA ด้วยเครื่อง ABI PRISM™ 3130xl Genetic Analyzer อยู่ในรูปของกราฟอิเล็กโทรฟีโรแกรม โดยภาพกราฟอิเล็กโทรฟีโรแกรมที่นำมาแสดงในภาพที่ 25-28 จะประกอบด้วย allelic ladder อยู่ช่องบนสุดเพื่อเป็น marker แสดงขนาดของอัลลีลแต่ละตำแหน่ง ช่องล่างถัดมาคือตัวอย่าง positive control เป็นตัวอย่าง DNA ที่ทราบขนาดแล้วเพื่อควบคุมประสิทธิภาพของขั้นตอนการทดลอง ถัดลงไปเป็นตัวอย่าง DNA ที่ต้องการวิเคราะห์ ในกรณีนี้ใช้ตัวอย่างเลือดจากประชากรไทยที่เข้ารับการตรวจหาความสัมพันธ์ทางสายเลือด จึงเป็นตัวอย่าง DNA ของผู้เป็นบิดา มารดา และบุตรตามลำดับ แต่ในงานวิจัยนี้ต้องการตัวอย่างจากบุตรที่เกี่ยวข้องกันทางสายเลือด จึงใช้ข้อมูลลายพิมพ์ DNAจากบุตรทั้งสองคนเท่านั้น

เนื่องจากตำแหน่งที่ใช้ทดสอบลายพิมพ์ DNA ทั้ง 16 ตำแหน่ง ได้ย้อมด้วยสีฟลูโอเรสเซนต์ 4 สี จึงมีกราฟอิเล็กโทรฟีโรแกรม 4 แบบ แยกตามขนาดและสีฟลูโอเรสเซนต์ที่ติดอยู่กับผลิตผล PCR นั้น ๆ ได้แก่

สีน้ำเงินย้อมด้วยสารเรืองแสง 6-FAM แสดงตำแหน่ง D8S1179, D21S11, D7S820 และ CSF1P0 ดังแสดงในภาพที่ 25

สีเขียวย้อมด้วยสารเรืองแสง VIC แสดงตำแหน่ง D3S1358, TH01, D13S317, D16S539 และ D2S1338 ดังแสดงในภาพที่ 26

สีเหลืองย้อมด้วยสารเรืองแสง NED แสดงตำแหน่ง D19S433, vWA, TPOX และ D18S51 ดังแสดงในภาพที่ 27

สีแดงย้อมด้วยสารเรืองแสง PET แสดงตำแหน่ง amelogenin, D5S818 และ FGA ดังแสดงในภาพที่ 28

เมื่อรวมข้อมูลจากกราฟทั้ง 4 แบบจากภาพที่ 25-28 จะได้รูปแบบลายพิมพ์ DNA ทั้ง 16 ตำแหน่ง โดยรูปแบบลายพิมพ์ DNA ของเพศชาย คือ ผู้เป็นบิดามี ดังนี้ ตำแหน่ง D8S1179 มีจีโนไทป์ 15 , 15 ตำแหน่ง D21S11 มีจีโนไทป์ 28 , 31.2 ตำแหน่ง D7S820 มีจีโนไทป์ 10 , 12 ตำแหน่ง CSF1PO มีจีโนไทป์ 12 , 12 ตำแหน่ง D3S1358 มีจีโนไทป์ 15 , 15 ตำแหน่ง TH01 มีจีโนไทป์ 9 , 9 ตำแหน่ง D13S317 มีจีโนไทป์ 11 , 12 ตำแหน่ง D16S539 มีจีโนไทป์ 11 , 11 ตำแหน่ง D2S1338 มีจีโนไทป์ 20 , 23 ตำแหน่ง D19S433 มีจีโนไทป์ 12 , 16 ตำแหน่ง vWA มีจีโนไทป์ 17 , 19 ตำแหน่ง TPOX มีจีโนไทป์ 8 , 8 ตำแหน่ง D18S51 มีจีโนไทป์ 16 , 18 ตำแหน่ง amelogenin แสดงผล X , Y ตำแหน่ง D5S818 มีจีโนไทป์ 10 , 12 และตำแหน่ง FGA มีจีโนไทป์ 18 , 20

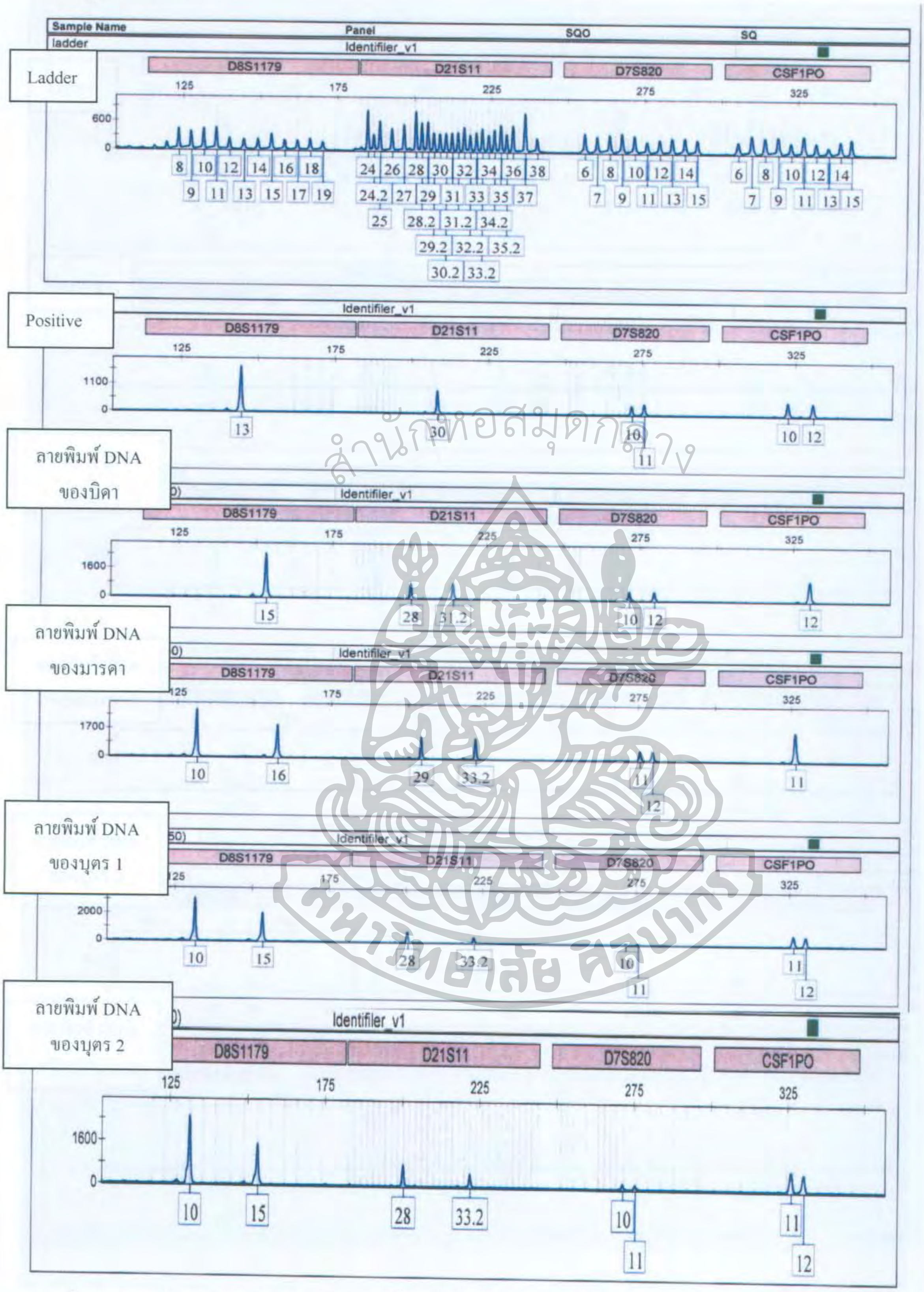
ส่วนรูปแบบลายพิมพ์ DNA ของผู้เป็นมารดามีดังนี้ ตำแหน่ง D8S1179 มีจีโนไทป์ 10 , 16 ตำแหน่ง D21S11 มีจีโนไทป์ 29 , 33.2 ตำแหน่ง D7S820 มีจีโนไทป์ 11 , 12 ตำแหน่ง CSF1PO มีจีโนไทป์ 11 , 11 ตำแหน่ง D3S1358 มีจีโนไทป์ 16 , 18 ตำแหน่ง TH01 มีจีโนไทป์ 7 , 7.3 ตำแหน่ง D13S317 มีจีโนไทป์ 8 , 9 ตำแหน่ง D16S539 มีจีโนไทป์ 10 , 13 ตำแหน่ง D2S1338 มีจีโนไทป์ 17 , 20 ตำแหน่ง D19S433 มีจีโนไทป์ 15 , 16 ตำแหน่ง vWA มีจีโนไทป์ 16 , 18 ตำแหน่ง TPOX มีจีโนไทป์ 8 , 11 ตำแหน่ง D18S51 มีจีโนไทป์ 14 , 14 ตำแหน่ง amelogenin แสดงผล X , X ตำแหน่ง D5 S818 มีจีโนไทป์ 10 , 10 และตำแหน่ง FGA มีจีโนไทป์ 18 , 21.2

ส่วนรูปแบบลายพิมพ์ DNA ของผู้เป็นบุตรคนที่1 มีดังนี้ ตำแหน่ง D8S1179 มีจีโนไทป์ 10 , 15 ตำแหน่ง D21S11 มีจีโนไทป์ 28 , 33.2 ตำแหน่ง D7S820 มีจีโนไทป์ 10 , 11 ตำแหน่ง CSF1PO มีจีโนไทป์ 11 , 12 ตำแหน่ง D3S1358 มีจีโนไทป์ 15 , 18 ตำแหน่ง TH01 มีจีโนไทป์ 7 , 9 ตำแหน่ง D13S317 มีจีโนไทป์ 9 , 12 ตำแหน่ง D16S539 มีจีโนไทป์ 11 , 13 ตำแหน่ง D2S1338 มีจีโนไทป์ 17 , 20 ตำแหน่ง D19S433 มีจีโนไทป์ 15 , 16 ตำแหน่ง vWA มีจีโนไทป์ 16 , 19 ตำแหน่ง TPOX มีจีโนไทป์ 8 , 8 ตำแหน่ง D18S51 มีจีโนไทป์ 14 , 18 ตำแหน่ง amelogenin แสดงผล X , X ตำแหน่ง D5 S818 มีจีโนไทป์ 10 , 10 และตำแหน่ง FGA มีจีโนไทป์ 18 , 21.2

