

การศึกษาอัตราการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย Y-STR ที่กลายพันธุ์รวดเร็วจำนวน 4 ตำแหน่งในคู่  
บิดาและบุตรชายไทย



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์  
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2565  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A study of 4 rapidly mutating Y-STR (RM Y-STR) mutation in Thai father-son pairs



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 2022

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาอัตราการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย Y-STR ที่ กลายพันธุ์รวดเร็วจำนวน 4 ตำแหน่งในคู่บิดาและบุตร ชาวไทย
โดย	น.ส.สมลวรรณ โชติกรณ์
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ นายแพทย์กรเกียรติ วงศ์ไพศาลสิน

---

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของ  
การศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์  
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉันทชาย สิทธิพันธุ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(ศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิงวิไล ชินธเนศ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์กรเกียรติ วงศ์ไพศาลสิน)

..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.วิไล อโนมะศิริ)

..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เจริญชัย พุดมปัญญาเลิศ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อจิรภาส พันธัย)

ฉนวนวรรณ โชติภรณ์ : การศึกษาอัตราการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย Y-STR ที่กลายพันธุ์รวดเร็ว  
จำนวน 4 ตำแหน่งในคู่บิดาและบุตรชายไทย. ( A study of 4 rapidly mutating Y-STR (RM Y-  
STR) mutation in Thai father-son pairs) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. นพ.กรเกียรติ วงศ์ไพศาลสิน

Y- chromosomal short tandem repeat (Y-STR) เป็นเครื่องหมาย DNA ที่ใช้ในการตรวจสอบความสัมพันธ์ทางสายบิดาและตรวจหาสารพันธุกรรมของเพศชายในคดีความผิดทางเพศ แต่อย่างไรก็ตาม หากเป็นคดีความผิดทางเพศที่ผู้กระทำความผิดเป็นสมาชิกเพศชายที่ใกล้ชิดกัน ชุดน้ำยา Y-STR ในปัจจุบันซึ่งมีอัตราการกลายพันธุ์ที่ต่ำถึงปานกลาง จะไม่สามารถระบุบุคคลได้ว่าเป็นสมาชิกเพศชายคนใดในครอบครัว เครื่องหมาย DYF399S1, DYS547, DYF403S1a และ DYS612 เป็นเครื่องหมาย Y-STR ที่มีอัตราการกลายพันธุ์ที่สูง จึงเรียกว่า Rapidly Mutating (RM) Y-STR โดยอัตราการกลายพันธุ์ของเครื่องหมายทั้ง 4 ในกลุ่มประชากรไทยยังต้องการการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อยืนยันว่าเครื่องหมายเหล่านี้มีอัตราการกลายพันธุ์ที่สูงในกลุ่มประชากรไทยและสามารถนำข้อมูลการกลายพันธุ์ที่ได้ไปต่อยอดการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแฮปโลไทป์ของเครื่องหมายวาย (Y-haplotype diversity) ในประชากรไทยได้ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อคำนวณอัตราการกลายพันธุ์ของ RM Y-STR ทั้ง 4 เครื่องหมาย และเปรียบเทียบอัตราการกลายพันธุ์ที่ได้กับกลุ่มประชากรอื่น โดยใช้ตัวอย่างเลือดที่ถูกเก็บบนกระดาษ FTA ของคู่บิดาและบุตรชายไทยจำนวน 240 คู่ นำตัวอย่างมาทำให้บริสุทธิ์ เพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบใหม่และอ้างอิง และนำไปแยกตามขนาดด้วยเทคนิค Capillary Electrophoresis จากการทดลอง พบว่า อัตราการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย DYF399S1 เท่ากับ  $6.7 \times 10^{-2}$  ต่อตำแหน่งต่อเซลล์ต่อรุ่น และอัตราการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย DYF403S1a และ DYS612 เท่ากับ  $2.1 \times 10^{-2}$  ต่อตำแหน่งต่อเซลล์ต่อรุ่น จัดว่าเป็นตำแหน่งที่มีอัตราการกลายพันธุ์สูงและอัตราการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย DYS547 เท่ากับ  $4 \times 10^{-3}$  ต่อตำแหน่งต่อเซลล์ต่อรุ่น จัดว่าเป็นตำแหน่งที่กลายพันธุ์ปานกลางในกลุ่มประชากรไทย เมื่อเปรียบเทียบอัตราการกลายพันธุ์ที่ได้กับกลุ่มประชากรอื่น พบว่า แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 และเมื่อเปรียบเทียบอายุของบิดามีเครื่องหมายกลายพันธุ์กับไม่เกิดการกลายพันธุ์ พบว่า อายุบิดาแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ดังนั้น ข้อมูลที่ได้ในการศึกษานี้จะเป็นการเพิ่มข้อมูลของ RM Y-STR ในกลุ่มประชากรไทยและมีประโยชน์ต่อการคำนวณค่าทางสถิติทางด้านนิติพันธุศาสตร์ได้ในอนาคต

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ลายมือชื่อนิสิต .....

ปีการศึกษา 2565

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

# # 6370018730 : MAJOR MEDICAL SCIENCES

KEYWORD: Rapidly mutating (RM) Y-STRs Y-STR mutation Mutation rate

Tamonwan Chotikorn : A study of 4 rapidly mutating Y-STR (RM Y-STR) mutation in Thai father-son pairs. Advisor: Assoc. Prof. KORNKIAT VONGPHAISARNSIN, M.D.

Y-chromosomal short tandem repeats (Y-STRs) are common DNA markers frequently used in forensic fields to investigate paternal lineage and identify male perpetrators in cases of sexual assault. However, commercial Y-STR kits typically fail to differentiate in same lineage due to low to moderate mutation rate. DYF399S1, DYS547, DYF403S1a, and DYS612 were classified as rapidly mutating Y-STR (RM) in which different mutation rate occurs between ethnic groups. There is a lack of information RM Y-STR in Thailand, and the mutation rate of RM Y-STR needs to be reported to support Y-STR haplotype studies in the future. The present study was conducted to determine the mutation rate of four RM Y-STR candidates and compare mutation rate of Thai population with other population. This study included 240 blood samples of father and son pairs on FTA. One 1.2 mm disc of the FTA card was purified and amplified with a specific primer that qualifies for a validation test. After that, the amplicons size were separated via capillary electrophoresis and a DNA profile was generated by Gene Mapper Software. Then, the father's DNA profile was compared with offspring's profile and the mutation was directly determined by repeat unit changes. Finally, the mutation rate of four candidate markers was calculated. The mutation rate of DYF399S1 was  $6.7 \times 10^{-2}$  per locus per gamete per generation, making it the most highly mutated marker in this study. In addition, the mutation rate of DYF403S1a was  $2.1 \times 10^{-2}$  per locus per generation, while the mutation rate of DYS612 was also  $2.1 \times 10^{-2}$  per locus per gamete per generation. The mutation rate of DYS547 was  $4 \times 10^{-3}$  per locus per gamete per generation, making it moderately mutated in the Thai population. The mutation rates of these markers in the Thai population were different but not significantly ( $P_{\text{value}} = 0.05$ ). Furthermore, the father's age at the son's birth showed a significant difference ( $P_{\text{value}} = 0.003$ ). We hope the findings of this study will promote more research and eventually extend the body of RM Y-STRs population data.

Field of Study: Medical Sciences

Student's Signature .....

Academic Year: 2022

Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์นายแพทย์เกรียงดิ วงศ์ไพศาลสิน อาจารย์ที่ปรึกษาหลักของวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำปรึกษา แก้ไขตรวจสอบเล่มวิทยานิพนธ์ และคำแนะนำตลอดการทำงานวิจัยครั้งนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิงวิไล ชินธเนศ รองศาสตราจารย์ ดร. วิไล อโนมะศิริ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เจริญชัย พุฒิปัญญาเลิศ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อจิรภาส พันธัย ที่เป็นกรรมการสอบโครงสร้างและสอบป้องกันวิทยานิพนธ์และแก้ไขเล่มวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ พี่นักวิจัยประจำห้องปฏิบัติการนิติเซโรวิทยาทุกท่าน พี่นัท ที่ช่วยตรวจเล่มวิทยานิพนธ์ ให้คำแนะนำในการวางแผนการปฏิบัติวิจัย ตลอดจนการปรับตัว ให้กำลังใจ และ ให้คำแนะนำในการใช้ชีวิต พี่ปอม พี่แพท พี่นิ พี่วิน พี่ก๊วก และพี่ตี ที่ช่วยให้คำแนะนำและสอนใช้เครื่องมือต่างๆในห้องปฏิบัติการ ตลอดจนให้คำแนะนำต่างๆ

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการนิติเซโรวิทยาทุกท่าน พี่อัจฉรา และ พี่วรรณ ที่ช่วยให้คำแนะนำและสอนใช้เครื่องมือต่างๆในห้องปฏิบัติการ อนุเคราะห์เครื่องมือและสารเคมีเพื่อใช้ในการวิจัยนี้

ขอขอบคุณเพื่อนปริญญาตรีชีวเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รุ่นที่ 48 ที่ให้กำลังใจและพาไปผ่อนคลายด้วยการดูงานศิลปะ ดื่มกาแฟ รับฟังความเครียดที่ผู้วิจัยพูดให้ฟังเสมอ

ขอขอบคุณนักจิตวิทยา พี่หลา ใน ChulaStudentWellness ที่ให้คำปรึกษาปัญหาและรับฟังปัญหาความเครียดในระหว่างการคิดหัวข้อและทำวิทยานิพนธ์ และให้คำแนะนำ เพื่อให้ผู้วิจัยนำไปปรับใช้ต่อไป

ขอขอบคุณพี่บอล ผู้เชี่ยวชาญทางด้านโปรแกรม Gene Mapper ที่ช่วยให้คำแนะนำการใช้โปรแกรม การออกแบบการทดลองจนได้ผลที่สมบูรณ์แบบ และพี่อุ๊ Gene Plus ที่ส่งน้ำยาได้รวดเร็ว ทำให้ได้ผลการทดลองออกมาทันเวลา

ขอบคุณริเวอร์ซี้ดี สีพระยา และย่านตลาดน้อย ที่ให้ศิลปินมาโชว์ผลงานศิลปะดีๆ และมีห้องฟ้าก่อนพระอาทิตย์ตกดินที่สวยงามทุกวัน ทำให้ผู้วิจัยได้ชื่นชมและเอาตัวเองออกจากความเครียดได้ชั่วขณะ

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา น้องชาย และครอบครัว ผู้ให้การสนับสนุนทั้งเงินทุนในการเรียนต่อระดับบัณฑิตศึกษา ให้ความรัก แนวคิดในการรับมือกับชีวิต อยู่เคียงข้างและกำลังใจที่มีให้เสมอมา และสุดท้ายขอบคุณนายเนติภูมิ เลิศวรดิถก ที่คอยรับฟังปัญหา อยู่เคียงข้าง และให้กำลังใจเสมอ

ธมลวรรณ โชติกรรม

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูปภาพ.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 คำถามของงานวิจัย.....	2
1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
1.4 สมมติฐานของงานวิจัย.....	3
1.5 คำสำคัญ.....	3
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....	4
2.1 จีโนมของมนุษย์ (Human Genome).....	4
2.2 ไมโครแซตเทลไลท์ (Microsatellite).....	5
2.3 ประเภทของเครื่องหมาย STR.....	5
2.4 Autosomal DNA marker.....	6
2.5 Lineage Marker.....	7
2.6 Y-Chromosome.....	7
2.7 Y - Chromosomal Short Tandem Repeat (Y-STR).....	8
2.8 การกลายพันธุ์ (Mutation).....	9

2.9	ลักษณะของการกลายพันธุ์.....	10
2.10	สาเหตุของการกลายพันธุ์.....	10
2.11	กลไกการเกิดการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย STR.....	11
2.12	ระบบการซ่อมแซม DNA (DNA repair) ถูกทำลาย.....	12
2.13	การจัดระดับการกลายพันธุ์ของ Y-STR.....	14
2.14	Rapidly Mutating (RM) Y-STR.....	15
2.15	ปัจจัยทางโมเลกุลที่มีผลต่ออัตราการกลายพันธุ์.....	16
2.16	เกณฑ์ในการคัดเลือกเครื่องหมาย RM Y-STR ในงานวิจัยนี้.....	19
2.17	พันธุศาสตร์ประชากร (Population Genetics).....	21
2.18	การคำนวณค่าทางพันธุศาสตร์ประชากร.....	22
2.19	การคำนวณในงานนิติพันธุศาสตร์.....	23
2.20	การตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการทางนิติพันธุศาสตร์ในการศึกษา RM Y-STR ตำแหน่ง DYF399S1 DYS547 DYF403S1a และ DYS612.....	25
บทที่ 3	ระเบียบวิธีวิจัย.....	34
3.1	รูปแบบการทดลอง.....	34
3.2	รูปแบบการวิจัย (Research Design).....	34
3.3	ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology).....	35
3.3.1	ตัวแปรในงานวิจัย (Variable).....	35
3.3.1.1	ตัวแปรอิสระ (Independent Variable) คือ.....	35
3.3.1.2	ตัวแปรตาม (Dependent Variable) คือ.....	35
3.3.2	กลุ่มประชากรเป้าหมาย (Target population).....	35
3.3.2.1	เกณฑ์คัดเข้า (Inclusion criteria).....	35
3.3.2.2	เกณฑ์คัดออก (Exclusion criteria).....	35
3.3.3	การคำนวณขนาดตัวอย่าง (Sample size).....	35



3.4 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	36
3.4.1 การออกแบบไพรเมอร์ (Primer design).....	37
3.4.1.1 การทดสอบหาสภาวะ PCR reaction ที่เหมาะสมกับไพรเมอร์ที่ออกแบบและ อ้างอิง (Primer Test).....	38
3.4.1.2 ทดสอบความจำเพาะกับตัวอย่าง (Specificity Test).....	39
3.4.1.3 ทดสอบความไวในการเพิ่มจำนวน DNA (Sensitivity Test).....	40
3.4.2 การเตรียมตัวอย่างเลือดบนกระดาษ FTA.....	40
3.4.3 ทำตัวอย่างกระดาษ FTA ให้บริสุทธิ์ (FTA card Purification).....	41
3.4.4 เพิ่มจำนวนของชิ้นตัวอย่างในบริเวณที่สนใจด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR amplification) .....	41
3.4.4.1 ทำให้ PCR product บริสุทธิ์ด้วยชุด DyeEx 2.0.....	42
3.4.5 แยกขนาดของชิ้นตัวอย่างด้วยเทคนิค Capillary Electrophoresis (CE).....	42
3.4.6 วิเคราะห์ข้อมูลดิบด้วยโปรแกรม GeneMapper™ ID-X Software v1.6.....	42
3.4.6.1 การทดลองเพื่อกำหนดค่าการวิเคราะห์ต่างๆ.....	42
3.4.6.1.1 การกำหนดค่า Analytical threshold.....	42
3.4.6.1.2 การกำหนดค่า Stochastic threshold.....	43
3.4.6.1.3 การกำหนดค่า Stutter threshold.....	44
3.4.6.2 การกำหนดขอบเขตของข้อมูลในการอ่านอัลลีล.....	45
3.4.6.2.1 การกำหนดขอบเขตเพื่อสร้าง allelic bin ของเครื่องหมาย DYF399S1 และ DYF403S1a.....	45
3.4.6.2.2 การกำหนดขอบเขตเพื่อสร้าง allelic bin ของเครื่องหมาย DYS547 และ DYS612.....	47
3.4.6.3 การวิเคราะห์ข้อมูลดิบที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยเครื่อง CE มีดังนี้.....	50
3.4.7 การพิจารณาการเกิดการกลายพันธุ์ของแต่ละตัวอย่างและคำนวณอัตราการกลายพันธุ์ .....	50

