

การศึกษาการกลายพันธุ์บนตำแหน่ง Y-STR ที่มีอัตราการกลายพันธุ์รวดเร็วจำนวนสองตำแหน่งใน
ชายไทยที่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือด



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The mutation study of two rapidly mutating Y-STRs in closely related Thai males



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medical Sciences

FACULTY OF MEDICINE

Chulalongkorn University

Academic Year 2021

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาการกลายพันธุ์บนตำแหน่ง Y-STR ที่มีอัตราการกลายพันธุ์รวดเร็วจำนวนสองตำแหน่งในชายไทยที่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือด
โดย	น.ส.พิมพ์พิศมัย แซดอน
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ นายแพทย์กรเกียรติ วงศ์ไพศาลสิน

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉันทชาย สิทธิพันธุ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วิไล อโนมะศิริ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์กรเกียรติ วงศ์ไพศาลสิน)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาลิสสา หลุยเจริญ ชีพสุนทร)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.บุษบา ฤกษ์อำนวยโชค)

พิมพ์พิศมัย แซดอน : การศึกษาการกลายพันธุ์บนตำแหน่ง Y-STR ที่มีอัตราการกลายพันธุ์รวดเร็วจำนวนสองตำแหน่งในชายไทยที่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือด. (The mutation study of two rapidly mutating Y-STRs in closely related Thai males) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. นพ.กรเกียรติ วงศ์ไพศาลสิน

Y chromosome short tandem repeat (Y-STR) ถูกใช้อย่างแพร่หลายในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ เช่น การตรวจการล่องละเมิดทางเพศ, การตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์พ่อ-ลูกชาย เนื่องจาก Y-STR มีความจำเพาะในเพศชาย อย่างไรก็ตาม ข้อจำกัดของ Y-STR คือไม่สามารถใช้ในการระบุตัวบุคคลของชายมีความใกล้ชิดทางสายเลือดเพราะ Y-STR มีรูปแบบ haplotype ที่เหมือนกันในครอบครัว

ในการศึกษานี้ทำการศึกษาการกลายพันธุ์ของชายที่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือดในตำแหน่ง DYF399S1 และตำแหน่ง DYF403S1a/b ซึ่งเป็น Y-STR ที่มีอัตราการกลายพันธุ์ที่รวดเร็ว (Rapidly Mutating Y-STR (RM Y-STR)) ในคู่พ่อและลูกชายชาวไทยจำนวน 150 คู่

จากผลการศึกษาพบการกลายพันธุ์ของคู่พ่อและลูกชายจำนวน 10 คู่ในตำแหน่ง DYF399S1 และ 3 คู่ในตำแหน่ง DYF403S1a แต่ไม่พบการกลายพันธุ์ในตำแหน่ง DYF403S1b โดยตำแหน่ง DYF399S1 มีอัตราการกลายพันธุ์เท่ากับ 6.67×10^{-2} ต่อตำแหน่งต่อรุ่น ตำแหน่ง DYF403S1a อัตราการกลายพันธุ์เท่ากับ 2.00×10^{-2} ต่อตำแหน่งต่อรุ่น ดังนั้นทั้งสองตำแหน่งนับว่าเป็น Y-STR ที่มีอัตราการกลายพันธุ์ที่รวดเร็วในชายที่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือดชาวไทย

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ปีการศึกษา 2564

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

6074075030 : MAJOR MEDICAL SCIENCES

KEYWORD: Rapidly mutating Y-STR (RM Y-STR), DYF399S1, DYF403S1a/b, Male lineage differentiation

Pimpisamai Khaedon : The mutation study of two rapidly mutating Y-STRs in closely related Thai males. Advisor: Assoc. Prof. Kornkiat Vongpaisarnsin, M.D.

Y chromosome short tandem repeat (Y-STR) is widely used in forensic science, such as sexual assault testing and paternity testing due to their male-specific property. However, Y-STR cannot differentiate in close-related male individuals because the same haplotype is shared in the family.

In this research, we study mutation patterns and calculate the mutation rate in DYF399S1 loci and DYF403S1a/b loci, which are rapidly mutating Y-STR (RM Y-STR), in 150 Thai father-son pairs.

According to the results, the mutation has been observed in DYF399S1 (10/150) and DYF403S1a (3/150) loci. No mutation observed in DYF403S1b locus. The mutation rate is 6.67×10^{-2} and 2.00×10^{-2} per locus per generation for DYF399S1 and DYF403S1a, respectively. Therefore, in this study, these two loci (DYF399S1 and DYF403S1a) were RM Y-STRs in Thai population.

Field of Study: Medical Sciences

Student's Signature

Academic Year: 2021

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ นายแพทย์เกรียงดิ วงศ์ไพศาลสิน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ให้คำแนะนำและการช่วยเหลือแก้ไขข้อบกพร่องมาโดยตลอดจนการศึกษานี้สำเร็จลุล่วงไปได้

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.วิไล โอนมะศิริ, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาลิสลา หลุยเจริญ ชีพสุนทรและรองศาสตราจารย์ ดร.บุษบา ฤกษ์อำนวยโชค คณะกรรมการสอบที่ช่วยแนะนำและแก้ไข ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้องนิสิตปริญญาโททุกคนที่คอยเป็นแรงผลักดัน

ขอขอบพระคุณพี่ ๆ จากหน่วยนิติเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำแนะนำ, ช่วยเหลือ, แนะนำและช่วยแก้ไขข้อบกพร่องที่เกิดขึ้นในการวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในคณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ตลอดระยะเวลาที่ผ่านมา

ขอขอบพระคุณกองทุนทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้การสนับสนุนเงินทุนการศึกษา

และสุดท้ายนี้ขอขอบคุณคุณพ่อ, คุณแม่และพี่แพร สำหรับกำลังใจ, ความช่วยเหลือ, ความรัก ความห่วงใยที่มอบให้อย่างไม่มีข้อแม้

งานศึกษานี้จะไม่สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้หากไม่ได้รับความอนุเคราะห์จากทุกท่าน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

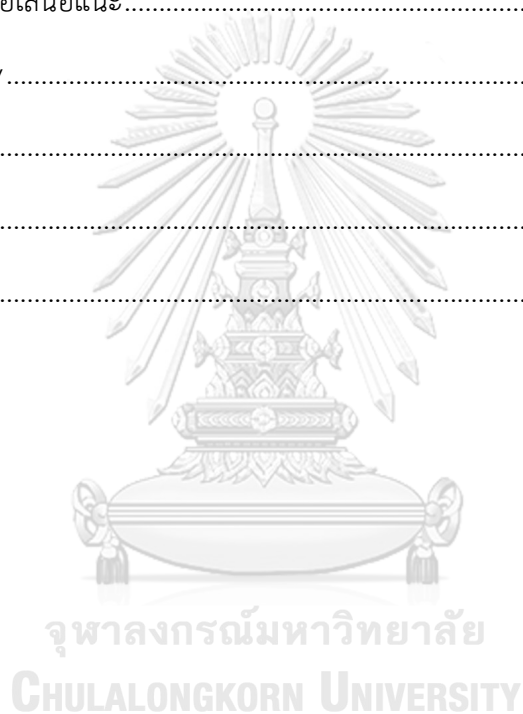
พิมพ์พิศมัย แวดอน

สารบัญ

	หน้า
.....	ค
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูปภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา (background and rationale).....	1
1.2 คำถามงานวิจัย (research question).....	1
1.3 วัตถุประสงค์ (objective).....	1
1.4 สมมติฐานของงานวิจัย (hypothesis).....	1
1.5 กรอบแนวคิดงานวิจัย (conceptual framework).....	2
1.6 คำสำคัญ (keywords).....	2
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (review of the related literatures).....	4
2.1 Y chromosome	4
2.2 เครื่องหมาย STR.....	5
2.2.1 Type of STR repeat unit.....	5
2.2.2 STR classes.....	5
2.2.3 กลไกการกลายพันธุ์ของ STR (STR mutation mechanism).....	6

2.3 Y-STR.....	8
2.4 Rapidly mutating Y-STR (RM Y-STR)	8
2.5 การคัดเลือก RM Y-STR สำหรับงานศึกษานี้.....	12
2.5.1 DYF399S1 locus.....	12
2.5.2 DYF403S1a/b locus	13
2.6 การคัดเลือกไมโครเมอร์.....	17
2.7 การนำการคำนวณทางสถิติมาใช้ในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์.....	17
2.7.1 Y-STR kinship index.....	17
2.7.2 สูตรการคำนวณอัตราการกลายพันธุ์ (mutation rate, μ).....	19
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย (research methodology).....	20
3.1 รูปแบบการทดลอง (experimental design).....	20
3.2 รูปแบบการวิจัย (research design).....	20
3.3 วิธีการดำเนินการวิจัย (methodology).....	20
3.3.1 Validation.....	21
3.3.1.1 PCR condition	21
3.3.1.2 การปรับความเข้มข้นของไมโครเมอร์.....	24
3.3.1.3 เกณฑ์การแปลผลการศึกษาจาก electropherogram	25
3.3.2 การทำการศึกษาการกลายพันธุ์กับตัวอย่างคู่พ่อและลูกชาย	34
3.3.2.1 การคัดเลือกตัวอย่าง (Sample collection)	34
3.3.2.2 Mutation study in Thai father-son pairs.....	36
3.4 สถานที่ทำการศึกษา	38
3.5 ข้อพิจารณาทางจริยธรรมการวิจัย	38
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปราย (results and discussion).....	39
4.1 Mutation patterns	39

4.2 Mutation rate calculation.....	40
4.3 อายุของพ่อขณะให้กำเนิดลูกชาย	41
4.4 Differentiation of father-son pairs	42
4.4.1 การกลายพันธุ์ที่พบบนตำแหน่ง DYF399S1.....	42
4.4.2 การกลายพันธุ์ที่พบบนตำแหน่ง DYF403S1a.....	48
บทที่ 5 สรุปผล (conclusion).....	50
5.1 ข้อจำกัดและข้อเสนอแนะ.....	51
5.2 Future study	51
บรรณานุกรม.....	52
ภาคผนวก.....	56
ประวัติผู้เขียน.....	74



สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงการแบ่งประเภทของ STR ตามรูปแบบการเรียงตัวของชุดซ้ำและลำดับเบส.....	6
ตารางที่ 2 แสดงจำนวนและอัตราการกลายพันธุ์เฉลี่ยของ Y-STR ที่มี length of repeat ต่างๆ....	11
ตารางที่ 3 ตารางแสดง repeat type, repeat structure และ allele range ของ RM Y-STR ทั้ง 13 ตำแหน่ง ดัดแปลงมาจาก Ballantyne et al. 2012 และ 2014.....	13
ตารางที่ 4 แสดงอัตราการกลายพันธุ์ของ RM Y-STR ตำแหน่งต่างๆ ในงานวิจัยก่อนหน้าที่ศึกษาในกลุ่มตัวอย่างที่มีความใกล้ชิดทางสายเลือด.....	15
ตารางที่ 5 แสดงรายละเอียดลำดับเบสของไพรเมอร์, การติดสี fluorescence dye ที่ตำแหน่ง DYF399S1 และ DYF403S1a/b.....	17
ตารางที่ 6 PCR condition อ้างอิงมาจาก Ballantyne et al., 2010 (14).....	22
ตารางที่ 7 แสดง genotype ของ male control DNA 007 ที่พบในตำแหน่ง DYF399S1, DYF403S1a/b.....	23
ตารางที่ 8 แสดง PCR components และปริมาณสารในหลอดปฏิกิริยาสำหรับการทำปฏิกิริยา PCR ในขั้นตอน validation	24
ตารางที่ 9 แสดง PCR components และปริมาณสารในหลอดปฏิกิริยาสำหรับการทำปฏิกิริยา PCR ในขั้นตอนการศึกษาการกลายพันธุ์ในคู่พ่อและลูกชาย	36
ตารางที่ 10 ข้อมูลแอลลีล, จำนวนการกลายพันธุ์ที่พบและลักษณะของการกลายพันธุ์ในตำแหน่ง DYF399S1 และ DYF403S1a/b.....	40
ตารางที่ 11 allele ของตัวอย่างคู่พ่อและลูกชายชาวไทยจำนวน 150 คู่.....	56
ตารางที่ 12 ตารางแสดงอายุของพ่อขณะให้กำเนิดลูกชาย.....	66
ตารางที่ 13 ผลการทดสอบเปรียบเทียบโอกาสการเกิด one-step mutation ต่อ multistep mutation ด้วย Binomial test ที่ค่าความเชื่อมั่นเท่ากับ 95%.....	72
ตารางที่ 14 ผลการทดสอบเปรียบเทียบโอกาสการพบ repeat loss ต่อ repeat gain ของตำแหน่ง DYF399S1 ด้วย Binomial test ที่ค่าความเชื่อมั่นเท่ากับ 95%.....	72

ตารางที่ 15 ผลการทดสอบเปรียบเทียบโอกาสการพบ repeat loss ต่อ repeat gain ของตำแหน่ง DYF403S1a ด้วย Binomial test ที่ค่าความเชื่อมั่นเท่ากับ 95%..... 73



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 โครงสร้างของโครโมโซมวาย.....	4
ภาพที่ 2 การถ่ายทอด Y chromosome จากพ่อสู่ลูกชาย โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลง	4
ภาพที่ 3 unequal crossing over ที่เกิดขึ้นระหว่างโครโมโซมคู่เหมือน	7
ภาพที่ 4 กลไกการเกิด Slippage-strand mispairing หรือ polymerase slippage	7
ภาพที่ 5 electropherogram ของคู่พ่อ-ลูกที่พบ Y-STR haplotype เหมือนกัน	8
ภาพที่ 6 กราฟแสดงอัตราการกลายพันธุ์ของ Y-STR จำนวน 186 ตำแหน่ง พบว่ามี 13 ตำแหน่ง (จุดสีแดง) ที่มีอัตราการกลายพันธุ์สูงกว่า 1×10^{-2} ต่อตำแหน่งต่อรุ่น	9
ภาพที่ 7 แสดง PCR product ของตำแหน่ง DYF399S1 (lane ที่ 2) และ DYF403S1a/b (lane ที่ 3), lane ที่ 1 คือ Low Molecular Weight DNA Ladder	23
ภาพที่ 8 แสดง electropherogram ของ male DNA control007 กับ RM Y-STR ตำแหน่ง DYF399S1 และ DYF403S1a/b หลังจากปรับความเข้มข้นของไพรเมอร์	25
ภาพที่ 9 แสดง electropherogram ที่ไม่มี allelic ladder.....	26
ภาพที่ 10 แสดง electropherogram ของ male control DNA 007 ในตำแหน่ง DYF399S1.....	27
ภาพที่ 11 แสดง electropherogram ของ male control DNA 007 ในตำแหน่ง DYF403S1a... 29	29
ภาพที่ 12 แสดง electropherogram ของ male control DNA 007 ในตำแหน่ง DYF403S1b .. 30	30
ภาพที่ 13 notepad ที่มีข้อมูลระยะห่าง data size ของ repeat unit ระหว่างแอลลีลของ DYF399Sa และDYF403S1a/b	31
ภาพที่ 14 electropherogram หลังการสร้างขอบเขต bin.....	31
ภาพที่ 15 แสดง electropherogram ของ DYF399S1 (ภาพ a), DYF403S1a (ภาพ b), DYF403S1b (ภาพ c) กับ male control DNA007 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	33
ภาพที่ 16 แสดงรายละเอียดการกำหนด stutter % ของ stutter product ต่อพีคจริง.....	34
ภาพที่ 17 แสดงช่วงแอลลีลที่พบ (allele range) ในการศึกษาปัจจุบันและการศึกษาของ Ballantyne et al., 2014	40

ภาพที่ 18 electropherogram ของคู่พ่อและลูกชายคู่ที่ 7 (F007/S007).....	42
ภาพที่ 19 electropherogram ของคู่พ่อและลูกชายคู่ที่ 8 (F008/S008).....	43
ภาพที่ 20 electropherogram ของคู่พ่อและลูกชายคู่ที่ 33 (F033/S033)	43
ภาพที่ 21 electropherogram ของคู่พ่อและลูกชายคู่ที่ 75 (F075/S075)	44
ภาพที่ 22 electropherogram ของคู่พ่อและลูกชายคู่ที่ 80 (F080/S080)	44
ภาพที่ 23 electropherogram ของคู่พ่อและลูกชายคู่ที่ 82 (F082/S082)	45
ภาพที่ 24 electropherogram ของคู่พ่อและลูกชายคู่ที่ 89 (F089/S089)	45
ภาพที่ 25 electropherogram ของคู่พ่อและลูกชายคู่ที่ 91 (F091/S091)	46
ภาพที่ 26 electropherogram ของคู่พ่อและลูกชายคู่ที่ 101 (F101/S101).....	46
ภาพที่ 27 electropherogram ของคู่พ่อและลูกชายคู่ที่ 147 (F147/S147).....	47
ภาพที่ 28 electropherogram ของคู่พ่อและลูกชายคู่ที่ 31 (F031/S031)	48
ภาพที่ 29 electropherogram ของคู่พ่อและลูกชายคู่ที่ 33 (F033/S033)	48
ภาพที่ 30 electropherogram ของคู่พ่อและลูกชายคู่ที่ 101 (F101/S101).....	49

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา (background and rationale)

สารพันธุกรรมของโครโมโซมวายจะถ่ายทอดจากพ่อไปสู่ลูกชายโดยปราศจากการเปลี่ยนแปลง (1) คุณสมบัตินี้ทำให้เครื่องหมายดีเอ็นเอบนโครโมโซมวายอย่าง Y-STR ถูกนำไปใช้อย่างแพร่หลายในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ เช่น การตรวจความสัมพันธ์ทางสายบิดา (paternity test), การวิเคราะห์ mixed DNA (2) ทั้งนี้คุณสมบัติที่เป็นการถ่ายทอดจากรุ่นสู่รุ่นโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงก็ทำให้ Y-STR ไม่สามารถแยกความแตกต่างของชายที่ความสัมพันธ์ทางสายเลือดได้ เนื่องจากการมี Y haplotype ที่เหมือนกัน ทำให้ต่อมาได้มีการศึกษาและค้นหาเครื่องหมาย Y-STR ที่มีอัตราการกลายพันธุ์ที่รวดเร็ว (rapidly mutating Y-STR, RM Y-STR) โดยหวังว่าการกลายพันธุ์ที่สูงของเครื่องหมายเหล่านั้นจะสามารถแยกแยะตัวบุคคลของชายมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางสายเลือด (Male lineage differentiation) ได้ (3)

1.2 คำถามงานวิจัย (research question)

รูปแบบการกลายพันธุ์และอัตราการกลายพันธุ์ของ RM Y-STR จำนวน 2 ตำแหน่ง คือ DYF399S1 และ DYF403S1a/b ในชายชาวไทยที่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือดเป็นอย่างไร

1.3 วัตถุประสงค์ (objective)

1. เพื่อศึกษารูปแบบการกลายพันธุ์ของ DYF399S1 และ DYF403S1a/b ในชายไทยที่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือด
2. เพื่อคำนวณอัตราการกลายพันธุ์ของ DYF399S1 และ DYF403S1a/b ในชายไทยที่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือด

1.4 สมมติฐานของงานวิจัย (hypothesis)

พบการกลายพันธุ์ของ DYF399S1 และ DYF403S1a/b ในกลุ่มตัวอย่างที่นำมาศึกษาและทั้งสองตำแหน่งมีอัตราการกลายพันธุ์รวดเร็วในกลุ่มตัวอย่างชายชาวไทย

1.5 กรอบแนวคิดงานวิจัย (conceptual framework)



1.6 คำสำคัญ (keywords)

1. Rapidly mutating Y-STR (RM Y-STR)
2. DYF399S1

3. D_{YF403S1a/b}
4. อัตราการกลายพันธุ์ (mutation rate)
5. การระบุตัวบุคคลของชายมีความสัมพันธ์ทางสายเลือด (Male lineage differentiation)

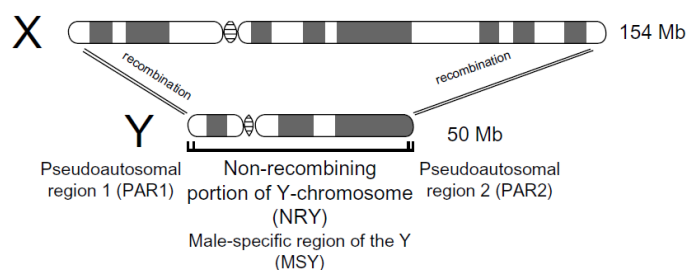


บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (review of the related literatures)

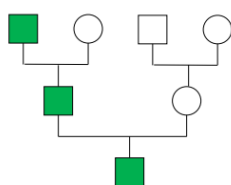
2.1 Y chromosome

ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างของโครโมโซมวาย (Y chromosome) ที่มีขนาด 50 ล้านคู่เบส (Mb) เป็นโครโมโซมที่มีขนาดเล็กเป็นอันดับที่สามของมนุษย์ โดยปลายทั้งสองด้านของโครโมโซมวาย (5 เพอร์เซ็นต์จากทั้งหมด) เป็นบริเวณที่มีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนกับบริเวณคู่เหมือนบนโครโมโซมเอ็กซ์ (X chromosome) เรียกบริเวณนี้ว่า pseudoautosomal regions (PAR) บริเวณ PAR1 มีตำแหน่งอยู่บนปลายของแขนข้างสั้นของโครโมโซมวาย (Yp) มีขนาดประมาณ 2.5 ล้านคู่เบส (Mb) ส่วนด้าน PAR2 มีตำแหน่งอยู่บนปลายของแขนข้างยาวของโครโมโซมวาย (Yq) มีขนาดน้อยกว่า 1 ล้านคู่เบส (Mb) ส่วนอีก 95 เปอร์เซ็นต์ที่เหลือเป็นบริเวณที่ไม่มีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนกับโครโมโซมเอ็กซ์ เรียกบริเวณนี้ว่า Nonrecombining portion of the Y-chromosome (NRY) หรือ male-specific region (MSY) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการถ่ายทอดสารพันธุกรรมจากพ่อไปสู่ลูกชายโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลง (ภาพที่ 2) ยกเว้นมีการกลายพันธุ์ (mutation) เกิดขึ้น (1, 2, 4)



ภาพที่ 1 โครงสร้างของโครโมโซมวาย

ที่มา: Butler, 2012 (2)



Y-Chromosome
(passed on complete,
but only by sons)

ภาพที่ 2 การถ่ายทอด Y chromosome จากพ่อสู่ลูกชาย โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลง

ที่มา: Butler, 2015 (5)

2.2 เครื่องหมาย STR

Microsatellite หรือ simple sequence repeat (SSR) หรือ short tandem repeat (STR) เป็นลำดับเบสที่เรียงตัวซ้ำๆ กัน แต่ละชุดซ้ำมีเบสจำนวน 1-6 เบส ในร่างกายของมนุษย์พบว่า มีลำดับเบสแบบ STR กระจายตัวอยู่ทั่วจีโนมประมาณ 3% ของลำดับเบสทั้งหมด เรียกบริเวณที่มีชุดซ้ำกระจายอยู่ว่า loci (พหูพจน์) หรือ locus (เอกพจน์) และสามารถแปลผลจำนวนชุดซ้ำของแต่ละบุคคลออกมาเป็นแอลลีล (allele) ซึ่งจำนวนชุดซ้ำที่มีความหลากหลายในแต่ละบุคคล (polymorphism) ของ STR นี้ถูกนำมาใช้ประโยชน์สำหรับการระบุตัวบุคคลในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ (human identification), การตรวจแหล่งที่มาของสิ่งส่งตรวจ, การศึกษาการปลูกถ่ายไขกระดูกของผู้บริจาค (bone marrow transplant donor engraftment studies) (6, 7)