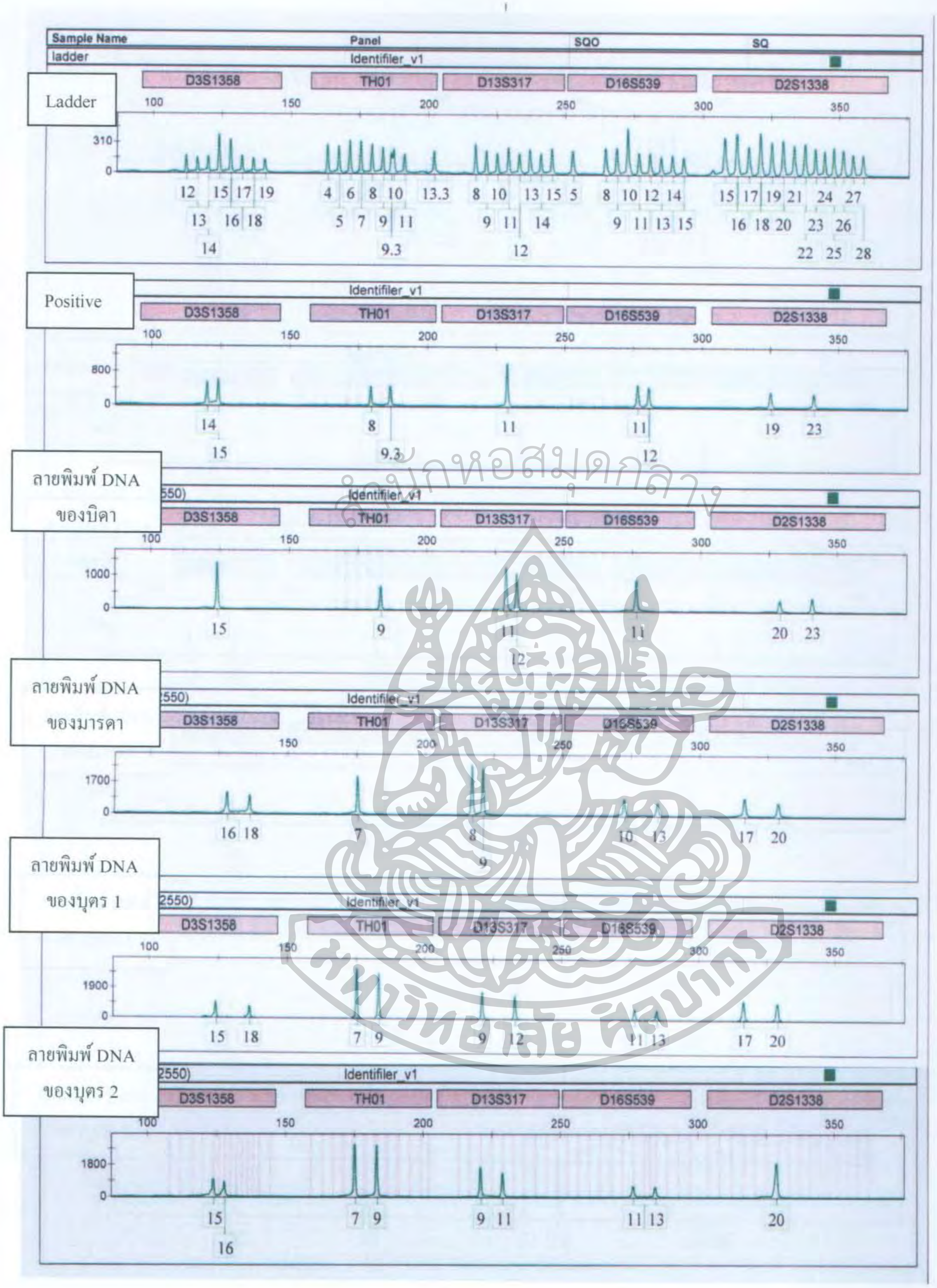
ส่วนรูปแบบลายพิมพ์ DNA ของผู้เป็นบุตรคนที่ 2 มีดังนี้ ตำแหน่ง D8S1179 มีจีโนไทป์ 10 , 15 ตำแหน่ง D21S11 มีจีโนไทป์ 28 , 33.2 ตำแหน่ง D7S820 มีจีโนไทป์ 10 ,11 ตำแหน่ง CSF1PO มีจีโนไทป์ 11 , 12 ตำแหน่ง D3S1358 มีจีโนไทป์ 15 ,16 ตำแหน่ง TH01

มีจีโนไทป์ 7 , 9 ตำแหน่ง D13S317 มีจีโนไทป์ 9 , 11 ตำแหน่ง D16S539 มีจีโนไทป์ 11 , 13 ตำแหน่ง D2S1338 มีจีโนไทป์ 20 , 20 ตำแหน่ง D19S433 มีจีโนไทป์ 16 , 16 ตำแหน่ง vWA มีจีโนไทป์ 16 , 17 ตำแหน่ง TPOX มีจีโนไทป์ 8 , 11 ตำแหน่ง D18S51 มีจีโนไทป์ 14 , 16 ตำแหน่ง amelogenin แสดงผล X , Y ตำแหน่ง D5 S818 มีจีโนไทป์ 11 , 12 และตำแหน่ง FGA มีจีโนไทป์ 20 , 26

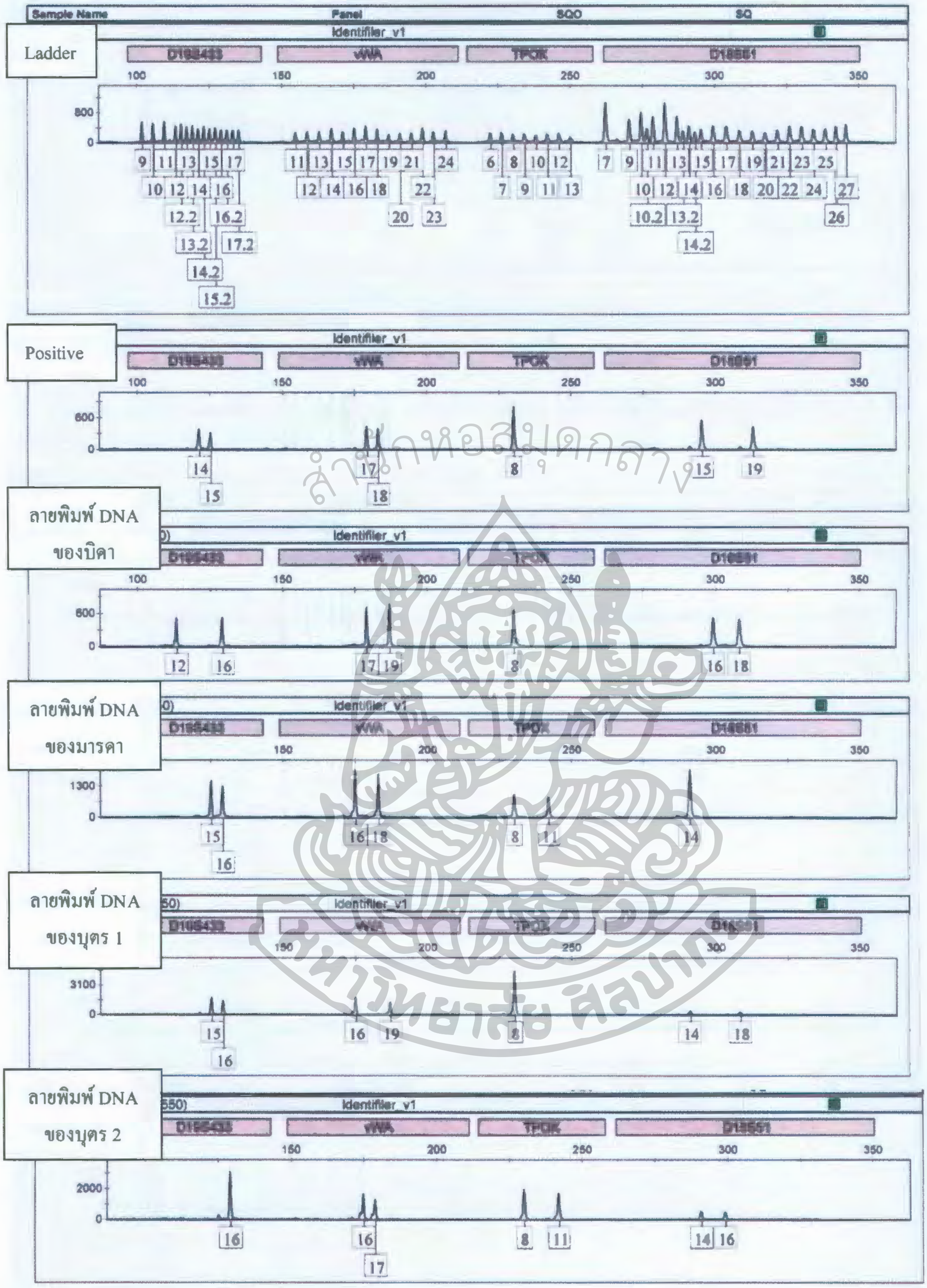
หากวิเคราะห์ผลการตรวจลายพิมพ์ DNA ในแง่ของการพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือด จากภาพอิเล็กโทรฟีโรแกรมที่ 25-28 พบว่าลายพิมพ์ DNA ทั้ง16 ตำแหน่งเป็นแบบ conclusive คือ ลายพิมพ์ DNA ของบุตรมีตำแหน่งที่ตรงกับบิดาและมารดาอย่างละครึ่งทุกตำแหน่ง จึงสรุปได้ว่า เป็นบุตรที่แท้จริง และจากการวิเคราะห์ จีโนไทป์ของบุตรทั้งสองคน ซึ่งเป็นคู่พี่น้องที่แท้จริง พบว่ามีจีโนไทป์ที่เหมือนกัน 6 ตำแหน่ง allele ได้แก่ D8S1179 , D21S11 , D7S820 , CSF1PO , THO1 และ D16S539 ดังตารางที่ 5