3.4.8 การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยค่าทางสถิติ.....	51
บทที่ 4 ผลการทดลอง .....	52
4.1 ผลการทดลองหาสภาวะ PCR reaction ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วย เทคนิค PCR.....	52
4.2 ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ (Specificity Test).....	54
4.2.1 ทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อตัวอย่าง DNA มนุษย์ (Human Specificity Test).....	54
4.2.2 ทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อตัวอย่างเพศชาย (Male Specificity Test).....	56
4.3 ผลการทดสอบความไวของไพรเมอร์ (Sensitivity Test).....	59
4.4 ผลการกลายพันธุ์และลักษณะการกลายพันธุ์ที่พบในแต่ละเครื่องหมายที่ได้จากตัวอย่างคู่บิดาและบุตรชาย.....	61
4.4.1 ผล Electropherogram และลักษณะการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย DYF399S1....	62
4.4.2 ผล Electropherogram และลักษณะการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย DYS547 .....	70
4.4.3 ผล Electropherogram และลักษณะการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย DYF403S1a..	71
4.4.4 ผล Electropherogram และลักษณะการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย DYS612.....	73
4.5 อัตราการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย DYF399S1 DYS547 DYF403S1a และ DYS612 ในคู่บิดาและบุตรชาย .....	77
4.6 เปรียบเทียบอัตราการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย DYF399S1 DYS547 DYF403S1a และ DYS612 ของคู่บิดาและบุตรชายในกลุ่มประชากรประเทศไทยกับกลุ่มประชากรอื่น .....	78
4.7 เปรียบเทียบอายุของบิดาที่เกิดการกลายพันธุ์กับอายุของบิดาที่ไม่เกิดการกลายพันธุ์ .....	79
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการวิจัย.....	80
5.1 ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ (Specificity Test).....	80
5.2 ผลการทดสอบความไวของไพรเมอร์ (Sensitivity Test).....	80
5.3 ผลการกลายพันธุ์และลักษณะการกลายพันธุ์ที่พบในแต่ละเครื่องหมายที่ได้จากตัวอย่างคู่บิดาและบุตรชายไทย .....	81

5.4 อัตราการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย DYF399S1 DYS547 DYF403S1a และ DYS612 ใน คู่บิดาและบุตรชายไทย .....	83
5.5 เปรียบเทียบอัตราการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย DYF399S1 DYS547 DYF403S1a และ DYS612 ของคู่บิดาและบุตรชายในกลุ่มประชากรประเทศไทยกับกลุ่มประชากรอื่น .....	85
5.6 เปรียบเทียบอายุของบิดาที่เกิดการกลายพันธุ์กับอายุของบิดาที่ไม่เกิดการกลายพันธุ์.....	85
สรุปผลการทดลอง.....	86
ข้อเสนอแนะและการศึกษาในอนาคต.....	86
บรรณานุกรม.....	87
ประวัติผู้เขียน .....	94



## สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 เครื่องหมาย Autosomal STR ที่นิยมใช้มากที่สุดมีจำนวน 24 ตำแหน่ง .....	6
ตารางที่ 2.2 ข้อมูลเครื่องหมาย RM Y-STR ทั้งหมด 13 ตำแหน่ง ดัดแปลงจาก (32) .....	15
ตารางที่ 2.3 อัตราการกลายพันธุ์เฉลี่ยของเครื่องหมาย Y-STR ที่จัดกลุ่มแบ่งตามจำนวนชุดเบสซ้ำ 18	
ตารางที่ 2.4 อัตราการกลายพันธุ์ของ RM Y-STR 13 ตำแหน่งในกลุ่มประชากรเอเชีย (7-13) .....	19
ตารางที่ 2.5 เครื่องหมายที่เลือกมาศึกษาในงานวิจัยนี้ .....	20
ตารางที่ 2.6 การพิจารณาช่วงของค่า LR เพื่อสนับสนุนสมมติฐาน .....	24
ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ของแต่ละเครื่องหมาย RM Y-STR ที่ได้คัดเลือกไว้ ได้แก่ DYF399S1 DYS547 และ DYS612 .....	38
ตารางที่ 3.2 ไพรเมอร์ของเครื่องหมาย DYF403S1a .....	38
ตารางที่ 3.3 ไพรเมอร์แบบติดตามเรืองแสง .....	39
ตารางที่ 3.4 Thermal cycles ใช้จำนวนรอบ 30 รอบ .....	39
ตารางที่ 3.5 PCR master mix ต่อกระดาษ FTA card 1 disc .....	41
ตารางที่ 3.6 ค่า % stutter ที่ใช้ในการกำหนดของเครื่องหมาย DYF399S1 DYS547 และ DYF403S1a .....	44
ตารางที่ 3.7 ค่า % stutter ที่ใช้ในการกำหนดของเครื่องหมาย DYS612 .....	45
ตารางที่ 3.8 จีโนไทป์ของ control 2800M DNA ของเครื่องหมาย DYF399S1 DYS547 DYF403S1a และ DYS612 (55) .....	45
ตารางที่ 4.1ขนาดของ PCR Product ที่คาดคะเนของแต่ละเครื่องหมาย .....	53
ตารางที่ 4.2 จำนวน รูปแบบ และลักษณะการกลายพันธุ์ที่พบในการศึกษานี้ .....	61
ตารางที่ 4.3 สรุปรูปการกลายพันธุ์ที่พบในตัวอย่างคู่บิดาและบุตรชายประชากรไทย จำนวน 240 คู่..	76
ตารางที่ 4.4 อัตราการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย DYF399S1 DYS547 DYF403S1a และ DYS612 ในบิดาและบุตรชายไทย .....	77

ตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบอัตราการกลายพันธุ์ของงานวิจัยนี้กับอัตราการกลายพันธุ์ในกลุ่มประชากรทวีปเอเชียและยุโรปด้วยสถิติ Binomial test.....	78
---	----



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

## สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 2.1 โครโมโซมทั้ง 23 คู่ของมนุษย์.....	4
รูปที่ 2.2 โครงสร้างและส่วนประกอบของโครโมโซม Y.....	8
รูปที่ 2.3 เปรียบเทียบการตรวจตัวอย่างความผิดทางเพศที่ได้มาจากการตรวจ Autosomal STR กับ Y-STR.....	9
รูปที่ 2.4 การกลายพันธุ์ที่เกิดจากการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซมไม่สมดุกัน.....	11
รูปที่ 2.5 การกลายพันธุ์ที่เกิดจากการเคลื่อนที่ของเบสขณะ DNA polymerase ทำการเติมเบส ...	12
รูปที่ 2.6 กระบวนการซ่อมแซม DNA ที่ถูกทำลายในแต่ละช่วงของการสร้างเซลล์สืบพันธุ์.....	13
รูปที่ 2.7 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนชุดเบสซ้ำกับอัตราการกลายพันธุ์.....	17
รูปที่ 2.8 แผนภาพตำแหน่งของเครื่องหมาย DYF403S1a+b.....	21
รูปที่ 2.9 ขั้นตอนของเทคนิค PCR.....	25
รูปที่ 2.10 ส่วนประกอบของเครื่อง Capillary Electrophoresis.....	27
รูปที่ 2.11 การทำงานของเครื่อง Capillary Electrophoresis.....	29
รูปที่ 2.12 ลักษณะของ split.....	30
รูปที่ 2.13 ลักษณะของ Peak imbalance.....	31
รูปที่ 2.14 ลักษณะของ stutter ที่สามารถเกิดขึ้นได้ของเครื่องหมาย DYS612.....	32
รูปที่ 2.15 ลักษณะของ dye blob.....	32
รูปที่ 2.16 ลักษณะของ pull up.....	33
รูปที่ 3.1 ช่วงขนาดของ PCR Product ของแต่ละเครื่องหมาย เมื่อแยกด้วยเทคนิค CE.....	42
รูปที่ 3.2 Analytical threshold ที่กำหนดในงานวิจัยนี้.....	43
รูปที่ 3.3 เครื่องหมาย DYF399S1 ของ control 2800M DNA ที่ไม่มี bin.....	46
รูปที่ 3.4 เครื่องหมาย DYF403S1a ของ control 2800M DNA ที่ไม่มี bin.....	46

รูปที่ 3.5 เครื่องหมาย DYS547 ของ control 2800M DNA ที่ไม่มี bin.....	47
รูปที่ 3.6 เครื่องหมาย DYS612 ของ control 2800M DNA ที่ไม่มี bin.....	48
รูปที่ 3.7 ตัวอย่างการอ่านอัลลีลของตำแหน่งที่ไม่อยู่ใน bin ที่กำหนดไว้.....	49
รูปที่ 4.1 ตรวจสอบ PCR product ด้วย 2% agarose gel electrophoresis.....	52
รูปที่ 4.2 Electropherogram ของ DNA control 2800M .....	53
รูปที่ 4.3 ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์เมื่อใช้ตัวอย่าง DNA ของหนู M. musculus ...	54
รูปที่ 4.4 ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์เมื่อใช้ตัวอย่าง DNA ของหนู R. rattus .....	55
รูปที่ 4.5 ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์เมื่อใช้ตัวอย่าง DNA ของหมู S. domesticus .	55
รูปที่ 4.6 ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อตัวอย่าง DNA เพศชาย โดยใช้ตัวอย่างที่เป็น DNA ของเพศหญิง .....	56
รูปที่ 4.7 ผล Electropherogram ของ negative control โดยใช้น้ำแทน DNA .....	56
รูปที่ 4.8 ผล Electropherogram ของช่องสีน้ำเงินของตัวอย่าง negative control .....	57
รูปที่ 4.9 ผล Electropherogram ของช่องสีเขียวของตัวอย่าง negative control.....	57
รูปที่ 4.10 ผล Electropherogram ของช่องสีน้ำเงินของ Control DNA 2800M.....	58
รูปที่ 4.11 ผล Electropherogram ของช่องสีเขียวของ control DNA 2800M .....	58
รูปที่ 4.12 ความสูงพีคเฉลี่ยของแต่ละอัลลีลของเครื่องหมาย DYF399S1 ที่ปริมาณของ DNA ตั้งต้นลดลง.....	59
รูปที่ 4.13 ความสูงพีคเฉลี่ยของแต่ละอัลลีลของเครื่องหมาย DYF403S1a ที่ปริมาณของ DNA ตั้งต้นลดลง.....	59
รูปที่ 4.14 ความสูงพีคเฉลี่ยของอัลลีลของเครื่องหมาย DYS547 ที่ปริมาณของ DNA ตั้งต้นลดลง..	60
รูปที่ 4.15 ความสูงพีคเฉลี่ยของอัลลีลของเครื่องหมาย DYS612 ที่ปริมาณของ DNA ตั้งต้นลดลง..	60
รูปที่ 4.16 Electropherogram แสดงการกลายพันธุ์ของคูบิดาและบุตรชายไทยตัวอย่างที่ 008....	62
รูปที่ 4.17 Electropherogram แสดงการกลายพันธุ์ของคูบิดาและบุตรชายไทยตัวอย่างที่ 025....	62
รูปที่ 4.18 Electropherogram แสดงการกลายพันธุ์ของคูบิดาและบุตรชายไทยตัวอย่างที่ 044....	63
รูปที่ 4.19 Electropherogram แสดงการกลายพันธุ์ของคูบิดาและบุตรชายไทยตัวอย่างที่ 067 ....	63







จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

โครโมโซมวาย (Y chromosome) เป็นโครโมโซมเพศชายที่มีขนาดประมาณ 50 ล้านคู่เบส โดยมีปลายทั้งสองด้าน สามารถแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนโครโมโซมกับบริเวณคู่เหมือนบนโครโมโซมเอ็กซ์ ซึ่งมี 5% จากโครโมโซมทั้งหมดบริเวณนี้ถูกเรียกว่า Pseudoautosomal region (PAR) อยู่บริเวณด้านแขนสั้นและด้านแขนยาวของโครโมโซมวาย และ อีก 95 % ที่เหลือ จะเป็นส่วนที่จะไม่มีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนกับโครโมโซมเอ็กซ์ บริเวณนี้ถูกเรียกว่า Non-recombining portion of Y chromosome (NRY) หรือ Male-specific region of the Y chromosome (MSY) ซึ่งบริเวณดังกล่าวจะเป็นส่วนที่ถ่ายทอดจากบิดาไปสู่บุตรชายโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลง (1) ดังนั้น คุณสมบัติดังกล่าวจึงถูกนำมาประยุกต์ใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์

Y-STR เป็นชุดเบสซ้ำที่อยู่บนโครโมโซมวายในส่วนของ NRY โดยในงานนิติวิทยาศาสตร์ ถูกนำมาประยุกต์ใช้เพื่อวัตถุประสงค์ต่างๆ เช่น ทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างบิดาและบุตรชาย ตรวจสอบ DNA ของผู้กระทำความผิดในคดีความผิดทางเพศ การศึกษาบรรพบุรุษในกลุ่มประชากรที่สนใจ เป็นต้น (2)

กรณีคดีความผิดทางเพศที่มีผู้กระทำเป็นเพศชายและผู้ถูกกระทำเป็นเพศหญิง ตัวอย่างที่เก็บของเหลวจากช่องคลอดเพศหญิง (3) เพื่อการตรวจพิสูจน์บุคคลมักพบว่า สัดส่วนของเซลล์เพศหญิงและชายผู้ต้องสงสัยที่ปรากฏในตัวอย่าง อาจจะมีปริมาณของ DNA เพศหญิงมากกว่าเพศชาย ส่งผลให้หากทำการตรวจ autosomal STR อาจไม่สามารถแยกรูปแบบดีเอ็นเอระหว่างหญิงและชายที่สงสัยออกจากกันได้ ในบางกรณีจึงต้องตรวจ Y-STR ร่วมด้วย (4) เพื่อตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมของเพศชายที่กระทำความผิด นอกจากนี้ ในกรณีผู้กระทำความผิดเป็นสมาชิกเพศชายในครอบครัวเดียวกัน เช่น บิดา พี่ชาย น้องชาย หรือ สมาชิกเพศชายคนอื่นที่มีความสัมพันธ์ทางสายบิดาร่วมกัน การตรวจ Y-STR จากชุดน้ำยาในปัจจุบันยังไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอที่สามารถแยกได้ว่าเป็นบุคคลใด เพราะมีอัตราการกลายพันธุ์ต่ำถึงปานกลาง ดังนั้น เพื่อเป็นการเพิ่มความสามารถในการแยกระบุตัวบุคคลในเพศชาย ควรใช้เครื่องหมาย Y-STR ที่มีคุณสมบัติอัตราการกลายพันธุ์ที่สูงมากขึ้น

ซึ่งการกลายพันธุ์ (Mutation) ของตำแหน่ง Y-STR อาจจะเกิดจากการถ่ายทอดทางพันธุกรรม ผิดพลาดและมีโอกาสเกิดขึ้นได้ตามธรรมชาติ