2.2.1 Type of STR repeat unit

ลำดับเบส STR สามารถแบ่งออกได้ตามความยาวของชุดซ้ำ (length of repeat) (7) ได้แก่

- dinucleotide repeat (di-) ลำดับเบส 2 เบสเรียงตัวซ้ำกัน เช่น (CA) (CA) (CA) (CA) (CA)
- trinucleotide repeat (tri-) ลำดับเบส 3 เบสเรียงตัวซ้ำกัน เช่น (GCC) (GCC) (GCC)
- tetranucleotide repeat (tetra-) ลำดับเบส 4 เบสเรียงตัวซ้ำกัน เช่น (AATG) (AATG)
- pentanucleotide repeat (penta-) ลำดับเบส 5 เบสเรียงตัวซ้ำกัน เช่น (AGAAA) (AGAAA) (AGAAA)
- hexanucleotide repeat (hexa-) ลำดับเบส 6 เบสเรียงตัวซ้ำกัน เช่น (AGTACA) (AGTACA) (AGTACA)

2.2.2 STR classes

แบ่งออกได้ 4 ประเภทตามรูปแบบการเรียงตัวของลำดับเบสและชุดซ้ำ (ตารางที่ 1) (7, 8)

1. ชุดซ้ำแบบง่าย (simple repeats) เป็นการเรียงตัวของชุดซ้ำที่มีลำดับเบสเหมือนกันเรียงตัวต่อกัน ไม่มีเบสทั่วไปแทรกอยู่
2. ชุดซ้ำแบบง่ายที่มีเบสไม่เป็นชุดแทรกอยู่ (simple repeats with non-consensus repeats) เป็นลำดับเบสที่มีการเรียงตัวของ simple repeat และลำดับเบสทั่วไป
3. ชุดซ้ำประกอบที่มีเบสไม่เป็นชุดแทรกอยู่ (compound repeats sequences with non-consensus repeats) เป็นการเรียงตัวของ simple repeats ที่มี repeat unit length เท่ากันแต่มีลำดับเบสต่างกันอย่างน้อย 2 รูปแบบขึ้นไป

4. ชุดซ้ำซับซ้อน (complex repeats sequences) เป็นการเรียงตัวของชุดซ้ำที่มีรูปแบบการซ้ำที่หลากหลายรูปแบบและชนิด รวมทั้งมีลำดับเบสทั่วไปที่ไม่จำเพาะแทรกอยู่ด้วย

ตารางที่ 1 แสดงการแบ่งประเภทของ STR ตามรูปแบบการเรียงตัวของชุดซ้ำและลำดับเบส

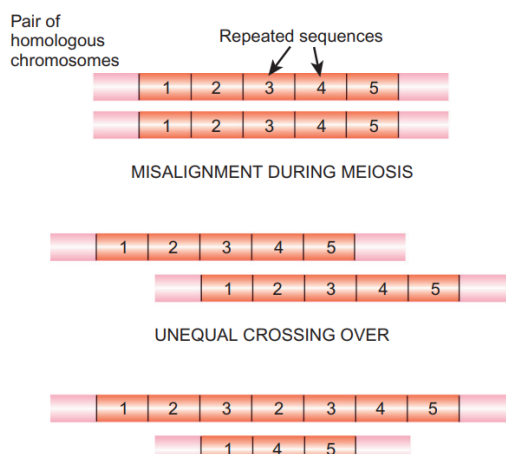
loci	classes	sequences
Penta A	Simple repeat	(AAAGA) ₁₂
HUMTH01	Simple repeat with non-consensus repeat	(TCAT) ₄ CAT(TCAT) ₅
vWA	Compound repeat	(TCTA)(TCTG) ₄ (TCTA) ₁₃
D1S1656	Complex repeat	(TAGA) ₄ TGA(TAGA) ₁₃ TAGG(TG) ₅

2.2.3 กลไกการกลายพันธุ์ของ STR (STR mutation mechanism)

ลำดับเบสแบบ STR เป็นลำดับเบสที่ไม่เสถียร การกลายพันธุ์ของ STR เป็นการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของชุดซ้ำทั้งชุด STR มีอัตราการกลายพันธุ์ที่สูงกว่าลำดับเบสแบบอื่นๆ อัตราการกลายพันธุ์ของ STR ในมนุษย์มีค่าประมาณ 1×10^{-3} ต่อตำแหน่งต่อรุ่น โดยอัตราการกลายพันธุ์ของ STR แต่ละตำแหน่งจะเกิดขึ้นได้ไม่เท่ากัน ซึ่งมีปัจจัยมาจากจำนวนของชุดซ้ำ (number of repeat), ความซับซ้อนของโครงสร้างชุดซ้ำ (complexity of repetitive structure) และ length of repetitive motif (6) สำหรับกลไกการเกิดการกลายพันธุ์ของ STR เกิดได้จาก 2 กลไก ได้แก่

1. Unequal crossing over in meiosis (UCO)

เป็นกลไกที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการแบ่งเซลล์แบบ meiosis เป็นกลไกการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของ repeat unit บริเวณโครโมโซมคู่เหมือน (homologous chromosome) หรือ sister chromatid หรือกระบวนการ recombination โดยเกิดการจับคู่ที่ไม่ตรงกันของชุดซ้ำ ทำให้ดีเอ็นเอสายหนึ่งมีจำนวนชุดซ้ำเพิ่มขึ้น ส่วนดีเอ็นเออีกสายมีจำนวนชุดซ้ำลดลง กลไกนี้ส่งผลต่อการกลายพันธุ์ที่มีการเปลี่ยนแปลงของชุดซ้ำมากกว่า 1 ชุด (multistep mutation) (ภาพที่ 3) (6, 9)

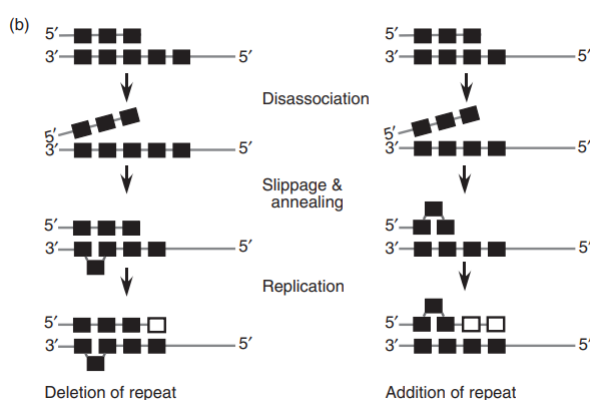


ภาพที่ 3 unequal crossing over ที่เกิดขึ้นระหว่างโครโมโซมคู่เหมือน

ที่มา: Clark DP, Pazdernik NJ and McGehee MR, 2019 (10)

2. Slip-strand mispairing (SSM) หรือ Polymerase slippage หรือ DNA slippage

เป็นกลไกที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการการจำลองดีเอ็นเอ (DNA replication) เป็นกลไกหลักที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์สำหรับลำดับเบสแบบ STR โดยเกิดจากการข้ามชุดซ้ำของสายดีเอ็นเอสายใดสายหนึ่ง ทำให้เกิดการโป่งพองของสายดีเอ็นเอ ซึ่งในกรณีที่เกิดการโป่งพองที่สายดีเอ็นเอต้นแบบ จะทำให้สายดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่มีจำนวนชุดซ้ำลดลง แต่ในกรณีที่เกิดการโป่งพองที่สายดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ จะทำให้สายดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ใหม่เกิดการกลายพันธุ์แบบมีการเพิ่มขึ้นของชุดซ้ำ (ภาพที่ 4) และเนื่องจาก STR เป็นลำดับเบสที่มีชุดซ้ำเรียงกัน ทำให้มีโอกาสที่จะเกิด slip-strand mispairing ได้มากกว่าเกิดขึ้นกับลำดับเบสทั่วไป กลไกดังกล่าวทำให้เกิดความหลากหลาย (polymorphism) ใน STR (6, 11)

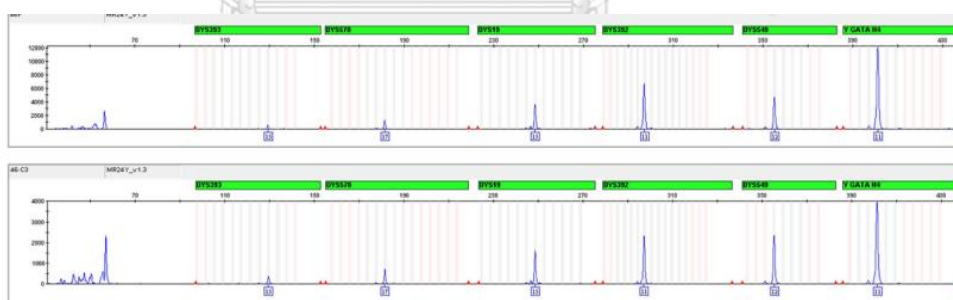


ภาพที่ 4 กลไกการเกิด Slippage-strand mispairing หรือ polymerase slippage

ที่มา: Karls, 2015 (12)

2.3 Y-STR

ลำดับเบส Y-STR คือลำดับเบสแบบ STR ที่กระจายตัวอยู่บริเวณโครโมโซม Y เนื่องจาก Y-STR พบได้เฉพาะในเพศชายเท่านั้นและมีคุณสมบัติของการถ่ายทอดสารพันธุกรรมได้อย่างสมบูรณ์ทางสายบิดาโดยปราศจากการเปลี่ยนแปลง (5) ทำให้เครื่องหมาย Y-STR ถูกนำไปใช้ประโยชน์ในด้านนิติวิทยาศาสตร์มากมาย เช่น การตรวจพิสูจน์ความเป็นบิดา (paternity testing), การระบุตัวบุคคลผู้สูญหายหรือเหยื่อจากภัยพิบัติ, การระบุตัวบุคคลเพื่อวัตถุประสงค์ทางมานุษยวิทยา, การระบุตัวบุคคลผู้กระทำความผิดจากคดีการล่องละเมิดทางเพศรวมการทิ้งการแยกตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้ชายออกจาก male-female mixed DNA (13) อย่างไรก็ตามคุณสมบัติของ Y-STR ที่พบได้เฉพาะในเพศชายและถ่ายทอดสารพันธุกรรมจากพ่อไปสู่ลูกชายโดยปราศจากการเปลี่ยนแปลงก็ถือว่าเป็นข้อจำกัดต่อการศึกษาด้านนิติวิทยาศาสตร์ด้วยเช่นกัน เนื่องจากชายที่มีความสัมพันธ์ทางสายบิดาทุกคนจะมี Y-STR haplotype เหมือนกัน ทำให้ไม่สามารถใช้เครื่องหมาย Y-STR (Y-STR marker) ในการระบุตัวในระดับบุคคลได้ (ภาพที่ 5) (5) เพื่อแก้ไขข้อจำกัดดังกล่าวจึงมีการศึกษาและค้นหา Y-STR ที่มีอัตราการกลายพันธุ์ที่รวดเร็วกว่าอัตราการกลายพันธุ์ของ Y-STR ของมนุษย์ที่ปกติจะมีอัตราการกลายพันธุ์เฉลี่ยประมาณ 1×10^{-3} ต่อตำแหน่งต่อรุ่น โดยตั้งสมมติฐานว่า Y-STR marker ที่มีอัตราการกลายพันธุ์สูงกว่าปกตินี้จะสามารถแยกความแตกต่างของชายที่มีความสัมพันธ์ทางสายบิดาในระดับบุคคลได้ (14)

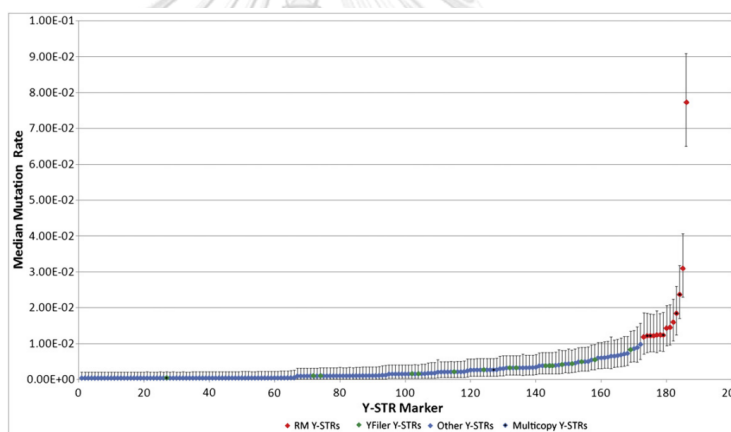


ภาพที่ 5 electropherogram ของคู่พ่อ-ลูกที่พบ Y-STR haplotype เหมือนกัน
ที่มา: Fu et al., 2020 (15)

2.4 Rapidly mutating Y-STR (RM Y-STR)

ในปี ค.ศ. 2010 Ballantyne และคณะ (14) ได้ทำการศึกษา Y-STR จำนวน 186 ตำแหน่ง เพื่อค้นหาองค์ความรู้เกี่ยวกับการกลายพันธุ์และปัจจัยทางโมเลกุลที่ส่งผลต่อการกลายพันธุ์ของ Y-STR นอกจากนี้ยังต้องการเครื่องหมาย Y-STR ที่เหมาะสมกับการใช้แยกความแตกต่างของชายที่มีความใกล้ชิดทางสายเลือด ซึ่งตั้งสมมติฐานว่า Y-STR ที่มีอัตราการกลายพันธุ์รวดเร็วจึงจะสามารถแยกความ

แตกต่างระหว่างชายที่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือดได้จากการพบการกลายพันธุ์ของ Y-STR อย่างน้อย 1 ตำแหน่ง โดยนำ Y-STR ไปศึกษาเกี่ยวกับตัวอย่างคู่พ่อและลูกชายจากประเทศเยอรมันและโปแลนด์จำนวน 1966 คู่ ด้วยเทคนิค multiplex PCR assay, แยกขนาด PCR product และติดตามสารเรืองแสงด้วย capillary electrophoresis (CE) พบว่า Y-STR ที่นำมาศึกษานี้มีอัตราการกลายพันธุ์ $3.81 \times 10^{-4} - 7.73 \times 10^{-2}$ ต่อตำแหน่งต่อรุ่น ซึ่งส่วนใหญ่มีอัตราการกลายพันธุ์ประมาณ $10^{-4} - 10^{-3}$ ต่อตำแหน่งต่อรุ่น มีเพียง 13 ตำแหน่งเท่านั้นที่มีอัตราการกลายพันธุ์ประมาณ 10^{-2} ต่อตำแหน่งต่อรุ่น (ภาพที่ 6) ซึ่งเป็นอัตราการกลายพันธุ์ที่รวดเร็วกว่า Y-STR ทั่วไป ตั้งชื่อตำแหน่งเหล่านี้ว่า Rapidly Mutating Y-STR (RM Y-STR) หรือ Y-STR ที่มีอัตราการกลายพันธุ์ที่รวดเร็ว ประกอบด้วย Y-STR จำนวน 13 ตำแหน่ง ได้แก่ DYF387S1, DYF399S1, DYF403S1a/b, DYF404S1, DYS526a/b, DYS449, DYS518, DYS626, DYS547, DYS570, DYS576, DYS612 และ DYS627



ภาพที่ 6 กราฟแสดงอัตราการกลายพันธุ์ของ Y-STR จำนวน 186 ตำแหน่ง พบว่ามี 13 ตำแหน่ง (จุดสีแดง) ที่มีอัตราการกลายพันธุ์สูงกว่า 1×10^{-2} ต่อตำแหน่งต่อรุ่น

ที่มา: Ballantyne et al., 2010 (14)

เพื่อตอบสนองพื้นฐานว่า Y-STR ที่มีอัตราการกลายพันธุ์รวดเร็วสามารถแยกความแตกต่างระหว่างชายที่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือดได้หรือไม่ จึงนำ RM Y-STR ทั้ง 13 ตำแหน่งและ AmpFLSTR Yfiler PCR Amplification kit (Applied Biosystems) จำนวน 17 ตำแหน่งซึ่งเป็น Y-STR set ที่ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในด้านนิติวิทยาศาสตร์มาศึกษาเกี่ยวกับคู่พ่อและลูกชายชาวโปแลนด์, เยอรมัน, แคนาดาและเบลเยียมจำนวน 103 คู่ด้วยเทคนิค multiplex PCR assay จากนั้นแยกขนาด PCR product ด้วย capillary electrophoresis (CE) จากการศึกษาพบว่า RM Y-STR สามารถแยกความแตกต่างของชายที่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือดได้ 70.9 เปอร์เซ็นต์ (แยกคู่พ่อ-ลูกชายได้ 70

เปอร์เซ็นต์, คู่พี่ชาย-น้องชาย 56 เปอร์เซ็นต์, คู่ลูกพี่ลูกน้อง 67 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่ Yfiler set แยกความแตกต่างของชายที่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือดได้เพียง 13 เปอร์เซ็นต์ (แยกคู่พี่ชาย-น้องชายได้ 6 เปอร์เซ็นต์ แต่แยกคู่พ่อ-ลูกชายและคู่ลูกพี่ลูกน้องไม่ได้) ชุดเครื่องหมาย RM Y-STR มีอัตราการกลายพันธุ์เฉลี่ย 1.97×10^{-2} ต่อตำแหน่งต่อรุ่น ในขณะที่ Yfiler มีอัตราการกลายพันธุ์เฉลี่ย 3.0×10^{-3} ต่อตำแหน่งต่อรุ่น และได้เสนอแนะว่าสามารถนำ RM Y-STR ไปใช้ในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ได้ทั้งในกรณีที่ผู้กระทำผิดมีหลายคนหรือมีความใกล้ชิดทางสายเลือด

○ ลักษณะการกลายพันธุ์ของ Y-STR (Y-STR Mutation Characteristics)

พบว่าจากการกลายพันธุ์ทั้งหมด 787 ครั้ง เป็นการกลายพันธุ์แบบการลดลงของชุดซ้ำ (repeat loss) 364 ครั้ง, การกลายพันธุ์แบบเพิ่มขึ้นของชุดซ้ำ (repeat gain) 423 ครั้ง คิดเป็นอัตราส่วนของ repeat loss : repeat gain เท่ากับ 1.61:1 ซึ่งโอกาสพบการกลายพันธุ์แบบ repeat loss และ repeat gain ของ Y-STR ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

นอกจากนี้ยังทำการศึกษาโอกาสการพบ one-step mutation ซึ่งเป็นการการเปลี่ยนแปลง repeat unit เพียง 1 ชุดซ้ำในแต่ละครั้งและศึกษาโอกาสการพบ multistep mutation ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงจำนวน repeat unit มากกว่า 1 ชุดซ้ำในแต่ละครั้ง (9) โดยในการศึกษานี้พบ one-step mutation 757 ครั้ง, พบ multistep mutation 30 ครั้ง คิดอัตราส่วนของการเกิด one-step mutation : multistep mutation เท่ากับ 25.23 : 1 ซึ่งโอกาสการเกิด one-step mutation และ multistep mutation มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

○ ปัจจัยทางโมเลกุลที่ส่งผลต่อการกลายพันธุ์ของ Y-STR (Molecular factors influencing Y-STR mutability)

พบว่าปัจจัยหลัก 3 ประการที่ส่งผลต่อการกลายพันธุ์ของ STR ได้แก่ จำนวนชุดซ้ำ (number of repeats), ความซับซ้อนของโครงสร้างชุดซ้ำ (complexity of repetitive structure), length of repetitive motif

1. จำนวนชุดซ้ำ (number of repeat)

จากการศึกษาพบว่าจำนวนชุดซ้ำส่งผลต่ออัตราการกลายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญ Y-STR ที่มีชุดซ้ำจำนวนมากจะมีอัตราการกลายพันธุ์ที่สูงกว่า

2. ความซับซ้อนของโครงสร้างชุดซ้ำ (complexity of repetitive structure)

เปรียบเทียบอัตราการกลายพันธุ์เฉลี่ยระหว่าง Y-STR ที่มีโครงสร้างชุดซ้ำแบบ simple repeat และ complex repeat เนื่องจากเครื่องหมาย Y-STR มีบางตำแหน่งเป็น multi-copy Y-STR จึงนับแต่ละ copy แยกออกจากกัน ทำให้ในการวิเคราะห์นี้เป็นการศึกษา Y-STR จำนวน 267 ตำแหน่ง โดยพบว่ามี 193 ตำแหน่งเป็น simple Y-STR loci อีก 74 ตำแหน่งเป็น complex Y-STR loci ซึ่ง complex Y-STR loci มีอัตราการกลายพันธุ์เฉลี่ยสูงกว่า simple Y-STR loci อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

3. Length of repetitive motif

ในการวิเคราะห์นี้แบ่ง Y-STR ออกเป็น 267 ตำแหน่ง จากตารางที่ 2 แสดงจำนวนและอัตราการกลายพันธุ์เฉลี่ยของลำดับเบสที่มีจำนวนเบสซ้ำที่ต่างกัน พบว่าอัตราการกลายพันธุ์เฉลี่ยของ Y-STR ที่เป็น tetranucleotide มีอัตราการกลายพันธุ์เฉลี่ยสูงที่สุดและอัตราการกลายพันธุ์เฉลี่ยมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อจำนวนเบสซ้ำ (length of repeat) เพิ่มขึ้น ทั้งนี้ Ballantyne และคณะ (2010) วิเคราะห์สาเหตุที่อัตราการกลายพันธุ์ของ tetranucleotide repeat มีค่าสูงที่สุดเป็นเพราะว่าไม่มีการนำ dinucleotide repeat มาศึกษาและจำนวน tetranucleotide repeat ที่นำมาศึกษา มีจำนวนมากเมื่อเทียบกับ repeat อื่นๆ

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนและอัตราการกลายพันธุ์เฉลี่ยของ Y-STR ที่มี length of repeat ต่างๆ

Length of repeat	Number of Y-STR loci	Average mutation rate
trinucleotide	72	1.11×10^{-3}
tetranucleotide	175	2.07×10^{-3}
pentanucleotide	17	1.55×10^{-3}
hexanucleotide	3	4.64×10^{-4}

นอกเหนือจากทั้ง 3 ปัจจัยที่กล่าวมาข้างต้นแล้วแล้ว ยังพบปัจจัยอื่นๆ ที่ส่งผลให้มีโอกาสเกิดการกลายพันธุ์เพิ่มมากขึ้น คือ

1. อายุของพ่อขณะให้กำเนิดลูก (father's age): พบกลายพันธุ์ระหว่างพ่อและลูกชายใน RM Y-STR อย่างน้อย 1 ตำแหน่งเมื่อพ่อมีอายุ 32.42 ± 10.91 ปี

2. Multi-copy marker: Y-STR ที่เป็น multi-copy มีโอกาสที่จะพบการกลายพันธุ์ได้มากเนื่องจากแต่ละ copy มีโอกาสกลายพันธุ์ได้อย่างอิสระ ดังนั้นยังมีจำนวน copy มาก ก็จะเพิ่มโอกาสในการพบการกลายพันธุ์ในตำแหน่งนั้นๆ ด้วย (13)

2.5 การคัดเลือก RM Y-STR สำหรับงานศึกษานี้

สำหรับในงานศึกษาเรื่องการศึกษาการกลายพันธุ์บนตำแหน่ง Y-STR ที่มีอัตราการกลายพันธุ์รวดเร็วจำนวนสองตำแหน่งในชายไทยที่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือด (The mutation study of two rapidly mutating Y-STRs in closely related Thai males) นี้ได้คัดเลือกเครื่องหมาย RM Y-STR ที่มีแนวโน้มที่จะมีอัตราการกลายพันธุ์สูงมาศึกษาในชายไทยที่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือด โดยพิจารณาจากข้อมูลปัจจัยทางโมเลกุลที่ส่งผลต่ออัตราการกลายพันธุ์และอัตราการกลายพันธุ์ของ RM Y-STR ที่ถูกนำไปศึกษาในประชากรเชื้อชาติต่างๆ ซึ่งปัจจัยทางโมเลกุลที่ส่งผลให้ Y-STR มีอัตราการกลายพันธุ์สูงที่พบจากการศึกษาของ Ballantyne et al., 2010 (14) คือ การมีจำนวนชุดซ้ำจำนวนมาก, โครงสร้างชุดซ้ำแบบ complex repeat และการเป็น multi-copy marker