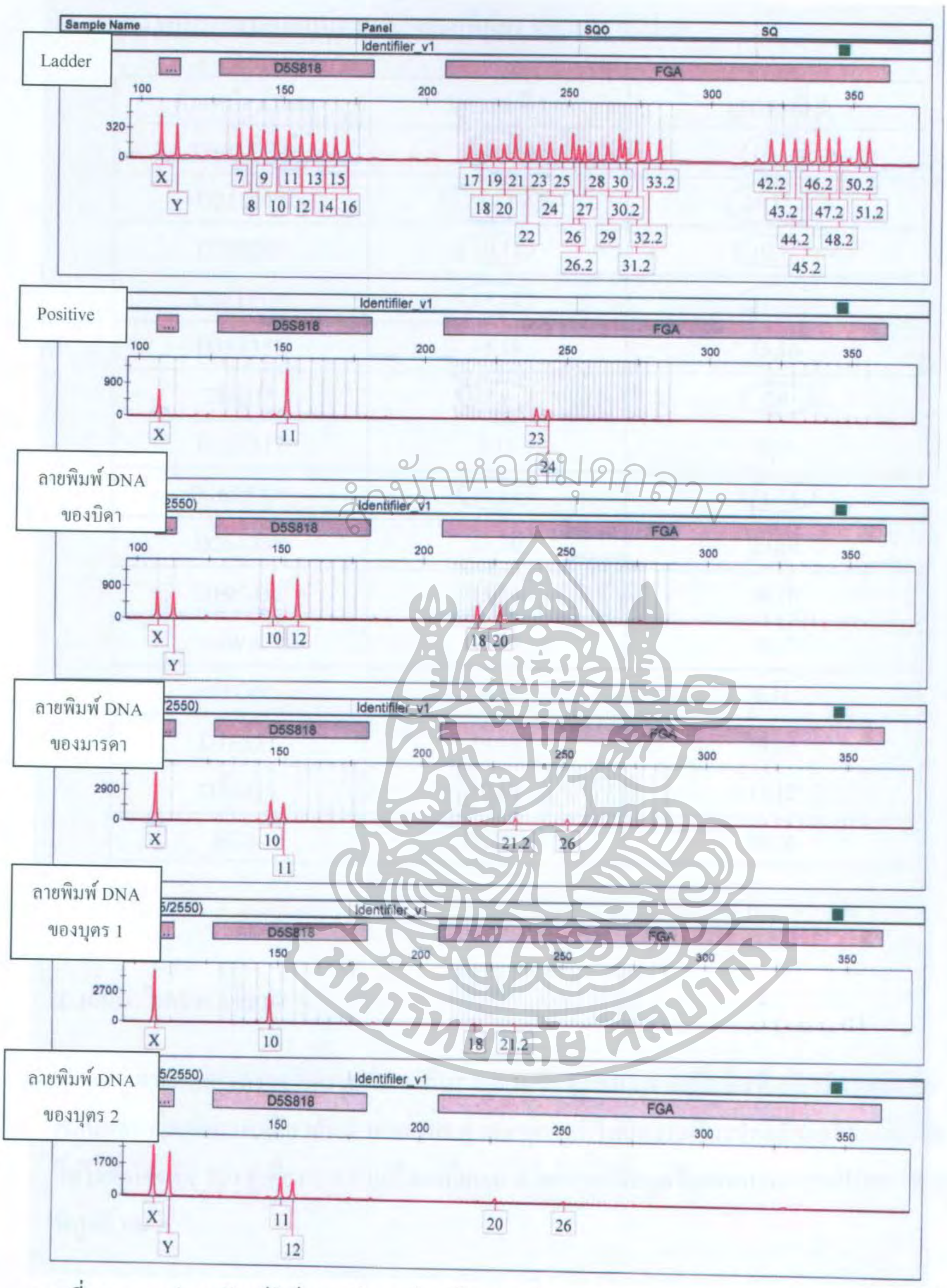
ภาพที่ 25 กราฟแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอสีน้ำเงินย้อมด้วยสารเรืองแสง 6-FAM แสดงตำแหน่ง D8S1179, D21S11, D7S820 และ CSF1P0



ภาพที่ 26 กราฟลายพิมพ์ดีอีนเอ สีเขียวย้อมด้วยสารเรืองแสง VIC แสดงตำแหน่ง D3S1358, TH01, D13S317, D16S539 และ D2S1338



ภาพที่ 27 กราฟลายพิมพ์ดีเอ็นเอ สีเหลืองย้อมด้วยสารเรืองแสง NED แสดงตำแหน่ง D19S433, vWA, TPOX และ D18S51



ภาพที่ 28 กราฟลายพิมพ์ดีเอ็นเอ สีแดงย้อมด้วยสารเรืองแสง PET แสดงตำแหน่ง amelogenin D5S818 และ FGA

ตารางที่ 5 สรุปตำแหน่ง allele ของคู่พี่น้อง จากภาพ ที่ 25-28

ตำแหน่ง Allele	บุตรคนที่ 1	บุตรคนที่ 2
D8S1179*	10,15	10,15
D21S11*	28,33.2	28,33.2
D7S820*	10,11	10,11
CSF1PO*	11,12	11,12
D3S1358	15,18	15,16
THO1*	7,9	7,9
D13S317	9,12	9,11
D16S539*	11,13	11,13
D2S1338	17,20	20,20
D19S433	15,16	16,16
vWA	16,19	16,17
TPOX	8,8	8,11
D18S51	14,18	14,16
D5S818	10,10	11,12
FGA	18,21.2	20,26

2. ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

จากผลการตรวจวิเคราะห์และเก็บรวบรวมข้อมูลพบว่าจากผู้ที่เป็นพี่-น้องที่แท้จริง คือ กำเนิดจากบิดา-มารดาเดียวกันจำนวน 100 คู่ และบุคคลที่ไม่มีความเกี่ยวข้องเป็นเครือญาติหรือไม่ใช่พี่น้องกัน 100 คู่เพื่อทดสอบเปรียบเทียบ การวิเคราะห์ข้อมูลในกระบวนการแปรผลการตรวจพิสูจน์ พบว่า

2.1 จากการศึกษาจำนวน allele บน chromosome ที่ได้จากการตรวจ STR Profile 15 ตำแหน่งที่มีความซ้ำกัน ของคู่ตัวอย่างพี่-น้องที่แท้จริงที่เกิดจาก บิดา มารดาเดียวกัน และคู่ตัวอย่างที่ไม่ใช่พี่-น้องที่แท้จริงที่ไม่ได้เกิดจาก บิดา มารดาเดียวกัน ที่ได้จากการตรวจ identification 16

ตำแหน่ง โดยใช้ allele 15 ตำแหน่ง ยกเว้นตำแหน่งของโครโมโซมเพศไม่นำมาพิจารณา พบว่า กรณี ของพี่น้องที่เกิดจาก บิดา มารดาเดียวกันจำนวน 100 คู่ มีความเหมือนกัน ตั้งแต่ 2 – 10 ตำแหน่ง allele โดยมีความถี่มากที่สุดคือ 5 ตำแหน่งซึ่งมีถึง 24 คู่ พี่น้องที่แท้จริงซึ่ง แตกต่างกันอย่างชัดเจน กับจำนวนความเหมือนกันของบุคคลที่ไม่มีความเกี่ยวข้องเป็นเครือญาติหรือไม่ใช่พี่น้องกันจำนวน 100 คู่ ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 สรุปจำนวนตำแหน่ง allele เหมือนกันของคู่พี่น้อง และคู่ตัวอย่างที่ไม่ใช่ พี่-น้องที่แท้จริง

จำนวนตำแหน่ง allele เหมือนกัน	คู่ตัวอย่างพี่-น้องที่แท้จริง	คู่ตัวอย่างที่ไม่ใช่ พี่-น้องที่แท้จริง
0	-	32
1	-	43
2	4	19
3	9	4
4	15	2
5	24	-
6	19	-
7	12	-
8	4	-
9	9	-
10	3	-

จากตาราง ที่ 6 พบว่า คู่พี่-น้องที่แท้จริง 100 คู่ มี 4 คู่ พี่-น้องที่มีจำนวนตำแหน่ง allele เหมือนกันเพียง 2 ตำแหน่ง ซึ่งถือได้ว่าจำนวนตำแหน่ง allele เหมือนกันน้อยที่สุด และมากที่สุดคือ 10 ตำแหน่งและจากตารางข้อมูลพบว่า คู่พี่-น้องที่แท้จริง 100 คู่ มี 24 คู่ พี่-น้องที่มีจำนวนตำแหน่ง allele เหมือนกัน 5 ตำแหน่ง เป็นอันดับที่ 1 19 คู่ พี่-น้องที่มีจำนวนตำแหน่ง allele

เหมือนกัน 6 ตำแหน่ง เป็นอันดับที่ 2 15 คู่ พี่-น้องที่มีจำนวนตำแหน่ง allele เหมือนกัน 4 ตำแหน่ง เป็นอันดับที่ 3

ส่วนคู่ที่ไม่ใช่พี่-น้องที่แท้จริงจากตารางที่ 6 พบว่า คู่ที่ไม่ใช่พี่-น้องที่แท้จริง 100 คู่ มี 2 คู่ พี่-น้องที่มีจำนวนตำแหน่ง allele เหมือนกัน 4 ตำแหน่ง ซึ่งถือได้ว่าจำนวนตำแหน่ง allele เหมือนกันมากที่สุดและ น้อยที่สุด คือไม่มีตำแหน่งเหมือนกันเลย และจากตารางข้อมูลพบว่า คู่ที่ไม่ใช่พี่-น้องที่แท้จริง 100 คู่ มี 43 คู่ ที่มีจำนวนตำแหน่ง allele เหมือนกัน 1 ตำแหน่ง เป็นอันดับที่ 1 32 คู่ ที่มีจำนวนตำแหน่ง allele ไม่เหมือนกันเลย เป็นอันดับที่ 2 19 คู่ที่มีจำนวนตำแหน่ง allele เหมือนกัน 2 ตำแหน่ง เป็นอันดับที่ 3