งานวิจัยของ Ballantyne และคณะปี 2010 (5) ได้ศึกษาอัตราการกลายพันธุ์ของ Y-STR จำนวน 186 ตำแหน่ง พบว่า มีเครื่องหมายที่มีอัตราการกลายพันธุ์รวดเร็ว (มากกว่าหรือเท่ากับ  $10^{-2}$  ต่อ ตำแหน่งต่อรุ่น) มีทั้งหมด 13 ตำแหน่ง เรียกกลุ่มเครื่องหมายเหล่านี้ว่า Rapidly mutating Y-STR (RM Y-STR) จากนั้นมีการศึกษาจำนวนมากได้ทำการศึกษาอัตราการกลายพันธุ์ของ RM Y-STR ในแต่ละกลุ่มประชากร (6-12) พบว่า บางเครื่องหมาย RM Y-STR มีอัตราการกลายพันธุ์ที่ต่ำถึงปานกลางในบางกลุ่มประชากร แต่บางประชากรพบว่ามีอัตราการกลายพันธุ์สูง (10, 13) เนื่องจากประชากรในกลุ่มที่แตกต่างกัน จะมีโครงสร้างทางพันธุกรรมและวิวัฒนาการที่แตกต่างกัน ทำให้มีการกลายพันธุ์ที่แตกต่างกัน (11) ซึ่งในประเทศไทยข้อมูลอัตราการกลายพันธุ์ของ RM Y-STR ยังต้องการการศึกษาเพิ่มเติม โดยการศึกษาอัตราการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย RM Y-STR ในประชากรไทยจะเป็นการยืนยันว่าเครื่องหมายเหล่านี้กลายพันธุ์สูงหรือไม่ และอีกทั้งยังเป็นฐานข้อมูล สำหรับการศึกษการเปลี่ยนแปลงแฮปโลไทป์ของโครโมโซมวาย (Y-Haplotype) ของชายในประชากรไทย

ดังนั้น วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือ ศึกษาอัตราการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย RM Y-STR ในประชากรคูบิดาและบุตรชายในประชากรไทย โดยใช้เครื่องหมาย RM Y-STR จากงานวิจัยมีการ รายงานอัตราการกลายพันธุ์ของตำแหน่ง RM Y-STR ของประเทศในทวีปเอเชีย โดยเลือกตำแหน่งที่มี อัตราการกลายพันธุ์สูง จากนั้นคัดเลือกตามปัจจัยระดับโมเลกุลที่ส่งผลต่ออัตราการกลายพันธุ์ ได้แก่ จำนวนชุดซ้ำ (Number of repeats) รูปแบบของเบสซ้ำ (Complexity of repetitive structure) และชุดของจำนวนเบสซ้ำ (Length of repetitive motif) จากเกณฑ์การคัดเลือกดังกล่าวได้ เครื่องหมายที่จะศึกษาในงานวิจัย จำนวน 4 ตำแหน่ง ได้แก่ DYF403S1a DYF399S1 DYS547 และ DYS612 เพื่อคำนวณอัตราการกลายพันธุ์และเปรียบเทียบค่าดังกล่าวกับกลุ่มประชากรอื่น

## 1.2 คำถามของงานวิจัย

อัตราการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย DYF403S1a DYF399S1 DYS547 และ DYS612 ของคูบิดาและบุตรชายในกลุ่มประชากรไทยเป็นเท่าไรและอัตราการกลายพันธุ์ที่ได้ แตกต่างจากกลุ่มประชากรอื่นหรือไม่

### 1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- คำนวณอัตราการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย DYF399S1 DYS547 DYF403S1a และ DYS612 บนตำแหน่ง Y-STR ที่กลายพันธุ์รวดเร็วของคู่บิดาและบุตรชายในกลุ่มประชากรประเทศไทย
- เปรียบเทียบอัตราการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย DYF399S1 DYS547 DYF403S1a และ DYS612 บนตำแหน่ง Y-STR ที่กลายพันธุ์รวดเร็วของคู่บิดาและบุตรชายในกลุ่มประชากรประเทศไทยกับกลุ่มประชากรอื่น

### 1.4 สมมติฐานของงานวิจัย

การกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย DYF399S1 DYS547 DYF403S1a และ DYS612 ของคู่บิดาและบุตรชายในประเทศไทย มากกว่าหรือเท่ากับ  $1 \times 10^{-2}$  ต่อตำแหน่งต่อเซลล์ต่อรุ่น และส่งผลต่อค่าอัตราการกลายพันธุ์ในประชากรไทย

### 1.5 คำสำคัญ

Rapidly mutating (RM) Y-STRs

Y-STR mutation

Mutation rate

## บทที่ 2

### บททวนวรรณกรรม

#### 2.1 จีโนมของมนุษย์ (Human Genome)

ร่างกายของมนุษย์ประกอบด้วยเซลล์หลายเซลล์ ซึ่งในแต่ละเซลล์จะมีนิวเคลียส และภายในของนิวเคลียสจะมี Deoxyribonucleic acid หรือ DNA โดยโครงสร้าง DNA จะประกอบด้วย 3 ส่วน ได้แก่ Nucleobase หรือ Base มี 4 ชนิด ได้แก่ A (Adenine) T (Thymine) C (Cytosine) และ G (Guanine) ส่วนที่สองคือ น้ำตาล และส่วนสุดท้ายคือ ฟอสเฟต (Phosphate) ซึ่ง DNA จะถูกจัดรวมกันด้วยโปรตีนฮิสโตน (Histone) ซึ่งจะขดตัวแน่นรวมกันเป็นโครโมโซม โดยในจีโนมของมนุษย์มีโครโมโซมทั้งหมด 23 คู่ (14) แสดงดังรูปที่ 1 โดยจะแบ่งออกเป็น 2 แบบ ได้แก่ 22 คู่เป็นโครโมโซมร่างกาย (Autosome) และมี 1 คู่เป็นโครโมโซมเพศ (Sex chromosome) ซึ่งเพศหญิงจะเป็น XX และเพศชายจะเป็น XY



รูปที่ 2.1 โครโมโซมทั้ง 23 คู่ของมนุษย์ แหล่งที่มาของรูปจากหนังสือ Pathobiology of Human Disease หัวข้อ Introduction to Cytogenetics (15)

ภายในจีโนมของมนุษย์มี 10% ของทั้งหมดที่เป็นส่วนของยีน (Gene) ส่วนที่เหลือจะเป็นส่วนที่ไม่ใช่ยีนซึ่งจะเรียกว่า Extragenic DNA โดยบริเวณดังกล่าวพบเบสซ้ำจำนวนมากที่เรียงตัวกัน และเมื่อแบ่งหน้าที่ตามการกระจายและลักษณะการกระจาย จะสามารถแบ่งได้เป็น ลำดับเบสซ้ำแบบกระจาย (Interspersed repeat) และ ลำดับเบสซ้ำแบบต่อเนื่อง (Tandem repeat) ซึ่งลำดับเบสซ้ำแบบต่อเนื่องสามารถแบ่งได้เป็น 3 ประเภท ได้แก่ 1. แซตเทลไลต์ (Satellite) 2. มินิแซตเทลไลต์ (Minisatellite) และ 3. ไมโครแซตเทลไลต์ (Microsatellite) (16)

## 2.2 ไมโครแซตเทลไลท์ (Microsatellite)

หรือ Simple sequence repeat หรือ Short tandem repeat คือ เครื่องหมาย DNA ที่เป็นชุดเบสนิวคลีโอไทด์ซ้ำเรียงกันความยาวประมาณ 1-6 คู่เบส และมีจำนวนชุดซ้ำไม่เกิน 100 ซ้ำ จึงเป็นเครื่องหมาย DNA ที่นิยมใช้กันมากที่สุด เนื่องจากง่ายต่อการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) และจำนวนชุดซ้ำของ STR มีความหลากหลายระหว่างบุคคล จึงมีประสิทธิภาพในการนำมาใช้ระบุระหว่างบุคคล (Human Identification) ได้ (16, 17)

## 2.3 ประเภทของเครื่องหมาย STR

- แบ่งตามจำนวนชุดของจำนวนเบสซ้ำ (Length of Repeat) (16)

1. Dinucleotide repeats มีจำนวนเบสในจำนวนชุดซ้ำ 2 เบส
2. Trinucleotide repeats มีจำนวนเบสในจำนวนชุดซ้ำ 3 เบส
3. Tetranucleotide repeats มีจำนวนเบสในจำนวนชุดซ้ำ 4 เบส
4. Pentanucleotide repeats มีจำนวนเบสในจำนวนชุดซ้ำ 5 เบส
5. Hexanucleotide repeats มีจำนวนเบสในจำนวนชุดซ้ำ 6 เบส

Tetranucleotide repeats เป็นเครื่องหมายที่นิยมใช้ในการระบุตัวบุคคลมากที่สุดในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์

นอกจากการแบ่งประเภทตามจำนวนชุดของจำนวนเบสซ้ำ ยังสามารถแบ่งประเภทได้ตามรูปแบบของชุดเบสซ้ำ (18) ได้ดังนี้

- แบ่งตามรูปแบบของชุดเบสซ้ำ (Complexity of repetitive structure)

1. ชุดซ้ำแบบง่าย (Simple repeat)
2. ชุดซ้ำแบบง่ายที่มีเบสที่ไม่เป็นชุดแทรกอยู่ (Simple repeats with non-consensus alleles)
3. ชุดซ้ำแบบประกอบ (Compound repeat)
4. ชุดซ้ำแบบซับซ้อน (Complex repeat)

## หลักเกณฑ์การเลือกเครื่องหมาย STR

การคัดเลือกเครื่องหมาย STR เพื่อใช้หาความสัมพันธ์ของบุคคล อาศัยหลักเกณฑ์ (19) ดังนี้

1. ค่าอำนาจในการจำแนกตัวบุคคล (Discriminating power) มากกว่า 0.9
2. ค่าความต่างของคู่อัลลีล (Heterozygosity) มากกว่าร้อยละ 70
3. มีอัตราการกลายพันธุ์ (Mutation rate) ปานกลาง
4. มีโอกาสในการเกิด Stutter ต่ำ
5. หากมีการตรวจซ้ำด้วยตำแหน่งเดิม จะต้องให้ผลการตรวจเหมือนเดิม
6. ความยาวของชุดซ้ำควรอยู่ระหว่าง 90-500 คู่เบส เพื่อให้เหมาะสมสำหรับตัวอย่างที่มีคุณภาพต่ำและปริมาณจำกัด

## 2.4 Autosomal DNA marker

เป็นเครื่องหมาย STR ที่อยู่บนโครโมโซมร่างกายในแต่ละคนจะได้รับอัลลีลมาจากบิดาครึ่งหนึ่ง และมาจากมารดาครึ่งหนึ่ง ทำให้เกิดความหลากหลายระหว่างบุคคล

Autosomal STR ที่นิยมใช้มากที่สุดมีจำนวน 24 ตำแหน่ง ดังตารางที่ 2.1

**ตารางที่ 2.1** เครื่องหมาย Autosomal STR ที่นิยมใช้มากที่สุดมีจำนวน 24 ตำแหน่ง โดยอ้างอิงตำแหน่งจากข้อมูลจีโนม GRCh8 (Genome Reference Consortium Human Build) แหล่งที่มาของตารางจากบทความวิจัยของ Gettings KB, Aponte RA, Vallone PM และ Butler JM. หัวข้อ STR allele sequence variation: Current knowledge and future issues จากวารสารวิชาการ Forensic Science International Genetics (20)

STR locus	Chromosome position	GRCh38 (Dec 2013)			
		Location	Strand	Allele designation	Repeat region sequence <sup>a</sup>
D1S1656	1q42	230,769,616–230,769,683	R	17	[TAGA] <sub>16</sub> [TAGG] [TG] <sub>5</sub>
TPOX	2p25.3	1,489,653–1,489,684	F	8	[AATG] <sub>8</sub>
D2S441	2p14	68,011,947–68,011,994	F	12	[TCTA] <sub>12</sub>
D2S1338	2q35	218,014,859–218,014,950	R	23	[TGCC] <sub>7</sub> [TTCC] <sub>13</sub> [GTCC] [TTCC] <sub>2</sub>
D3S1358	3p21.31	45,540,739–45,540,802	F	16	[TCTA] [TCTG] [TCTA] <sub>14</sub>
FGA	4q31.3	154,587,736–154,587,823	R	22	[TTTC] <sub>5</sub> [TTTT] [TTCT] [CTTT] <sub>14</sub> [CTCC] [TTCC] <sub>2</sub>
D5S818	5q23.2	123,775,556–123,775,599	R	11	[AGAT] <sub>11</sub>
CSF1PO	5q31.1	150,076,324–150,076,375	F	13	[ATCT] <sub>13</sub>
SE33	6q14	88,277,144–88,277,245	R	25.2	[AAAG] <sub>2</sub> AG [AAAG] <sub>3</sub> AG [AAAG] <sub>9</sub> AAAAA [AAAG] <sub>15</sub> G AAGG [AAAG] <sub>2</sub> AG
D6S1043	6q15	91,740,225–91,740,272	R	12	[AGAT] <sub>12</sub>
D7S820	7q21.11	84,160,226–84,160,277	R	13	[GATA] <sub>13</sub>
D8S1179	8q24.13	124,894,865–124,894,916	F	13	[TCTA] [TCTG] [TCTA] <sub>11</sub>
D10S1248	10q26.3	129,294,244–129,294,295	F	13	[GGAA] <sub>13</sub>
TH01	11p15.5	2,171,088–2,171,115	F	7	[AATG] <sub>7</sub>
vWA	12p13.31	5,983,977–5,984,044	R	17	[TCTA] [TCTG] <sub>5</sub> [TCTA] <sub>11</sub> TCCA TCTA
D12S391	12p13.2	12,297,020–12,297,095	F	19	[AGAT] <sub>11</sub> [AGAC] <sub>7</sub> [AGAT]
D13S317	13q31.1	82,148,025–82,148,068	F	11	[TATC] <sub>11</sub> [AATC] <sub>2</sub>
Penta E	15q26.2	96,831,015–96,831,039	R	5	[AAAGA] <sub>5</sub>
D16S539	16q24.1	86,352,702–86,352,745	F	11	[GATA] <sub>11</sub>
D18S51	18q21.33	63,281,667–63,281,738	F	18	[AGAA] <sub>18</sub>
D19S433	19q12	29,926,235–29,926,298	R	14	[AAGG] AAAG[AAGG] TAGG [AAGG] <sub>2</sub>
D21S11	21q21.1	19,181,973–19,182,099	F	29	[TCTA] <sub>4</sub> [TCTG] <sub>6</sub> [TCTA] <sub>5</sub> TA[TCTA] <sub>3</sub> TCA[TCAT] <sub>2</sub> TCCATA[TCTA] <sub>11</sub>
Penta D	21q22.3	43,636,205–43,636,269	F	13	[AAAGA] <sub>13</sub>
D22S1045	22q12.3	37,140,287–37,140,337	F	17	[ATT] <sub>14</sub> ACT [ATT] <sub>2</sub>

จากตารางที่ 2.1 ในระบบ CODIS (The Combine DNA Index System) ได้กำหนดให้มีตำแหน่งหลัก (Core loci) ทั้งหมด 20 ตำแหน่ง ได้แก่ CSF1PO, FGA, THO1, TPOX, VWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, D1S1656, D2S441, D2S1338, D10S1248, D12S391, D19S433 และ D22S1045