จากข้อมูล repeat type และ repeat structure ที่แสดงในตารางที่ 3 พบว่ามี 5 จาก 13 ตำแหน่ง ได้แก่ เครื่องหมาย DYF387S1a/b, DYF399S1, DYF4033S1a/b, DYF404S1 และ DYS526a/b ที่มีลักษณะตรงตามข้อพิจารณาของปัจจัยทางโมเลกุล จากนั้นเมื่อพิจารณาจากอัตราการกลายพันธุ์ของตำแหน่งดังกล่าวจากงานศึกษาอื่นๆ (ตารางที่ 4) พบว่าตำแหน่ง DYF399S1 และ DYF403S1a/b เป็น 2 ตำแหน่งที่พบการกลายพันธุ์และมีอัตราการกลายพันธุ์รวดเร็วในทุกๆ กลุ่มประชากรที่ถูกนำมาทำการศึกษา ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเลือก DYF399S1 และ DYF403S1a/b มาศึกษาในชายที่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือดชาวไทย โดยจะศึกษาในกลุ่มตัวอย่างคู่พ่อและลูกชาย เนื่องจากวิธีการคำนวณอัตราการกลายพันธุ์ของ Y-STR ที่มีความแม่นยำมากที่สุด คือ การสังเกตการถ่ายทอดระหว่างพ่อและลูกชาย (14)

2.5.1 DYF399S1 locus

DYF399S1 มีชุดซ้ำแบบ tetranucleotide repeat, มีโครงสร้างชุดซ้ำแบบซ้ำซ้อน (complex repeat) และเป็น multi-copy marker ที่มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมวายบริเวณแขนข้างยาว (Yq) จำนวน 3 ตำแหน่ง (16) (ตารางที่ 3)

2.5.2 DYF403S1a/b locus

DYF403S1a/b มีโครงสร้างชุดซ้ำซับซ้อน (complex repeat) มีตำแหน่งอยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมวาย (Yp) (16) เป็น multi-copy marker ที่ประกอบด้วย 4 copies แบ่งออกได้ 2 subtypes จากรูปแบบการเรียงตัวของชุดซ้ำ ได้แก่ subtype a จำนวน 3 copies, subtype b จำนวน 1 copy (17) (ตารางที่ 3) ในการศึกษาจะแปลผลการกลายพันธุ์บนตำแหน่ง DYF403S1a และ DYF403S1b แยกออกจากกัน

ตารางที่ 3 ตารางแสดง repeat type, repeat structure และ allele range ของ RM Y-STR ทั้ง 13 ตำแหน่ง ดัดแปลงมาจาก Ballantyne et al. 2012 และ 2014

markers	Repeat types	Repeat structure	Allele range
DYF387S1a/b	Tetra, complex, multi (2 copies)	(AAAG) ₃ (GTAG) ₁ (GAAG) ₄ N ₁₆ (GAAG) ₉ (AAAG) ₁₃	28 - 45.2
DYF399S1	Tetra, complex, multi (3 copies)	GAAA) ₃ N ₇₋₈ (GAAA) ₁₀₋₂₃	14 - 31.3
DYF403S1a/b	Tetra, complex, multi (a: 3 copies, b: 1 copy)	a: (TTCT) ₁₀₋₁₇ N ₂₋₃ (TTCT) ₃₋₁₇ b: (TTCT) ₁₂ N ₂ (TTCT) ₈ (TTCC) ₉ (TTCT) ₁₄ N ₂ (TTCT) ₃	a: 5 - 24 b: 38 - 62
DYF404S1	Tetra, complex, multi (2 copies)	(TTTC) ₁₀₋₂₀ N ₄₂ (TTTC) ₃	7 - 21
DYS526a/b	Tetra, complex, multi (a: 1 copy, b: 1 copy)	a: (CCCT) ₃ N ₂₀ (CTTT) ₁₁₋₁₇ (CCTT) ₆₋₁₀ N ₁₁₃ (CCTT) ₁₀₋₁₇ b: (CCCT) ₃ N ₂₀ (CTTT) ₁₁₋₁₇ (CCTT) ₆₋₁₀ N ₁₁₃ (CCTT) ₁₀₋₁₇	a: 7 - 21 b: 29 - 44
DYS449	Tetra, complex, single	(TTCT) ₁₃₋₉ N ₂₂ (TTCT) ₃ N ₁₂ (TTCT) ₁₃₋₁₉	23 - 40
DYS518	Tetra, complex, single	(AAAG) ₃ (GAAG) ₁ (AAAG) ₁₄₋₂₂ (GGAG) ₁ (AAAG) ₄ N ₆ (AAAG) ₁₁₋₁₉ N ₂₇ (AAGG) ₄	32 - 52.2
DYS626	Tetra, complex, single	(GAAA) ₁₄₋₂₃ N ₂₄ (GAAA) ₃ N ₆ (GAAA) ₅ (AAA) ₁ (GAAA) ₂₋₃ (GAAG) ₁ (GAAA) ₃	22 - 52

markers	Repeat types	Repeat structure	Allele range
DYS547	Tetra, complex, single	(CCTT) ₉₋₁₃ T(CTTC) ₄₋₅ N ₅₆ (TTTC) ₁₀₋₂₂ N ₁₀ (CCTT) ₄ (TCTC) ₁ (TTTC) ₉₋₁₆ N ₁₄ (TTTC) ₃	39 - 57
DYS570	Tetra, simple, single	(TTTC) ₁₄₋₂₄	10 - 24
DYS576	Tetra, simple, single	(AAAG) ₁₃₋₂₂	11 - 23
DYS612	Tri, complex, single	(CCT) ₅ (CTT) ₁ (TCT) ₄ (CCT) ₁ (TCT) ₁₉₋₃₁	25 - 43
DYS627	Tetra, complex, single	(AGAA) ₃ N ₁₆ (AGAG) ₃ (AAAG) ₁₂₋ ₂₄ N ₈₁ (AAGG) ₃	12 -27

ตารางที่ 4 แสดงอัตราการกลายพันธุ์ของ RM Y-STR ตำแหน่งต่างๆ ในงานวิจัยก่อนหน้าที่ศึกษาในกลุ่มตัวอย่างที่มีความใกล้ชิดทางสายเลือด

Loci	Ballantyne et al., 2010 (14)	Adnan et al., 2016 (18)	Chen et al., 2017 (19)	Javed et al., 2018 (20)
DYF38751	1.59×10^{-2}	2.3×10^{-2}	AB: 0	4.28×10^{-2}
DYF399S1	7.73×10^{-2}	6.3×10^{-2}	abc: 5.00×10^{-2}	7.14×10^{-2}
DYF403S1a/b	a: 3.10×10^{-2}	a: 2.60×10^{-2}	a: 2.22×10^{-2}	7.14×10^{-2}
	b: 1.10×10^{-2}	b: 7.00×10^{-3}	b ₁ : 5.60×10^{-2} b ₂ : 2.78×10^{-2}	
DYF404S1	1.25×10^{-2}	1.20×10^{-2}	5.60×10^{-3}	4.28×10^{-2}
DYS449	1.22×10^{-2}	4.70×10^{-2}	0	2.83×10^{-2}
DYS518	1.84×10^{-2}	3.30×10^{-2}	1.67×10^{-2}	-
DYS526a/b	a: 2.72×10^{-3}	a: 0	a: 0	1.43×10^{-2}
	b: 1.25×10^{-2}	b: 1.4×10^{-2}	b: 5.60×10^{-3}	
DYS547	2.36×10^{-2}	1.90×10^{-2}	1.67×10^{-2}	3.80×10^{-2}
DYS570	1.24×10^{-2}	9.40×10^{-3}	2.78×10^{-2}	1.90×10^{-2}
DYS576	1.43×10^{-2}	1.40×10^{-2}	5.60×10^{-3}	1.05×10^{-2}
DYS612	1.45×10^{-2}	3.30×10^{-2}	1.67×10^{-2}	3.10×10^{-2}
DYS626	1.22×10^{-2}	7.00×10^{-2}	1.11×10^{-2}	1.43×10^{-2}
DYS627	1.23×10^{-2}	7.00×10^{-2}	0	1.67×10^{-2}
Samples	German, Polish Belgium, Canadian	Pakistani	Chinese Han	Pakistani

หมายเหตุ: 0 หมายถึง ไม่พบอัตราการกลายพันธุ์ในตำแหน่งดังกล่าว

ตารางที่ 4 แสดงอัตราการกลายพันธุ์ของ RM Y-STR ตำแหน่งต่างๆ ในงานวิจัยก่อนหน้าที่ศึกษาในกลุ่มตัวอย่างที่มีความใกล้ชิดทางสายเลือด (ต่อ)

Loci	Zhang et al., 2017 (21)	Zgonjanin et al., 2017 (22)	Rakha et al., 2018 (23)	Wang et al., 2019 (24)	Yuan et al., 2019 (25)
DYF38751	8.70×10^{-3}	5.40×10^{-2}	0	$< 3.85 \times 10^{-3}$	2.00×10^{-3}
DYF399S1	6.29×10^{-2}	10.08×10^{-2}	1.22×10^{-2}	3.85×10^{-2}	4.59×10^{-2}
DYF403S1a/b	a: 2.71×10^{-2}	a: 4.10×10^{-2}	a: 2.04×10^{-2}	a: 3.08×10^{-2}	a: 7.14×10^{-2}
	b: 7.74×10^{-3}	b: 0	b ₁ : 2.04×10^{-2} b ₂ : 4.08×10^{-2}	b: 2.15×10^{-2}	b: 2.00×10^{-3}
DYF404S1	1.06×10^{-2}	1.40×10^{-2}	0	1.15×10^{-2}	8.00×10^{-3}
DYS449	1.26×10^{-2}	0	4.08×10^{-2}	1.15×10^{-2}	2.00×10^{-3}
DYS518	1.25×10^{-2}	2.70×10^{-2}	4.08×10^{-2}	$< 3.85 \times 10^{-3}$	4.00×10^{-3}
DYS526a/b	9.67×10^{-3}	a: 0	a: 0	a: 3.85×10^{-3}	a: 2.00×10^{-3}
		b: 1.40×10^{-2}	b: 0	b: 1.92×10^{-2}	b: 8.00×10^{-3}
DYS547	1.35×10^{-2}	1.40×10^{-2}	4.08×10^{-2}	7.69×10^{-3}	1.40×10^{-2}
DYS570	4.84×10^{-3}	0	0	$< 3.85 \times 10^{-3}$	1.40×10^{-2}
DYS576	1.35×10^{-2}	0	2.04×10^{-2}	2.60×10^{-2}	6.00×10^{-3}
DYS612	1.35×10^{-2}	4.10×10^{-2}	2.04×10^{-2}	3.08×10^{-2}	1.00×10^{-2}
DYS626	7.74×10^{-3}	1.40×10^{-2}	0	7.69×10^{-2}	1.00×10^{-2}
DYS627	8.70×10^{-3}	0	2.04×10^{-2}	1.92×10^{-2}	1.80×10^{-2}
Samples	Chinese Han	Serbian	Sindhi	Chinese Yi	Chinese Han

หมายเหตุ: 0 หมายถึง ไม่พบอัตราการกลายพันธุ์ในตำแหน่งดังกล่าว

2.6 การคัดเลือกไพรเมอร์

คัดเลือกไพรเมอร์ DYF399S1 และ DYF403S1a/b โดยการอ้างอิงลำดับเบสของ forward primer, reverse primer มาจากงานศึกษาของ Ballantyne et al., 2010 (14) (ตารางที่ 5)

เนื่องจากการศึกษาด้วยเทคนิค multiplex PCR assay และแยกขนาด PCR product ด้วยเครื่อง Capillary electrophoresis (CE) ดังนั้นจึงติดสารเรืองแสง (fluorescent dye) ที่ปลายด้าน 5' ของ forward primer โดยเลือกติด fluorescent กลุ่ม G5 ได้แก่ 6-FAMTM และ VIC[®] เนื่องจากเป็นสารเรืองแสงที่ส่งสัญญาณที่แข็งแกร่งและมีความเสถียรสูง สีที่ปรากฏในโปรแกรม GeneMapper ID X version 1.4 ของสารเรืองแสงทั้งสองจะต่างกัน โดย 6-FAMTM ปรากฏเป็นสีน้ำเงิน ส่วน VIC[®] จะปรากฏเป็นสีเขียว (26)

ตารางที่ 5 แสดงรายละเอียดลำดับเบสของไพรเมอร์, การติดสี fluorescence dye ที่ตำแหน่ง DYF399S1 และ DYF403S1a/b

Markers	Sequences (5' to 3')	
DYF399S1	Forward primer	6-FAM-GGGTTTTCCACGTTTGCAT
	Reverse primer	CCATGTTTTGGGACATTCCT
DYF403S1a/b	Forward primer	VIC-CAAATTCATGTGGATAATGAG
	Reverse primer	ACAGAGCAGGATTCCATCTA

2.7 การนำการคำนวณทางสถิติมาใช้ในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์

2.7.1 Y-STR kinship index

Likelihood ratio (LR) เป็นการคำนวณค่าสถิติเพื่ออธิบายว่า genotype ระหว่างคน 2 คน สันนิษฐานความสัมพันธ์มากน้อยเพียงใด สำหรับการศึกษานี้ของ Y-STR นั้น ค่า likelihood ratio จะถูกเรียกว่า Y-STR kinship index เป็นการแสดงออกถึงความเป็นไปได้ที่ลูกชายจะได้สารพันธุกรรมภายใต้สมมติฐาน 2 สมมติฐานที่ต่างกัน (H_1 และ H_2) โดยค่า LR ของแต่ละ locus จะเป็นอิสระต่อกัน (27, 28) และมีเงื่อนไขว่าอัตราการกลายพันธุ์ (μ) ต้องเป็นการกลายพันธุ์แบบ one-step

mutation หรือการกลายพันธุ์แบบที่มีการลดลงหรือเพิ่มขึ้นของ STR จำนวน 1 ชุดซ้ำเท่านั้น (29, 30)

Y-STR kinship index มีสูตรการคำนวณ ดังนี้

$$LR_{\text{one-step mutation}} = \frac{P(E|H_1)}{P(E|H_2)}$$

$$LR_{\text{one-step mutation}} = \frac{\prod_{l \in L} \left[\binom{m}{s_l} \left(\left(\frac{\mu}{2} \right)^{s_l} (1-\mu)^{m-s_l} \right) \right]}{f(\text{offspring})}$$

เมื่อกำหนดให้,

H_1 คือ สมมติฐานที่ ancestor และ offspring มี Y-STR haplotype ตรงกันและทั้งสองคน มีความสัมพันธ์เป็นพ่อและลูกชายอย่างแท้จริง

H_2 คือ สมมติฐานที่ ancestor และ offspring ไม่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือดเป็นพ่อและลูกชายที่แท้จริง

L คือ Y-STR haplotype ของ son และ alleged father

s_l คือ ความต่างของแอลลีล (allelic different) ในแต่ละเครื่องหมาย Y-STR ระหว่าง son และ alleged father

μ คือ อัตราการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย Y-STR นั้น

$\frac{\mu}{2}$ คือ ความน่าจะเป็นของการเกิด one-step mutation ที่เครื่องหมาย Y-STR ตำแหน่งดังกล่าว

$\left(\frac{\mu}{2} \right)^{s_l}$ คือ ความน่าจะเป็นของการเกิด one-step mutation ที่เครื่องหมาย Y-STR ตำแหน่งดังกล่าว

$1 - \mu$ คือ ความน่าจะเป็นที่ไม่เกิดการกลายพันธุ์ที่เครื่องหมาย Y-STR นั้น

m คือ จำนวน transmission event ภายใต้เงื่อนไขการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพ่อและลูกชาย จึงกำหนดให้ transmission event มีค่าเท่ากับ 1

f(offspring) คือ ความถี่แฮปพอไทด์ (haplotype frequency) ของลูกชาย

จากสมมติฐานที่ 1

$$P(E|H_1) = \prod_{l \in L} \left[\binom{m}{s_l} \left(\left(\frac{\mu_l}{2} \right)^{s_l} (1 - \mu_l)^{m-s_l} \right) \right]$$

- กรณีที่ไม่พบการกลายพันธุ์ระหว่างพ่อและลูกชาย

แทนค่า S_l (allelic different) = 0

m (transmission event) = 1

$$P(E|H_1) = \binom{m}{s} \left(\left(\frac{\mu_1}{2} \right)^{s_l} \times (1 - \mu_1)^{m-s_l} \right)$$

$$P(E|H_1) = \binom{1}{0} \left(\left(\frac{\mu_1}{2} \right)^0 \times (1 - \mu_1)^1 \right)$$

$$P(E|H_1) = 1 - \mu$$

- กรณีที่การกลายพันธุ์ระหว่างพ่อและลูกชาย โดยเป็นการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของชุดซ้ำ 1 ชุดซ้ำ

แทนค่า S_l (allelic different) = 1

m (transmission event) = 1

$$P(E|H_1) = \binom{m}{s} \left(\left(\frac{\mu_1}{2} \right)^{s_l} \times (1 - \mu_1)^{m-s_l} \right)$$

$$P(E|H_1) = \binom{1}{1} \left(\left(\frac{\mu_1}{2} \right)^1 \times (1 - \mu_1)^0 \right)$$

$$P(E|H_1) = \left(\frac{\mu_1}{2} \right)^1$$

จากสูตรการคำนวณ Y-STR kinship index ที่กล่าวมาข้างต้น พบว่าเงื่อนไขของการคำนวณ คือ การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นระหว่างคู่พ่อและลูกชายที่มีการเปลี่ยนแปลงของชุดซ้ำ 1 ชุด (one-step mutation) และต้องทราบอัตราการกลายพันธุ์ที่จำเพาะต่อ Y-STR ตำแหน่งนั้นๆ

2.7.2 สูตรการคำนวณอัตราการกลายพันธุ์ (mutation rate, μ)

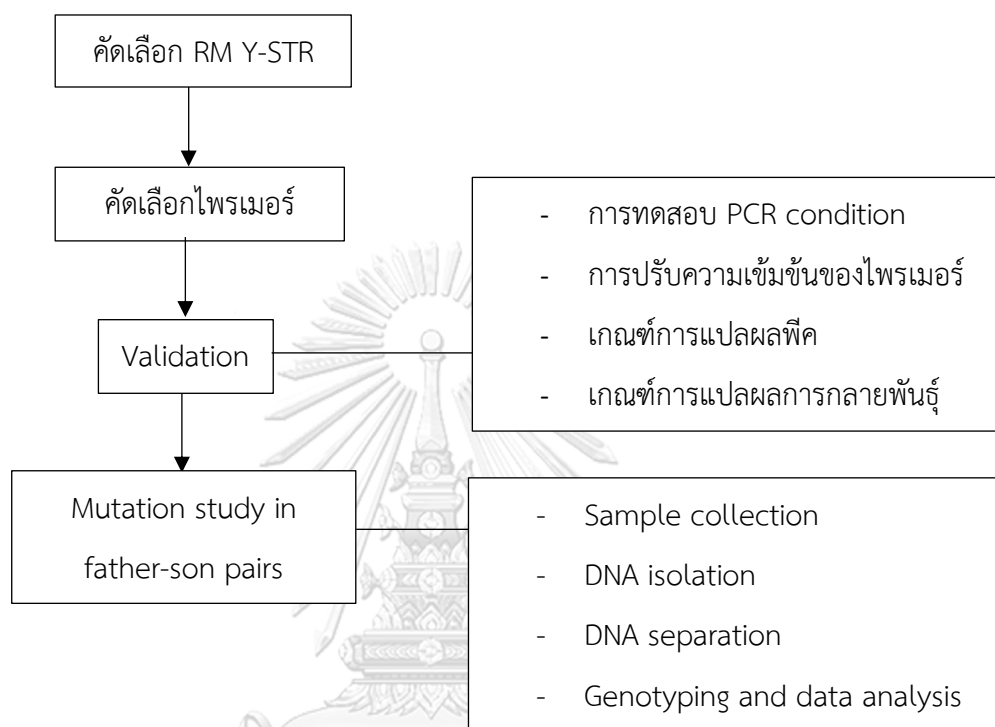
จำนวนการกลายพันธุ์ที่พบ

จำนวนตัวอย่างคู่พ่อและลูกชายที่นำมาศึกษา

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย (research methodology)

3.1 รูปแบบการทดลอง (experimental design)



3.2 รูปแบบการวิจัย (research design)

การวิจัยเชิงพรรณนา (descriptive study)

3.3 วิธีการดำเนินการวิจัย (methodology)

○ สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย (chemical reagents)

1. FTA purification reagent
2. TE buffer (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 8.0)
3. TBE buffer (Tris, Boric acid, EDTA buffer)
4. agarose
5. AmpliTaq Gold PCR buffer
6. dNTPs
7. $MgCl_2$

8. AmpliTaq Gold™ PCR polymerase
9. H₂O
10. Male control DNA007
11. DYF399S1 F+R primer
12. DYF403S1a/b F+R primer
13. HiDi™ formamide (Applied Biosystems)
14. GeneScan™ 600 LIZ™ dye Size Standard v2.0 (Applied Biosystem)

○ **เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย (research instruments)**

1. Puncher
2. FTA card
3. PCR tube ขนาด 200 ไมโครลิตร
4. ProFlex™ 3 x 32 – well PCR System (Applied Biosystems)
5. Pipet
6. Vortex mixer
7. 96-well reaction plate (Applied Biosystems)
8. Mini Plate Spinner Centrifuge (Fisher Scientific)
9. 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)
10. GeneMapper ID X version 1.4 (Applied Biosystems)

3.3.1 Validation

ในขั้นตอนนี้จะทำการทดสอบและปรับปรุงเพื่อหาวิธีการศึกษาและเกณฑ์การแปลผลการศึกษา โดยทดสอบไพรเมอร์ DYF399S1 และ DYF403S1a/b ใน PCR กับ male control DNA007

3.3.1.1 PCR condition

เพื่อทดสอบ PCR condition ที่เหมาะสมกับไพรเมอร์ DYF399S1 และ DYF403S1/b ที่อ้างอิงมาจากการศึกษาของ Ballantyne et al., 2010 (14) โดยนำไพรเมอร์ดังกล่าว (ไม่ติดสีเรืองแสง, ตารางที่ 5) ไปทำปฏิกิริยา PCR แบบ single plex PCR reaction ด้วยเครื่อง ProFlex™ 3 x 32 - well PCR System (Applied Biosystems) กับ male control DNA007 ความเข้มข้น 2 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรด้วย PCR condition ที่แสดงในตารางที่ 6 เป็นการทำปฏิกิริยา PCR แบบ

touchdown PCR ซึ่งเป็นเทคนิค PCR ที่ในขั้นตอน annealing รอบแรกๆ จะตั้งอุณหภูมิให้สูงมากๆ ทำให้ไพรเมอร์จะจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่ตำแหน่งจำเพาะเท่านั้น แม้ว่าในรอบต่อๆ ไปจะลดอุณหภูมิลงจนถึงอุณหภูมิลงมาเรื่อย ๆ จนถึงอุณหภูมิที่ต้องการ แต่ PCR product ที่จำเพาะก็มีจำนวนมากกว่า PCR product ที่ไม่จำเพาะ (31) ดังที่แสดงในตารางที่ 6 สำหรับขั้นตอน annealing 1 จะตั้งอุณหภูมิ annealing รอบแรกไว้ที่ 70 องศาเซลเซียสและจะลดอุณหภูมิในรอบถัดไปลง 1 องศาเซลเซียส เมื่อทำซ้ำ 20 รอบ อุณหภูมิก็จะลดลงเหลือ 50 องศาเซลเซียส

เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการ PCR จะนำ PCR product ไปแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยการ run gel 1% agarose gel 100 V เป็นเวลา 40 นาที