ตารางที่ 7 การทดสอบจำนวนคู่เหมือนของ allele บน chromosome พี่-น้องโดย t-test

คู่ตัวอย่าง	ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด	ค่าเฉลี่ย	SD	t	P - value
คู่พี่-น้อง	2	10	5.6	1.944	3.087	0.003
ไม่ใช่คู่พี่-น้อง	0	4	1.01	0.927	-43.063	0.999

ผลการทดลองและเก็บรวบรวมข้อมูลพบว่าจากผู้ที่เป็นพี่-น้องที่แท้จริง คือกำเนิดจากบิดา-มารดาเดียวกันจำนวน 100 คู่ และบุคคลที่ไม่มีความเกี่ยวข้องเป็นเครือญาติหรือไม่ใช่พี่น้องกัน 100 คู่

สำหรับคู่พี่-น้องที่แท้จริงจำนวน allele ที่เหมือนกันเฉลี่ย 5.6 คู่ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานมีค่าเท่ากับ 1.944 ค่า t เท่ากับ 3.087 แสดงว่า จำนวน allele ที่เหมือนกันสำหรับพี่-น้องที่แท้จริงมากกว่า 5 คู่ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($p = 0.003 < 0.05$)

สำหรับคู่ที่ไม่ใช่พี่-น้องที่แท้จริงจำนวนallele ที่ตรงกันเฉลี่ย 1.01 คู่ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน มีค่าเท่ากับ 0.927

4.2 จากศึกษาตำแหน่ง allele บน chromosome ที่เหมือนกันเพื่อบอกถึงความสัมพันธ์พี่น้องที่แท้จริง

ตารางที่ 8 แสดงจำนวนคู่พี่-น้องที่มีตำแหน่ง allele บน chromosome เหมือนกัน

ตำแหน่งที่ตรวจพิสูจน์	พี่-น้องที่แท้จริง	ไม่ใช่พี่-น้องที่แท้จริง
D8S1179	37	3
D21S11	33	4
D7S820	37	6
CSF1PO	43	6
D3S1358	38	11
TH01	45	11
D13S317	36	6
D16S539	38	8
D2S1338	32	5
D19S433	42	1
vWA	31	5
TPOX	50	25
D18S51	29	6
D5S818	34	3
FGA	35	1

จากตารางที่ 8 พบว่า คู่พี่-น้องที่แท้จริง 100 คู่ มีจำนวน 50 คู่พี่-น้องที่มีตำแหน่ง allele เหมือนกัน ตรงตำแหน่ง TPOX มากที่สุด รองลงมาคือตำแหน่ง THO1 จำนวน 45 คู่พี่-น้อง และตำแหน่ง CSF1PO เป็นลำดับที่ 3 จำนวน 43 คู่พี่-น้อง ตำแหน่งที่คู่พี่-น้องที่มีตำแหน่ง allele เหมือนกัน น้อยที่สุดคือ ตำแหน่ง D18S51 มีเพียง 29 ตำแหน่ง

ส่วนคู่ที่ไม่ใช่พี่-น้องที่แท้จริงจากตาราง ที่ 7 พบว่า คู่ที่ไม่ใช่พี่-น้องที่แท้จริง 100 คู่ มี 25 คู่ไม่ใช่พี่-น้องที่มีตำแหน่ง allele เหมือนกัน ตรง TPOX ซึ่งถือได้ว่าจำนวนตำแหน่ง allele

เหมือนกันมากที่สุด 11 คู่ไม่ใช่พี่-น้องที่มีตำแหน่ง allele เหมือนกัน ตรง 2 ตำแหน่ง คือ D3S1358 TH01 และ 1 คู่ไม่ใช่พี่-น้องที่มีตำแหน่ง allele เหมือนกัน ตรง 2 ตำแหน่ง คือ D19S433 FGA น้อยที่สุด

4.3 จากการศึกษาและวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ตำแหน่ง allele บน chromosome ที่เหมือนกัน บอกถึงความสัมพันธ์พี่น้องที่แท้จริงนั้น ตัวแปรหรือปัจจัยหลักคือพันธุกรรม ที่คนพี่-น้องกันย่อมต้องได้รับสารพันธุกรรมมาจากบิดา-มารดาเดียวกัน

การใช้เทคนิคทางสถิติ Logistic Regression Analysis ทำนายค่าความน่าจะเป็นสำหรับความเป็นพี่-น้องที่แท้จริงจากตำแหน่ง allele ที่เหมือนกัน จาก allele 15 ตำแหน่งที่ได้รับจากบิดา-มารดา คือ D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539 D2S1338. VWA , TPOX, D18S51, D5S818, FGA

ตารางที่ 9 ตำแหน่ง allele ที่สามารถ ทำนายความเป็นพี่-น้องที่แท้จริง

ตำแหน่ง allele	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
D8S1179	9.580	3.415	7.869	1	.005	14472.247
D7S820	6.340	2.543	6.215	1	.013	566.547
CSF1PO	5.473	1.664	10.812	1	.001	238.214
D16S539	3.355	1.460	5.280	1	.022	28.652
D2S1338	4.627	1.764	6.877	1	.009	102.231
D19S433	6.433	1.911	11.326	1	.001	621.900
TPOX	6.952	2.605	7.124	1	.008	1045.366
D18S51	3.999	1.810	4.881	1	.027	54.554
D5S818	9.326	2.976	9.817	1	.002	11223.860
FGA	9.292	4.012	5.363	1	.021	10846.678
Constant	-12.191	3.562	11.716	1	.001	.000

$R^2 = 0.944$ ค่า Percentage Correct = 96.5

จากตาราง 9 พบว่ามี allele ทั้งหมด 10 ตำแหน่ง allele ที่มีนัยสำคัญสำหรับใช้ทำนายความเป็นพี่-น้องคือ D8S1179, D7S820, CSF1PO, D16S539, D2S1338, D19S433, TPOX, D18S51, D5S818, FGA และพบว่าตำแหน่งที่แสดงความสัมพันธ์สูง เป็นอันดับที่ 1 คือ D8S1179

Exp(B) = 14472.247 รองลงมาคือ D5S818 Exp(B) = 11223.860 FGA Exp(B) = 10846.678 เป็นอันดับที่ 3 TPOX Exp(B) = 1045.366 เป็นอันดับที่ 4 $R^2 = 0.944$ และร้อยละของการทำนายที่ถูกต้องเท่ากับ 96.5 สามารถแสดงได้ดังสมการ 4.1 และ 4.2

$$\hat{P}\ \{\text{เป็นพี่น้องที่แท้จริง}\} = \frac{1}{1+e^{-W}}$$

$$W = -12.191 + 9.58 \cdot D8S1179 + 6.34 \cdot D7S820 + 5.473 \cdot CSF1PO + 3.355 \cdot D16S359 \ldots\ldots(4.1)$$
$$+ 4.627 \cdot D2S1338 + 6.43 \cdot D19S433 + 6.952 \cdot TPOX + 3.999 \cdot D18S51$$
$$+ 9.326 \cdot D5S818 + 9.292 \cdot FGA$$

$$P = \frac{e^{-12.191+9.58 \cdot D8S1179+6.34 \cdot D7S820+\ldots 9.292 \cdot FGA}}{1+e^{-12.191+9.58 \cdot D8S1179+6.34 \cdot D7S820+\ldots 9.292 \cdot FGA}} \ldots\ldots(4.2)$$

<u>หมายเหตุ</u> P คือ ความน่าจะเป็นของการเป็นพี่-น้องที่แท้จริง

โดย $P \leq 0.5$ หมายความว่าไม่เป็นพี่น้องที่แท้จริง

โดย $P > 0.5$ หมายความว่าเป็นพี่น้องที่แท้จริง

จากการแทนค่าในสูตรที่ 4.2 ของคู่ที่เป็นพี่น้องที่แท้จริง จำนวน 100 คู่ ได้ค่า P (prob) ดังตารางที่ 10 ซึ่งส่วนใหญ่ค่า $P > 0.5$ จำนวน 98 คู่ และ ค่า $P \leq 0.5$ จำนวน 2 คู่ คือคู่ตัวอย่างที่ 46 และ 51 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความถูกต้อง 98% ส่วนคู่ที่ไม่ใช่พี่น้องที่แท้จริง จำนวน 100 คู่ ได้ค่า P (prob) ดังตารางที่ 11 ซึ่งส่วนใหญ่ค่า $P \leq 0.5$ เป็นจำนวน 95 คู่ และ ค่า $P > 0.5$ จำนวน 5 คู่ คือคู่ตัวอย่างที่ 16 , 62 , 76 , 86 และ 93 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความถูกต้อง 95%

ตารางที่ 10 แสดงค่า P ของ DNA ของคู่พี่น้องที่แท้จริง จำนวนทั้งหมด 100 คู่

พี่น้องที่แท้จริง	D8S1179	D7S820	CSF1PO	D16S539	D2S1338	D19S433	TPOX	D18S51	D5S818	FGA	Total	P(prob)
1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	3	0.99735
2	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	4	1.00000
3	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	4	0.99915
4	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	3	0.99943
5	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	4	1.00000
6	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	4	1.00000
7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0.96896
8	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	4	0.99998
9	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	2	0.55823
10	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	4	1.00000
11	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	6	1.00000
12	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	7	1.00000
13	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	4	1.00000
14	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	3	0.99999
15	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	2	0.62011
16	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	3	0.99766
17	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	3	0.99990
18	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	4	1.00000
19	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	3	0.99941
20	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	4	1.00000
21	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	3	0.99947
22	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	5	1.00000
23	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	4	1.00000
24	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	5	1.00000
25	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	2	0.85346

ตารางที่ 10 (ต่อ)

พี่น้องที่แท้จริง	D8S1179	D7S820	CSF1PO	D16S539	D2S1338	D19S433	TPOX	D18S51	D5S818	FGA	Total	P(prob)
26	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	4	0.99950
27	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	4	1.00000
28	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	5	1.00000
29	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	6	1.00000
30	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	4	0.99998
31	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	4	1.00000
32	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	3	0.99948
33	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	5	1.00000
34	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	4	0.99999
35	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	2	0.93137
36	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	3	0.99987
37	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0.88247
38	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	3	0.99944
39	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	3	0.99999
40	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	3	0.89235
41	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	4	1.00000
42	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	6	1.00000
43	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	2	0.55823
44	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	6	1.00000
45	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	4	0.99999
46	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	* 0.00528
47	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	7	1.00000
48	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	2	0.98349
49	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	2	0.93137
50	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	4	1.00000