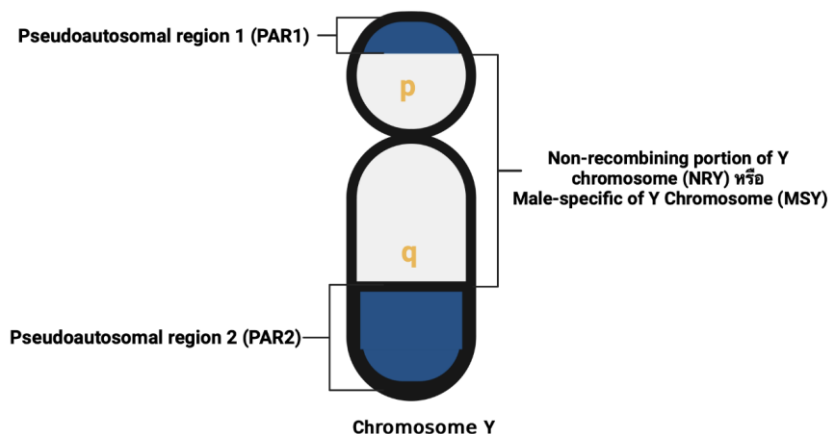
## 2.5 Lineage Marker

เป็นเครื่องหมาย DNA ที่ใช้ในการหาความสัมพันธ์ทางสายบิดาหรือมารดา โดยส่งต่อจากรุ่นสู่รุ่นโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลง ยกเว้นมีการกลายพันธุ์เกิดขึ้น ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น เครื่องหมายที่ใช้หาความสัมพันธ์ทางสายมารดา (Maternal lineages) นิยมใช้ DNA ของไมโทคอนเดรีย (Mitochondrial DNA) และ เครื่องหมายที่ใช้หาความสัมพันธ์ทางสายบิดา (Paternal lineages) นิยมใช้ Y-STR (21)

## 2.6 Y-Chromosome

โครโมโซม Y เป็นโครโมโซมของเพศชายที่มีขนาดประมาณ 60 ล้านคู่เบส ซึ่งมีขนาดเล็กเป็นอันดับที่ 3 โดยมีองค์ประกอบทั้งหมด 2 บริเวณหลัก แสดงดังรูปที่ 2.2 ได้แก่ Non-recombining portion of Y chromosome (NRY) หรือ Male-specific region of Y (MSY) เป็นบริเวณส่วนใหญ่ของโครงสร้าง (95%) เป็นบริเวณที่ส่งจากบิดาไปยังบุตรชายอย่างไม่มี การเปลี่ยนแปลง ยกเว้นมีการกลายพันธุ์ และบริเวณที่เหลือ (5%) คือ Pseudoautosomal region เป็นบริเวณที่มีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วน (Crossing over) กับโครโมโซม X โดยสามารถแบ่งออกเป็น 2 ส่วนย่อย ได้แก่ PAR1 อยู่ด้านปลายสั้น (p) PAR2 อยู่ด้านปลายยาว (q)





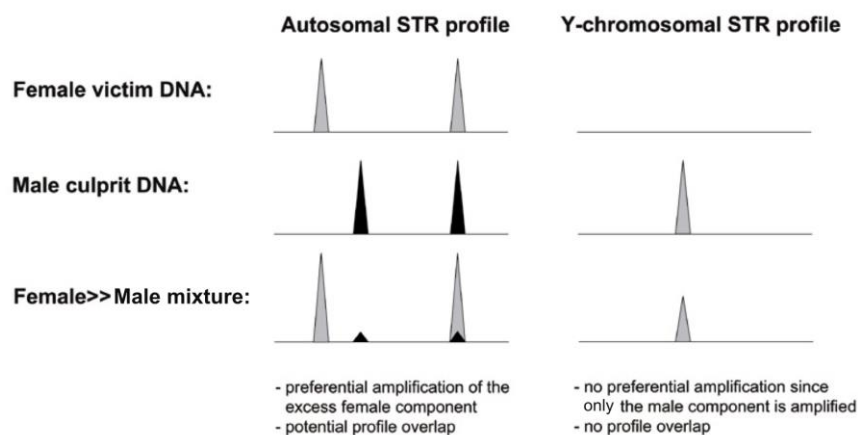
รูปที่ 2.2 โครงสร้างและส่วนประกอบของโครโมโซม Y

## 2.7 Y - Chromosomal Short Tandem Repeat (Y-STR)

คือ ตำแหน่งชุดเบสซ้ำ STR ที่อยู่บนบริเวณ NRY ซึ่งจะถ่ายทอดจากบิดาไปสู่บุตรชายโดยไม่มี การเปลี่ยนแปลง ยกเว้นมีการกลายพันธุ์เกิดขึ้น (22)

- การใช้ประโยชน์ในงานนิติวิทยาศาสตร์ของ Y-STR

- ใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์ทางสายบิดา (Paternity Testing)
- ตรวจสอบบุคคลสูญหายกรณีบุคคลที่มีความสัมพันธ์ทางสายบิดาสูญหาย สามารถใช้ตัวอย่างจากบุคคลที่มีความสัมพันธ์ทางสายบิดา เดียวกันอยู่เป็นตัวอย่างอ้างอิง (Reference) ได้
- ใช้ตรวจสอบคดีล่วงละเมิดทางเพศ (Sexual Assault) ในกรณีที่ผู้กระทำเป็นผู้ชาย และตัวอย่างที่ได้ปะปนกันของเพศหญิงและชาย หากตรวจ STR บนโครโมโซมร่างกายมักจะได้ DNA profile เป็นลักษณะ Mixed profile โดยมีตัวอย่างเพศหญิงเป็น Major contributor ดังนั้น การตรวจ Y-STR จะสามารถบอกได้ว่าในตัวอย่างมี DNA ของเพศชายอยู่หรือไม่
- ใช้ในการศึกษาการอพยพและวิวัฒนาการของบรรพบุรุษในพื้นที่ที่สนใจ (Human migration and evolutionary studies)



รูปที่ 2.3 เปรียบเทียบการตรวจตัวอย่างความผิดทางเพศที่ได้มาจากการตรวจ Autosomal STR กับ Y-STR แหล่งที่มาจากบทความปริทัศน์ BioTechniques หัวข้อ Uni-parental markers in human identity testing including forensic DNA analysis (4)

- ข้อจำกัดของ Y-STR

- ตรวจได้เฉพาะเพศชายเท่านั้น
- มีอัตราการกลายพันธุ์ของเครื่องหมายต่ำถึงปานกลาง

## 2.8 การกลายพันธุ์ (Mutation)

คือ การเกิดขึ้นของอัลลีลใหม่ หรือ การเปลี่ยนแปลงจากอัลลีลเดิมเป็นอัลลีลใหม่ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งสามารถเกิดขึ้นเองได้ตามธรรมชาติ

- การคำนวณอัตราการกลายพันธุ์ สามารถคำนวณได้จากสูตร (23)

อัตราการกลายพันธุ์ =

จำนวนการกลายพันธุ์ที่พบ (Number of mutation)

หน่วยทางพันธุกรรม (Genetic unit) × หน่วยของเวลา (Unit time) × จำนวนประชากรทั้งหมดที่ใช้ในการทดลอง (Population size)

โดย จำนวนการกลายพันธุ์ที่พบ คือ จำนวนของตัวอย่างที่มีการกลายพันธุ์เกิดขึ้น

หน่วยทางพันธุกรรม คือ เซลล์สืบพันธุ์ (Gamete)

หน่วยของเวลา คือ จำนวนรุ่น (Generation)

การกลายพันธุ์เป็นกระบวนการที่สามารถเกิดขึ้นได้ตามธรรมชาติและมีโอกาสเกิดขึ้นตลอดเวลา ซึ่งการกลายพันธุ์ของ STR ก็สามารถเกิดขึ้นได้ตามธรรมชาติเช่นเดียวกัน เนื่องจาก STR เป็นชุดของเบสซ้ำเรียงกัน โดยการกลายพันธุ์ของ STR สามารถเกิดขึ้นได้ตามกระบวนการ ดังนี้

## 2.9 ลักษณะของการกลายพันธุ์

- การกลายพันธุ์ที่ถ่ายทอดได้ (Germline Mutation)

เป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดระหว่างการสร้างเซลล์สืบพันธุ์และส่งต่อการกลายพันธุ์เหล่านี้ให้กับบุตร ทำให้สามารถพบเซลล์ที่เกิดการกลายพันธุ์ได้ทุกเซลล์ในร่างกายบุตร (24)

- การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นภายหลัง (Somatic Mutation)

เป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นในร่างกาย หลังจากปฏิสนธิ ซึ่งจะเกิดการกลายพันธุ์ในเซลล์ร่างกาย ยกเว้นเซลล์สืบพันธุ์ และไม่มีถาวรถ่ายทอดไปยังรุ่นถัดไป เป็นการกลายที่สามารถเกิดขึ้นได้จากปัจจัยภายนอกในร่างกาย เช่น รังสี UV สารเคมี หรืออยู่ในสภาวะที่ทำให้เซลล์ในร่างกายผิดปกติ (25)

## 2.10 สาเหตุของการกลายพันธุ์

- การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นได้เอง (Spontaneous Mutation) (24)

เป็นการเปลี่ยนแปลงของ DNA sequence ที่เกิดขึ้นได้ตามธรรมชาติซึ่งเกิดจากความผิดพลาดของกระบวนการในร่างกาย โดยแบ่งออกเป็น 3 รูปแบบ ได้แก่ DNA Replication error คือ การเปลี่ยนแปลงของ DNA sequence ที่ขึ้นในระหว่างการเพิ่มจำนวนของ DNA เรียกว่า Polymerase slippage เป็นต้น หรือเกิดจาก Repair error คือ DNA sequence ที่มีการเติมเบสหรือต่อสายที่ผิดพลาด หรือ ถูกทำลายแล้วระบบการซ่อมแซม DNA sequence ไม่สามารถซ่อมแซมหรือซ่อมแซมได้ไม่สมบูรณ์ และ Recombinant error คือ ความผิดพลาดระหว่างการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของ DNA คู่เหมือน (Homologous Chromosome)

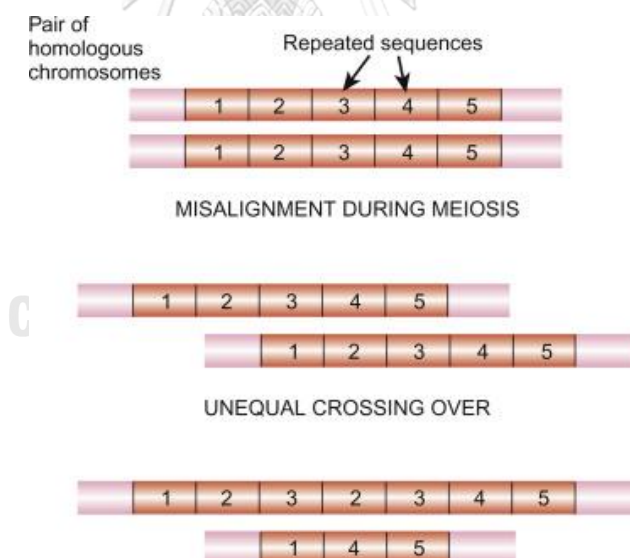
- การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นจากการเหนี่ยวนำ (Induced Mutation)

เป็นการเปลี่ยนแปลงของ DNA sequence ที่เกิดขึ้นจากการเหนี่ยวนำของปัจจัยภายนอก เช่น สารเคมี รังสี เช่น Gamma radiations, Ultraviolet radiations, X-ray สารอนุมูลอิสระ เช่น Superoxide radical, Hydrogen peroxide เป็นต้น (26)

## 2.11 กลไกการเกิดการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย STR

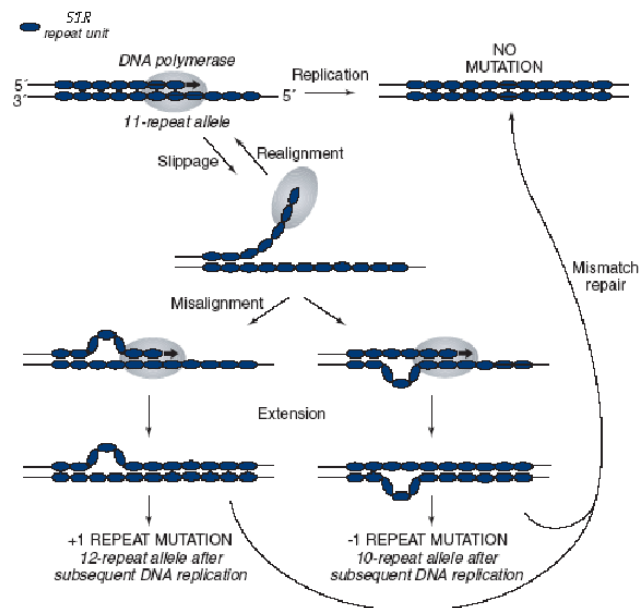
การกลายพันธุ์ของ STR อาจเกิดขึ้นได้ขณะที่เซลล์มีการแบ่งตัวแล้วเกิดการผิดพลาด โดยกลไกที่ทำให้ตำแหน่ง STR เกิดการกลายพันธุ์ (27) มีดังนี้

1. การแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซมไม่สมมูลกัน (Unequal crossing over) คือ การแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซมขณะการแบ่งเซลล์เพศในระยะ Prophase I แบบไม่สมบูรณ์ เนื่องจากตำแหน่ง STR เป็นเบสซ้ำ เมื่อเกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซมคู่เหมือน จะทำให้มีการแลกเปลี่ยน Sister chromatid ที่ไม่เท่ากัน ทำให้เกิดการขาด หรือเกินของจำนวนเบส แสดงดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 การกลายพันธุ์ที่เกิดจากการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซมไม่สมมูลกัน แหล่งที่มาของรูปจากหนังสือ Molecular Biology บทที่ 4 Gene, Genome and DNA (28)

2. การเคลื่อนที่ของเบสขณะเกิดการเติมเบส (Strand-slippage replication) คือ การเพิ่มหรือลดของจำนวนเบสที่เกิดจากการเลื่อนของเบส ซึ่งในบริเวณที่มีการซ้ำกัน อาจจะมีการเลื่อนของเบส ทำให้เกิดการทับซ้อนกัน ส่งผลให้จำนวนเบสเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม แสดงดังรูปที่ 2.5



**รูปที่ 2.5** การกลายพันธุ์ที่เกิดจากการเคลื่อนที่ของเบสขณะ DNA polymerase ทำการเติมเบส แหล่งที่มาจากบทความปริทัศน์ Genomics Proteomics Bioinformatics หัวข้อ A brief review of short tandem repeat mutation ของวารสาร Genomics Proteomics Bioinformatics (27)