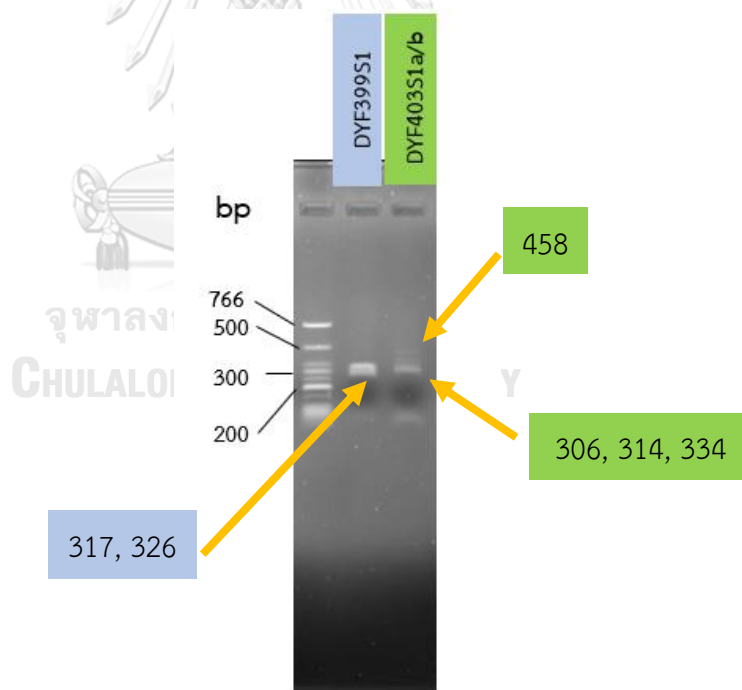
ตารางที่ 6 PCR condition อ้างอิงมาจาก Ballantyne et al., 2010 (14)

Initial denaturation	95 °C	15 min	
Denaturation 1	94 °C	30 s	X20
Annealing 1	70-1 °C	45 s	
Primer extension 1	72 °C	1 min	
Denaturation 2	94 °C	30 s	X15
Annealing 2	50 °C	45 s	
Primer extension 2	72 °C	1 min	
Final extension	60 °C	45 s	
Hold	15 °C	∞	

ภาพที่ 7 ปรากฏ PCR product ของ RM Y-STR ทั้ง 2 ตำแหน่ง ซึ่งพบว่าขนาด PCR product ของทั้งคู่มีขนาดที่ใกล้เคียงกับที่คาดไว้ โดยอ้างอิงมาจากการศึกษาของ Ballantyne และคณะ (2014) (3) ที่พบว่า male control DNA007 พบแอลลีลในตำแหน่ง DYF399S1, DYF403S1a และ DYF403S1b ดังที่แสดงในตารางที่ 7 การพบ PCR product ขนาดที่คาดหวังไว้แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ DYF399S1 และ DYF403S1a/b สามารถทำปฏิกิริยา single plex PCR reaction กับ PCR condition ที่แนะนำจากการศึกษาของ Ballantyne และคณะ (2010) (14) ได้

ตารางที่ 7 แสดง genotype ของ male control DNA 007 ที่พบในตำแหน่ง DYF399S1, DYF403S1a/b

markers	DYF399S1	DYF403S1a	DYF403S1b
Male control DNA007 genotype	24, 26.1	11, 13, 18	51
PCR product (bp)	317, 326	306, 314, 334	458



ภาพที่ 7 แสดง PCR product ของตำแหน่ง DYF399S1 (lane ที่ 2) และ DYF403S1a/b (lane ที่ 3), lane ที่ 1 คือ Low Molecular Weight DNA Ladder

3.3.1.2 การปรับความเข้มข้นของไพรเมอร์

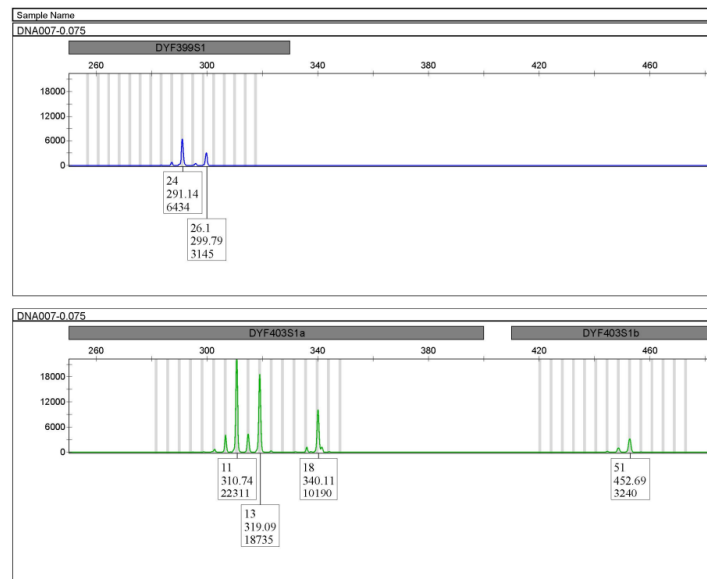
นำไพรเมอร์ DYF399S1 และ DYF403Sa/b (ติดสีเรืองแสง, ตารางที่ 5) ไปทำปฏิกิริยา PCR แบบ multiplex PCR reaction ด้วย PCR condition ตามที่แสดงในตารางที่ 6 กับ male control DNA007 ความเข้มข้น 2 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ความเข้มข้นและส่วนประกอบภายในหลอดปฏิกิริยาแสดงรายละเอียดในตารางที่ 8 ซึ่งดัดแปลงมาจากงานวิจัยของ Ballantyne et al., 2010 (14) โดยมีการปรับความเข้มข้นของไพรเมอร์ทั้งสองไพรเมอร์เพื่อให้ได้ปริมาณ PCR product ที่เหมาะสมไม่มากหรือน้อยเกินไปสำหรับการทำปฏิกิริยา PCR แบบ multiplex PCR reaction จากนั้นนำ PCR product ไปแยกขนาดดีเอ็นเอด้วย 3500 Genetic Analyzer และนำข้อมูลดิบไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม GeneMapper ID X version 1.4 เพื่อสร้าง electropherogram

ตารางที่ 8 แสดง PCR components และปริมาณสารในหลอดปฏิกิริยาสำหรับการทำปฏิกิริยา PCR ในขั้นตอน validation

PCR components	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาณ (µl)
male control DNA007	2 ng/µl	0.5
AmpliTaq Gold PCR buffer (conc.)	1X	2
MgCl ₂ (conc.)	2.27 mM	2
dNTPs (conc.)	250 µM	0.5
AmpliTaq Gold PCR polymerase (conc.)	0.25 U	0.2
DYF399S1 primer (conc.)	0.075 µM	1
DYF403S1a/b primer (conc.)	1.0 µM	1
H ₂ O		12.8

Final volume = 20 µl

จากภาพที่ 8 แสดง electropherogram ของ male control DNA007 หลังจากปรับความเข้มข้นของไพรเมอร์ DYF399S1 (0.075 ไมโครโมลาร์) และ DYF403S1a/b (1 ไมโครโมลาร์) จะเห็นได้ว่าความสูงของพีคทั้งหมดมีค่าระหว่าง 3,240 ถึง 22,311 ซึ่งเป็นความสูงของพีคที่ไม่น้อยเกินไปจนโปรแกรมไม่สามารถแปลผลออกมาเป็นพีคและความสูงของพีคไม่สูงเกินไปจน off-scale



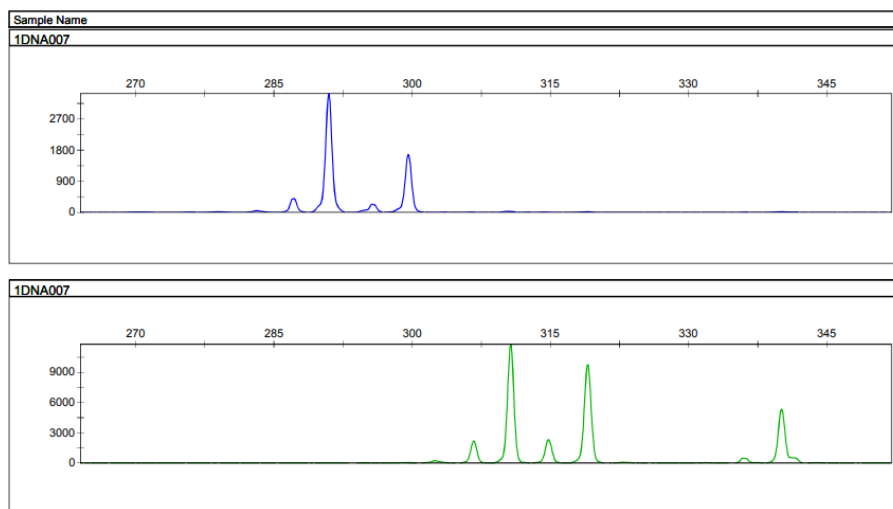
ภาพที่ 8 แสดง electropherogram ของ male DNA control007 กับ RM Y-STR ตำแหน่ง DYF399S1 และ DYF403S1a/b หลังจากปรับความเข้มข้นของไพรเมอร์

3.3.1.3 เกณฑ์การแปลผลการศึกษาจาก electropherogram

เมื่อนำข้อมูลดิบจากการแยกขนาดดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม GeneMapper ID X version 1.4 จำเป็นต้องมีการกำหนดเกณฑ์การแปลผลพีคที่ปรากฏบน electropherogram ให้ออกเป็น DNA profile โดยในการศึกษานี้กำหนดหลักเกณฑ์ดังต่อไปนี้

1. การสร้างขอบเขต bin

เนื่องจากในการศึกษานี้ไม่มีพีคแสดงตำแหน่งแอลลิล (allelic ladder) ทำให้ electropherogram ไม่สามารถแปลผลพีคที่ปรากฏได้ว่าเป็นแอลลิลใด (ภาพที่ 9) ดังนั้นจึงนำ male control DNA007 ซึ่งทราบ genotype ที่พบในตำแหน่ง DYF399S1 และ DYF403S1a/b (ตารางที่ 7)



ภาพที่ 9 แสดง electropherogram ที่ไม่มี allelic ladder

○ การสร้างขอบเขต bin สำหรับตำแหน่ง DYF399S1

จากภาพที่ 10 แสดง electropherogram ของ male control DNA007 ของตำแหน่ง DYF399S1 ปรากฏพีคจริงจำนวน 2 พีค ซึ่งเมื่ออ้างอิงจาก Ballantyne และคณะ (2014) (3) พีคทั้งสอง คือ พีคของแอลลีล 24, 26.1 (ตารางที่ 7)

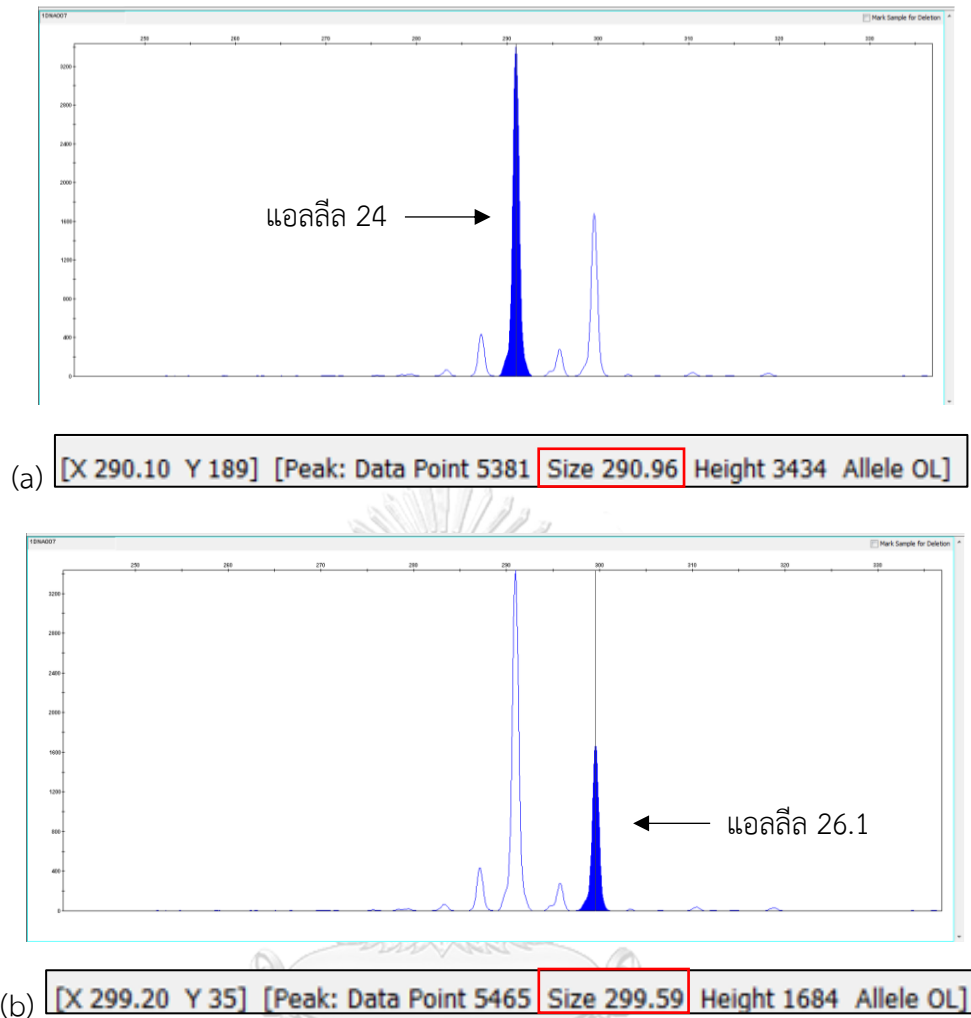
จากภาพที่ 10a พีคของแอลลีล 24 มีค่า data size 290.96 ในขณะที่พีคของแอลลีล 26.1 มีค่า data size 299.59 (ภาพที่ 10b) ดังนั้นระยะห่าง data size ของแอลลีล 24 และ 26.1 มีค่าเท่ากับ 8.6 data size ในขณะที่แอลลีล 24 และ 26.1 มีจำนวนลำดับเบสต่างกัน 9 bp (2 repeat units + 1 bp)

ดังนั้น 9 bp มีค่าเท่ากับ 8.6 data size

1 bp มีค่าเท่ากับ 0.955

1 repeat unit (4 bp) มีค่าเท่ากับ 3.822

แทนค่าระยะห่างระหว่าง 1 repeat unit ของ DYF399S1 เท่ากับ 3.822 ลงไปใน notepad (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 10 แสดง electropherogram ของ male control DNA 007 ในตำแหน่ง DYF399S1

(10a) แอลลีล 24 มีค่า data size เท่ากับ 290.96 (กรอบสีแดง)

(10b) แอลลีล 26.1 มีค่า data size เท่ากับ 299.59 (กรอบสีแดง)

○ การสร้างขอบเขต bin สำหรับตำแหน่ง DYF403S1a

จากภาพที่ 11 แสดง electropherogram ของ male control DNA007 ของตำแหน่ง DYF403S1a ซึ่งเมื่ออ้างอิงจาก Ballantyne และคณะ (2014) (3) พีคที่ปรากฏเป็นพีคของแอลลีล 11, 13, 18 (ตารางที่ 7)

จากภาพที่ 11a พีคของแอลลีล 11 มีค่า data size 310.72, พีคของแอลลีล 13 มีค่า data size 319.11 (ภาพที่ 11b) และของแอลลีล 18 มี data size เท่ากับ 340.11 (ภาพที่ 11c)

ดังนั้นระยะห่าง data size ของแอลลีล 11 และ 13 มีค่าเท่ากับ 8.39 data size ในขณะที่แอลลีล 11 และ 13 มีจำนวนลำดับเบสต่างกัน 8 bp (2 repeat units)

ดังนั้น 20 bp มีค่าเท่ากับ 21 data size

1 bp มีค่าเท่ากับ 1.04875

1 repeat unit (4 bp) มีค่าเท่ากับ 4.195

ระยะห่างของ data size ระหว่างแอลลีล 11 และ 13 มีค่าเท่ากับ 4.195 data size

ในขณะที่แอลลีล 13 และ 18 ที่มีจำนวนลำดับเบสต่างกัน 20 bp (5 repeat units) มีค่าเท่ากับ 21

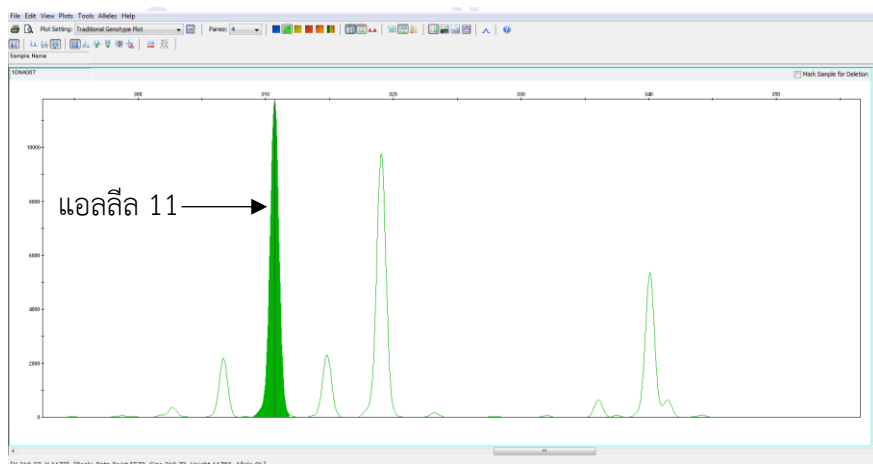
ดังนั้น ดังนั้น 8 bp มีค่าเท่ากับ 8.39 data size

1 bp มีค่าเท่ากับ 1.05

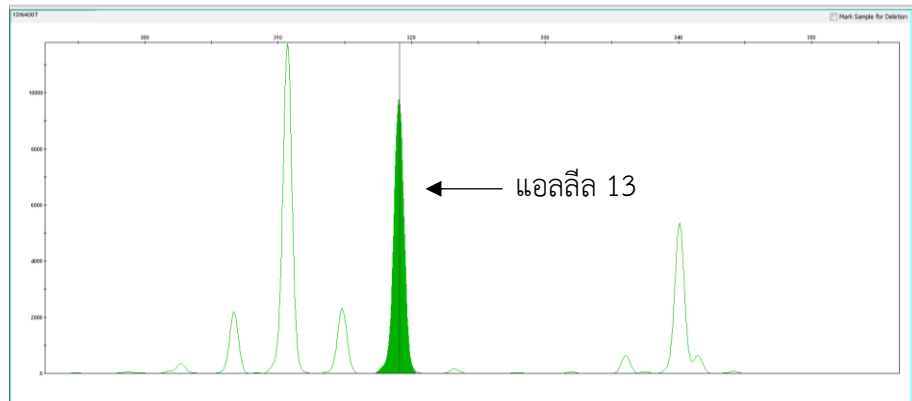
1 repeat unit (4 bp) มีค่าเท่ากับ 4.2

นำค่า data size จากระยะห่างระหว่างแอลลีล 11 กับแอลลีล 13 และระยะห่างระหว่างแอลลีล 13 กับแอลลีล 18 มาหาค่าเฉลี่ยได้เท่ากับ 4.1975

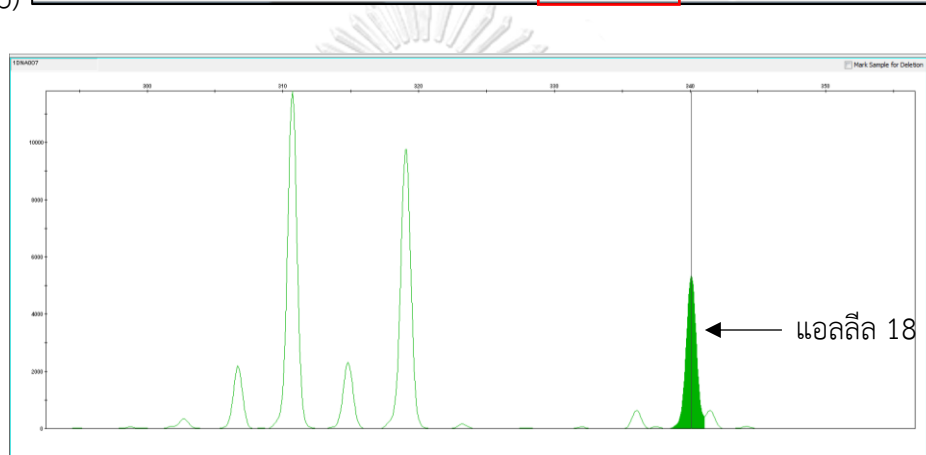
แทนค่าระยะห่างระหว่าง 1 repeat unit ของ DYF403S1a เท่ากับ 4.1975 ลงไปใน notepad (ภาพที่ 13)



(a) [X 310.37 Y 1177] [Peak: Data Point 5573 Size 310.72 Height 11792 Allele OL]



(b) [X 319.01 Y 7855] [Peak: Data Point 5650 Size 319.11 Height 9750 Allele OL]



(c) [X 340.57 Y 1096] [Peak: Data Point 5844 Size 340.11 Height 5363 Allele OL]

ภาพที่ 11 แสดง electropherogram ของ male control DNA 007 ในตำแหน่ง DYF403S1a

(11a) แอลลีล 11 มีค่า data size เท่ากับ 310.72 (กรอบสีแดง)

(11b) แอลลีล 13 มีค่า data size เท่ากับ (กรอบสีแดง)

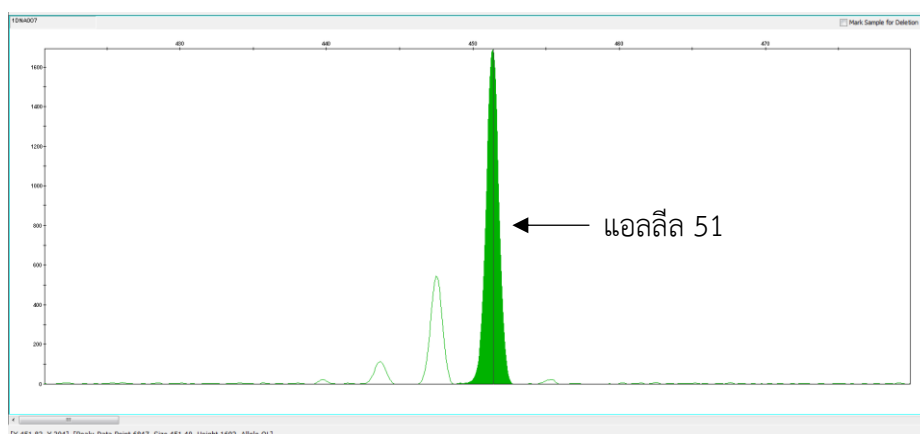
(11c) แอลลีล 18 มีค่า data size เท่ากับ (กรอบสีแดง)

○ การสร้างขอบเขต bin สำหรับตำแหน่ง DYF403S1b

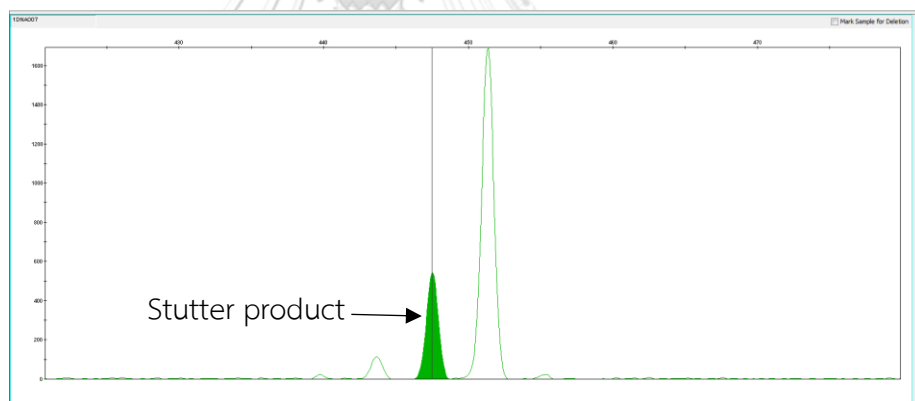
จากภาพที่ 12 แสดง electropherogram ของ male control DNA007 ของตำแหน่ง DYF399S1 ปรากฏพิกัดจริงจำนวน 1 พิกัด ซึ่งเมื่ออ้างอิงจาก Ballantyne และคณะ (2014) (3) พิกัดทั้งสอง คือ พิกัดของแอลลีล 51 (ตารางที่ 7)

เนื่องจากในตำแหน่ง DYF403S1b มีพิกัดจริงเพียงพิกัดเดียว ดังนั้นจึงนำ stutter product มาหารระยะห่างของ data size จากภาพที่ 12a พิกัดของแอลลีล 51 มีค่า data size 451.40