ตารางที่ 10 (ต่อ)

พี่น้องที่แท้จริง	D8S1179	D7S820	CSF1PO	D16S539	D2S1338	D19S433	TPOX	D18S51	D5S818	FGA	Total	P(prob)
51	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2	* 0.40661
52	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	5	1.00000
53	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	4	0.99996
54	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	4	1.00000
55	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	4	1.00000
56	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	5	1.00000
57	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0.94594
58	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	3	0.99991
59	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	7	1.00000
60	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.97655
61	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	5	1.00000
62	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	4	1.00000
63	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0.96997
64	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	3	0.89388
65	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	3	0.99873
66	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	3	0.99997
67	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	4	0.99990
68	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2	0.76746
69	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	4	0.99915
70	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	3	0.83146
71	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2	0.76746
72	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	4	0.99998
73	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	5	1.00000
74	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	4	1.00000
75	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	3	0.99997

ตารางที่ 10 (ต่อ)

พี่น้องที่แท้จริง	D8S1179	D7S820	CSF1PO	D16S539	D2S1338	D19S433	TPOX	D18S51	D5S818	FGA	Total	P(prob)
76	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	3	0.99995
77	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	3	0.99993
78	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	6	1.00000
79	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	4	1.00000
80	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	3	0.89235
81	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	3	0.99979
82	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2	0.98293
83	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	3	0.99537
84	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	3	0.99993
85	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	5	1.00000
86	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	7	1.00000
87	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	6	1.00000
88	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	7	1.00000
89	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	3	0.99993
90	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	3	1.00000
91	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	4	0.99998
92	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	2	0.98349
93	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	4	0.99995
94	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	3	0.99537
95	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	4	0.99999
96	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	4	1.00000
97	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	6	1.00000
98	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	4	0.99915
99	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	6	1.00000
100	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	5	1.00000

ตารางที่ 11 แสดงค่า P ของ DNA ของคู่ที่ไม่ใช่พี่ - น้องที่แท้จริง จำนวนทั้งหมด 100 คู่

คู่ที่ไม่ใช่พี่น้อง	D8S1179	D7S820	CSF1PO	D16S539	D2S1338	D19S433	TPOX	D18S51	D5S818	FGA	Total	P(prob)
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001
2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0.00028
3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0.00052
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001
5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0.00528
6	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0.00015
7	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0.00052
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001
9	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0.05391
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001
11	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0.00015
12	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0.00528
13	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0.00121
14	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0.00528
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001
16	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	2	* 0.55823
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001
18	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0.00121
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001
22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001
23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001
25	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0.00052

ตารางที่ 11 (ต่อ)

คู่ที่ไม่ใช่	D8S1179	D7S820	CSF1PO	D16S539	D2S1338	D19S433	TPOX	D18S51	D5S818	FGA	Total	P(prob)
26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001
27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001
28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001
29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001
30	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0.00528
31	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0.00528
32	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	2	0.35160
33	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.06843
34	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0.00528
35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001
36	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0.00028
37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001
38	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0.00528
39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001
40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001
41	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.06843
42	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	2	0.13193
43	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0.00015
44	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0.00121
45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0.05220
46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001
47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001
48	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.00287
49	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.00287
50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001

ตารางที่ 11 (ต่อ)

คู่ที่ไม่ใช่	D8S1179	D7S820	CSF1PO	D16S539	D2S1338	D19S433	TPOX	D18S51	D5S818	FGA	Total	P(prob)
51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001
52	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001
53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001
54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001
55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001
56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001
57	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2	0.22444
58	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.00287
59	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0.00028
60	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0.05391
61	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001
62	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	2	*0.55823
63	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001
64	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0.00528
65	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0.00528
66	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001
67	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0.00528
68	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0.00528
69	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001
70	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0.00528
71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001
72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001
73	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001
74	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001
75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001

ตารางที่ 11 (ต่อ)

คู่ที่ไม่ใช่	D8S1179	D7S820	CSF1PO	D16S539	D2S1338	D19S433	TPOX	D18S51	D5S818	FGA	Total	P(prob)
76	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	2	* 0.55823
77	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001
78	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	2	0.13193
79	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.06843
80	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0.00528
81	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001
82	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0.00528
83	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0.13564
84	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001
85	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0.00528
86	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	2	* 0.62011
87	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001
88	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001
89	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001
90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001
91	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0.00528
92	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0.00528
93	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	2	* 0.64153
94	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001
95	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.00287
96	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0.00015
97	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00001
98	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	2	0.02752
99	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0.00528
100	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0.00015

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาวิจัย เรื่อง การวิเคราะห์ความเป็นพี่-น้องจากการตรวจลายพิมพ์ DNA 15 ตำแหน่ง นั้น มีวัตถุประสงค์เพื่อพิสูจน์ ความเป็นพี่-น้อง โดยใช้ allele บน chromosome ที่ได้จากการตรวจ STR Profile เป็นตัวหลักในการตอบวัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้

กลุ่มตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้ คือ allele บน chromosome ที่ได้จากการตรวจ STR Profile 16 ตำแหน่งที่มีความซ้ำกัน ของคู่ตัวอย่างพี่-น้องที่แท้จริงที่เกิดจาก บิดา มารดาเดียวกัน 100 คู่และคู่ตัวอย่างที่ไม่ใช่พี่-น้องที่แท้จริงที่ไม่ได้เกิดจาก บิดา มารดาเดียวกันจำนวน 100 คู่ โดยไม่ใช้ตำแหน่งการระบุเพศมาคิดคำนวณ

การวิเคราะห์ข้อมูล ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS Logistic Regression V 11.5 สถิติที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ ได้แก่ สถิติ t-test Logistic Regression Analysis

1. สรุปผลการวิจัย

1.1 การศึกษาจำนวน allele บน chromosome ที่ได้จากการตรวจ STR Profile 15 ตำแหน่งที มีความซ้ำกัน ของคู่ตัวอย่างพี่-น้องที่แท้จริงที่เกิดจาก บิดา มารดาเดียวกัน พบว่า จำนวน allele ที่ตรงกันสำหรับพี่-น้องที่แท้จริง มากกว่า 5 คู่ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($p = 0.003$)

1.2 ส่วนคู่ที่ไม่ใช่พี่-น้องที่แท้จริงจำนวน allele ที่ตรงกันเฉลี่ย 1.01 คู่ มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.999

จากข้อมูลที่นำมาศึกษาทั้งสองกลุ่มสรุปได้ว่าจำนวน allele บน chromosome ที่เหมือนกันมากกว่า 5 คู่ สามารถยืนยันได้ว่าเป็นพี่- น้องที่แท้จริงได้ แต่ถ้ามีจำนวน allele บน chromosome ที่เหมือนกันน้อยกว่า 5 คู่ จะไม่สามารถตอบยืนยันได้ว่าเป็นพี่- น้องที่แท้จริงได้เพราะจากข้อมูลของกลุ่มตัวอย่างพี่-น้องที่แท้จริงที่เกิดจาก บิดา มารดาเดียวกัน พบว่า จำนวน allele ที่ตรงกันน้อยกว่า 5 คู่ มากถึง 52 คู่พี่-น้อง

1.2 การศึกษาความสัมพันธ์ของตำแหน่ง allele บน chromosome ที่เหมือนกันเพื่อบอกถึงความสัมพันธ์พี่น้อง ที่แท้จริง จากข้อมูลทั้งสองกลุ่มตัวอย่างพบว่ามีตำแหน่ง allele เหมือนกันตรงตำแหน่ง TPOX มากที่สุด รองลงมาคือตำแหน่ง THO1 และตำแหน่ง CSF1PO เป็นลำดับที่ 3 เหมือนกันทั้งสองกลุ่ม ด้วยข้อมูลดังกล่าวทำให้ไม่สามารถช่วยจำแนกความเป็นพี่น้องได้ซึ่งเมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์พบว่าตำแหน่ง TPOXและตำแหน่งTHO1มีค่าpolymorphism information content (PIC) คือค่าที่แสดงความหลากหลายของข้อมูลในตำแหน่งที่ศึกษา ซึ่งตำแหน่งที่มีความหลากหลายน้อยที่สุดคือ ตำแหน่ง TPOX มีค่าเท่ากับ 0.55 ทำให้ตำแหน่ง TPOX มีความเหมือนตำแหน่ง allele ถึงแม้ว่าไม่ได้เป็นญาติพี่ก็ตาม จึงสรุปได้ว่า ตำแหน่ง allele บน chromosome ที่เหมือนกันไม่สามารถบอกถึงความสัมพันธ์พี่น้องกันได้

1.3 การศึกษาความสัมพันธ์ของ allele บน chromosome ที่จำแนกความเป็นพี่-น้องที่แท้จริง และไม่ใช่พี่-น้องที่แท้จริง การใช้เทคนิคทางสถิติ Logistic Regression Analysis ทำนายค่าความน่าจะเป็นความเป็นพี่-น้องที่แท้จริงจากตำแหน่ง allele ที่เหมือนกัน จาก allele 15 ตำแหน่งที่ได้รับจากบิดา-มารดา จากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธีทางสถิตินี้พบว่ามีallele ทั้งหมด 10 allele ที่มีนัยสำคัญสำหรับใช้พิสูจน์บุคคลความเป็นพี่-น้องที่แท้จริงคือ D8S1179, D7S820, CSF1PO, D16S539, D2S1338, D19S433, TPOX, D18S51, D5S818, FGA พบว่าตำแหน่งที่แสดงความสัมพันธ์สูง อันดับที่ 1 คือ D8S1179 ค่าExp(B) = 14472.247 อันดับที่ 2 คือ D5S818 ค่า Exp(B) = 11223.860 อันดับที่3 คือ FGA ค่า Exp(B)=10846.678 อันดับ4คือTPOXExp(B)= 1045366

จากข้อมูลทางสถิติที่ได้ช่วยตอบคำถามความเป็นพี่-น้องของบุคคลได้ในระดับที่ 96.50% ซึ่งจะยังประโยชน์ในการพิสูจน์ความเป็นพี่-น้องในคดีความต่างๆ