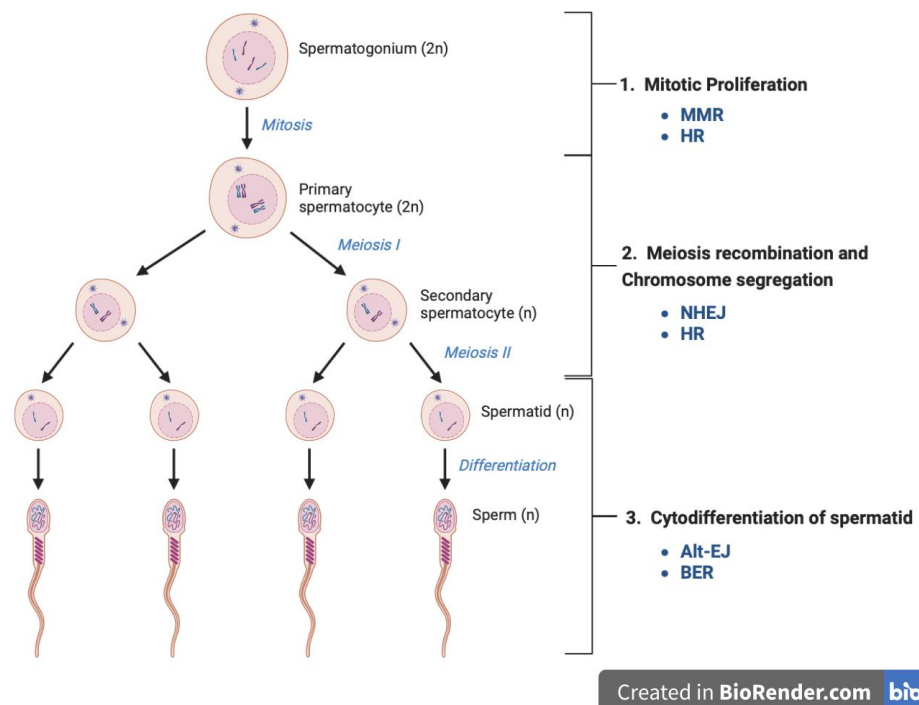
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## 2.12 ระบบการซ่อมแซม DNA (DNA repair) ถูกทำลาย

ในร่างกายของมนุษย์ขณะเพิ่มและสร้างเซลล์สามารถเกิดการกลายพันธุ์ได้ แต่อย่างไรก็ตามร่างกายก็มีกลไกในการซ่อมแซม DNA ที่ถูกทำลายเหล่านั้น ได้แก่ (29)

- DNA repair ขณะที่กำลังสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Gametogenesis)

ในเซลล์สืบพันธุ์มีกระบวนการมากมายที่จะป้องกันการเกิดการกลายพันธุ์ ดังนี้



**รูปที่ 2.6** กระบวนการซ่อมแซม DNA ที่ถูกทำลายในแต่ละช่วงของการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ คัดแปลงมาจากบทความปริทัศน์ International Journal of Molecular Sciences หัวข้อ DNA Damage and Repair in Human Reproductive Cells

- การซ่อมแซม DNA ในกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศชาย (Spermatogenesis) สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ขั้นตอนหลัก ได้แก่

■ Mitotic proliferation

ขั้นตอนนี้มีการสร้าง Spermatoocyte จำนวนมาก จึงมีโอกาสนในการเกิดการกลายพันธุ์แบบ DNA mismatch ซึ่งจะถูกรักษาโดยกระบวนการ Mismatch repair (MMR)

■ Meiosis recombinant and chromosome segregation

เป็นขั้นตอนที่มีการสร้าง haploid gamete ที่หลากหลาย ซึ่งในบริเวณที่สามารถเกิด recombinant ได้ ซึ่งหากเกิดการกลายพันธุ์จะมี 2 กระบวนการที่สามารถซ่อมแซมได้ ได้แก่ Homologous recombination (HR) สามารถซ่อมแซมได้ในระยะ S ซึ่งจะซ่อมแซมการกลายพันธุ์ที่สามารถเกิดขึ้นได้ในกระบวนการ replication และกระบวนการ Non-homologous end joining (NHEJ) จะอยู่ในระยะ  $G_1$  ที่จะทำให้หน้าที่ซ่อมแซม DNA ที่ Double-strand DNA ถูกทำลาย

#### ■ Cytodifferentiation of spermatid

เป็นขั้นตอนที่มีการขดกันแน่นของ DNA (DNA compaction) ซึ่ง DNA อาจจะถูกทำลายทั้งแบบ Single-stand DNA และ Double-stand DNA ซึ่งสามารถถูกซ่อมแซมได้ด้วยกระบวนการ Alternative NHEJ (Alt-EJ)

แต่อย่างไรก็ตามการกลายพันธุ์ที่อาจเกิดขึ้นในระหว่างการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้แล้ว ก็สามารถเกิดขึ้นได้จากการที่กระบวนการซ่อมแซม DNA เกิดการผิดพลาด (30) ทำให้ DNA บริเวณที่ถูกทำลายไม่ได้รับการซ่อมแซม เกิดเป็นการกลายพันธุ์ในบริเวณนั้นๆ ขึ้น

### 2.13 การจัดระดับการกลายพันธุ์ของ Y-STR

การกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย Y-STR สามารถเกิดขึ้นได้ในธรรมชาติ ซึ่งในชุดตรวจ Y-STR สำเร็จรูปมีอัตราการกลายพันธุ์น้อยกว่า  $10^{-3}$  ซึ่งจัดว่าเป็นอัตราการกลายพันธุ์ต่ำถึงปานกลาง สามารถใช้ในการระบุบุคคล ที่มีใช้เครือญาติกัน แต่ไม่สามารถที่จะใช้แยกชายที่มีความสัมพันธ์ทางสายบิดาร่วมกันได้ จึงมีการค้นหา Y-STR ที่มีอัตราการกลายพันธุ์สูงขึ้น เพื่อนำมาประยุกต์ในกรณีดังกล่าว จากงานวิจัยของ Ballantyne และคณะ ปี 2010 ได้นำ Y-STR มาจำนวน 186 ตำแหน่ง เพื่อศึกษาการกลายพันธุ์ของ Y-STR และหาอัตราการกลายพันธุ์ของ Y-STR เนื่องจากการที่เกิดการกลายพันธุ์ขึ้น จะส่งผลต่อความหลากหลายของประชากร จึงสามารถที่จะนำไปแยกบุคคลที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันได้ จากการทดลองพบว่า มี 13 ตำแหน่งที่มีอัตราการกลายพันธุ์สูง (มากกว่า  $10^{-2}$ ) จึงเรียกชุดตำแหน่งเหล่านี้ว่า **Rapidly mutating (RM) Y-STR** และมีการจัดกลุ่มของ Y-STR ได้ตามการกลายพันธุ์ (31) ดังนี้

1. Slowly mutating Y-STRs (SM Y-STRs) เป็นกลุ่มของ Y-STR ที่มีอัตราการกลายพันธุ์ช้า เหมาะสำหรับใช้ศึกษาวิวัฒนาการของประชากรที่สนใจ (Evolution Study)
2. Medium mutating Y-STRs (MM Y-STRs) เป็นกลุ่มของ Y-STR ที่มีอัตราการกลายพันธุ์ปานกลาง เหมาะสำหรับใช้ศึกษาประวัติศาสตร์ของประชากรในกลุ่มที่สนใจ (Population history) และศึกษาลำดับญาติ (Genealogy Study)
3. Rapidly mutating Y-STRs (RM Y-STRs) เป็นกลุ่มของ Y-STR ที่มีอัตราการกลายพันธุ์ที่กลายพันธุ์รวดเร็ว เหมาะสำหรับใช้ศึกษาวิวัฒนาการในระดับ

ประชากรของสิ่งมีชีวิตโดยจะศึกษาการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของ พันธุกรรมของประชากร (Microevolutionary) และใช้ในการระบุตัวบุคคลที่มีความสัมพันธ์ทางสายบิดา

## 2.14 Rapidly Mutating (RM) Y-STR

เครื่องหมาย Y-STR ที่มีการกลายพันธุ์สูง และจากงานวิจัยของ Ballantyne และคณะ ปี 2012 ได้เปรียบเทียบความสามารถในการระบุตัวบุคคลเพศชายที่มีความสัมพันธ์และไม่มี ความสัมพันธ์กันของ RM Y-STR และชุดน้ำยาสำเร็จรูป Yfiler พบว่า RM Y-STR สามารถแยก ระบุตัวบุคคลที่มีความสัมพันธ์ทางสายบิดาเดียวกันได้ โดยสามารถแยกกระบู่ระหว่างบิดาและบุตรชาย ได้ประมาณร้อยละ 50 และสามารถแยกคู่พี่น้องชายได้ประมาณร้อยละ 60 ขณะที่ Yfiler มีความสามารถในการแยกได้เพียงร้อยละ 7.7 และ 8 ตามลำดับ (32) ข้อมูลของ RM Y-STR มี ทั้งหมด 13 ตำแหน่ง สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 2.2 ดังนี้

ตารางที่ 2.2 ข้อมูลเครื่องหมาย RM Y-STR ทั้งหมด 13 ตำแหน่ง ดัดแปลงจาก (32)

เครื่องหมาย	ประเภทของ ชุดซ้ำ	รูปแบบโมติฟของชุดซ้ำ (Repeat motif)	ตำแหน่งบน โครโมโซม (Chromosomal location)	ช่วงอัลลีลที่สามารถเกิดขึ้นได้	อัตราการกลายพันธุ์
DYF387S1*	Tetra, complex	(AAAG) <sub>3</sub> (GTAG) <sub>1</sub> (GAAG) <sub>4</sub> N <sub>16</sub> (GAAG) <sub>9</sub> (AAAG) <sub>13</sub>	Yq11.2 และ Yq11.23	28-38	1.59 x10 <sup>-2</sup>
DYF399S1*	Tetra, complex	(GAAA) <sub>3</sub> N <sub>7-8</sub> (GAAA) <sub>10-23</sub>	Yq11.223 และ Yq11.2	10-23	7.73 x10 <sup>-2</sup>
DYF403a+b**	Tetra, complex	A: (TTCT) <sub>10-17</sub> N <sub>2-3</sub> (TTCT) <sub>3-17</sub> B:(TTCT) <sub>12</sub> N <sub>2</sub> (TTCT) <sub>8</sub> (TTCC) <sub>9</sub> (TTCT) <sub>14</sub> N <sub>2</sub> (TTCT) <sub>3</sub>	Yq11.2	A: 12-39 B: 40-59	A:3.1x10 <sup>-2</sup> B:1.1 x10 <sup>-2</sup>
DYF404S1*	Tetra, complex	(TTTC) <sub>10-20</sub> N <sub>42</sub> (TTTC) <sub>3</sub>	Yq11.23 และ Yq12	10-20	1.25 x10 <sup>-2</sup>
DYS449	Tetra, complex	(TTCT) <sub>13-19</sub> N <sub>22</sub> (TTCT) <sub>3</sub> N <sub>12</sub> (TTCT) <sub>13-19</sub>	Yp11.2	24-37	1.22 x10 <sup>-2</sup>
DYS518	Tetra, complex	(AAAG) <sub>3</sub> (GAAG) <sub>1</sub> (AAAG) <sub>14-22</sub> (GGAG) <sub>1</sub> (AAAG) <sub>4</sub> N <sub>6</sub> (AAAG) <sub>11-19</sub> N <sub>27</sub> (AAGG) <sub>4</sub>	Yq11.221	23-35	1.84 x10 <sup>-2</sup>



DYS526a+b**	Tetra, complex	(CCCT) <sub>3</sub> N <sub>20</sub> (CTTT) <sub>11-17</sub> (CCTT) <sub>6-10</sub> N <sub>113</sub> (CCTT) <sub>10-17</sub>	Yp11.2	A: 10-17 B: 29-42	1.25 x10 <sup>-2</sup>
DYS547	Tetra, complex	(CCTT) <sub>9-13</sub> T(CTTC) <sub>4-5</sub> N <sub>56</sub> (TTTC) <sub>10-22</sub> N <sub>10</sub> (CCTT) <sub>4</sub> (TCTC) <sub>1</sub> (TTTC) <sub>9-16</sub> N <sub>14</sub> (TTTC) <sub>3</sub>	Yp11.221	36-48	2.36 x10 <sup>-2</sup>
DYS570	Tetra, simple	(TTTC) <sub>14-2</sub>	Yp11.2	10-21	1.24 x10 <sup>-2</sup>
DYS576	Tetra, simple	(AAAG) <sub>13-2</sub>	Yp11.2	13-23	1.43 x10 <sup>-2</sup>
DYS612	Tri, complex	(CCT) <sub>5</sub> (CTT) <sub>1</sub> (TCT) <sub>4</sub> (CCT) <sub>1</sub> (TCT) <sub>19-31</sub>	Yq11.221	14-31	1.45 x10 <sup>-2</sup>
DYS626	Tetra, complex	(GAAA) <sub>14-23</sub> N <sub>24</sub> (GAAA) <sub>3</sub> N <sub>6</sub> (GAAA) <sub>5</sub> (AAA) <sub>1</sub> (GAAA) <sub>2-</sub> <sub>3</sub> (GAAG) <sub>1</sub> (GAAA) <sub>3</sub>	Yq11.223	11-23	1.22 x10 <sup>-2</sup>
DYS627	Tetra, complex	(AGAA) <sub>3</sub> N <sub>16</sub> (AGAG) <sub>3</sub> (AAAG) <sub>12-24</sub> N <sub>81</sub> (AAGG) <sub>3</sub>	Yp11.2	10-24	1.23 x10 <sup>-2</sup>

\* สามารถมีจำนวนอัลลีลได้มากกว่า 1 อัลลีล (Multicopy)

\*\* สามารถมีจำนวนอัลลีลได้มากกว่า 1 อัลลีล (Multicopy) และมี 2 subtype ในเครื่องหมายเดียวกัน

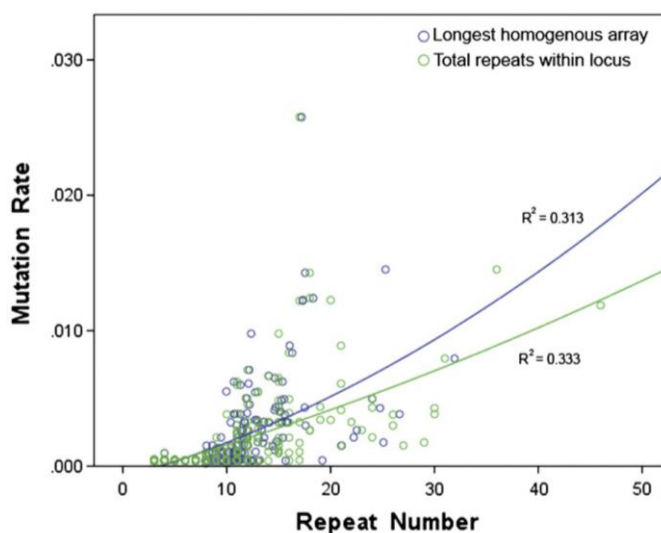
จากงานวิจัยปี 2010 ของ Ballantyne และคณะ หาอัตราการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย Y-STR จำนวน 186 เครื่องหมาย และหาปัจจัยที่ส่งผลต่ออัตราการกลายพันธุ์ในระดับโมเลกุล สามารถอธิบายได้ ดังนี้

## 2.15 ปัจจัยทางโมเลกุลที่มีผลต่ออัตราการกลายพันธุ์

ปัจจัยระดับโมเลกุลที่ส่งผลต่ออัตราการกลายพันธุ์ (5) มีดังนี้

### 1. จำนวนชุดซ้ำ (Number of repeat)

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ของจำนวนชุดเบสซ้ำกับอัตราการกลายพันธุ์ พบว่า เมื่อจำนวนชุดซ้ำเพิ่มขึ้น จะมีอัตราการกลายพันธุ์สูงขึ้น แสดงดังรูปที่ 2.7 เนื่องจากเมื่อความยาวของจำนวนชุดซ้ำมากขึ้น จะทำให้มีโอกาสเกิดโครงสร้างลำดับที่สอง (Secondary structure) เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้มีโอกาสเกิดการกลายพันธุ์แบบ Polymerase slippage ได้มากขึ้นตามลำดับ (33)