ในขณะที่ stutter product มีค่า data size 447.49 (ภาพที่ 12b) ดังนั้นระยะห่าง data size ของแอลลีล 51 และ stutter product ซึ่งจำนวนเบสต่างกัน 4 bp มีค่า data size เท่ากับ 3.91 แทนค่าระยะห่างระหว่าง 1 repeat unit ของ DYF403S1b เท่ากับ 3.91 ลงไปใน notepad (ภาพที่ 13)



(a) [X 451.83 Y 204] [Peak: Data Point 6847 Size 451.40 Height 1692 Allele OL]



(b) [X 447.80 Y 116] [Peak: Data Point 6812 Size 447.49 Height 546]

ภาพที่ 12 แสดง electropherogram ของ male control DNA 007 ในตำแหน่ง DYF403S1b
(12a) แอลลีล 11 มีค่า data size เท่ากับ 310.72 (กรอบสีแดง)

(12b) แอลลีล 13 มีค่า data size เท่ากับ (กรอบสีแดง)

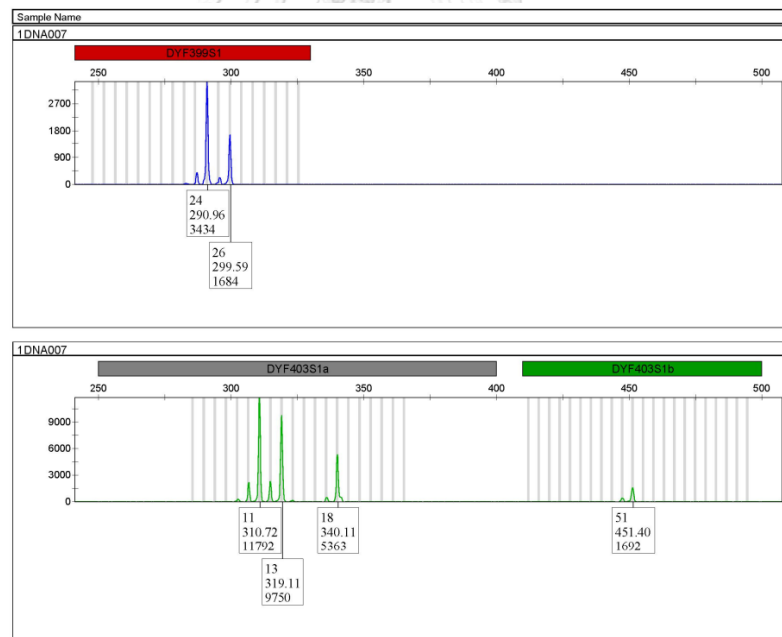
เมื่อเติมข้อมูลระยะห่างของ data size ของทุกๆ แอลลีลแล้ว นำไฟล์ notepad (ภาพที่ 13) แทรกเข้าไปในโปรแกรม GeneMapper ID X version 1.4 เพื่อระบุขอบเขต bin เมื่อนำข้อมูล ตัวอย่างมาวิเคราะห์ โปรแกรมจะเทียบตำแหน่งของพีคกับ bin ถ้ามีตำแหน่งของทั้งสองตรงกัน โปรแกรมจะแปลผลพีคนั้นออกมาเป็นแอลลีลทันที (ภาพที่ 14)

```

BIN_Pim08 - Notepad
File Edit Format View Help
Version GMID-X v 1.2
Chemistry Kit PIM08
BinSet Name PIM08
Panel Name PIM08
Marker Name DYE399S1
14 252.74 0.5 0.5
15 256.562 0.5 0.5
16 260.384 0.5 0.5
17 264.206 0.5 0.5
18 268.028 0.5 0.5
19 271.85 0.5 0.5
20 275.672 0.5 0.5
21 279.494 0.5 0.5
22 287.138 0.5 0.5
23 287.138 0.5 0.5
24 290.96 0.5 0.5
25 294.782 0.5 0.5
26 298.604 0.5 0.5
27 302.426 0.5 0.5
28 306.248 0.5 0.5
29 310.07 0.5 0.5
30 313.892 0.5 0.5
31 317.714 0.5 0.5
32 321.536 0.5 0.5
Marker Name DYE403S1a
5 285.55 0.5 0.5
6 289.745 0.5 0.5
7 293.94 0.5 0.5
8 298.135 0.5 0.5
9 302.33 0.5 0.5
10 306.525 0.5 0.5
11 310.72 0.5 0.5
12 314.915 0.5 0.5
13 319.11 0.5 0.5
14 323.305 0.5 0.5
15 327.5 0.5 0.5
16 331.695 0.5 0.5
17 335.89 0.5 0.5
18 340.085 0.5 0.5
19 344.28 0.5 0.5
20 348.475 0.5 0.5
21 352.67 0.5 0.5
22 356.865 0.5 0.5
23 361.06 0.5 0.5
24 365.255 0.5 0.5
Marker Name DYE403S1b
38 400.59 0.5 0.5
39 404.5 0.5 0.5
40 408.41 0.5 0.5

```

ภาพที่ 13 notepad ที่มีข้อมูลระยะทาง data size ของ repeat unit ระหว่างแอลลีลของ DYE399Sa และ DYE403S1a/b



ภาพที่ 14 electropherogram หลังการสร้างขอบเขต bin

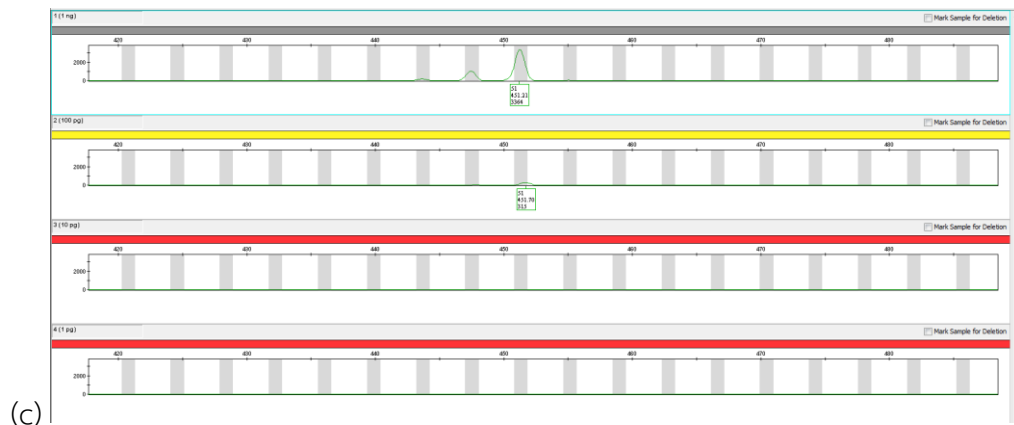
2. Analytical threshold

กำหนดค่า relative fluorescence unit (RFU) ได้จากการนำ DYF399S1 และ DYF403S1a/b ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR และติดตามสารเรืองแสงด้วย CE กับ male control DNA007 ที่ทำ serial dilution ให้มีความเข้มข้น 1 ng, 100 pg, 10 pg และ 1 pg เพื่อหาระดับความสูงของพีคจริงที่มีความสูงน้อยที่สุดที่สามารถพบได้

ในภาพที่ 15a ความสูงของพีคที่ต่ำที่สุดที่พบได้กับตำแหน่ง DYF399S1 คือ 179 ดังนั้นจึงตั้งค่า cut off ของ RFU ของตำแหน่ง DYF399S1 ไว้ที่ 150 RFU

ในภาพที่ 15b ความสูงของพีคที่ต่ำที่สุดที่พบได้กับตำแหน่ง DYF403S1a คือ 324 ในขณะที่ความสูงของพีคที่ต่ำที่สุดที่พบได้กับตำแหน่ง DYF403S1b คือ 315 (ภาพที่ 15c) ดังนั้นจึงตั้งค่า cut off ของ RFU ของ DYF403S1a/b ไว้ที่ 300 RFU





(c)

ภาพที่ 15 แสดง electropherogram ของ DYF399S1 (ภาพ a), DYF403S1a (ภาพ b), DYF403S1b (ภาพ c) กับ male control DNA007 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

3. Stutter %

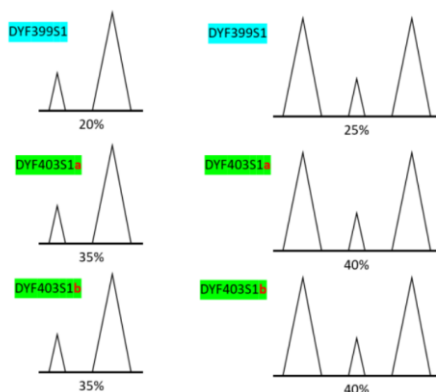
stutter product เป็น minor peak ที่มีชุดซ้ำมากกว่าหรือน้อยกว่าชุดซ้ำของพีคจริง 1 ชุด (n+1 หรือ n-1) และมักจะปรากฏอยู่ด้านหน้า (forward stutter, n+1) หรือด้านหลัง (backward stutter, n-1) ของพีคจริง ซึ่ง stutter product จะเกิดขึ้นระหว่างการทำปฏิกิริยา PCR เพราะกระบวนการ strand slippage โดยปกติแล้ว stutter product จะมีความสูงน้อยกว่าพีคจริง ความสูงของ stutter product จะแตกต่างกันตามแต่ละ STR locus โดย forward stutter จะมีความสูงน้อยกว่า backward stutter (7) และเนื่องจากทั้งตำแหน่ง DYF399S1 และ DYF403S1a/b เป็น multi-copy marker ทำให้ electropherogram ของ single source DNA สามารถปรากฏพีคได้มากกว่า 1 พีค จึงควรกำหนดค่า stutter % เพื่อเป็นหลักเกณฑ์สำหรับการแปลผลว่าพีคใดเป็นพีคจริงและพีคใดเป็น stutter product

- สูตรการคำนวณ stutter % (32)

$$\text{Stutter \%} = \frac{\text{ความสูงของพีค } n+1 \text{ หรือ } n-1}{\text{ความสูงของ allele peak}} \times 100$$

กำหนด stutter % จากความสูงของพีคที่ปรากฏใน electropherogram ของ male control DNA007 กับ DYF399S1 และ DYF403S1a/b โดยการคำนวณ stutter % ได้จากสูตรที่กล่าวมาข้างต้น โดยนำความสูงของพีคที่อยู่ด้านหน้า (n+1) หรือด้านหลัง (n-1) ของพีคจริงหารด้วยความสูงของพีคจริงและคูณด้วย 100

จากภาพที่ 16 แสดง stutter % ที่กำหนดในการศึกษานี้ โดย backward stutter จะมีความสูง 20% สำหรับตำแหน่ง DYF399S1 และ 35% สำหรับตำแหน่ง DYF403S1a/b ส่วน stutter peak อยู่ระหว่างพีคจริง 2 พีคจะกำหนดให้มี stutter % ที่สูงขึ้นเนื่องจากเป็น stutter product ที่รวมกันของ backward stutter และ forward stutter



ภาพที่ 16 แสดงรายละเอียดการกำหนด stutter % ของ stutter product ต่อพีคจริง

4. เกณฑ์การแปลผลแอลลีลจากความสูงของพีค

เนื่องจากทั้ง DYF399S1 และ DYF403S1a/b เป็น multi-copy marker ทำให้มีโอกาสที่ electropherogram ของทั้ง 2 เครื่องหมายจะปรากฏพีคมากกว่า 1 พีค หรือปรากฏพีคที่มีความสูงกว่าพีคอื่น ๆ ซึ่งอาจเกิดจากการพบแอลลีลที่มีขนาดเท่ากันมากกว่า 1 แอลลีลและจะมีความสูงของพีคมากกว่าพีคอื่นเป็น 2 เท่า (33) ดังนั้นถ้าปรากฏพีคที่มีความสูงมากกว่าพีคใกล้เคียง 2 เท่า จะแปลผลว่าพบแอลลีลนั้นซ้ำกันจำนวน 2 แอลลีล

3.3.2 การทำการศึกษารกการกลายพันธุ์กับตัวอย่างคู่พ่อและลูกชาย

หลังจากขั้นตอน validation จะทำการศึกษา DYF399S1 และ DYF403S1a/b กับตัวอย่างคู่พ่อและลูกชายชาวไทย

3.3.2.1 การคัดเลือกตัวอย่าง (Sample collection)

- การคำนวณขนาดตัวอย่าง (sample size calculation)

คำนวณขนาดกลุ่มตัวอย่างของ RM Y-STR ทั้งสองตำแหน่ง โดยแทนค่า P จากอัตราการกลายพันธุ์ของของทั้งสองตำแหน่งที่พบในงานวิจัยก่อนหน้า (ตารางที่ 4) จากนั้นจึงเลือกผลลัพธ์ที่ให้ขนาด

กลุ่มตัวอย่างที่มากที่สุด ในการศึกษานี้ อัตรการกลายพันธุ์จากงานศึกษาของ Zgonjanin และคณะ (2017) (22) ให้จำนวนตัวอย่างมากที่สุด

คำนวณจำนวนกลุ่มตัวอย่างอ้างอิงจาก W.G. Cochran (1977) ดังสูตรต่อไปนี้

$$n = \frac{Z^2 P(1 - P)}{D^2}$$

เมื่อ n คือ ขนาดกลุ่มตัวอย่าง

Z คือ ค่าที่ระดับความเชื่อมั่นหรือระดับนัยสำคัญ โดยกำหนดระดับนัยสำคัญที่ 0.05 ดังนั้น ค่า $Z = 1.96$

P คือ ร้อยละของการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้น แทนค่าด้วย 0.108 ซึ่งเป็นอัตรการกลายพันธุ์ของ ตำแหน่ง DYF399S1 ซึ่งให้ผลลัพธ์จำนวนตัวอย่างที่ต้องทำการศึกษามากที่สุด

D คือ ค่าความคลาดเคลื่อน (ในงานวิจัยนี้กำหนดค่าคลาดเคลื่อนเท่ากับ 0.05) แทนค่าได้ดังนี้

$$n = \frac{(1.96)^2 (0.108)(1 - 0.108)}{(0.05)^2}$$

$$n = 148.0338$$

ดังนั้น ขนาดกลุ่มตัวอย่างของชายที่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือดเท่ากับ 150 คู่

○ Inclusion criteria

1. สัญชาติไทย
2. เป็นตัวอย่างที่ผ่านการทดสอบและยืนยันความสัมพันธ์ทางสายบิดา (paternity test) และมีความสัมพันธ์เป็นพ่อและลูกชาย

จาก inclusion criteria ข้างต้นทำให้คัดเลือกตัวอย่างเลือดที่เก็บบน FTA card ของคู่พ่อและลูกชายที่ผ่านการทดสอบและยืนยันความสัมพันธ์ทางสายบิดาที่หน่วยนิติเวชโรวิทยา ภาควิชานิติเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในช่วงปี พ.ศ. 2556 – 2562

3.3.2.2 Mutation study in Thai father-son pairs

○ DNA isolation (34)

1. กด puncher (Harris Uni-Core disposable punch) ลงบนตัวอย่างเลือดที่เก็บบน FTA card ขนาด 1.2 มิลลิเมตร จำนวน 1 punch ต่อ 1 ตัวอย่างและปล่อย punch ลงใน PCR tube ขนาด 200 ไมโครลิตร
2. เติม FTA purification reagent ปริมาณ 100 ไมโครลิตรลงใน PCR tube เพื่อล้างเซลล์ แช่ทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นดูด FTA purification reagent ทิ้ง ทำซ้ำในขั้นตอนนี้อีก 2 ครั้ง
3. เติม TE buffer ปริมาณ 100 ไมโครลิตรลงใน PCR tube เพื่อลด PCR inhibitor แช่ทิ้งไว้ 15 นาที ดูด TE buffer ออก ทำซ้ำในขั้นตอนนี้อีก 1 ครั้ง
4. นำ punch ไปทำให้แห้งโดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 15 นาที

○ DNA amplification

เติม PCR components และปริมาณตามที่แสดงในตารางที่ 9 ลงไปใน PCR tube ที่มี punch อยู่ เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่อยู่บน punch ด้วยเทคนิค PCR ด้วยเครื่อง ProFlex™ 3 x 32 - well PCR System (Applied Biosystems) โดยใช้อุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยา ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 6

ตารางที่ 9 แสดง PCR components และปริมาณสารในหลอดปฏิกิริยาสำหรับการทำปฏิกิริยา PCR ในขั้นตอนการศึกษาการกลายพันธุ์ในคู่พ่อและลูกชาย

PCR components	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาณ (µl)
AmpliTaq Gold PCR buffer (conc.)	1X	2
MgCl ₂ (conc.)	2.27 mM	2
dNTPs (conc.)	250 µM	0.5
AmpliTaq Gold PCR polymerase (conc.)	0.25 U	0.2
DYF399S1 primer (conc.)	0.075 µM	1
DYF403S1a/b primer (conc.)	1.0 µM	1
H ₂ O		13.3

final volume = 20 µl

○ DNA separation

1. เติมสารผสม PCR product 1 ไมโครลิตร, GeneScan™ 600 LIZ™ dye Size Standard v2.0 (Applied Biosystem) 0.3 ไมโครลิตร และ HiDi formamide (Applied Biosystems) 8.7 ไมโครลิตร ลงใน 96-well reaction plate
2. นำ 96-well reaction plate ปั่นเหวี่ยงด้วย Mini Plate Spinner Centrifuge (Fisher Scientific)
3. ให้ความร้อน 96-well reaction plate ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 นาที
4. นำ 96-well reaction plate ไปให้ความเย็นเป็นเวลา 3 นาที
5. นำ 96-well reaction plate ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)
6. นำข้อมูลดิบไฟล์ชนิด .hid จากเครื่อง 3500 Genetic Analyzer ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม GeneMapper ID X version 1.4 (Applied Biosystems)

○ Genotyping and data analysis

1. เกณฑ์การแปลผลพีคเป็นแอลลีล

ตั้งค่าการแปลผลพีคทั้งการสร้างขอบเขต bin, analytical threshold, stutter % ในโปรแกรม GeneMapper ID X version 1.4 ตามที่กำหนดไว้กับข้อ 3.3.1.3 ส่วนการแปลผลพีคที่มีความสูงมากกว่าพีคข้างเคียง จะแปลผลโดยการเปรียบเทียบความสูงของพีค ถ้าพีคนั้นๆ มีความสูงมากกว่าพีคใกล้เคียง 2 เท่า จะแปลผลว่าพบแอลลีลนั้นซ้ำกันจำนวน 2 แอลลีล หลังจากแปลผลพีคที่ปรากฏบน electropherogram เป็นแอลลีลแล้ว จะทำการแปลผลแอลลีลของแต่ละตัวอย่างออกมาเป็น DNA profile

2. เกณฑ์การแปลผลการกลายพันธุ์

นำ DNA profile มาแปลผลการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นระหว่างคู่พ่อและลูกชายที่นำมาศึกษา เนื่องจากการกลายพันธุ์ที่พบใน STR นั้น จะเป็นการเพิ่มขึ้นและลดลงของชุดซ้ำที่จำนวน n ชุด (6) ดังนั้นในกรณีที่มีการเพิ่มหรือขาดหายไปของชุดซ้ำอย่างน้อย 1 ชุดในคู่พ่อและลูกชายจะแปลผลว่าพบการกลายพันธุ์ของตำแหน่ง DYF399S1 หรือตำแหน่ง DYF403S1a/b ในตัวอย่างคู่ นั้น ๆ และ

เพื่อให้สอดคล้องกับวัตถุประสงค์ของการศึกษาจะพิจารณารูปแบบการกลายพันธุ์ว่าเป็นการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของชุดซ้ำมากกว่าหรือเท่ากับ 1 ชุดซ้ำและคำนวณอัตราการกลายพันธุ์ของตำแหน่ง DYF399S1 และ DYF403S1a/b ในชายไทยที่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือดตามสูตรการคำนวณอัตราการกลายพันธุ์ตามข้อที่ 2.6.2

3.4 สถานที่ทำการศึกษา

หน่วยนิติเวชวิทยา ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5 ข้อพิจารณาทางจริยธรรมการวิจัย

งานวิจัยนี้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมวิจัยในมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย IRB No. 463/62



บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปราย (results and discussion)

4.1 Mutation patterns

การศึกษาการกลายพันธุ์บนตำแหน่ง Y-STR ที่มีอัตราการกลายพันธุ์รวดเร็วจำนวนสองตำแหน่งในชายไทยที่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือด (The mutation study of two rapidly mutating Y-STRs in closely related Thai males) มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษารูปแบบการกลายพันธุ์ของ RM Y-STR ในชายไทยที่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือดและเพื่อคำนวณอัตราการกลายพันธุ์ของ RM Y-STR ในชายไทยที่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือด โดยทำการศึกษา RM Y-STR ตำแหน่ง DYF399S1 และ DYF403S1a/b กับตัวอย่างคู่พ่อและลูกชาย 150 คู่ รายละเอียด genotype ของทุกๆ ตัวอย่างแสดงอยู่ที่ตารางที่ 11 (ภาคผนวก)

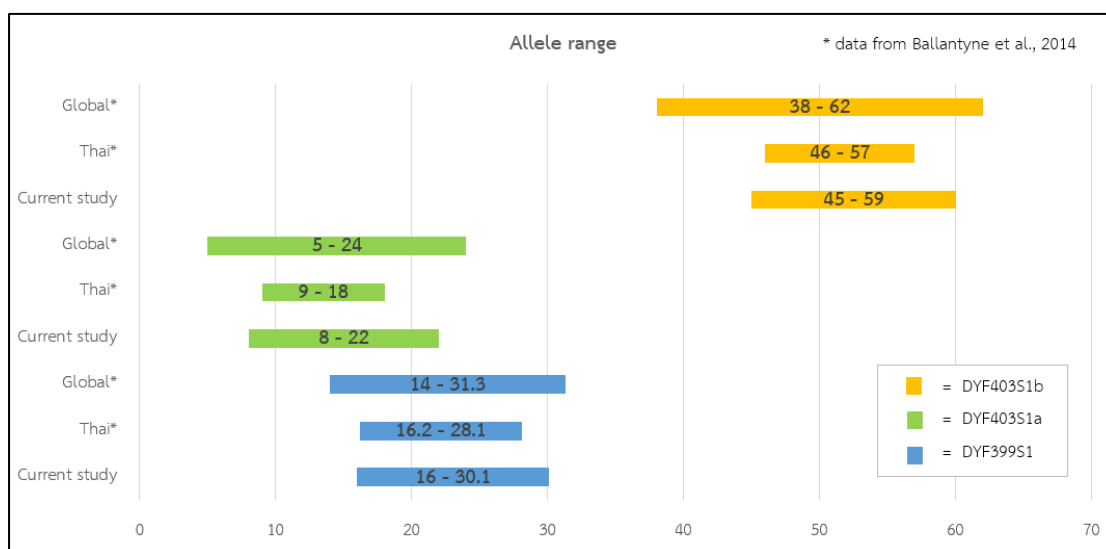
จากตารางที่ 10 และภาพที่ 17 แสดงข้อมูลช่วงแอลลีลที่พบในการศึกษานี้ เมื่อเปรียบเทียบกับช่วงแอลลีลที่พบในงานศึกษาของ Ballantyne et al., 2014 (3) ซึ่งเป็นการศึกษา RM Y-STR ในประชากรชายทั่วโลก (111 กลุ่มรวมทั้งประชากรไทย) พบว่าช่วงแอลลีลที่พบในการศึกษาก่อนหน้าในประชากร 111 กลุ่มครอบคลุมกับช่วงแอลลีลที่พบในการศึกษานี้

จากการศึกษาคู่พ่อและลูกชายจำนวน 150 คู่ พบการกลายพันธุ์ในตำแหน่ง DYF399S1 จำนวน 10 คู่ และ DYF403S1a จำนวน 3 คู่ ทั้งนี้มีเพียงคู่พ่อและลูกชายคู่ที่ 33 (F033/S033) เท่านั้นที่พบการกลายพันธุ์ทั้งในตำแหน่ง DYF399S1 และ DYF403S1a โดยทุกๆ การกลายพันธุ์เป็นการกลายพันธุ์แบบ one-step mutation ทั้งหมด โดยไม่พบ multistep mutation ซึ่งโอกาสการเกิด one-step mutation และ multistep mutation มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.001) (ตารางที่ 13, ภาคผนวก) สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Ballantyne et al., 2010 (14)