2. อภิปรายผล

2.1 การศึกษาจำนวน allele บน chromosome ที่ได้จากการตรวจ STR Profile 15 ตำแหน่งที่มีความซ้ำกัน พบว่า จำนวน allele ที่ตรงกันสำหรับพี่-น้องที่แท้จริง มากกว่า 5 คู่ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 จากข้อมูลที่นำมาศึกษาทั้งสองกลุ่มสรุปได้ว่าจำนวน allele บน chromosome ที่เหมือนกันมากกว่า 5 คู่ สามารถยืนยันได้ว่าเป็นพี่- น้องที่แท้จริงได้ แต่ถ้ามีจำนวน allele บน chromosome ที่เหมือนกันน้อยกว่า 5 คู่ จะไม่สามารถตอบยืนยันได้ว่าเป็นพี่- น้องที่แท้จริงได้เพราะจากข้อมูลของกลุ่มตัวอย่างพี่-น้องที่แท้จริงที่เกิดจาก บิดา มารดาเดียวกัน พบว่าจำนวน allele ที่ตรงกันน้อยกว่า 5 คู่ มากถึง 52 คู่พี่-น้อง ซึ่งก็หมายความว่า คู่ตัวอย่างที่มี allele เหมือนกัน 4 คู่ หรือ 3 คู่ก็สามารถเป็นพี่น้องที่แท้จริงได้ เพียงแต่จำนวนคู่เหมือนของ allele บน

chromosome จะไม่สามารถบอกได้ เพราะฉนั้น จำนวนคู่เหมือนของ allele บน chromosome จะสามารถคัดกรองได้ในระดับหนึ่ง ยังจำเป็นต้องใช้วิธีอื่น ๆ ร่วมวิเคราะห์ด้วย

2.2 การศึกษาความสัมพันธ์ของตำแหน่ง allele บน chromosome ที่เหมือนกันเพื่อบอกถึงความสัมพันธ์พี่ - น้อง ที่แท้จริงจากการศึกษาข้อมูลทั้งสองกลุ่มพบว่า ตำแหน่ง allele บน chromosome ที่เหมือนกัน ของประชากรไทยมีความหลากหลายค่อนข้างน้อยในหลายตำแหน่งของ allele บน chromosome เช่น TPOX , THO1 ทำให้พบตำแหน่ง allele บน chromosome ที่เหมือนกันทั้งที่ไม่ได้เป็นญาติพี่ – น้องกันเลยก็ตาม

2.3 การศึกษาความสัมพันธ์ของ allele บน chromosome ที่จำแนกความเป็นพี่-น้องที่แท้จริง และไม่ใช่พี่-น้องที่แท้จริง การใช้เทคนิคทางสถิติ Logistic Regression Analysis ทำนายค่าความน่าจะเป็นความเป็นพี่-น้องที่แท้จริงจากตำแหน่ง allele ที่เหมือนกันจากกลุ่มตัวอย่าง 200 คู่ สามารถทำนายถูกต้องที่ 96.5% มีเพียง 7 คู่ที่ทำนายผิดพลาด คือ 3.5% ตำแหน่ง คือ TPOX D7S820 CSF1PO D16S539 D5S818 D19S433 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ต้องระวังในกรณีที่ตรวจพบ

3. ข้อเสนอแนะ

3.1 ข้อเสนอแนะจากการวิจัย

ผลการตรวจพิสูจน์จะเหมาะสำหรับ พี่-น้องที่ บิดา-มารดา ได้เสียชีวิต หรือหายสาบสูญไป และจะเพิ่มความน่าเชื่อถือมากขึ้น หากมีการ ตรวจสารพันธุกรรมทาง สายพันธุ์บิดา (Y-Chromosome) หรือ สายพันธุ์มารดา (Mitochondrial DNA)ร่วมด้วย

3.2 ข้อเสนอแนะจากการวิจัยครั้งต่อไป

ควรมีการศึกษา STR ในตำแหน่งอื่นเพิ่มเติม อาจใช้วิธีการสังเคราะห์ไพรเมอร์ขึ้นใหม่หรือใช้วิธีการการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากชุดสำเร็จรูป PowerPlex 16 ของบริษัท Promegaเนื่องจากมีตำแหน่งที่ใช้ในการวิเคราะห์แตกต่างกันกับชุดสำเร็จรูป AmpFℓSTR Identifiers 2 ตำแหน่ง หรือใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูปทั้งสองชุดร่วมกัน จะมีตำแหน่งที่ใช้วิเคราะห์เพิ่มเป็น 17ตำแหน่ง ซึ่งในปัจจุบันพบงานวิจัยจากต่างประเทศได้ทำการทดลองด้วยวิธีนี้

บรรณานุกรม

ภาษาไทย

กรกฎ บุญลพ. ดี เอน เอ ไมโทคอนเดรียลโบราณกับการสืบค้นบรรพบุรุษของผู้คนในดินแดนประเทศไทย[ออนไลน์]. เข้าถึงเมื่อ 27 เมษายน. 2553. เข้าถึงได้จาก http://203.185.130.68/.../Files/2006-11-03/index.him.

ธงชัย เตโชวิศาล. การตรวจเอกลักษณ์บุคคลโดยวิธี "AmpFSTR Identifiler PCR Amplification Kit."เอกสารประกอบวิชา 510693 เทคนิคในห้องปฏิบัติการทางนิติวิยาศาสตร์ สาขาวิชา นิติวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร,2550.

ธานินทร์ ภู่พัฒน์. วิทยาการดีเอ็นเอในงานนิติเวช.เชียงใหม่ : คณะแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2538.

ธานินทร์ ศิลป์จารุ. การวิจัยและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย SPSS. พิมพ์ครั้งที่ 9. กรุงเทพฯ: บิสซิเนสอาร์แอนด์ดี,2551.

นำชัย ชีววิวรรธน์ และคณะ.ดีเอ็นเอ ปริศนาลับรหัสชีวิต.ปทุมธานี : ศูนย์พันธุวิศกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ,2546.

พรทิพย์ โรจนสุนันท์. "ความรู้เบื้องต้น เรื่อง DNA Fingerprint." บทบัณฑิตย์ 57 (มีนาคม 2544) : 86 – 100.

เพ็ญพรรณ เวชวิทยาขลัง. ความรู้เกี่ยวกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอ. นครปฐม : หน่วยผลิตเอกสารคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร, 2548.

พิมพ์รัตน์ ชาญปรีชญา. "ค่าทางสถิติของ STR 15 ตำแหน่งของประชากรไทย." วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขานิติวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร,2551

ไพจิตร สวัสดิสาร. "การพิสูจน์ลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ ในศาลในคดีอาญา." เอกสารการอบรมหลักสูตรผู้บริหารกระบวนการยุธรรมระดับสูง รุ่นที่7 วิทยาลัยการยุติธรรม สำนักงานศาลยุติธรรม, 2547.

ไพศาล เหล่าสุวรรณ. พันธุศาสตร์.พิมพ์ครั้งที่4.กรุงเทพฯ: บริษัทโรงพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช จำกัด,2535.

วรรณา ทองนพคุณ, ชนินทร์ ลิ่มวงศ์ และเพทาย เย็นจิตโสมนัส.สาระน่ารู้อณูพันธุศาสตร์. กรุงเทพฯ: เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น, 2548.

วิชาการดอทคอม. การทำ molecular makers [ออนไลน์]. เข้าถึงเมื่อ 15ก.พ.2553.เข้าถึงได้จาก http:www.vcharkarn.com/include/vcafe/showkratoo.php?Pid = 39569.

วิชัย บุญแสงและคณะ. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากสารพันธุกรรมสู่เทคโนโลยีพิสูจน์บุคคล. ปทุมธานี: สำนักงานพัฒนา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ , 2547.

วิมลธรา คำศรี. "การศึกษาความถี่ของอัลลีลและค่าทางสถิติของ 15 AmpFSTR identifiler loci ของประชากรไทย." วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี,2548.

วิสุทธิ์ ใบไม้. พันธุศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: เอ็นพีซับพลายพริ้นติ้ง, 2536.

สถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย. บทที่ 1 หลักการทางพันธุศาสตร์[ออนไลน์]. เข้าถึงเมื่อ 27 เมษายน2553 เข้าถึงได้จาก http:/learn.in.th/sample/gmodna/chapter.htm.

แสงเดือน วงษ์เมตตา." การศึกษาลายพิมพ์ DNA จากบริเวณ Short Tandem Repeat Loci. ในประชากรไทย." วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2541.

อรรถพล แช่มสุวรรณวงศ์และคณะ. นิติวิทยาศาสตร์เพื่อการสืบสวนสอบสวน 2. พิมพ์ครั้งที่3. กรุงเทพฯ :บริษัท ทีซีจี พริ้นติ้ง จำกัด, 2546.

อัญชลี ก่องศรีสุข. "ข้อมูลพื้นฐานของตำแหน่งช็อทแทนเดมรีพีท เพื่อประยุกต์ใช้ในการพิสูจน์บุคคลและความเป็นพ่อลูก." วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย,2541

อุทยานการศึกษาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์. DNA เกลียวคู่แห่งชีวิต [ออนไลน์].เข้าถึงเมื่อ 21 มิ.ย.2553.เข้าถึงได้จาก http://masterorg.wu.ac.th/source/content.php?menu_id=18&menuid=3&paths=stpark.

เอกดนัย กอกิมพงษ์. Thermal Cyclerเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR[ออนไลน์]. เข้าถึงเมื่อ 14ก.ย.2553 เข้าถึงได้จาก ttp://www.thaiscience.com/lab_vol/p22/Thermal_Cycler.asp.

ภาษาต่างประเทศ

Applied Biosystems. AmpFlSTR Identifler PCR Amplification Kit:User's Manual. California: n.p..2006

Barbaro,Anna. "Population genetic study of 15 STRs loci using AmpFlSTR IdentifilerKit."

International Congress Series 1239(2003): 259-266

Bhoopat, Tanin.,Suthat Sriduangkaew,and heinrich F.Steger. "STR loci D10S2325,D16S539 and D19S253:Northern Thai population data." Legal Medicine 8(2006):306-307.

Bhoopat, Tanin.,Theerapon Leaungsiyakul,and heinrich F.Steger. "Forensic value of nine in Northern Thai." Legal Medicine 8(2006):198-200.

Butler, John M. Aspects of Forensic DNA Typing[Online].Accessed 16 January 2011. Available from http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/FDT2e.htm.