**รูปที่ 2.7** ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนชุดเบสซ้ำกับอัตราการกลายพันธุ์ เมื่อมีจำนวนชุดซ้ำเพิ่มขึ้น ส่งผลให้อัตราการกลายพันธุ์เพิ่มขึ้น โดยเส้นสีน้ำเงิน คือ ความยาวของชุดซ้ำ และเส้นกราฟสีเขียว คือ จำนวนชุดซ้ำทั้งหมดในเครื่องหมาย แหล่งที่มาของรูปจากบทความวิจัย The American Journal of Human Genetics หัวข้อ Mutability of Y-Chromosomal Microsatellites: Rates, Characteristics, Molecular Bases, and Forensic Implications (5)

## 2. รูปแบบของเบสซ้ำ (Complexity of repetitive structure)

เมื่อคิดอัตราส่วนของอัตราการกลายพันธุ์ระหว่างรูปแบบเบสซ้ำแบบง่ายและแบบซับซ้อน พบว่า เมื่อเครื่องหมายมีรูปแบบการซ้ำแบบซับซ้อนมากขึ้น จะมีอัตราการกลายพันธุ์สูงขึ้น อาจจะเป็นเพราะเมื่อมีการเพิ่มจำนวนของ DNA เครื่องหมายที่มีรูปแบบซ้ำแบบซับซ้อน จะมีความยากเนื่องจากโครงสร้างของเครื่องหมายนั้น ซึ่งจะเพิ่มโอกาสในการเกิดการกลายพันธุ์มากขึ้น ส่งผลให้มีอัตราการกลายพันธุ์สูงขึ้น (33)

## 3. จำนวนเบสซ้ำ (Motif unit size)

เมื่อจัดกลุ่มเครื่องหมาย Y-STR ที่มีจำนวนชุดซ้ำเหมือนกัน และหาอัตราการกลายพันธุ์เฉลี่ย พบว่า ชุดซ้ำที่มีจำนวนเบสซ้ำน้อย จะมีอัตราการกลายพันธุ์สูงขึ้น เนื่องจากเมื่อความยาวชุดเบสซ้ำน้อย จะมีโอกาสที่สาย DNA จับได้ผิดเพิ่มขึ้น เนื่องจากมีลำดับเบสซ้ำที่เหมือนกันเรียงตัวติดกันจำนวนมาก เช่น DYS612 เป็น RM Y-STR ที่มี repeat unit เป็น  $(CCT)_5(CTT)_1(TCT)_4(CCT)_1(TCT)_{19-31}$  จัดว่ามีจำนวนเบสซ้ำแบบซ้ำ 3 คู่เบส (Trinucleotide repeat) อาจจะทำให้บางส่วนของ DNA ต้นแบบ กับ DNA สายใหม่ที่จำลองขึ้นมาจับได้ไม่ตรงกัน

ส่งผลให้เพิ่มโอกาสในการเกิดโครงสร้างลำดับที่สองขึ้น จึงมีโอกาสเกิดการกลายพันธุ์ ส่งผลให้มีอัตราการกลายพันธุ์สูงขึ้น (33)

**ตารางที่ 2.3** อัตราการกลายพันธุ์เฉลี่ยของเครื่องหมาย Y-STR ที่จัดกลุ่มแบ่งตามจำนวนชุดเบสซ้ำ

จำนวนเบสซ้ำ	จำนวนเครื่องหมายที่ทำการศึกษา	อัตราการกลายพันธุ์เฉลี่ย (95% CI)
Trinucleotide repeat	72	$1.11 \times 10^{-3}$ ( $6.24 \times 10^{-4}$ to $1.59 \times 10^{-3}$ )
Tetranucleotide repeat	175	$2.07 \times 10^{-3}$ ( $1.60 \times 10^{-3}$ to $2.54 \times 10^{-3}$ )
Pentanucleotide repeat	17	$1.55 \times 10^{-3}$ ( $1.03 \times 10^{-3}$ to $2.07 \times 10^{-3}$ )
Hexanucleotide repeat	3	$4.64 \times 10^{-4}$ ( $4.20 \times 10^{-4}$ to $4.71 \times 10^{-4}$ )

#### 4. อายุของบิดา

เมื่อหาอายุเฉลี่ยบิดาที่มีการกลายพันธุ์ พบว่า อายุเฉลี่ยของบิดาที่พบการกลายพันธุ์เกิดขึ้นเท่ากับ  $32.42 \pm 10.97$  ปี แต่อย่างไรก็ตามอายุของบิดาไม่ใช่ปัจจัยที่ส่งผลต่อการกลายพันธุ์โดยตรง ดังนั้น จึงสรุปปัจจัยที่ส่งผลต่อการกลายพันธุ์ของ Y-STR ดังกล่าว ได้แก่ จำนวนชุดเบสซ้ำ รูปแบบของเบสซ้ำ และชุดของจำนวนเบสซ้ำ (5)

#### 5. เชื้อชาติ

กลุ่มชาติพันธุ์ที่แตกต่างกัน จะมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่แตกต่างกัน เนื่องจากในแต่ละพื้นที่มีปัจจัยที่ทำให้เกิดวิวัฒนาการในช่วงต่างๆของประชากรที่ไม่เหมือนกัน การกลายพันธุ์คือหนึ่งในปัจจัยที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของอัลลีลเดิมเป็นอัลลีลใหม่ ส่งผลให้ความถี่อัลลีลเปลี่ยนแปลง ดังนั้น กลุ่มประชากรที่พบการกลายพันธุ์ แสดงว่าพบการเปลี่ยนแปลงของอัลลีลเพิ่มขึ้น จะทำให้ประชากรกลุ่มนั้นมีค่าอัตราการกลายพันธุ์ที่สูงกว่าประชากรที่ไม่เกิดการกลายพันธุ์ นอกจากนี้อาจจะมีปัจจัยอื่น ๆ ร่วมด้วย (34) เช่น การอพยพย้ายถิ่นฐาน การคัดเลือกโดยธรรมชาติ การเปลี่ยนแปลงอัลลีลของประชากรอย่างกะทันหัน และการแต่งงานการในเครือญาติ

## 2.16 เกณฑ์ในการคัดเลือกเครื่องหมาย RM Y-STR ในงานวิจัยนี้

เครื่องหมาย RM Y-STR ในงานวิจัยนี้ถูกเลือกด้วยเกณฑ์ ดังต่อไปนี้

### 1. อัตราการกลายพันธุ์ของ RM Y-STR 13 ตำแหน่งในกลุ่มประชากรเอเชีย

จากตารางที่ 2.4 เป็นการเปรียบเทียบอัตราการกลายพันธุ์ของกลุ่มประชากรในแต่ละประเทศของทวีปเอเชีย จะเลือกเฉพาะเครื่องหมายที่มีอัตราการกลายพันธุ์สูง โดยหากเครื่องหมายใดมีอัตราการกลายพันธุ์ที่ต่ำถึงปานกลาง หรือ ถูกรายงานว่าไม่พบการกลายพันธุ์ในจำนวนมากกว่า 2 งานวิจัย เครื่องหมายดังกล่าวจะถูกคัดทิ้งจากการศึกษา

ตารางที่ 2.4 อัตราการกลายพันธุ์ของ RM Y-STR 13 ตำแหน่งในกลุ่มประชากรเอเชีย (7-13)

เครื่องหมาย RM Y-STR	Adnan <i>et al.</i> , 2016	Javed <i>et al.</i> , 2018	Rakha <i>et al.</i> , 2018	Zhang <i>et al.</i> , 2017	Chen <i>et al.</i> , 2017	Yuan <i>et al.</i> , 2019	Wang <i>et al.</i> , 2019
กลุ่ม ประชากร	ปากีสถาน	ปากีสถาน	สินธิ (ปากีสถาน)	จีน (กลุ่มชาติ พันธุ์ฮั่น)	จีน (กลุ่มชาติ พันธุ์ฮั่น)	จีน (กลุ่มชาติ พันธุ์ฮั่น)	จีน (กลุ่ม ชาติพันธุ์ฮั่น)
จำนวน ตัวอย่าง	428	35	49	1034	180	501	260
DYF387S1	$2.30 \times 10^{-2}$	$4.28 \times 10^{-2}$	0	$8.70 \times 10^{-3}$	0	$2.00 \times 10^{-2}$	$3.85 \times 10^{-3}$
DYF399S1	$6.30 \times 10^{-2}$	$7.14 \times 10^{-2}$	$1.22 \times 10^{-2}$	$6.29 \times 10^{-2}$	$5.00 \times 10^{-2}$	$4.59 \times 10^{-2}$	$3.85 \times 10^{-2}$
DYF403S1a /b	A: $2.60 \times 10^{-2}$ B: $7.00 \times 10^{-3}$	$7.14 \times 10^{-2}$	A: $2.04 \times 10^{-2}$ B1: $2.04 \times 10^{-2}$ B2: $4.08 \times 10^{-2}$	A: $2.71 \times 10^{-2}$ B: $7.74 \times 10^{-3}$	A: $2.22 \times 10^{-2}$ B1: $5.60 \times 10^{-3}$ B2: $2.78 \times 10^{-2}$	$2.00 \times 10^{-3}$	$1.15 \times 10^{-2}$
DYF404S1	$1.20 \times 10^{-2}$	$4.28 \times 10^{-2}$	0	$1.06 \times 10^{-2}$	$5.60 \times 10^{-3}$	$8.00 \times 10^{-3}$	$1.15 \times 10^{-2}$
DYS449	$4.70 \times 10^{-2}$	$2.38 \times 10^{-2}$	$4.08 \times 10^{-2}$	$1.26 \times 10^{-2}$	0	$2.00 \times 10^{-3}$	$1.15 \times 10^{-2}$
DYS518	$3.30 \times 10^{-2}$	-	$4.08 \times 10^{-2}$	$1.26 \times 10^{-2}$	$1.67 \times 10^{-2}$	$4.00 \times 10^{-3}$	$3.85 \times 10^{-2}$
DYS526a/b	A: 0 B: $1.40 \times 10^{-2}$	$1.90 \times 10^{-2}$	0	$9.67 \times 10^{-3}$	A: 0 B: $5.60 \times 10^{-3}$	A: $8.00 \times 10^{-3}$ B: $8.00 \times 10^{-3}$	A: $3.85 \times 10^{-3}$ B: $1.92 \times 10^{-3}$
DYS547	$1.90 \times 10^{-2}$	$3.80 \times 10^{-2}$	$4.05 \times 10^{-2}$	$1.35 \times 10^{-2}$	$1.67 \times 10^{-2}$	$1.40 \times 10^{-2}$	$7.89 \times 10^{-3}$
DYS570	$9.40 \times 10^{-3}$	$1.90 \times 10^{-2}$	0	$4.84 \times 10^{-3}$	$2.78 \times 10^{-2}$	$4.00 \times 10^{-3}$	$3.85 \times 10^{-3}$
DYS576	$1.40 \times 10^{-2}$	$1.05 \times 10^{-2}$	$2.04 \times 10^{-2}$	$1.35 \times 10^{-2}$	$5.60 \times 10^{-3}$	$6.00 \times 10^{-3}$	$2.69 \times 10^{-2}$
DYS612	$3.30 \times 10^{-2}$	$3.10 \times 10^{-2}$	$2.04 \times 10^{-2}$	$1.35 \times 10^{-2}$	$1.67 \times 10^{-2}$	$1.00 \times 10^{-2}$	$3.08 \times 10^{-2}$
DYS626	$7.00 \times 10^{-3}$	$1.43 \times 10^{-2}$	0	$7.74 \times 10^{-3}$	$1.11 \times 10^{-2}$	$1.00 \times 10^{-2}$	$7.69 \times 10^{-3}$
DYS627	$7.00 \times 10^{-3}$	$1.67 \times 10^{-2}$	$2.04 \times 10^{-2}$	$8.70 \times 10^{-3}$	0	$1.80 \times 10^{-2}$	$1.92 \times 10^{-2}$

## 2. ปัจจัยทางโมเลกุลที่มีผลต่ออัตราการกลายพันธุ์

ได้แก่ จำนวนชุดซ้ำ รูปแบบของเบสซ้ำ และจำนวนเบสซ้ำ จากเกณฑ์การคัดเลือกดังกล่าว จึงมีเครื่องหมายที่จะศึกษาในงานวิจัยนี้ทั้งหมด 4 เครื่องหมาย ดังตารางที่ 2.5

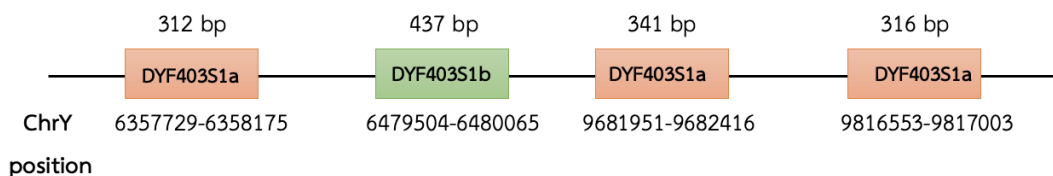
ตารางที่ 2.5 เครื่องหมายที่เลือกมาศึกษาในงานวิจัยนี้

เครื่องหมาย	จำนวน copy	โครงสร้าง	รูปแบบของการซ้ำ	จำนวนเบสซ้ำ
DYF399S1	Multicopy	$(GAAA)_3N_{7-8}(GAAA)_{10-23}$	Complex repeat	Tetranucleotide repeat
DYS547	Single copy	$(CCTT)_{9-13}T(CCTT)_{4-5}N_{56}(TTTC)_{10-22}N_{10}(CCTT)_4(TCTC)_1(TTTC)_{9-16}N_{14}(TTTC)_3$	Complex repeat	Tetranucleotide repeat
DYF403S1a	Multicopy	$(TTCT)_{10-17}N_{2-3}(TTCT)_{3-17}$	Complex repeat	Tetranucleotide repeat
DYS612	Single copy	$(CCT)_5CTT(TCT)_4CCT(TCT)_{19-31}$	Complex repeat	Trinucleotide repeat

เครื่องหมาย DYF403S1 เป็นเครื่องหมายที่มีโครงสร้างความซับซ้อนมากที่สุด โดยประกอบด้วย 4 copies ซึ่ง 3 copies จะเป็น Subtype A โดยมี 2 copies มีโครงสร้างและ flanking region เหมือนกัน ส่วนอีก 1 copy มี flanking region ที่ขยายออกไปกว่าเดิมเล็กน้อย และที่เหลือเป็น Subtype B ที่มีขนาดแตกต่างจาก Subtype A แสดงดังรูปที่ 2.8 แต่อย่างไรก็ตาม ตำแหน่งที่ไพรเมอร์จับ จะเหมือนกันทั้ง 4 copies (35) ดังนั้น จึงจับได้ทั้งเครื่องหมาย DYF403S1a และ b

ในการศึกษานี้เลือกศึกษาเครื่องหมาย DYF403S1a เนื่องจากเครื่องหมาย DYF403S1b จากการศึกษการกลายพันธุ์บนตำแหน่ง Y-STR ที่มีอัตราการกลายพันธุ์รวดเร็วจำนวนสองตำแหน่ง ในชายไทยที่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือด (36) ได้ศึกษาเครื่องหมาย DYF399S1 และ DYF403S1a+b พบว่า ไม่พบการกลายพันธุ์เครื่องหมาย DYF403S1b ดังนั้น การศึกษานี้จึงต้องการ

เพิ่มจำนวนตัวอย่าง เพื่อให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับการกลายพันธุ์ของ DYF399S1 และ DYF403S1a ในกลุ่มประชากรไทยมากขึ้น