ในตำแหน่ง DYF399S1 พบการเปลี่ยนแปลงของชุดซ้ำแบบการลดลงของชุดซ้ำ 3 ครั้ง, เป็นการเพิ่มขึ้นของชุดซ้ำ 8 ครั้ง ซึ่งโอกาสการพบ repeat loss และ repeat gain ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value = 0.344) (ตารางที่ 14, ภาคผนวก) สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Ballantyne et al., 2010 (14) เช่นเดียวกับตำแหน่ง DYF403S1 ที่พบการเปลี่ยนแปลงของชุดซ้ำแบบการลดลงของชุดซ้ำ 1 ครั้ง, เป็นการเพิ่มขึ้นของชุดซ้ำ 2 ครั้ง ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทาง

สถิติ (p -value = 1.000) (ตารางที่ 15, ภาคผนวก) สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Ballantyne et al., 2010 (14)

ภาพที่ 17 แสดงช่วงแอลลีลที่พบ (allele range) ในการศึกษาปัจจุบันและการศึกษาของ Ballantyne et al., 2014



ตารางที่ 10 ข้อมูลแอลลีล, จำนวนการกลายพันธุ์ที่พบและลักษณะของการกลายพันธุ์ในตำแหน่ง DYF399S1 และ DYF403S1a/b

	DYF399S1 locus	DYF403S1a locus	DYF403S1b locus
Allele range	16 - 30.1	8 - 22	45 - 59
Number of mutations	10	3	0
Repeat loss (-1)	3	1	-
Repeat gain (+1)	7	2	-
One-step mutation	10	3	-
Multistep mutation	0	0	-

4.2 Mutation rate calculation

จากการศึกษาคู่พ่อและลูกชายจำนวน 150 คู่ พบการกลายพันธุ์ในตำแหน่ง DYF399S1 จำนวน 10 คู่และ DYF403S1a จำนวน 3 คู่ ส่วนตำแหน่ง DYF403S1b ไม่พบการกลายพันธุ์ของคู่พ่อและลูกชายชาวไทยในตำแหน่งนี้ คำนวณอัตราการกลายพันธุ์ตามสูตรที่แสดงไว้ในข้อ 2.7.2

○ สูตรการคำนวณอัตราการกลายพันธุ์

จำนวนการกลายพันธุ์ที่พบ

จำนวนตัวอย่างคู่พ่อและลูกชายที่นำมาศึกษา

สำหรับการศึกษานี้อัตราการกลายพันธุ์ของแต่ละตำแหน่งในคู่พ่อและลูกชายชาวไทยมีค่า ดังนี้

1. อัตราการกลายพันธุ์ของตำแหน่ง DYF399S1

พบการกลายพันธุ์ของตัวอย่างคู่พ่อและลูกชาย 10 คู่จากตัวอย่างทั้งหมด 150 คู่พ่อและลูกชายสำหรับตำแหน่ง DYF399S1

ดังนั้น อัตราการกลายพันธุ์ของตำแหน่งนี้

$$= 10/150 = 0.0667 = 6.67 \times 10^{-2} \text{ ต่อตำแหน่งต่อรุ่น}$$

2. อัตราการกลายพันธุ์ของตำแหน่ง DYF403S1a

พบการกลายพันธุ์ของตัวอย่างคู่พ่อและลูกชาย 3 คู่จากตัวอย่างทั้งหมด 150 คู่พ่อและลูกชายสำหรับตำแหน่ง DYF403S1a

ดังนั้น อัตราการกลายพันธุ์ของตำแหน่งนี้

$$= 3/150 = 0.02 = 2.00 \times 10^{-2} \text{ ต่อตำแหน่งต่อรุ่น}$$

3. อัตราการกลายพันธุ์ของตำแหน่ง DYF403S1b

เนื่องจากไม่พบการกลายพันธุ์ของตำแหน่ง DYF403S1b ในตัวอย่างคู่พ่อและลูกชายชาวไทยในการศึกษานี้ ดังนั้นจึงสรุปว่าอัตราการกลายพันธุ์ของตำแหน่ง DYF403S1b ของการศึกษานี้เท่ากับ 0 ต่อตำแหน่งต่อรุ่น

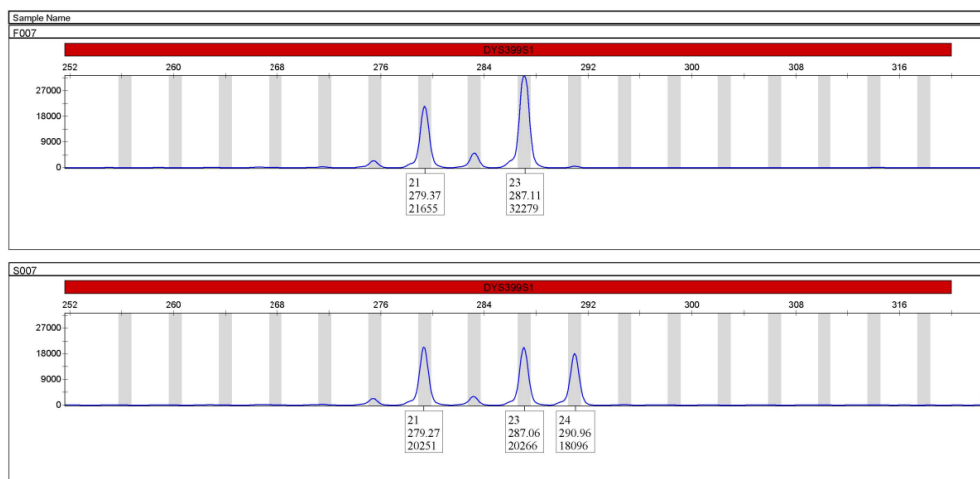
4.3 อายุของพ่อขณะให้กำเนิดลูกชาย

จากตารางที่ 12 (ภาคผนวก) แสดงข้อมูลอายุของพ่อขณะให้กำเนิดลูกชาย โดยจากตัวอย่าง 150 คู่ ทราบอายุของพ่อขณะให้กำเนิดลูกชายจำนวน 101 คู่ เป็นตัวอย่างที่พบการกลายพันธุ์ระหว่างพ่อ-ลูกชายจำนวน 8 คู่ ค่า median ของอายุของพ่อขณะให้กำเนิดลูกชายที่พบการกลายพันธุ์มีค่าเท่ากับ 42 ส่วนค่า median ของอายุของพ่อขณะให้กำเนิดลูกชายที่ไม่พบการกลายพันธุ์มีค่าเท่ากับ 29

4.4 Differentiation of father-son pairs

4.4.1 การกลายพันธุ์ที่พบบนตำแหน่ง DYS399S1

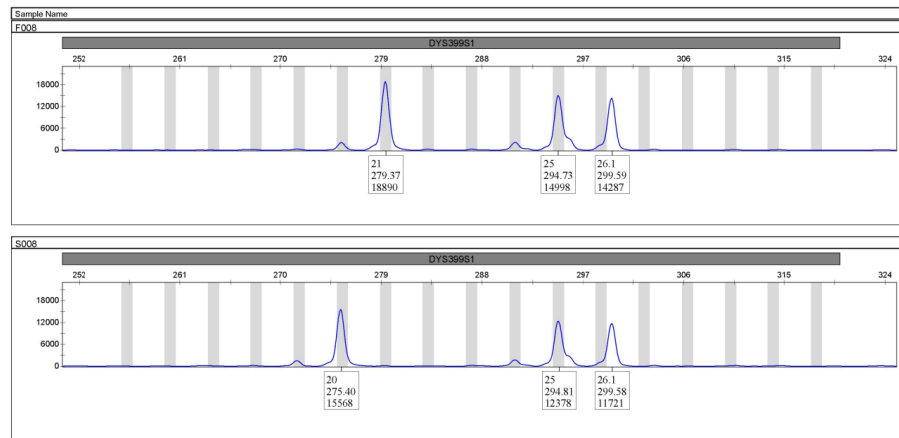
1. ตัวอย่างคู่ที่ 7 (F007/S007)



ภาพที่ 18 electropherogram ของคู่พ่อและลูกชายคู่ที่ 7 (F007/S007)

ภาพที่ 18 แสดงผล electropherogram ของพ่อ (F007) และลูกชาย (S007) พบว่าพ่อพบพีคจำนวน 2 พีค (เนื่องจากแอลลีล 23 ของพ่อมีค่า peak height มากกว่าแอลลีล 21 ไม่ถึง 2 เท่าทำให้แปลผลการพบแอลลีล 23 ได้เพียง 1 พีคเท่านั้น) และแปลผลเป็นแอลลีล 21 (peak height = 21,655) และ 23 (peak height = 32,279) ส่วนลูกชายพบพีคจำนวน 3 พีค แปลผลเป็นแอลลีล 21 (peak height = 20,251), 23 (peak height = 20,266) และ 24 (peak height = 18,096) การกลายพันธุ์จากแอลลีล 23 ของพ่อเป็นแอลลีล 24 ของลูกชายเป็นการเพิ่มขึ้นของชุดซ้ำ 1 ชุด

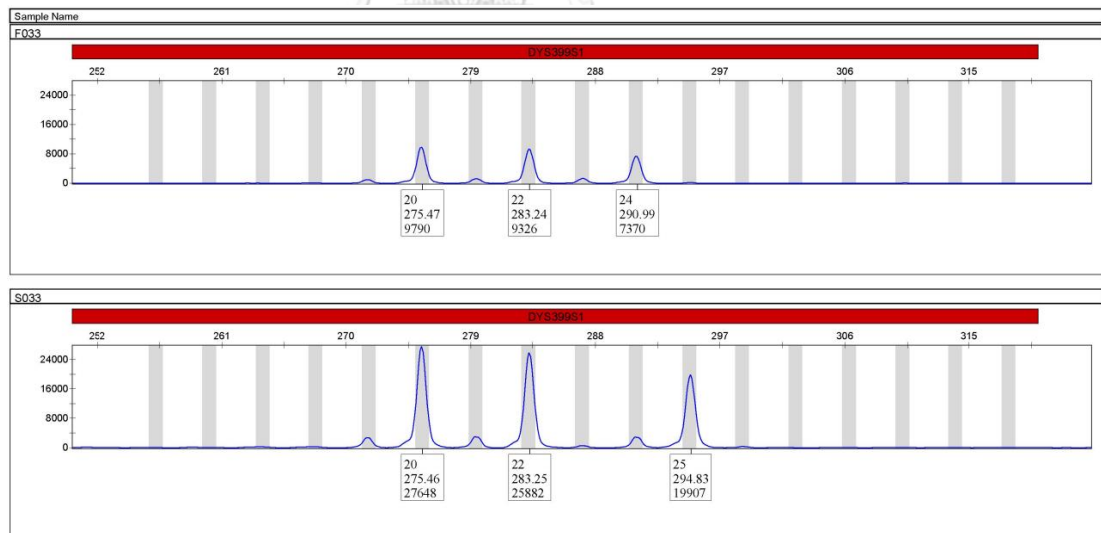
2. ตัวอย่างคู่ที่ 8 (F008/S008)



ภาพที่ 19 electropherogram ของคู่พ่อและลูกชายคู่ที่ 8 (F008/S008)

จากภาพที่ 19 พบว่าทั้งพ่อและลูกชายพบพีคจำนวน 3 พีคเหมือนกัน โดยแปลผล DNA profile ของพ่อเป็นแอลลีล 21, 25 และ 26.1 ส่วนลูกชายพบแอลลีล 20, 25 และ 26.1 การกลายพันธุ์จากแอลลีล 21 ของพ่อเป็นแอลลีล 20 ของลูกชายเป็นการกลายพันธุ์แบบลดลงของชุดซ้ำ 1 ชุด

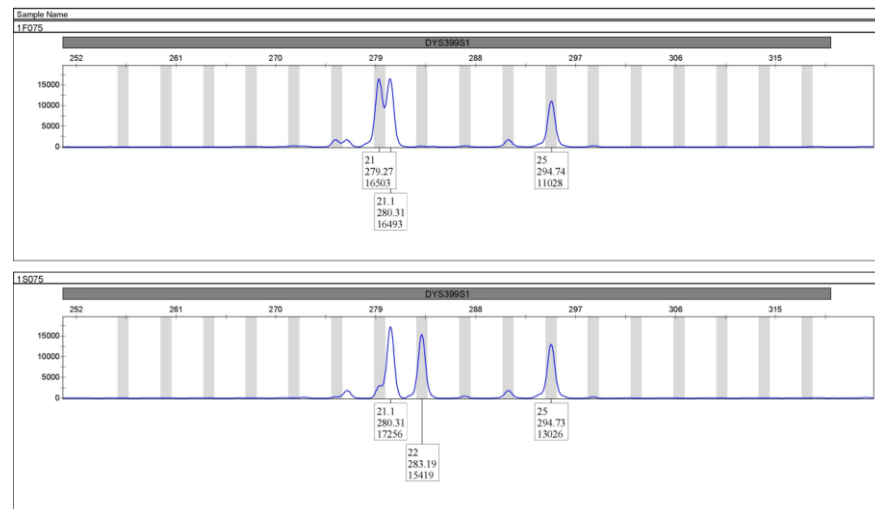
3. คู่พ่อและลูกชายคู่ที่ 33 (F033/S033)



ภาพที่ 20 electropherogram ของคู่พ่อและลูกชายคู่ที่ 33 (F033/S033)

ทั้งพ่อและลูกชายพบแอลลีลจำนวน 3 พีคเท่ากัน DNA profile ของพ่อและลูกชายพบแอลลีล 20 และ 22 เหมือนกัน ต่างกันที่พ่อพบแอลลีล 24 ส่วนลูกชายพบแอลลีล 25 การเปลี่ยนแปลงนี้เป็น การกลายพันธุ์แบบเพิ่มขึ้นของชุดซ้ำ 1 ชุด

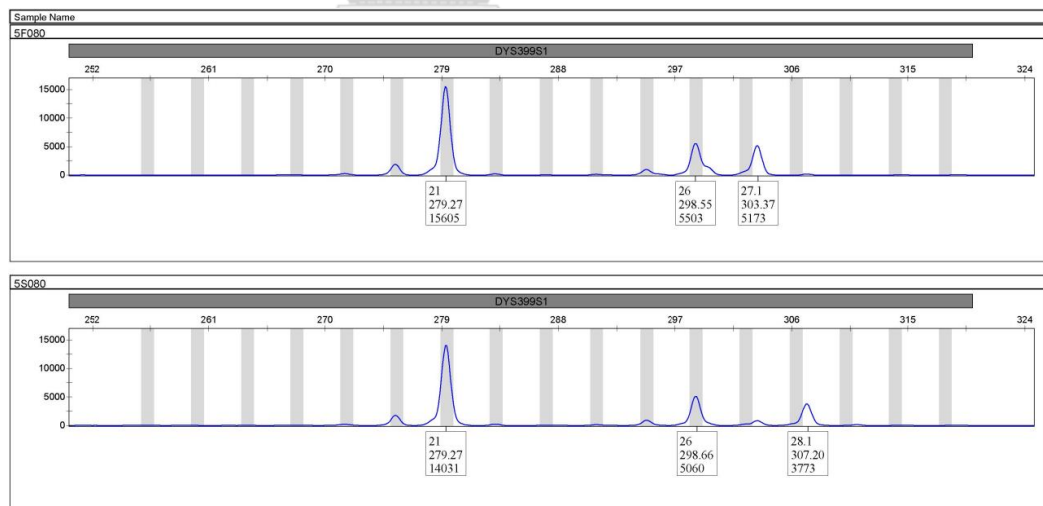
4. คู่พ่อและลูกชายคู่ที่ 75 (F075/S075)



ภาพที่ 21 electropherogram ของคู่พ่อและลูกชายคู่ที่ 75 (F075/S075)

ทั้ง 2 ตัวอย่างพบพีคจำนวน 3 พีคเหมือนกัน แต่ DNA profile ของพ่อแปลผลได้เป็นแอลลีล 21, 21.1, 25 ส่วนลูกชายแปลผลเป็นแอลลีล 21.1, 22, 23 การเปลี่ยนแปลงจากแอลลีล 21 ของพ่อเป็นแอลลีล 22 ของลูกชายเป็นการเพิ่มขึ้นของชุดซ้ำ 1 ชุด

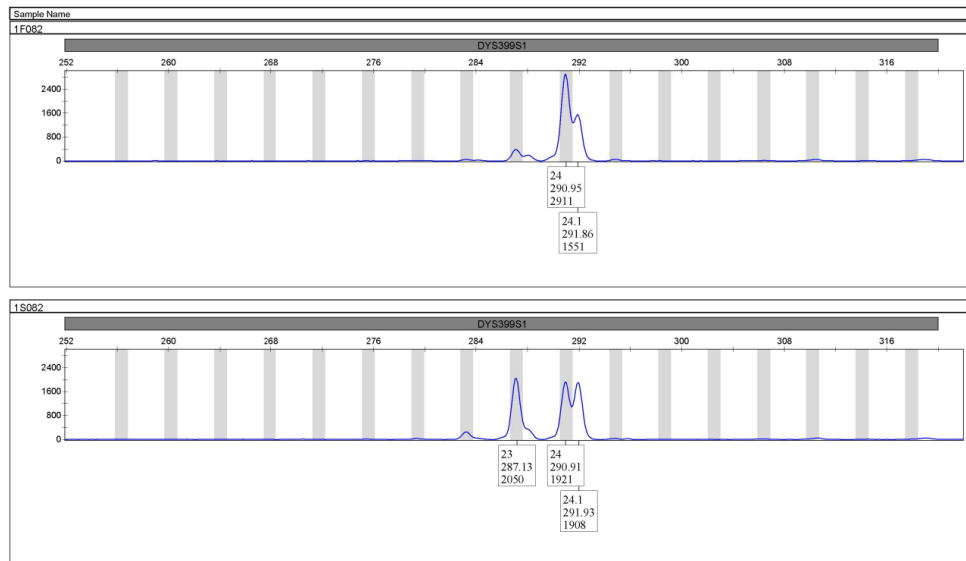
5. คู่พ่อและลูกชายคู่ที่ 80 (F080/S080)



ภาพที่ 22 electropherogram ของคู่พ่อและลูกชายคู่ที่ 80 (F080/S080)

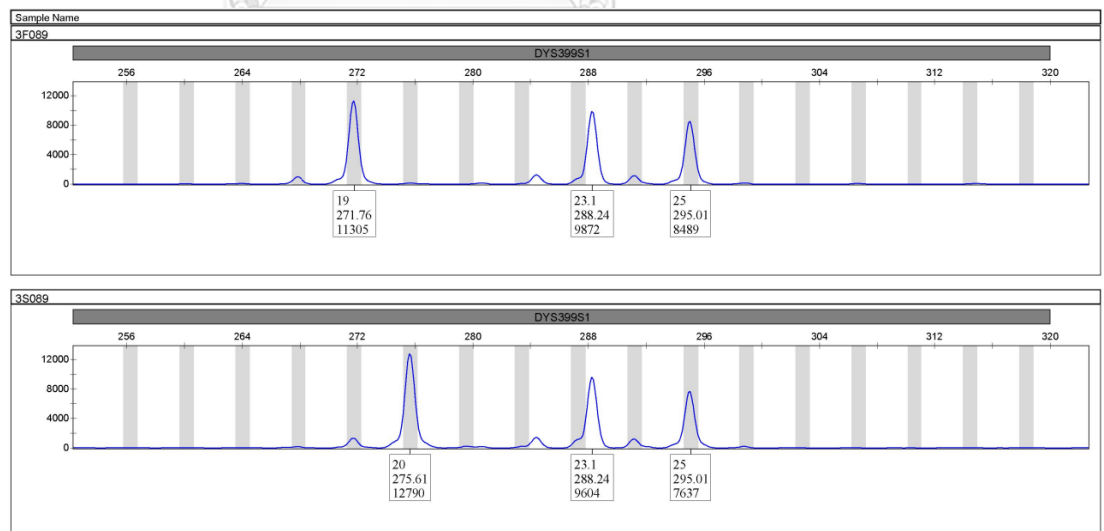
จากภาพที่ 22 ทั้งพ่อและลูกชายพบแอลลีลจำนวน 3 พีคเหมือนกัน แต่ DNA profile ของพ่อพบแอลลีล 21, 26, 27.1 ต่างจากลูกชายที่ DNA profile แสดงผลเป็นแอลลีล 21, 26, 28.1 การเปลี่ยนแปลงจากแอลลีล 27.1 เป็นแอลลีล 28.1 การกลายพันธุ์แบบเพิ่มขึ้นของชุดซ้ำ 1 ชุด

6. คู่พ่อและลูกชายคู่ที่ 82 (F082/S082)



ภาพที่ 23 electropherogram ของคู่พ่อและลูกชายคู่ที่ 82 (F082/S082) พบแอลลีลจำนวน 3 แอลลีลทั้งใน DNA profile ของพ่อและลูกชาย โดยพ่อพบแอลลีล 24, 24, 24.1 ส่วนลูกชายพบแอลลีล 23, 24, 24.1 โดยพบการกลายพันธุ์จากพ่อไปสู่ลูกชายในแอลลีล 24 ของพ่อไปเป็นแอลลีล 23 ของลูกชาย ซึ่งการกลายพันธุ์ของคู่พ่อและลูกชายคู่นี้เป็นการลดลงของชุดซ้ำจำนวน 1 ชุด

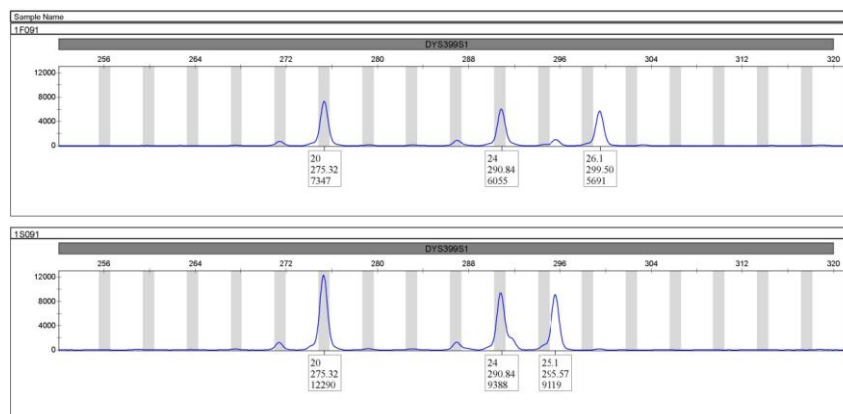
7. คู่พ่อและลูกชายคู่ที่ 89 (F089/S089)



ภาพที่ 24 electropherogram ของคู่พ่อและลูกชายคู่ที่ 89 (F089/S089) จะเห็นได้ว่าทั้งพ่อและลูกชายปรากฏแอลลีลจำนวน 3 แอลลีลเหมือนกัน โดย DNA profile ของพ่อแปลผลเป็นแอลลีล 19, 23.1, 25 ส่วน DNA profile ของลูกชายแปลผลเป็นแอลลีล 20, 23.1,

25 การกลายพันธุ์ของตัวอย่างคู่นี้เป็นการกลายพันธุ์ที่มีการเพิ่มขึ้นของชุดซ้ำจำนวน 1 ชุดในแอลลีล 19 ของพ่อไปสู่แอลลีล 20 ของลูกชาย

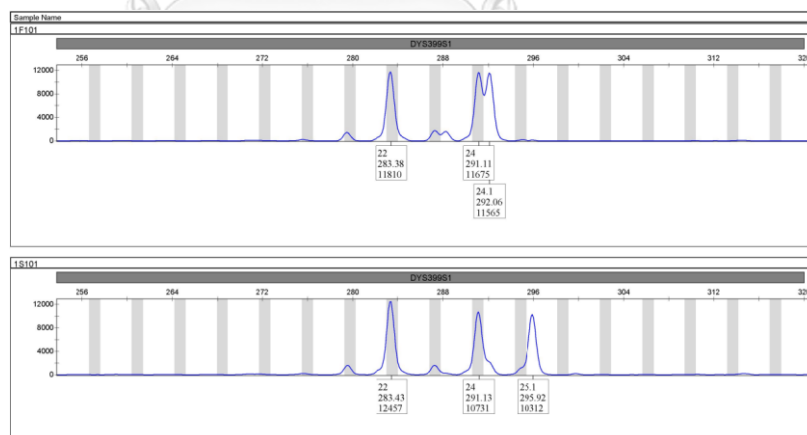
8. คู่พ่อและลูกชายคู่ที่ 91 (F091/S091)