Chang,En Pu et al. "Genetic variation at nine STR loci in population from the Philippines and Thailand living in Taiwan." Forensic Science International 106(1999):1-6

Chantratitaa, Wasun et al. "Thai population data on nine tetrameric STR loci-D3S1358,vWA,FGA,TH01,TPOX,CSF1PO,D5S818,D13S317 and D7S820." Forensic Science International 115(2001):113-115.

Craft KJ, Owens JD, Ashley MV. Application of DNA markers in forensic : Genetic comparison of Quercus evidence leaves to crime scene trees using microsatellites. Forensic Sci Int. 2007;165:64-70

Rerkamnuaychoke, Budsaba et al. "Thai Population data on 15 tetrameric STR loci – D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433 VWA, TPOX, D18S51, D5S818, FGA" Forensic Science International 158 (1999):234-237

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1.การเตรียมการเตรียม EDTA 0.5 M ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างเลือด

ชั่งสารละลาย EDTA-$2H_2O$ 186.1 g ละลายในน้ำกลั่น 800 ml เติมเกล็ด NaOH 15-20 g เมื่อเกล็ด NaOH ละลายหมด ให้ปรับ pH เป็น 8.0 ด้วยสารละลาย NaOH และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น นำเข้า autoclave จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการสกัดตัวอย่างเลือด

2.1 การเตรียมบัพเฟอร์ TE ตวงสาร 1M Tris-HCl pH 8.0 ปริมาณ 10 ml สาร 0.5 M EDTA ปริมาณ 0.2 ml และน้ำกลั่นปริมาณ 990 ml ผสมให้เข้ากัน นำเข้าเครื่อง autoclave จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.2 การเตรียม 1M DTT ใช้สาร 5g DTT ใส่ในน้ำกลั่น nucleus–free water 32.4 ml. ถ้าปริมาณ sample น้อยควรเตรียมแค่ 1g ก็พอ 1g DTT ในน้ำกลั่น 32.4/5 = 6.48

2.3 การเตรียม 1x wash buffer เติม Ethanol 95-100% 35 ml + Isopropyl alcohol 35 ml ลงในขวด 2x wash buffer จะได้ 1x wash buffer ปริมาตร 70 ml

2.4 การเตรียม Lysis buffer Lysis buffer 100 µl : 1µl DTT, Working lysis solution

3. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการตรวจคุณภาพDNAด้วยวิธี gel electrophoresis

3.1 การเตรียมบัพเฟอร์ TBE (Tris-borate,EDTA)

เตรียม 5x TBE เพื่อเป็น stock solution ก่อนโดยการชั่งสาร Tris base 54g สาร boric acid 27.5 g และตวง 0.5 M EDTA pH 8.0 ปริมาณ 20 ml ผสมรวมในขวดแก้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตรนำเข้า autoclave จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

เมื่อจะนำมาใช้ในความเข้มข้น 1x TBE ให้เจือจาง 5x TBE ในน้ำกลั่นอัตรา 5x TBE 1 ส่วน ต่อน้ำกลั่น 4 ส่วน

3.2 การเตรียม Ethidium bromide ชั่งสาร ethidium bromide 5 mg ต่อน้ำ 1 ml ผสมให้เข้ากันบรรจุลงในขวดหรือกล่องพลาสติกที่ห่อด้วยแผ่นตะกั่วเพื่อกันแสง แล้วเก็บในที่มืด

4.การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในชุดทดสอบสำเร็จรูป AmpFlSTR® Identifiler® PCR Amplification Kit

ชุดทดสอบAmpFlSTR® Identifiler® PCR Amplification Kit ต้องการตัวอย่าง DNA ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณพีซีอาร์ 10 µl โดยมีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 0.05-0.125 ng/µl ดังนั้นถ้าตัวอย่าง DNA ที่สกัดได้มีความเข้มข้นน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.125 ng/µl ให้เติมตัวอย่างปริมาณ10 ng/µl ใน PCR tube ได้ทันที แต่ถ้าตัวอย่าง DNA มีความเข้มข้นมากกว่า 0.125 ng/µl ให้เจือจางตัวอย่างด้วยสารบัฟเฟอร์ TE ก่อนแล้วจึงเติมตัวอย่าง DNA ที่เจือจางแล้วปริมาณ 10 ng/µl ใน PCR tube

ภาคผนวก ข

ข้อมูลการวิจัย

ตารางที่ 12 data DNA ของคู่พี่น้องที่แท้จริง จำนวนทั้งหมด 100 คู่

พี่น้องที่แท้จริง	D8S1179	D21S11	D7S820	CSF1PO	D3S1358	TH01	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	vWA	TPOX	D18S51	D5S818	FGA	Total
1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	4
2	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	8
3	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	6
4	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	4
5	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	7
6	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	6
7	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	3
8	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	5
9	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2
10	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	7
11	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	7
12	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	10
13	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	5
14	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	6
15	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	5
16	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	4
17	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	5
18	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	5
19	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	4
20	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	7
21	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	5
22	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	6
23	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	5
24	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	5
25	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	6

ตารางที่ 12 (ต่อ)

พี่น้องที่แท้จริง	D8S1179	D21S11	D7S820	CSF1PO	D3S1358	TH01	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	vWA	TPOX	D18S51	D5S818	FGA	Total
26	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	6
27	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	5
28	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	9
29	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	8
30	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	5
31	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	5
32	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	5
33	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	7
34	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	5
35	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	5
36	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3
37	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	5
38	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	4
39	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	3
40	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	4
41	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	5
42	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	9
43	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3
44	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	9
45	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	4
46	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2
47	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	9
48	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	4
49	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3
50	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	4

ตารางที่ 12 (ต่อ)

พี่น้องที่แท้จริง	D8S1179	D21S11	D7S820	CSF1PO	D3S1358	TH01	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	vWA	TPOX	D18S51	D5S818	FGA	Total
51	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
52	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	7
53	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	7
54	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	6
55	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	6
56	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	8
57	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3
58	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	6
59	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	9
60	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	5
61	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	6
62	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	4
63	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	5
64	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	5
65	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	6
66	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	4
67	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	6
68	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	3
69	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	5
70	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	4
71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	2
72	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	6
73	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	7
74	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	7
75	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	4

ตารางที่ 12 (ต่อ)

พี่น้องที่แท้จริง	D8S1179	D21S11	D7S820	CSF1PO	D3S1358	TH01	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	vWA	TPOX	D18S51	D5S818	FGA	Total
76	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	6
77	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	4
78	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	8
79	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	6
80	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	4
81	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	7
82	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2
83	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	3
84	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	6
85	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	9
86	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	10
87	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	10
88	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	9
89	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	6
90	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	5
91	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	4
92	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	5
93	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	7
94	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	6
95	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	5
96	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	5
97	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	9
98	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	6
99	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	9
100	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	7

ตารางที่ 13 data DNA ของคู่ที่ไม่ได้เป็นพี่น้อง หรือเครือญาติกันเลย จำนวนทั้งหมด 100 คู่

คู่ที่ไม่ใช่	D8S1179	D21S11	D7S820	CSF1PO	D3S1358	TH01	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	vWA	TPOX	D18S51	D5S818	FGA	Total
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
6	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
13	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2
19	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1

ตารางที่ 13 (ต่อ)

คู่ที่ไม่ใช่	D8S1179	D21S11	D7S820	. CSF1PO	D3S1358	TH01	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	vWA	TPOX	D18S51	D5S818	FGA	Total
26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	2
30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
32	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	2
33	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
39	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
40	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
41	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
42	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	3
43	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2
44	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	2
46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
47	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
48	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
49	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
50	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

ตารางที่ 13 (ต่อ)

คู่ที่ไม่ใช่	D8S1179	D21S11	D7S820	CSF1PO	D3S1358	TH01	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	vWA	TPOX	D18S51	D5S818	FGA	Total
51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
52	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
54	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
55	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
57	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	3
58	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
59	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3
60	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2
61	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
62	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3
63	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
64	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
65	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
66	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
67	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
68	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2
69	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
71	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2
72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
73	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
74	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ตารางที่ 13 (ต่อ)

คู่ที่ไม่ใช่	D8S1179	D21S11	D7S820	CSF1PO	D3S1358	TH01	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	vWA	TPOX	D18S51	D5S818	FGA	Total
76	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	4
77	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
78	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	4
79	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
81	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
82	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
83	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2
84	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
86	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	2
87	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
88	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
89	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
91	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2
92	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
93	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2
94	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
95	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
96	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2
97	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
98	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	2
99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2
100	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2

ภาคผนวก ค

ข้อมูลทางสถิติ

ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ Logistic Rogation โดยใช้โปรแกรม SPSS

ตารางที่14 Case Processing Summary

Unweighted Cases(a)		N	Percent
Selected Cases	Included in Analysis	200	100.0
	Missing Cases	0	.0
	Total	200	100.0
Unselected Cases		0	.0
Total		200	100.0

a If weight is in effect, see classification table for the total number of cases.