**รูปที่ 2.8** แผนภาพตำแหน่งของเครื่องหมาย DYF403S1a+b ดัดแปลงมาจากบทความวิจัย Forensic Science International: Genetics หัวข้อ A multiplex PCR system for 13 RM Y-STRs with separate amplification of two different repeat motif structures in DYF403S1a (35)

## 2.17 พันธุศาสตร์ประชากร (Population Genetics)

คือ การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรที่สนใจและศึกษาการเปลี่ยนแปลงของอัลลีลและจีโนไทป์ที่เกิดขึ้นในประชากรเมื่อเวลาผ่านไป (37) ซึ่งทำให้เกิดเป็นความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic Diversity)

- **หลักการของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg principle)** คือ ประชากรจะมีความถี่อัลลีลและความถี่จีโนไทป์จะคงที่ในทุกๆ รุ่น โดยประชากรนั้นจะต้องมี (38)
  1. ประชากรมีขนาดใหญ่
  2. ประชากรมีการผสมพันธุ์กันแบบสุ่ม
  3. ไม่มีการอพยพย้ายถิ่น
  4. มีความสามารถในการอยู่รอดและสืบพันธุ์เท่ากัน
  5. ไม่เกิดการกลายพันธุ์

แต่ไม่มีประชากรกลุ่มใดที่เป็นไปตามหลักการของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก เนื่องจากทุกกลุ่มประชากรมีวิวัฒนาการที่จะทำให้เกิดความหลากหลายในแต่ละกลุ่มประชากร โดยปัจจัยที่ส่งผลต่อความหลากหลายของประชากร ได้แก่ การกลายพันธุ์, การอพยพ, การคัดเลือก, การผสมกันในเครือญาติ และการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมอย่างฉับพลัน (39)

เมื่อในกลุ่มประชากรมีเครื่องหมาย STR ที่เกิดการกลายพันธุ์เกิดขึ้น จะมีการคำนวณอัตราการกลายพันธุ์ เพื่อเป็นการบ่งบอกว่าในกลุ่มประชากรนั้นเครื่องหมายนั้นๆ มีโอกาสในการเกิดการ

กลายพันธุ์เท่าไร จากตารางที่ 2.4 จะเห็นได้ว่าในประชากรที่แตกต่างกัน จะมีอัตราการกลายพันธุ์ที่ไม่เท่ากัน เช่น ในประชากรจีนกลุ่มชาติพันธุ์ฮั่น เครื่องหมาย DYS499 ไม่พบการกลายพันธุ์ ในขณะที่กลุ่มประชากรเชื้อชาติอื่นในทวีปเอเชีย เครื่องหมาย DYS499 มีแนวโน้มที่จะมีอัตราการกลายพันธุ์ที่สูง ดังนั้น อัตราการกลายพันธุ์ที่สูงจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลง Y- haplotype ในกลุ่มประชากรนั้น ทำให้เกิดเป็นความหลากหลายมากขึ้นในประชากร (40) ดังนั้น การศึกษาอัตราการกลายพันธุ์ในกลุ่มประชากรจึงเป็นหนึ่งในกระบวนการศึกษาทางพันธุศาสตร์ประชากร

## 2.18 การคำนวณค่าทางพันธุศาสตร์ประชากร

- **ความถี่ของอัลลีล (Allele Frequency)**

คือ สัดส่วนของรูปแบบอัลลีลทั้งหมดที่มีอยู่ในประชากร เช่น อัลลีล A มีความถี่อัลลีลเท่าไรในประชากร สามารถคำนวณได้จากสูตร (41) ดังนี้

$$\text{Allele Frequency} = \frac{\text{จำนวนของอัลลีล A ที่มีในประชากร}}{\text{จำนวนประชากรทั้งหมด}}$$

- **ความถี่ของแฮพโลไทป์ (Haplotype Frequency)**

คือ สัดส่วนของรูปแบบชุดของอัลลีลบนโครโมโซมหนึ่งๆ ที่สนใจที่มีอยู่ในกลุ่มประชากร

$$\text{Haplotype Frequency} = \frac{\text{จำนวนของรูปแบบของชุดอัลลีลกลุ่มในประชากร}}{\text{จำนวนประชากรทั้งหมด}}$$

- **ความหลากหลายของยีน (Gene Diversity)**

คือ ค่าที่บอกความหลากหลายของยีนที่สนใจในกลุ่มประชากร สามารถคำนวณได้จากสูตร (42) ดังนี้

$$\text{Gene Diversity} = \frac{N(1 - \sum_{i=1}^n P_i^2)}{N-1}$$

โดย P คือ ความถี่ของอัลลีล i

N คือ จำนวนของตัวอย่าง

- ความหลากหลายของแฮพลไทป์ (Haplotype Diversity)

คือ ค่าที่บอกความหลากหลายของ Haplotype บนโครโมโซมที่สนใจในกลุ่มประชากร สามารถคำนวณได้จากสูตร (42) ดังนี้

$$\text{Haplotype Diversity} = \frac{N(1 - \sum_{i=1}^n f_i^2)}{N-1}$$

โดย N คือ จำนวนของตัวอย่าง

f คือ ความถี่ของ Haplotype i

- ความสามารถในการแยกระบุ (Discrimination Capacity)

คือ ค่าที่บอกความเป็นความเฉพาะของ Haplotype ในกลุ่มประชากรที่สนใจ บอกถึงความสามารถแยกบุคคลที่มีบรรพบุรุษร่วมกันได้ สามารถคำนวณได้จากสูตร (43) ดังนี้

$$\text{Discrimination Capacity} = \frac{\text{จำนวนของ Haplotype ที่แตกต่างกัน}}{\text{จำนวน Haplotype ทั้งหมด}}$$

## 2.19 การคำนวณในงานนิติพันธุศาสตร์

งานนิติพันธุศาสตร์มีการคำนวณค่าความสัมพันธ์ระหว่างบุคคลโดยอาศัยหลักสถิติและความน่าจะเป็น ดังนี้

- Likelihood Ratio (LR)

เป็นการเปรียบเทียบสมมติฐาน 2 สมมติฐานที่ตรงข้ามกัน โดยการนำอัตราการกลายพันธุ์มาใช้ในกรณีที่เปรียบเทียบระหว่างความน่าจะเป็นที่ชายสองคนจะมีความสัมพันธ์ทางสายบิดาและความน่าจะเป็นที่ชายสองคนจะไม่มีความสัมพันธ์ทางสายบิดา เรียกว่า Y-STR kinship index ด้วยสูตรคำนวณอ้างอิงจาก (44) ดังต่อไปนี้

$$\text{LR} = \frac{P(E|H_0)}{P(E|H_1)} = \frac{H_0: \text{สมมติฐานที่ชายสองคนเป็นเครือญาติกัน}}{H_1: \text{สมมติฐานที่ชายสองคนไม่เป็นเครือญาติกัน}}$$

โดยการนำอัตราการกลายพันธุ์มาใช้ ดังนี้

$$\text{LR} = \frac{\prod_{i \in L} \left[ \binom{m}{s} \left( \frac{\mu}{2} \right)^s (1-\mu)^{m-s} \right]}{f(\text{offspring})}$$



โดย  $L$  คือ haplotype ที่ได้จาก Profile ของชายทั้งสองคน

$s$  คือ ค่าความแตกต่างของอัลลีลในแต่ละเครื่องหมาย Y-STR ระหว่างชายทั้งสองคน

$\mu$  คือ อัตราการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย Y-STR ที่สนใจ

$\left(\frac{\mu}{2}\right)$  คือ ความน่าจะเป็นที่เครื่องหมาย Y-STR ที่สนใจนั้นจะเกิดการกลายพันธุ์

$1 - \mu$  คือ ความน่าจะเป็นที่เครื่องหมาย Y-STR ที่สนใจนั้นจะไม่เกิดการกลายพันธุ์

$m$  คือ จำนวนของการส่งต่อที่เกิดขึ้นภายใต้เหตุการณ์  $H_0$  และ  $H_1$  (Number of transmission event)

$f$  (offspring) คือ ความถี่ของ Haplotype ของชายที่เป็นคู่เทียบ

โดยกำหนดให้ จำนวนของการถ่ายทอดที่เกิดขึ้น ( $m$ ) = 1 และการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเป็นการกลายพันธุ์แบบเพิ่มขึ้นหรือลดลง 1 ชุดซ้ำ (One-step mutation)

$$\text{จะได้ } LR = \frac{\prod_{i \in L} \left(\frac{\mu}{2}\right)^i}{f \text{ (offspring)}}$$

ดังนั้น ค่า LR ที่ได้จะสามารถบอกโอกาสที่ชายสองคนจะมีความสัมพันธ์ทางสายบิดาได้

การพิจารณาค่า LR ในการแปลผลเพื่อสนับสนุนสมมติฐานว่า ชายสองคนเป็นเครือญาติสามารถพิจารณาตามเกณฑ์ (45) ดังตารางนี้

**ตารางที่ 2.6** การพิจารณาช่วงของค่า  $LR$  เพื่อสนับสนุนสมมติฐาน

ช่วงของค่า LR	ระดับในการสนับสนุน
1-10	การสนับสนุนถูกจำกัด
10-100	สนับสนุนระดับกลาง
100-1000	สนับสนุนระดับกลางพอสมควร
1000-10,000	สนับสนุนระดับมาก
มากกว่า 10,000	สนับสนุนระดับมากที่สุด

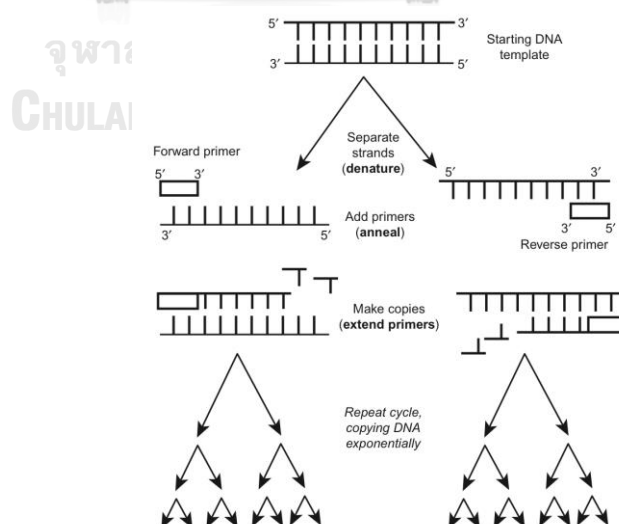
## 2.20 การตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการทางนิติพันธุศาสตร์ในการศึกษา RM Y-STR ตำแหน่ง DYF399S1 DYS547 DYF403S1a และ DYS612

### ● Polymerase Chain Reaction

Polymerase Chain Reaction หรือ PCR เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่โดยอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งเป็นการจำลองกระบวนการ DNA replication เพื่อเพิ่มจำนวนของชิ้น DNA ในบริเวณที่สนใจ โดยจะขึ้นอยู่กับการอุณหภูมิในแต่ละรอบของปฏิกิริยา (Thermal cycling) มี 3 ขั้นตอนหลัก (46) (รูปที่ 2.9) ดังนี้

1. Denaturation ( $94^{\circ}\text{C}$ ) เป็นการเพิ่มอุณหภูมิสูง เพื่อแยกสายคู่ของ DNA ให้กลายเป็นสายเดี่ยว ซึ่งเป็นการใช้ความร้อนในการทำลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างสาย DNA
2. Annealing หรือ renaturation ( $T_m \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) เป็นการลดอุณหภูมิเพื่อให้ไพรเมอร์ (Primer) เป็น DNA สายสั้นที่เข้าไปจับกับ DNA เป้าหมายแบบคู่สม แล้วเกิดการสร้างเป็น DNA สายคู่
3. Extension ( $72^{\circ}\text{C}$ ) เป็นการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อให้เอนไซม์ DNA polymerase ทำการเติมเบสและเติมจากปลาย  $5' \rightarrow 3'$

โดยทั่วไปจำนวนรอบของ PCR จะอยู่ที่ประมาณ 20-40 รอบ



รูปที่ 2.9 ขั้นตอนของเทคนิค PCR จากหนังสือ Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology บทที่ 4 PCR Amplification (46)

### ส่วนประกอบที่ใช้ในการทำ PCR

- DNA ต้นแบบ (DNA template) คือ DNA ต้นแบบที่ต้องการจะเพิ่มจำนวน
- เอนไซม์ DNA polymerase คือ เอนไซม์ทำหน้าที่สังเคราะห์ DNA สายใหม่โดยจะเติมเบสคู่สม (Complementary nucleotides) ให้กับ DNA ต้นแบบ
- ไพร์เมอร์ (Primer) คือ นิวคลีโอไทด์สายเดี่ยวขนาดสั้น (Single-strand Oligonucleotide) ใช้ในการจับกับบริเวณขนาบข้าง (Flanking region) ของ DNA เป้าหมาย เพื่อเป็นการกำหนดขอบเขตของบริเวณที่ต้องการจะเพิ่มจำนวน ได้แก่ Forward primer และ Reverse primer โดยที่ Forward primer จะออกแบบจากปลาย 5' ของ DNA เป้าหมาย และเข้าจับกับ DNA เป้าหมายที่เป็น anti-sense strand (3' → 5') ส่วน Reverse primer จะออกแบบจากปลาย 3' ของ DNA เป้าหมาย และเข้า จับกับ DNA เป้าหมายที่เป็น sense strand (5' → 3')
- Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) ประกอบด้วย dATP dGTP dTTP dCTP เป็น Substrate ของ DNA polymerase ในการสร้างสาย DNA คู่สม
- บัฟเฟอร์ (Buffer) ทำหน้าที่ควบคุมสถานะของปฏิกิริยาให้สามารถทำงานได้
- แมกนีเซียมไอออน ( $Mg^{2+}$ ) ทำหน้าที่เป็น Co-factor ให้เอนไซม์ DNA polymerase ทำงานได้ดีขึ้น ซึ่งปริมาณของแมกนีเซียมไอออน จะส่งผลต่อผลผลิต PCR (PCR Product) หากมีปริมาณความเข้มข้นของ  $Mg^{2+}$  มากเกินไป จะทำให้เกิด PCR Product แบบไม่จำเพาะ (Non-specific PCR) ดังนั้น การใช้ปริมาณ  $Mg^{2+}$  ที่พอเหมาะ นอกจากจะช่วยให้เอนไซม์ทำงานได้ดีขึ้นแล้ว ยังช่วยให้ ไพร์เมอร์ทำงานความจำเพาะขึ้นอีกด้วย

รูปแบบของ PCR มีหลายประเภท เช่น Multiplex PCR, Nested PCR, Allele-specific PCR เป็นต้น โดยในแต่ละรูปแบบจะถูกเลือกใช้ตามจุดประสงค์ของงานวิจัย ซึ่งในงานวิจัยนี้จะเลือกใช้ multiplex PCR