ภาพที่ 25 electropherogram ของคู่พ่อและลูกชายคู่ที่ 91 (F091/S091)

พบแอลลีลจำนวน 3 แอลลีลทั้งพ่อและลูกชาย โดยพ่อพบแอลลีล 20, 24, 26.1 ต่างจากลูกชายที่พบแอลลีล 20, 24, 25.1 การกลายพันธุ์ที่พบเป็นการลดลงของชุดซ้ำ 1 ชุดในแอลลีล 26.1 เป็นแอลลีล 25.1

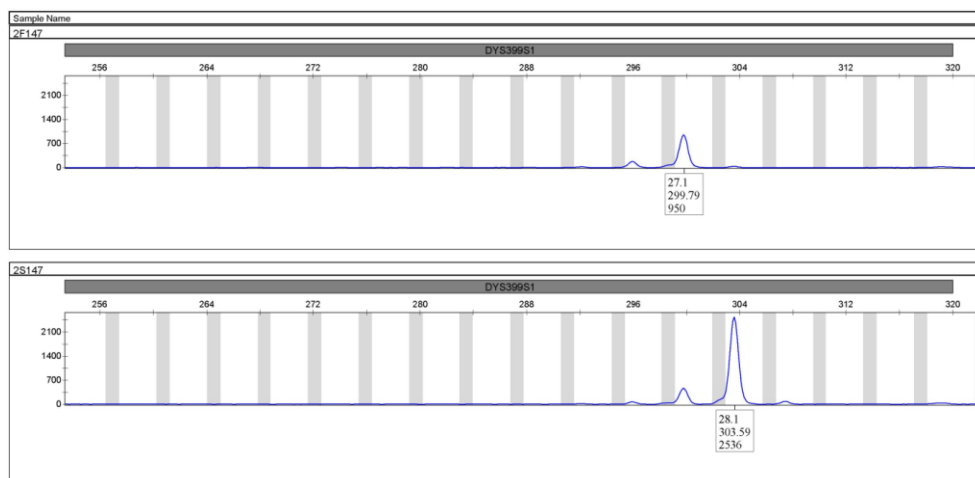
9. คู่พ่อและลูกชายคู่ที่ 101 (F101/S101)



ภาพที่ 26 electropherogram ของคู่พ่อและลูกชายคู่ที่ 101 (F101/S101)

DNA profile ของทั้งพ่อและลูกชายพบแอลลีลจำนวน 3 แอลลีล โดยพ่อพบแอลลีล 22, 24, 24.1 ส่วนลูกชายพบแอลลีล 22, 24, 25.1 โดยการกลายพันธุ์ของแอลลีล 24.1 ของพ่อเป็นแอลลีล 25.1 ของลูกชายเป็นการเพิ่มขึ้นของชุดซ้ำจำนวน 1 ชุด

10. คู่พ่อและลูกชายคู่ที่ 147 (F147/S147)

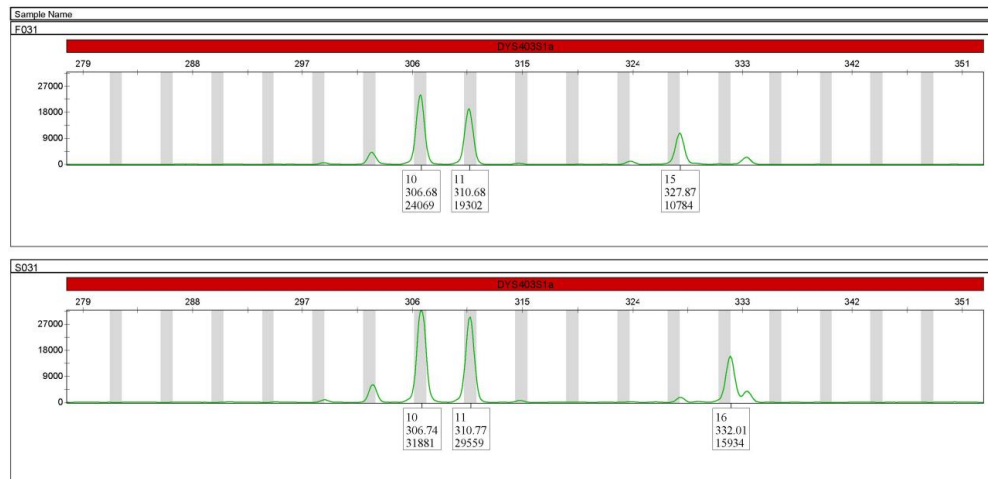


ภาพที่ 27 electropherogram ของคู่พ่อและลูกชายคู่ที่ 147 (F147/S147)

พบว่าทั้งสองตัวอย่างพบแอลลีลจำนวน 1 แอลลีลเหมือนกัน แต่ DNA profile ของพ่อแปลผลแอลลีลได้เป็นแอลลีล 26.1 ส่วนลูกชายแปลผล DNA profile ได้เป็นแอลลีล 27.1 เป็นการกลายพันธุ์แบบมีการเพิ่มขึ้นของชุดซ้ำ 1 ชุด จาก electropherogram จะเห็นได้ว่าทั้งสองตัวอย่างมีพีคเพียง 1 พีคเท่านั้น ซึ่งการพบพีคเพียง 1 พีคทั้งๆ ที่ DYF399S1 เป็น multi-copy marker ที่มีตำแหน่งบนโครโมโซมวาย 3 ตำแหน่ง อาจเกิดได้จากกรณีที่ทุกๆ copy มีจำนวนชุดซ้ำที่เท่ากัน ทำให้มีเพียงพีค 1 พีคที่ปรากฏบน electropherogram หรือเกิดจากกรณีที่มีเพียง 1 copy เท่านั้น ส่วน copy อื่นๆ มีการขาดหายไป ซึ่งจากภาพที่ 22 จะเห็นได้ว่า peak height ของแอลลีลทั้งสองมาค่าไม่สูงมาก (peak height ของแอลลีล 27.1 = 950, peak height ของแอลลีล 27.1 = 2,536) จึงคาดว่า การปรากฏพีค 1 พีคของตัวอย่างทั้งสองอาจเกิดจากมี DYF399S1 เพียง 1 copy เท่านั้น

4.4.2 การกลายพันธุ์ที่พบบนตำแหน่ง DYS403S1a

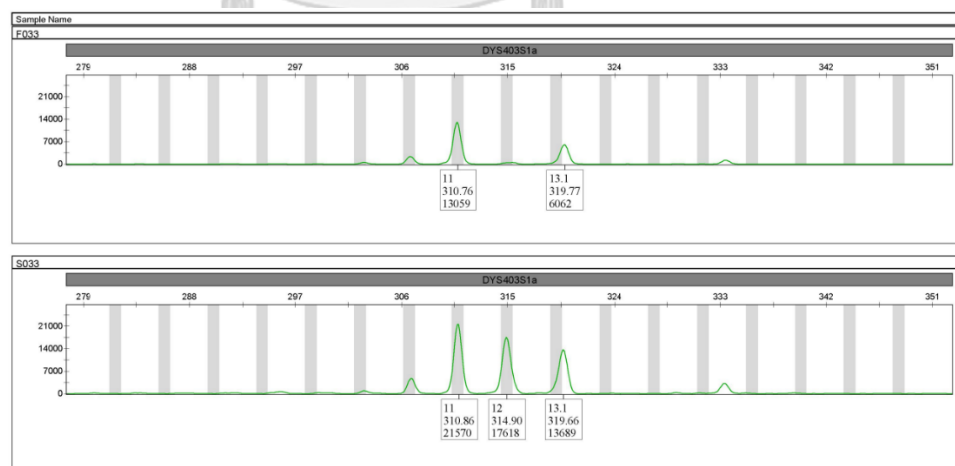
1. ตัวอย่างคู่พ่อลูกคู่ที่ 31 (F031/S031)



ภาพที่ 28 electropherogram ของคู่พ่อและลูกชายคู่ที่ 31 (F031/S031)

พบว่าคู่พ่อและลูกชายนั้นมีแอลลีลของตำแหน่ง DYS403S1a จำนวน 3 แอลลีลเหมือนกัน โดย DNA profile ของพ่อแปลผลได้เป็นแอลลีล 10, 11, 15 ส่วนลูกชายนั้นพบแอลลีล 10, 11, 16 ซึ่งการกลายพันธุ์ที่พบจากแอลลีล 15 ของพ่อเป็นแอลลีล 16 ของลูกชายเป็นการกลายพันธุ์แบบที่มีการเพิ่มขึ้นของชุดซ้ำ 1 ชุด

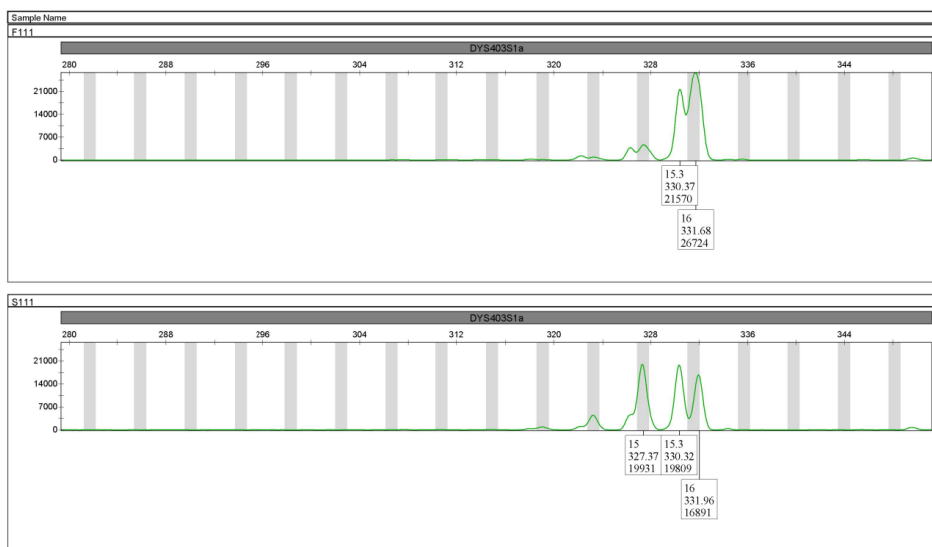
2. ตัวอย่างคู่พ่อลูกคู่ที่ 33 (F033/S033)



ภาพที่ 29 electropherogram ของคู่พ่อและลูกชายคู่ที่ 33 (F033/S033)

พบว่า DNA profile ของพ่อแปลผลได้เป็นแอลลีล 11, 11, 13.1 ซึ่งต่างจาก DNA profile ของลูกชายที่พบแอลลีลจำนวน 3 แอลลีล ได้แก่ แอลลีล 11, 12, 13.1 และการกลายพันธุ์ที่พบจากแอลลีล 11 ของพ่อเป็นแอลลีล 12 ของลูกชายเป็นการกลายพันธุ์แบบการเพิ่มขึ้นของชุดซ้ำ 1 ชุด

3. ตัวอย่างคู่พ่อลูกคู่ที่ 101 (F101/S101)



ภาพที่ 30 electropherogram ของคู่พ่อและลูกชายคู่ที่ 101 (F101/S101)

DNA profile ของพ่อแปลผลได้เป็นแอลลีลจำนวน 2 แอลลีล คือ แอลลีล 15.3 และ 16 ส่วน DNA profile ของลูกชายแปลผลได้เป็นแอลลีลจำนวน 3 แอลลีล ได้แก่ แอลลีล 15, 15.3, 16 ซึ่งการกลายพันธุ์จากแอลลีล 16 ของพ่อเป็นแอลลีล 15 ของลูกชาย พบว่าเป็นการกลายพันธุ์แบบที่มีการลดของชุดซ้ำจำนวน 1 ชุด

ในการศึกษานี้มีการรายงานการพบการกลายพันธุ์ในตำแหน่ง DYF399S1 และ DYF403S1a/b ในตัวอย่างคู่พ่อและลูกชายชาวไทย ซึ่งก่อนหน้านี้ไม่เคยมีการรายงานผลการศึกษการกลายพันธุ์ในตัวอย่างคู่พ่อและลูกชายชาวไทยมาก่อน แม้ว่าในงานศึกษาของ Ballantyne และคณะ (2014) (3) จะทำการศึกษาในคนไทยก็ตาม แต่เป็นการศึกษา RM Y-STR ในตัวอย่างชายไทยที่ไม่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือด ($n = 120$ คน)

บทที่ 5

สรุปผล (conclusion)

การวิจัยเรื่องการศึกษาการกลายพันธุ์บนตำแหน่ง Y-STR ที่มีอัตราการกลายพันธุ์รวดเร็วจำนวนสองตำแหน่งในชายไทยที่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือด มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1. เพื่อศึกษารูปแบบการกลายพันธุ์ของ RM Y-STR ในชายไทยที่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือด 2. เพื่อคำนวณอัตราการกลายพันธุ์ของ RM Y-STR ในชายไทยที่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือด โดย RM Y-STR ที่นำมาศึกษาในการศึกษานี้ คือ ตำแหน่ง DYF399S1 และ DYF403S1a/b ในกลุ่มตัวอย่างชายไทยที่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือด โดยทำการศึกษาในคู่พ่อและลูกชายจำนวน 150 คู่ โดยมีผลการศึกษา ดังนี้

1. รูปแบบการกลายพันธุ์ของ DYF399S1 และ DYF403S1b

- พบการกลายพันธุ์เป็นการกลายพันธุ์แบบ one-step mutation ทั้งหมด โดยไม่พบ multistep mutation
- ตำแหน่ง DYF399S1 และ DYF403S1a มีโอกาสพบการเกิด repeat loss และ repeat gain ได้อย่างไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ที่ p-value = 0.344)

2. จากการศึกษาการกลายพันธุ์ของ DYF399S1 และ DYF403S1a/b ในตัวอย่างคู่พ่อและลูกชายชาวไทยจำนวน 150 คู่ พบว่าการกลายพันธุ์ของตำแหน่ง DYF399S1 และ DYF403S1a จำนวน 10 และ 3 คู่ ตามลำดับ ส่วนตำแหน่ง DYF403S1b นั้น ไม่พบการกลายพันธุ์ในกลุ่มตัวอย่างนี้

3. อัตราการกลายพันธุ์ของชายชาวไทยที่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือด

- ตำแหน่ง DYF399S1 มีอัตราการกลายพันธุ์เท่ากับ 6.67×10^{-2} ต่อตำแหน่งต่อรุ่น
- ตำแหน่ง DYF403S1a มีอัตราการกลายพันธุ์เท่ากับ 2.00×10^{-2} ต่อตำแหน่งต่อรุ่น
- ไม่พบการกลายพันธุ์ในตำแหน่ง DYF403S1b

4. อายุของพ่อขณะให้กำเนิดลูกชาย

- ค่า median อายุของพ่อขณะให้กำเนิดลูกชายที่พบการกลายพันธุ์มีค่าเท่ากับ 42
- ค่า median อายุของพ่อขณะให้กำเนิดลูกชายที่ไม่พบการกลายพันธุ์มีค่าเท่ากับ 29

5.1 ข้อจำกัดและข้อเสนอแนะ

1. การแยกขนาด PCR product และติดตามสารเรืองแสงด้วย CE สามารถใช้ในการศึกษาการกลายพันธุ์ของ DYF399S1 และ DYF403S1a/b ระหว่างคู่พ่อและลูกชายได้ดี แต่เทคนิคนี้ยังคงมีข้อจำกัดไม่สามารถแปลผลการศึกษาในระดับลำดับเบสได้ ทำให้ในตัวอย่างคู่ที่ F147/S147 ที่พบการกลายพันธุ์บนตำแหน่ง DYF399S1 ซึ่งปรากฏพีคจำนวน 1 พีค ไม่สามารถแปลผลได้ว่าเป็นการพบ multi-copy marker ที่มีขนาดเท่ากัน 3 copies หรือตำแหน่งนี้พบแค่เพียง 1 copy เท่านั้น ดังนั้นจึงอาจจะต้องใช้เทคนิคการวิเคราะห์อื่นๆ เพื่อตอบคำถามนี้

2. เนื่องจากในการศึกษาการกลายพันธุ์ของคู่พ่อและลูกชายใช้ดีเอ็นเอที่อยู่บน FTA card ซึ่งมีข้อจำกัดในการนำไปวัดปริมาณ DNA ตั้งต้นก่อนนำไปทำปฏิกิริยา PCR ได้ ทำให้ไม่ทราบได้ว่าปริมาณ DNA ที่อยู่บน FTA card มีอยู่เท่าใด ดังนั้นในการศึกษาในอนาคตควรเลือกใช้ตัวอย่างที่สามารถวัดปริมาณ DNA ตั้งต้นได้

5.2 Future study

ศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับอายุของพ่อขณะให้กำเนิดลูกชายเพื่อให้ได้ค่าอัตราการกลายพันธุ์ที่เหมาะสมและแม่นยำต่อการนำไปใช้ในกลุ่มช่วงอายุนั้นๆ

บรรณานุกรม

1. Butler JM. Chapter 16 - Lineage Markers: Y Chromosome and mtDNA Testing. In: Butler JM, editor. Fundamentals of Forensic DNA Typing. San Diego: Academic Press; 2010. p. 363-96.
2. Butler JM. Chapter 13 - Y-Chromosome DNA Testing. In: Butler JM, editor. Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology. San Diego: Academic Press; 2012. p. 371-403.
3. Ballantyne KN, Ralf A, Aboukhalid R, Achakzai NM, Anjos MJ, Ayub Q, et al. Toward Male Individualization with Rapidly Mutating Y-Chromosomal Short Tandem Repeats. Human Mutation. 2014;35(8):1021-32.
4. บุชบา ฤกษ์อำนาจโชค. วิทยาการก้าวหน้าด้านนิติวิทยาศาสตร์ Recent Advance in Forensic Genetics. กรุงเทพมหานคร: บริษัท ปิยอนต์ เอ็นเทอร์ไพรซ์ จำกัด; 2561.
5. Butler JM. Chapter 15 - Lineage Marker Statistics. In: Butler JM, editor. Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Interpretation. San Diego: Academic Press; 2015. p. 403-44.
6. สุรินทร์ ปะโชคณากุล. Chapter 8 - เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์. เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2552. p. 128-44.
7. Butler JM. Chapter 8 - Short Tandem Repeat Markers. In: Butler JM, editor. Fundamentals of Forensic DNA Typing. San Diego: Academic Press; 2010. p. 147-73.
8. Biostatistics University of Washington. STR introduction. [Powerpoint slides]. n.d. [29 August 2022]. Available from: <https://si.biostat.washington.edu/sites/default/files/modules/2.1%20STR%20Introduction.pdf>.
9. Fan H, Chu JY. A Brief Review of Short Tandem Repeat Mutation. Geno Prot Bioinfo. 2007;5(1):7-14.
10. Clark DP, Pazdernik NJ, McGehee MR. Genes, Genomes, and DNA. Elsevier Inc; 2019. p. 106-8.
11. Sehn JK. Insertions and Deletions (Indels). In: Kulkarni S, Pfeifer J, editors. Clinical Genomics: Elsevier Inc.; 2015. p. 133.

12. Karls AC. Alternation of Gene Expression. In: Maloy S, Hughes K, editors. *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)*. San Diego: Academic Press; 2013. p. 92-6.
13. Hadi S. Analysis of Rapidly Mutating Y Chromosome Short Tandem Repeats (RM Y-STRs). In: Goodwin W, editor. *Forensic DNA typing protocols*. 2nd ed. New York: Springer Science+Business Media; 2016. p. 201-12.
14. Ballantyne KN, Goedbloed M, Fang R, Schaap O, Lao O, Wollstein A, et al. Mutability of Y-Chromosomal Microsatellites: Rates, Characteristics, Molecular Bases, and Forensic Implications. *The American Journal of Human Genetics*. 2010;87:341-53.
15. Fu J, Cheng J, Wei C, Khan MA, Jin Z, Fu J. Assessing 23 Y-STR loci mutation rates in Chinese Han father-son pairs from southwestern China. *Mol Biol Rep*. 2020;47(10):7755-60.
16. Ballantyne KN, Keerl V, Wollstein A, Choi Y, Zuniga SB, Ralf A, et al. A new future of forensic Y-chromosome analysis: Rapidly mutating Y-STRs for differentiating male relatives and paternal lineages. *Forensic Science International: Genetics*. 2012;6:208-18.
17. Lee EY, Lee HY, Kwon SY, Oh YN, Yang WI, Shin KJ. A multiplex PCR system for 13 RM Y-STRs with separate amplification of two different repeat motif structures in DYF403S1a. *Forensic Science International: Genetics*. 2017;26:85-90.
18. Adnan A, Ralf A, Rakha A, Kousouri N, Kayser M. Improving empirical evidence on differentiating closely related men with RM Y-STRs: A comprehensive pedigree study from Pakistan. *Forensic Science International: Genetics*. 2016;25:45-51.
19. Chen Y, Zhou W, Li M, Li Y, Huang L, Jiang L, et al. Mutation rates of 13 RM Y-STRs in a Han population from Shandong province, China. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 2017;6:e346-e8.
20. Javed F, Sumbal S, Shafique M, Shahid AA, Shahzadi A, Rani N, et al. Male individualization using 12 rapidly mutating Y-STRs in Araein ethnic group and shared paternal lineage of Pakistani population. *International Journal of Legal Medicine*. 2018;132:1621-4.
21. Zhang W, Xiao C, Yu J, Wei T, Liao F, Wei W, et al. Multiplex assay development and mutation rate analysis for 13 RM Y-STRs in Chinese Han population. *Int J Legal Med*. 2017;131:345-50.

22. Zgonjanin D, Alghafri R, Almheiri R, Antov M, Toljic D, Vukovic R, et al. Mutation rate at 13 rapidly mutating Y-STR loci in the population of Serbia. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 2017;6:e377-e9.
23. Rakha A, Oh YN, Lee HY, Hussain A, Waryah AM, Adnan A, et al. Discriminating power of rapidly mutating Y-STRs in deep rooted endogamous pedigrees from Sindhi population of Pakistan. *Legal Medicine*. 2018;34:17-20.
24. Wang Q, Jin B, An G, Zhong Q, Chen M, Luo X, et al. Rapidly mutating Y-STRs study in Chinese Yi population. *International Journal of Legal Medicine*. 2019;133:45-50.
25. Yuan L, Chen W, Zhao D, Li Y, Hao S, Liu Y, et al. Mutation analysis of 13 RM Y-STR loci in Han population from Beijing of China. *International Journal of Legal Medicine*. 2019;133:59-63.
26. Thermo Fisher Scientific Inc. DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis. 2014 [29 August 2022]. Available from: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4474504.pdf>.
27. Rebała K, Branicki W, Pawłowski R, Spólnicka M, Kupiec T, Parys-Proszek A, et al. Recommendations of the Polish Speaking Working Group of the International Society for Forensic Genetics on forensic Y chromosome typing. *Arch Med Sadowej Kryminol*. 2020;70(1):1-18.
28. O'Conner KL. Interpretation of DNA Typing Results for Kinship Analysis. [Powerpoint slides]. 2011 [29 August 2022]. Available from: https://strbase.nist.gov/pub_pres/OConnor_USCIS_interpretation%20of%20DNA.pdf.
29. YHRD. Y-STR Kinship-Index Calculation n.d. [13 February 2022]. Available from: <https://yhrd.org/kinship>.
30. Family Tree DNA Learning Center. Y-DNA Step Mutations Houston2001 [22 July 2022]. Available from: <https://learn.familytreedna.com/y-dna-testing/y-str/one-step-mutation-two-step-mutation-etc/>.
31. สุรินทร์ ปะโชคณากุล. Chapter 4 - PCR : ทฤษฎีและการประยุกต์. เครื่องหมายดีเอ็นเอ : จากพื้นฐานสู่การประยุกต์ กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2552. p. 46-59.
32. Coble MD. Stutter. [Powerpoint slides]. 2010 [29 August 2022]. Available from: <https://strbase.nist.gov/mixture/4%20-%20Stutter.pdf>.
33. Butler J, Decker A, Kline M, Vallone P. Chromosomal Duplications Along the Y-

Chromosome and Their Potential Impact on Y-STR Interpretation. J Forensic Sci. 2005;50(4):853-9.