ตารางที่15 Dependent Variable Encoding

Original Value	Internal Value
0	0
1	1

Block 0: Beginning Block

ตารางที่ 16 Classification Table(a,b)

	Observed		Predicted		
			FAMILY		Percentage Correct
			0	1	
Step 0	FAMILY	0	0	100	.0
		1	0	100	100.0
	Overall Percentage				50.0

a Constant is included in the model.
b The cut value is .500

ตารางที่ 17 Variables in the Equation

		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Step 0	Constant	.000	.141	.000	1	1.000	1.000

ตารางที่ 18 Variables not in the Equation

			Score	df	Sig.
Step 0	Variables	D8S1179	36.125	1	.000
		D21S11	27.889	1	.000
		D7S820	28.470	1	.000
		CSF1PO	37.005	1	.000
		D3S1358	19.705	1	.000
		TH01	28.671	1	.000
		D13S317	27.125	1	.000
		D16S539	25.409	1	.000
		D2S1338	24.175	1	.000
		D19S433	49.800	1	.000
		VWA	22.900	1	.000
		TPOX	13.333	1	.000
		D18S51	18.320	1	.000
		D5S818	31.869	1	.000
		FGA	39.160	1	.000
	Overall Statistics		147.632	15	.000

ตารางที่ 19 Model Summary

Step	-2 Log likelihood	Cox & Snell R Square	Nagelkerke R Square
1	216.315	.263	.350
2	167.921	.421	.562
3	129.627	.522	.696
4	104.255	.579	.772
5	83.129	.621	.828
6	68.954	.647	.863
7	60.567	.662	.882
8	53.290	.674	.898
9	41.808	.692	.923
10	35.959	.701	.934
11	37.232	.699	.932
12	31.123	.708	.944

Block 1: Method = Forward Stepwise (Likelihood Ratio)

ตารางที่ 20 Omnibus Tests of Model Coefficients

		Chi-square	df	Sig.
Step 1	Step	60.944	1	.000
	Block	60.944	1	.000
	Model	60.944	1	.000
Step 2	Step	48.394	1	.000
	Block	109.338	2	.000
	Model	109.338	2	.000
Step 3	Step	38.294	1	.000
	Block	147.632	3	.000
	Model	147.632	3	.000
Step 4	Step	25.373	1	.000
	Block	173.004	4	.000
	Model	173.004	4	.000
Step 5	Step	21.126	1	.000
	Block	194.130	5	.000
	Model	194.130	5	.000
Step 6	Step	14.174	1	.000
	Block	208.305	6	.000
	Model	208.305	6	.000
Step 7	Step	8.387	1	.004
	Block	216.692	7	.000
	Model	216.692	7	.000
Step 8	Step	7.277	1	.007
	Block	223.969	8	.000
	Model	223.969	8	.000
Step 9	Step	11.482	1	.001
	Block	235.451	9	.000
	Model	235.451	9	.000
Step 10	Step	5.849	1	.016
	Block	241.300	10	.000
	Model	241.300	10	.000
Step 11(a)	Step	-1.273	1	.259
	Block	240.027	9	.000
	Model	240.027	9	.000
Step 12	Step	6.109	1	.013
	Block	246.136	10	.000
	Model	246.136	10	.000

a A negative Chi-squares value indicates that the Chi-squares value has decreased from the previous step.

ตารางที่ 21 Classification Table(a)

	Observed		Predicted		
			FAMILY		Percentage Correct
			0	1	
Step 1	FAMILY	0	99	1	99.0
		1	58	42	42.0
	Overall Percentage				70.5
Step 2	FAMILY	0	98	2	98.0
		1	34	66	66.0
	Overall Percentage				82.0
Step 3	FAMILY	0	92	8	92.0
		1	15	85	85.0
	Overall Percentage				88.5
Step 4	FAMILY	0	89	11	89.0
		1	8	92	92.0
	Overall Percentage				90.5
Step 5	FAMILY	0	86	14	86.0
		1	4	96	96.0
	Overall Percentage				91.0
Step 6	FAMILY	0	95	5	95.0
		1	10	90	90.0
	Overall Percentage				92.5
Step 7	FAMILY	0	94	6	94.0
		1	8	92	92.0
	Overall Percentage				93.0
Step 8	FAMILY	0	96	4	96.0
		1	8	92	92.0
	Overall Percentage				94.0
Step 9	FAMILY	0	96	4	96.0
		1	6	94	94.0
	Overall Percentage				95.0
Step 10	FAMILY	0	96	4	96.0
		1	5	95	95.0
	Overall Percentage				95.5
Step 11	FAMILY	0	95	5	95.0
		1	4	96	96.0
	Overall Percentage				95.5
Step 12	FAMILY	0	95	5	95.0
		1	2	98	98.0
	Overall Percentage				96.5

a The cut value is .500

ตารางที่ 22 Variables in the Equation

		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Step 1(a)	D19S433	4.272	1.025	17.365	1	.000	71.690
	Constant	-.535	.165	10.456	1	.001	.586
Step 2(b)	D19S433	4.498	1.035	18.888	1	.000	89.841
	FGA	4.242	1.039	16.656	1	.000	69.558
	Constant	-1.059	.199	28.301	1	.000	.347
Step 3(c)	CSF1PO	2.987	.541	30.453	1	.000	19.835
	D19S433	4.754	1.059	20.133	1	.000	116.016
	FGA	4.503	1.066	17.831	1	.000	90.251
	Constant	-1.820	.278	42.755	1	.000	.162
Step 4(d)	CSF1PO	3.180	.607	27.435	1	.000	24.036
	D19S433	4.902	1.096	19.999	1	.000	134.534
	D5S818	3.362	.759	19.607	1	.000	28.848
	FGA	4.710	1.103	18.251	1	.000	111.102
	Constant	-2.441	.369	43.792	1	.000	.087
Step 5(e)	D8S1179	3.572	.870	16.856	1	.000	35.590
	CSF1PO	3.417	.718	22.628	1	.000	30.473
	D19S433	5.200	1.163	19.997	1	.000	181.254
	D5S818	3.930	.848	21.482	1	.000	50.890
	FGA	4.462	1.194	13.966	1	.000	86.668
	Constant	-3.176	.514	38.205	1	.000	.042
Step 6(f)	D8S1179	3.947	1.041	14.386	1	.000	51.791
	CSF1PO	3.891	.894	18.934	1	.000	48.944
	D16S539	3.015	.914	10.883	1	.001	20.386
	D19S433	5.085	1.302	15.263	1	.000	161.606
	D5S818	4.517	1.015	19.794	1	.000	91.575
	FGA	5.322	1.331	16.001	1	.000	204.874
	Constant	-4.138	.751	30.322	1	.000	.016
Step 7(g)	D8S1179	3.854	1.075	12.857	1	.000	47.172
	CSF1PO	3.932	.949	17.175	1	.000	51.019
	TH01	2.093	.775	7.293	1	.007	8.106
	D16S539	3.132	.960	10.637	1	.001	22.919
	D19S433	5.252	1.384	14.396	1	.000	190.989
	D5S818	4.432	1.076	16.972	1	.000	84.063
	FGA	5.625	1.421	15.665	1	.000	277.149
	Constant	-4.787	.862	30.865	1	.000	.008

ตารางที่ 22 (ต่อ)

		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Step 8(h)							
	D8S1179	5.086	1.314	14.991	1	.000	161.795
	CSF1PO	3.871	1.010	14.688	1	.000	48.010
	TPOX	2.206	.904	5.957	1	.015	9.079
	D5S818	5.204	1.272	16.749	1	.000	181.965
	FGA	6.445	1.642	15.410	1	.000	629.391
	Constant	-6.094	1.206	25.524	1	.000	.002
Step 9(i)	D8S1179	7.135	2.011	12.583	1	.000	1255.105
	D7S820	4.488	1.760	6.500	1	.011	88.950
	CSF1PO	3.515	1.063	10.938	1	.001	33.601
	TH01	1.715	1.032	2.764	1	.096	5.558
	D16S539	3.758	1.128	11.104	1	.001	42.862
	D19S433	5.120	1.459	12.313	1	.000	167.282
	TPOX	4.325	1.600	7.305	1	.007	75.593
	D5S818	6.722	1.916	12.307	1	.000	830.481
	FGA	6.696	2.274	8.672	1	.003	808.932
	Constant	-8.315	1.961	17.976	1	.000	.000
Step 10(j)	D8S1179	7.041	2.527	7.761	1	.005	1142.685
	D7S820	4.759	1.929	6.084	1	.014	116.613
	CSF1PO	4.249	1.346	9.967	1	.002	70.052
	TH01	1.257	1.161	1.173	1	.279	3.515
	D16S539	4.107	1.416	8.409	1	.004	60.753
	D2S1338	3.776	1.754	4.638	1	.031	43.658
	D19S433	5.808	1.685	11.884	1	.001	332.971
	TPOX	5.005	1.830	7.479	1	.006	149.226
	D5S818	6.732	1.905	12.492	1	.000	838.456
	FGA	7.575	2.704	7.848	1	.005	1948.154
	Constant	-9.455	2.475	14.592	1	.000	.000
Step 11(j)	D8S1179	7.660	2.545	9.057	1	.003	2120.908
	D7S820	5.178	1.817	8.116	1	.004	177.297
	CSF1PO	4.581	1.375	11.095	1	.001	97.646
	D16S539	4.119	1.394	8.725	1	.003	61.500
	D2S1338	3.904	1.647	5.622	1	.018	49.623
	D19S433	6.046	1.732	12.193	1	.000	422.586
	TPOX	5.594	1.865	8.996	1	.003	268.691
	D5S818	7.214	1.951	13.671	1	.000	1358.213
	FGA	7.896	2.840	7.731	1	.005	2685.505
	Constant	-9.864	2.585	14.559	1	.000	.000

ตารางที่ 22(ต่อ)

		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Step 12(k)							
	D8S1179	9.580	3.415	7.869	1	.005	14472.247
	D7S820	6.340	2.543	6.215	1	.013	566.547
	CSF1PO	5.473	1.664	10.812	1	.001	238.214
	D16S539	3.355	1.460	5.280	1	.022	28.652
	D2S1338	4.627	1.764	6.877	1	.009	102.231
	TPOX	6.952	2.605	7.124	1	.008	1045.366
	D18S51	3.999	1.810	4.881	1	.027	54.554
	D5S818	9.326	2.976	9.817	1	.002	11223.860
	FGA	9.292	4.012	5.363	1	.021	10846.678
	Constant	-12.191	3.562	11.716	1	.001	.000

a Variable(s) entered on step 1: D19S433.
b Variable(s) entered on step 2: FGA.
c Variable(s) entered on step 3: CSF1PO.
d Variable(s) entered on step 4: D5S818.
e Variable(s) entered on step 5: D8S1179.
f Variable(s) entered on step 6: D16S539.
g Variable(s) entered on step 7: TH01.
h Variable(s) entered on step 8: TPOX.
i Variable(s) entered on step 9: D7S820.
j Variable(s) entered on step 10: D2S1338.
k Variable(s) entered on step 12: D18S51.

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ – สกุล นาง อัจฉรา บุญเลิศ

ที่อยู่ 25/191 หมู่ 4 ซอย รามคำแหง174 แขวงมีนบุรี เขตมีนบุรี กรุงเทพฯ 10510

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2535 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยรามคำแหง

พ.ศ. 2550 ศึกษาต่อระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ประวัติการทำงาน

พ.ศ. 2537 พนักงานตรวจสอบคุณภาพขบวนการผลิต บริษัทสยามอุตสาหกรรมการเกษตร สับปะรดและอื่นๆ จำกัด (มหาชน)

พ.ศ. 2541 นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ 6 ฝ่ายนิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์