34. GE Health care Life Sciences. FTA cards manual (Data file 28-9843-54 AA) 2011. 6 May 2021:[1-4 pp.]. Available from:

<https://www.lobov.com.ar/downloads/FTA%20Cards2.pdf>.



ภาคผนวก

ตารางที่ 11 allele ของตัวอย่างคู่พ่อและลูกชายชาวไทยจำนวน 150 คู่

ลำดับ	รหัส ตัวอย่าง	DYF399S1				DYF403S1a			DYF403S1b	
		Allele1	Allele2	Allele3	Allele4	Allele1	Allele2	Allele3	Allele1	Allele2
1	F001	21	23	29.1		13	14	16	55	
	S001	21	23	29.1		13	14	16	55	
2	F002	21	23	30.1		13	14	15	53	
	S002	21	23	30.1		13	14	15	53	
3	F003	21				9	12	14	47	
	S003	21				9	12	14	47	
4	F004	20	22.1	25		14	14	16	53	
	S004	20	22.1	25		14	14	16	53	
5	F005	21	22	25.1		11	14		54	
	S005	21	22	25.1		11	14		54	
6	F006	24.1				11	13	15	52	
	S006	24.1				11	13	15	52	
7	F007	21	23			12	14	15	48	
	S007	21	23	24		12	14	15	48	
8	F008	21	25	26.1		11	12	14	51	
	S008	20	25	26.1		11	12	14	51	
9	F009	21	22	24.1		12	13	14	51	
	S009	21	22	24.1		12	13	14	51	
10	F010	19	24	27.1		11	11	14	52	
	S010	19	24	27.1		11	11	14	52	
11	F011	20	22	24.1		13	15	17	56	
	S011	20	22	24.1		13	15	17	56	
12	F012	24	24	25.1		12	12	16	49	
	S012	24	24	25.1		12	12	16	49	
13	F013	20	24	24.1		11	12	14	51	
	S013	20	24	24.1		11	12	14	51	
14	F014	22	23.1	25		12	14	20	56	

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง	DYF399S1				DYF403S1a			DYF403S1b	
		Allele1	Allele2	Allele3	Allele4	Allele1	Allele2	Allele3	Allele1	Allele2
	S014	22	23.1	25		12	14	20	56	
15	F015	20	23	24.1		12	13	17	54	
	S015	20	23	24.1		12	13	17	54	
16	F016	22	22.1	23		10	12	14	51	
	S016	22	22.1	23		10	12	14	51	
17	F017	21	25	25.1		11	13	14	52	
	S017	21	25	25.1		11	13	14	52	
18	F018	20	22	28.1		10	12	13.1	57	
	S018	20	22	28.1		10	12	13.1	57	
19	F019	20				11	13	15	52	
	S019	20				11	13	15	52	
20	F020	21	24.1	25		13	14	15	54	
	S020	21	24.1	25		13	14	15	54	
21	F021	20	22.1	24		10	11	13	53	
	S021	20	22.1	24		10	11	13	53	
22	F022	19	25.1	26.1		12	17	18	47	
	S022	19	25.1	26.1		12	17	18	47	
23	F023	21	21.1	23		11	15	16	54	
	S023	21	21.1	23		11	12	16	54	
24	F024	19	22.1	25		11	12	14	53	
	S024	19	22.1	25		11	12	14	53	
25	F025	20	24	24.1		10	13	14	50	
	S025	20	24	24.1		10	13	14	50	
26	F026	21	25	26.1		11	14	15	50	
	S026	21	25	26.1		11	14	15	50	
27	F027	22				11	13	14	55	
	S027	22				11	13	14	55	
28	F028	21	21	24.1		11	14	18	49	
	S028	21	21	24.1		11	14	18	49	
29	F029	20	21	23	26.1	13	14	16	51	

ลำดับ	รหัส ตัวอย่าง	DYF399S1				DYF403S1a			DYF403S1b	
		Allele1	Allele2	Allele3	Allele4	Allele1	Allele2	Allele3	Allele1	Allele2
	S029	20	21	23	26.1	13	14	16	51	
30	F030	21	22	23.1		12	14	15	51	
	S030	21	22	23.1		12	14	15	51	
31	F031	20	24	25.1		10	11	15	49	
	S031	20	24	25.1		10	11	16	49	
32	F032	21	22.1	23		10	14	17	50	
	S032	21	22.1	23		10	14	17	50	
33	F033	20	22	24		11	11	13.1	49	
	S033	20	22	25		11	12	13.1	49	
34	F034	19	23.1	24		12	13	15	49	
	S034	19	23.1	24		12	13	15	49	
35	F035	20	24.1	26		11	12	15	48	
	S035	20	24.1	26		11	12	15	48	
36	F036	22	24	24.1		13	14	15	50	
	S036	22	24	24.1		13	14	15	50	
37	F037	20	22	24.1		11	13	15	52	
	S037	20	22	24.1		11	13	15	52	
38	F038	20	23	24.1		12	14	17	48	
	S038	20	23	24.1		12	14	17	48	
39	F039	20	22	25.1		16	16	17.2	50	
	S039	20	22	25.1		16	16	17.2	50	
40	F040	19	20.1	26		14	16	18	52	
	S040	19	20.1	26		14	16	18	52	
41	F041	23	24	24.1		12	14	15	53	
	S041	23	24	24.1		12	14	15	53	
42	F042	20	23	24.1		12	12	14	51	
	S042	20	23	24.1		12	12	14	51	
43	F043	20	23	24.1		12	16	17	51	
	S043	20	23	24.1		12	16	17	51	
44	F044	20	24	25.1		11	12	14	50	

ลำดับ	รหัส ตัวอย่าง	DYF399S1				DYF403S1a			DYF403S1b	
		Allele1	Allele2	Allele3	Allele4	Allele1	Allele2	Allele3	Allele1	Allele2
	S044	20	24	25.1		11	12	14	50	
45	F045	22	22.1	25		13	13	16	53	
	S045	22	22.1	25		13	13	16	53	
46	F046	22	24.1	27		14	15	16	55	
	S046	22	24.1	27		14	15	16	55	
47	F047	23.1	24	26		12	12	13	51	
	S047	23.1	24	26		12	12	13	51	
48	F048	23	24	27.1		13	14	17	54	
	S048	23	24	27.1		13	14	17	54	
49	F049	19	23.1	27		13	14	15	51	
	S049	19	23.1	27		13	14	15	51	
50	F050	24	25.1			12	12	18	51	
	S050	24	25.1			12	12	18	51	
51	F051	24.1	26			15	16	17	53	
	S051	24.1	26			15	16	17	53	
52	F052	21	22	24	24.1	12	15	17	55	
	S052	21	22	24	24.1	12	15	17	55	
53	F053	22	22.1	26		10	15	17	53	
	S053	22	22.1	26		10	15	17	53	
54	F054	22	22	25.1		11	13	14	51	
	S054	22	22	25.1		11	13	14	51	
55	F055	22	23.1	24		12	17	18	48	
	S055	22	23.1	24		12	17	18	48	
56	F056	22	22.1	23	24.1	13	13	15	56	
	S056	22	22.1	23	24.1	13	13	15	56	
57	F057	21.1	22	23		12	15	17	50	
	S057	21.1	22	23		12	15	17	50	
58	F058	22	22.1	24		10	14	15	50	
	S058	22	22.1	24		10	14	15	50	
59	F059	20	22	26.1		13	15	16	59	

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง	DYF399S1				DYF403S1a			DYF403S1b	
		Allele1	Allele2	Allele3	Allele4	Allele1	Allele2	Allele3	Allele1	Allele2
	S059	20	22	26.1		13	15	16	59	
60	F060	23	24	24.1		8	13	14	45	
	S060	23	24	24.1		8	13	14	45	
61	F061	18	22	22		13	15	17	45	
	S061	18	22	22		13	15	17	45	
62	F062	22	24	24.1		12	14		55	
	S062	22	24	24.1		12	14		55	
63	F063	17.2	23	24.1		13	14	15	45	
	S063	17.2	23	24.1		13	14	15	45	
64	F064	20	23	24.1		13	14	15	45	
	S064	20	23	24.1		13	14	15	45	
65	F065	21.1				9	12	14	48	
	S065	21.1				9	12	14	48	
66	F066	24.1				8	13	16	50	
	S066	24.1				8	13	16	50	
67	F067	21	23	25.1		11	17	18	51	
	S067	21	23	25.1		11	17	18	51	
68	F068	20	25	27.1		14	15	17	56	
	S068	20	25	27.1		14	15	17	56	
69	F069	18	24.1	25		14	15.3	16	54	
	S069	18	24.1	25		14	15.3	16	54	
70	F070	21	25	26.1		12	14	16	51	
	S070	21	25	26.1		12	14	16	51	
71	F071	21	21.1	24		13	15		52	
	S071	21	21.1	24		13	15		52	
72	F072	20.1	24			9	15	18	51	
	S072	20.1	24			9	15	18	51	
73	F073	20	24	24.1		13	15	16	52	
	S073	20	24	24.1		13	15	16	52	
74	F074	22	23.1	24.1		11	13	16	45	

ลำดับ	รหัส ตัวอย่าง	DYF399S1				DYF403S1a			DYF403S1b	
		Allele1	Allele2	Allele3	Allele4	Allele1	Allele2	Allele3	Allele1	Allele2
	S074	22	23.1	24.1		11	13	16	45	
75	F075	21	21.1	25		13	14		54	
	S075	21.1	22	25		13	14		54	
76	F076	24	24	24.1		11	13	14	53	
	S076	24	24	24.1		11	13	14	53	
77	F077	21	23	24.1		12	12	18	50	
	S077	21	23	24.1		12	12	18	50	
78	F078	20	22.1	25		12	12	16	57	
	S078	20	22.1	25		12	12	16	57	
79	F079	22.1	23	26		11	12		51	
	S079	22.1	23	26		11	12		51	
80	F080	21	26	27.1		12	13	18	52	
	S080	21	26	28.1		12	13	18	52	
81	F081	22	23.1	27		13	17	18	48	
	F081	22	23.1	27		13	17	18	48	
82	F082	24	24	24.1		11	13	14	51.2	
	S082	23	24	24.1		11	13	14	51.2	
83	F083	18	23.1	24		14	15.3	16	53	
	S083	18	23.1	24		14	15.3	16	53	
84	F084	20	22	26.1		12	12	14	51	
	S084	20	22	26.1		12	12	14	51	
85	F085	20.1	23	24		13	15	18	48.1	
	S085	20.1	23	24		13	15	18	48.1	
86	F086	22	24	25.1		11	13		52	
	S086	22	24	25.1		11	13		52	
87	F087	19	22	24.1		12	13	15	52	
	S087	19	22	24.1		12	13	15	52	
88	F088	22.1	23	26		13	13	15	52	
	S088	22.1	23	26		13	13	15	52	
89	F089	19	23.1	25		10	12	17	48	

ลำดับ	รหัส ตัวอย่าง	DYF399S1				DYF403S1a			DYF403S1b	
		Allele1	Allele2	Allele3	Allele4	Allele1	Allele2	Allele3	Allele1	Allele2
	S089	20	23.1	25		10	12	17	48	
90	F090	22	22	24.1		10	12	18	50	
	S090	22	22	24.1		10	12	18	50	
91	F091	20	24	26.1		13	14	16	50	
	S091	20	24	27.1		13	14	16	50	
92	F092	20	24	26.1		12	14	15	50	
	S092	20	24	26.1		12	14	15	50	
93	F093	22	23	24.1		12	13	14	50	
	S093	22	23	24.1		12	13	14	50	
94	F094	25.1				13	14		50	
	S094	25.1				13	14		50	
95	F095	21	23.1	24		13	14		51	53
	S095	21	23.1	24		13	14		51	53
96	F096	25	25.1			12	13	14	53	
	S096	25	25.1			12	13	14	53	
97	F097	22	24	24.1		13	14	17	50	
	S097	22	24	24.1		13	14	17	50	
98	F098	18	24.1	29.1		12	14	17	49	
	S098	18	24.1	29.1		12	14	17	49	
99	F099	19	22.1	26.2		9	13	14	50	
	S099	19	22.1	26.2		9	13	14	50	
100	F100	16	22.2	24		12	13	15	53	
	S100	16	22.2	24		12	13	15	53	
101	F101	22	24	24.1		12	17		47	
	S101	22	24	25.1		12	17		47	
102	F102	21	23	24	26.1	13	14	18	49	
	S102	21	23	24	26.1	13	14	18	49	
103	F103	20	24	25.1		11	14	17	52	
	S103	20	24	25.1		11	14	17	52	
104	F104	20	23	25.1		11	13		51	

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง	DYF399S1				DYF403S1a			DYF403S1b	
		Allele1	Allele2	Allele3	Allele4	Allele1	Allele2	Allele3	Allele1	Allele2
	S104	20	23	25.1		11	13		51	
105	F105	23	24	24.1		12	16	18	47	
	S105	23	24	24.1		12	16	18	47	
106	F106	21	22	23.1		8	13	14	50	
	S106	21	22	23.1		8	13	14	50	
107	F107	20	21	24.1		12	17	20	49	
	S107	20	21	24.1		12	17	20	49	
108	F108	21	24	24.1		13	13	17	53	
	S108	21	24	24.1		13	13	17	53	
109	F109	21	23	28.1		10	15	17	59	
	S109	21	23	28.1		10	15	17	59	
110	F110	18	24	25.1		12	14	15	54	
	S110	18	24	25.1		12	14	15	54	
111	F111	18	25.1	29		15.3	16		53	
	S111	18	25.1	29		15	15.3	16	53	
112	F112	18	22	24.1		12	12	17	50	
	S112	18	22	24.1		12	12	17	50	
113	F113	21	24	25.1		12	12	14	50	
	S113	21	24	25.1		12	12	14	50	
114	F114	22	23	25.1		11	12	15	48.1	
	S114	22	23	25.1		11	12	15	48.1	
115	F115	20	23	24.1		11	12	14	51	
	S115	20	23	24.1		11	12	14	51	
116	F116	20	23	27.1		11	14	15	52	
	S116	20	23	27.1		11	14	15	52	
117	F117	21.1	22	23		13	14	17	52	
	S117	21.1	22	23		13	14	17	52	
118	F118	21	21	25.1		9	14		52	
	S118	21	21	25.1		9	14		52	
119	F119	21	22	27.1		12	13		51	

ลำดับ	รหัส ตัวอย่าง	DYF399S1				DYF403S1a			DYF403S1b	
		Allele1	Allele2	Allele3	Allele4	Allele1	Allele2	Allele3	Allele1	Allele2
	S119	21	22	27.1		12	13		51	
120	F120	23	23	24.1		11	13	14	50	
	S120	23	23	24.1		11	13	14	50	
121	F121	20	22	27.1		13	13	14	49	
	S121	20	22	27.1		13	13	14	49	
122	F122	18	24	26.1		12	15	16	55	
	S122	18	24	26.1		12	15	16	55	
123	F123	21.1	24	26.2		12	15	18	48	
	S123	21.1	24	26.2		12	15	18	48	
124	F124	19	24.1	26		12	13	14	51	
	S124	19	24.1	26		12	13	14	51	
125	F125	22	22	24.1		13	17	18	51	
	S125	22	22	24.1		13	17	18	51	
126	F126	20	24	24.1		13	14	15	51	
	S126	20	24	24.1		13	14	15	51	
127	F127	21	22	24.1		12	15	19	47	
	S127	21	22	24.1		12	15	19	47	
128	F128	21	24	24.1		11	13.1	16	52	
	S128	21	24	24.1		11	13.1	16	52	
129	F129	19	24	25.1		14	15	16	50	
	S129	19	24	25.1		14	15	16	50	
130	F130	19	24	24.1		11	13		51	
	S130	19	24	24.1		11	13		51	
131	F131	22	22	26.1		12	18	19	48	
	S131	22	22	26.1		12	18	19	48	
132	F132	22	23	26.1		13	17	22	51	
	S132	22	23	26.1		13	17	22	51	
133	F133	23.1				12	13		51	
	S133	23.1				12	13		51	
134	F134	23	23.1	24.1		12	13	15	53	

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง	DYF399S1				DYF403S1a			DYF403S1b	
		Allele1	Allele2	Allele3	Allele4	Allele1	Allele2	Allele3	Allele1	Allele2
	S134	23	23.1	24.1		12	13	15	53	
135	F135	21	25	25.1		13	14	16	54	
	S135	21	25	25.1		13	14	16	54	
136	F136	20	24	27.1		13	14	18	49	
	S136	20	24	27.1		13	14	18	49	
137	F137	22	23.1	23.2		13	13	16	47	
	S137	22	23.1	23.2		13	13	16	47	
138	F138	23	25	26.1		13	14	17	49	
	S138	23	25	26.1		13	14	17	49	
139	F139	20	24	25.1		9	13	15	50	
	S139	20	24	25.1		9	13	15	50	
140	F140	21	22.1	23		13	13	14	51	
	S140	21	22.1	23		13	13	14	51	
141	F141	20.1	21	21		11	14	17	50	
	S141	20.1	21	21		11	14	17	50	
142	F142	18	25	26.1		15.3	16	17	52	
	S142	18	25	26.1		15.3	16	17	52	
143	F143	18	24	25.1		16	16	17	56	
	S143	18	24	25.1		16	16	17	56	
144	F144	21	22	25.1		12	17	18	51	
	S144	21	22	25.1		12	17	18	51	
145	F145	19	23	24.1		13	15		59	
	S145	19	23	24.1		13	15		59	
146	F146	20	23	23.1		14	14	17	53	
	S146	20	23	23.1		14	14	17	53	
147	F147	26.1				9	13		48	
	S147	27.1				9	13		48	
148	F148	21	24.1	25		12	17		52	
	S148	21	24.1	25		12	17		52	
149	F149	20	21	24.1		11	13	14	51	

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง	DYF399S1				DYF403S1a			DYF403S1b	
		Allele1	Allele2	Allele3	Allele4	Allele1	Allele2	Allele3	Allele1	Allele2
	S149	20	21	24.1		11	13	14	51	
150	F150	21.1				9	12.1	13	47	
	S150	21.1				9	12.1	13	47	

ตารางที่ 12 ตารางแสดงอายุของพ่อขณะให้กำเนิดลูกชาย

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง	อายุของพ่อ ขณะที่ลูกชายเกิด
1	F001	32
2	F002	27
3	F003	*
4	F004	19
5	F005	24
6	F006	23
7	F007	46
8	F008	26
9	F009	*
10	F010	31
11	F011	24
12	F012	49
13	F013	*
14	F014	34
15	F015	27
16	F016	19
17	F017	30
18	F018	34
19	F019	18
20	F020	39

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง	อายุของพ่อ ขณะที่ลูกชายเกิด
21	F021	41
22	F022	21
23	F023	22
24	F024	25
25	F025	32
26	F026	*
27	F027	*
28	F028	32
29	F029	33
30	F030	94
31	F031	41
32	F032	24
33	F033	28
34	F034	17
35	F035	42
36	F036	33
37	F037	56
38	F038	29
39	F039	*
40	F040	36
41	F041	20
42	F042	36
43	F043	35
44	F044	22
45	F045	29
46	F046	*
47	F047	29
48	F048	69

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง	อายุของพ่อ ขณะที่ลูกชายเกิด
49	F049	25
50	F050	*
51	F051	36
52	F052	36
53	F053	*
54	F054	46
55	F055	26
56	F056	57
57	F057	*
58	F058	41
59	F059	27
60	F060	22
61	F061	24
62	F062	17
63	F063	35
64	F064	*
65	F065	24
66	F066	*
67	F067	25
68	F068	16
69	F069	31
70	F070	57
71	F071	19
72	F072	34
73	F073	*
74	F074	19
75	F075	*
76	F076	43

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง	อายุของพ่อ ขณะที่ลูกชายเกิด
77	F077	*
78	F078	49
79	F079	28
80	F080	*
81	F081	38
82	F082	*
83	F083	33
84	F084	30
85	F085	19
86	F086	*
87	F087	24
88	F088	*
89	F089	43
90	F090	*
91	F091	38
92	F092	25
93	F093	*
94	F094	*
95	F095	34
96	F096	28
97	F097	*
98	F098	25
99	F099	*
100	F100	20
101	F101	*
102	F102	35
103	F103	*
104	F104	*

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง	อายุของพ่อ ขณะที่ลูกชายเกิด
105	F105	*
106	F106	28
107	F107	18
108	F108	41
109	F109	32
110	F110	26
111	F111	26
112	F112	25
113	F113	38
114	F114	*
115	F115	*
116	F116	*
117	F117	*
118	F118	26
119	F119	*
120	F120	33
121	F121	72
122	F122	46
123	F123	*
124	F124	34
125	F125	24
126	F126	17
127	F127	22
128	F128	29
129	F129	41
130	F130	29
131	F131	22
132	F132	*

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง	อายุของพ่อ ขณะที่ลูกชายเกิด
133	F133	*
134	F134	*
135	F135	*
136	F136	*
137	F137	*
138	F138	*
139	F139	*
140	F140	*
141	F141	29
142	F142	*
143	F143	*
144	F144	33
145	F145	*
146	F146	*
147	F147	53
148	F148	35
149	F149	*
150	F150	*

หมายเหตุ * แทนตัวอย่างที่ไม่มีข้อมูลอายุของพ่อขณะให้กำเนิดลูกชาย

ตารางที่ 13 ผลการทดสอบเปรียบเทียบโอกาสการเกิด one-step mutation ต่อ multistep mutation ด้วย Binomial test ที่ค่าความเชื่อมั่นเท่ากับ 95%

Binomial Test						
		Category	N	Observed Prop.	Test Prop.	Exact Sig. (2-tailed)
mutation	Group 1	One-step mutation	13	1.00	.50	<.001
	Total		13	1.00		

โอกาสที่จะเกิด one-step mutation มีมากกว่าโอกาสเกิด multistep mutation อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p\text{-value} < 0.001$

ตารางที่ 14 ผลการทดสอบเปรียบเทียบโอกาสการพบ repeat loss ต่อ repeat gain ของตำแหน่ง DYF399S1 ด้วย Binomial test ที่ค่าความเชื่อมั่นเท่ากับ 95%

Binomial Test						
		Category	N	Observed Prop.	Test Prop.	Exact Sig. (2-tailed)
mutation	Group 1	repeat loss	3	.30	.50	.344
	Group 2	repeat gain	7	.70		
	Total		10	1.00		

โอกาสที่จะพบ repeat loss กับ repeat gain ของตำแหน่ง DYF399S1 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p\text{-value} = 0.344$

ตารางที่ 15 ผลการทดสอบเปรียบเทียบโอกาสการพบ repeat loss ต่อ repeat gain ของตำแหน่ง DYF403S1a ด้วย Binomial test ที่ค่าความเชื่อมั่นเท่ากับ 95%

Binomial Test						
		Category	N	Observed Prop.	Test Prop.	Exact Sig. (2-tailed)
mutation	Group 1	repeat loss	1	.33	.50	1.000
	Group 2	repeat gain	2	.67		
	Total		3	1.00		

โอกาสที่จะพบ repeat loss กับ repeat gain ของตำแหน่ง DYF403S1a ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ p-value = 1.000



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	พิมพ์พิศมัย แวดอน
วัน เดือน ปี เกิด	19 มกราคม 2538
สถานที่เกิด	นครสวรรค์
วุฒิการศึกษา	- วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร จังหวัดนครปฐม - โรงเรียนสิรินธรราชวิทยาลัย จังหวัดนครปฐม
ที่อยู่ปัจจุบัน	196/33 หมู่ 1 ตำบลนครสวรรค์ตก อำเภอเมือง จังหวัดนครสวรรค์ 60000
ผลงานตีพิมพ์	การศึกษาการกลายพันธุ์บนตำแหน่ง DYF399S1 ในชายไทยที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางสายเลือด (งานประชุมวิชาการบัณฑิตศึกษาระดับชาติ ครั้งที่ 11 เรื่อง วิจัยและนวัตกรรมเพื่อเตรียมพร้อมรับการเปลี่ยนแปลง”)