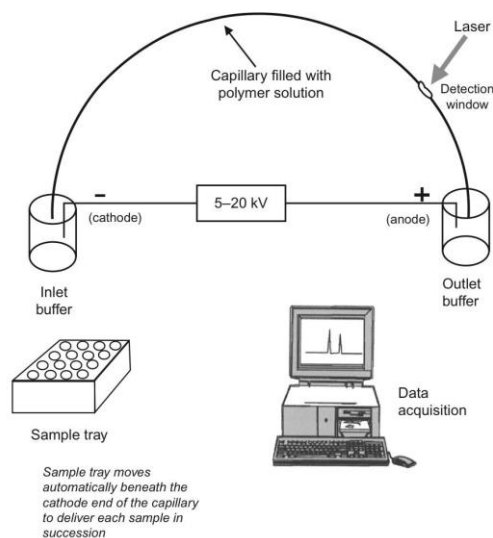
- **Multiplex PCR**

เป็นเทคนิค PCR ที่ต้องการจะเพิ่มจำนวน (Amplify) DNA เป้าหมายพร้อมกันมากกว่า 1 เป้าหมาย โดยจะใช้ไพรเมอร์พร้อมกันหลายๆคู่ แต่ละคู่จะ amplify ตำแหน่งที่แตกต่างกัน ข้อดีคือ รวดเร็ว เพราะสามารถทำได้หลายเป้าหมายพร้อมๆ กัน อย่างไรก็ตามไพรเมอร์แต่ละคู่จะมี condition ที่แตกต่างกัน เช่น  $T_m$  ที่ไม่เท่ากัน และต้องระวังเรื่องการจับคู่กันเองของไพรเมอร์ (dimer-primer) (46)

### Capillary Electrophoresis

Capillary Electrophoresis หรือ CE เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกและตรวจสอบ STR allele ในงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ โดยอาศัยความแตกต่างของประจุไฟฟ้าในการแยก (47) มีส่วนประกอบของเครื่องแสดงดังรูปที่ 2.10

- **ส่วนประกอบของเครื่อง Capillary Electrophoresis**



**รูปที่ 2.10** ส่วนประกอบของเครื่อง Capillary Electrophoresis จากหนังสือ Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology บทที่ 6 Capillary Electrophoresis (47)

1. หลอดแคปิลลารี (Narrow glass capillary) เป็นหลอดที่ทำมาจากแก้วมีขนาดเล็ก ยาวประมาณ 50 เซนติเมตร และมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 50 ไมโครเมตร โดยหลอดแคปิลลารีจะถูกเติมสารละลายพอลิเมอร์ที่มีลักษณะเหนียวหนืด (Viscous polymer solution)

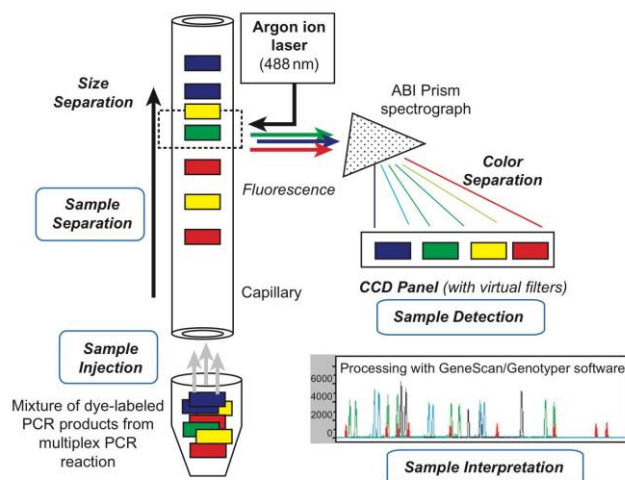
2. ภาชนะสำหรับบรรจุบัฟเฟอร์ (Buffer vials)
3. ถาดสำหรับใส่ตัวอย่าง (Sample tray)
4. ขั้วไฟฟ้าที่ต่อกับแหล่งจ่ายไฟฟ้า (Two Electrodes) มี 2 ขั้ว ได้แก่ แอโนด (anode) และแคโทด (Cathode)
5. เครื่องตรวจวัด (Detector)
6. เลเซอร์ (Laser)

### สารละลายที่ใช้ในการแยก DNA โดยใช้เทคนิค CE

1. พอลิเมอร์ (Polymer) ที่ใช้จะเรียกว่า Performance Optimized Polymer (POP) มีหน้าที่ในการสร้างสภาพแวดล้อมในหลอดแคปิลลารีให้เหมาะสมกับสาย DNA ที่ถูก denature เช่น POP-4 (4% uncross-linked dimethyl polyacrylamide) เป็นพอลิเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับการใช้วิเคราะห์ชิ้น DNA, POP-6 (6% uncross-linked dimethyl polyacrylamide) เป็นพอลิเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับการใช้ทำ DNA sequencing
2. บัฟเฟอร์ (Buffer) ทำหน้าที่ช่วยให้พอลิเมอร์มีการกระจายตัวและช่วย stabilizes และ solubilizes DNA และเตรียมเป็นที่รับประจุที่ถูกปล่อยออกมา

### การทำงานของเครื่อง Capillary Electrophoresis

ตัวอย่าง DNA จะถูกติดสารเรืองแสงและบรรจุอยู่ในถาดใส่ตัวอย่างและจะถูกฉีดเข้าไปในหลอดแคปิลลารีอย่างเป็นลำดับโดยอาศัยความต่างศักย์ไฟฟ้า นอกจากนี้ยังอาศัยแรงภายในหลอดแคปิลลารี เนื่องจากหลอดแคปิลลารีทำมาจากแก้ว (Silicon dioxide, SiO<sub>2</sub>) และมี Hydroxyl group ของ SiOH ที่เป็นประจุอยู่ภายในหลอดแคปิลลารี ที่มีค่า pH ประมาณ 5 เนื่องจากบัฟเฟอร์มีค่า pH ประมาณ 8 ดังนั้น ประจุบวกจากบัฟเฟอร์จะไปจับกับ SiO<sup>-</sup> ได้พื้นที่ผิวเป็นลักษณะกำแพงสองชั้น จากนั้นตัวอย่างจะถูกแยกโดย DNA จะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก โมเลกุลของ DNA ที่มีขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ DNA ที่ถูกติดด้วยสารเรืองแสง จะถูกกระตุ้นด้วยลำแสงของเลเซอร์ เมื่อเคลื่อนที่ผ่าน detection window จากนั้นจะถูกตรวจจับด้วยกล้อง CCD และวิเคราะห์ผลที่ได้ด้วยโปรแกรม GeneMapper โดยกระบวนการทั้งหมดแสดงดังรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.11 การทำงานของเครื่อง Capillary Electrophoresis จากหนังสือ Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology บทที่ 6 Capillary Electrophoresis (47)

### การวิเคราะห์ข้อมูลดิบที่ได้จาก Capillary Electrophoresis

การวิเคราะห์ข้อมูลดิบจากการแยกขนาดของ PCR product ด้วยเทคนิค Capillary Electrophoresis สามารถใช้โปรแกรมในการอ่านและวิเคราะห์ โดยในงานวิจัยนี้เลือกใช้โปรแกรม Gene Mapper ID-X v.1.6 (48) ในการวิเคราะห์ข้อมูลดิบและจะแสดงผลวิเคราะห์เป็น DNA profile หรือ Electropherogram

- ลักษณะของพีคที่สามารถพบได้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลในตัวอย่างที่เป็นชีววัตถุ อาจจะมีพีคสิ่งแปลกปลอมที่สามารถเกิดขึ้นได้ ซึ่งสามารถแบ่งตามสาเหตุของการเกิด ได้ดังนี้ (16)

1. DNA ตั้ดต้นที่ใช้ในการทดลอง

กรณี DNA ตั้ดต้นที่ใช้ในการทดลองมากเกินไป สามารถมีพีคสิ่งแปลกปลอมเกิดขึ้นได้ ได้แก่

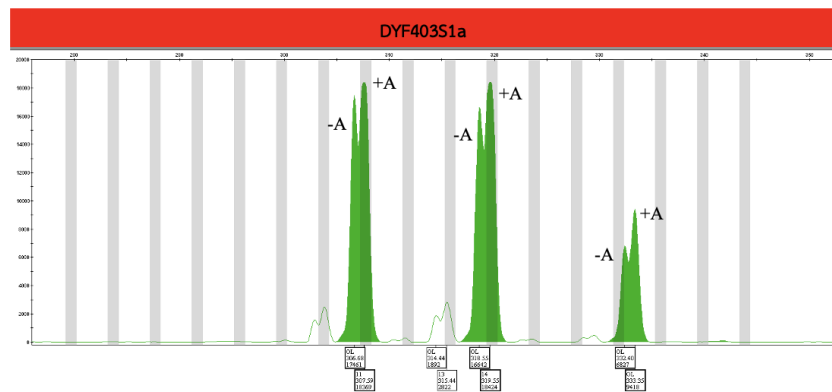
#### - Spike

คือ พีครองที่เกิดจากพีคหลักที่มีความสูงมากเกินไป ทำให้เกิดการรบกวนช่องสี ส่งผลให้เกิดเป็นพีคแหลมขึ้นมา นอกจากนี้ Spike อาจจะมีสาเหตุจากการกระชากของกระแสไฟฟ้า หรือ มีฟองอากาศในหลอด (Capillary Spike) (16, 49) สามารถแก้ไขโดย

เจือจางความเข้มข้นของ PCR Product ให้มีความเข้มข้นน้อยลงและลองแยกขนาดด้วย CE ใหม่อีกครั้ง

#### - Split

คือ เป็นพีคที่มีลักษณะ 2 ยอด เกิดจาก DNA template มากเกินไป ทำให้ DNA polymerase ทำงานได้ไม่สมบูรณ์ (16, 49) สามารถแก้ไขโดย เพิ่มเวลาในขั้นตอน Extension เพื่อให้ DNA polymerase ได้ทำงานอย่างสมบูรณ์



รูปที่ 2.12 ลักษณะของ split

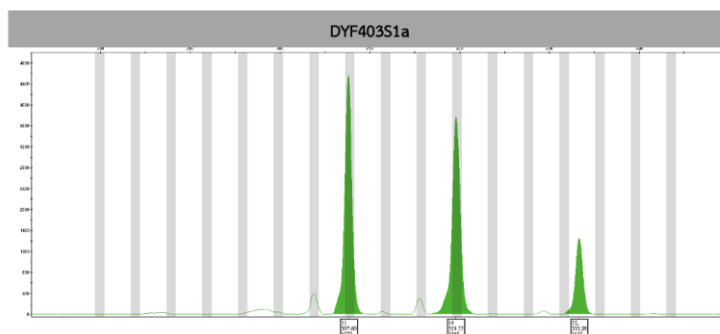
#### - Off-scale

คือ พีคที่มีลักษณะสูงเกินขนาดของสเกลที่ตั้งไว้ เกิดจาก DNA template มากเกินไป ทำให้มีการเกิดขึ้นของ Product ที่มาก ซึ่งสารเรืองแสงที่ติดอยู่กับ Product ที่มาก ทำให้มีพีคที่สูงเกินกว่าปกติ (49) แก้ไขโดยเจือจางความเข้มข้นของ PCR Product หรือเจือจางความเข้มข้นของ DNA template หรือ ลดความเข้มข้นของไพรเมอร์ หรือลดจำนวนรอบของ PCR หรือ ลด Injection time ของเครื่อง CE เพื่อให้เครื่อง CE ดูตัวอย่างไปที่ละน้อยๆลง

2. กรณี DNA ตั้งต้นที่ใช้ในการทดลองน้อยเกินไป สามารถพบลักษณะของพีค ดังนี้

#### - Peak height imbalance

คือ การที่มีความสูงของพีคที่ไม่สมดุลกันในตำแหน่งที่สามารถเกิดพีคได้มากกว่า 1 พีค เกิดจาก Stochastic effect ที่อาจจะเกิดขึ้นได้จาก DNA ตั้งต้นน้อยเกินไป ทำให้ PCR ทำงานได้ไม่สมบูรณ์ แก้ไขโดย วิเคราะห์ซ้ำตั้งแต่ขั้นตอน PCR อีกครั้งหนึ่ง (16, 49)



รูปที่ 2.13 ลักษณะของ Peak imbalance

- Allele dropout

คือ การที่ไม่พบอัลลีลในตำแหน่งนั้นจากเดิมที่ตรงพบในตำแหน่งนั้น โดย Allele drop out เกิดขึ้นได้จาก DNA template น้อยเกินไป หรือ อาจเกิดจากการที่มี PCR condition ที่ไม่เหมาะสม แก้ไขโดย วิเคราะห์ซ้ำตั้งแต่ขั้นตอน PCR อีกครั้งหนึ่งด้วยชุดไพรเมอร์ใหม่ที่มีเป้าหมายตำแหน่งเดียวกัน

กรณีเกิดจากคุณภาพของ DNA สามารถมีพิคสิ่งแปลกปลอมเกิดขึ้นได้ ดังนี้

- Off-ladder

Off Ladder หรือ OL เกิดจากการที่พบอัลลีลที่พบได้น้อย หรือ เป็นอัลลีลใหม่ที่ยังไม่มีในฐานข้อมูลทำให้ต้องคำนวณหาพิคที่แท้จริง แก้ไขโดย ยืนยันขนาดของ PCR product โดยการนำตัวอย่างมาแยกขนาดในขั้นตอนการแยกขนาดใหม่ จากนั้นคำนวณหมายเลขชื่ออัลลีลที่แท้จริง หรือจำนวนชุดของชุดซ้ำที่แท้จริง (16)

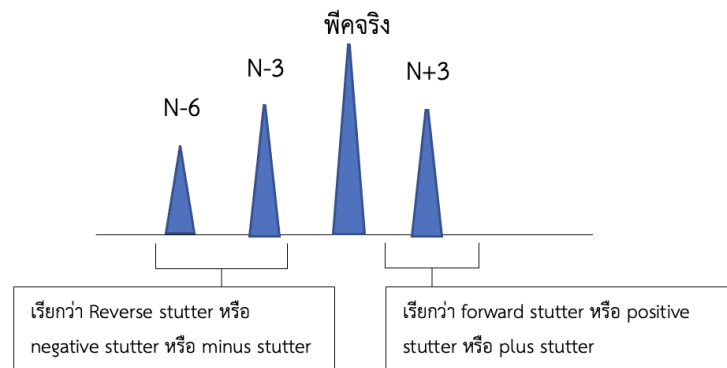
3. ขั้นตอนขณะที่มีการเพิ่มจำนวนของตำแหน่งที่สนใจด้วยเทคนิค PCR

- Stutter

คือ PCR product ที่สามารถเกิดได้จากกระบวนการ Polymerase Slippage ช่วงขั้นตอน Elongation (50) มีลักษณะเป็นพิคที่มีลำดับเบสซ้ำน้อยกว่าหรือมากกว่าพิคหลัก 1 ชุดซ้ำ ดังตัวอย่างที่รูปที่ 2.14 แก้ไขโดย การกำหนดค่า % stutter ที่อนุญาตให้เกิดขึ้น



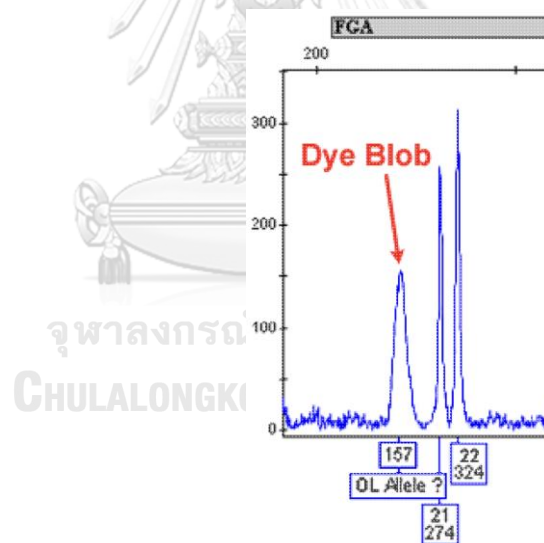
เช่น DYS612 เป็น trinucleotide repeat



รูปที่ 2.14 ลักษณะของ stutter ที่สามารถเกิดขึ้นได้ของเครื่องหมาย DYS612

- Dye blob

คือ สิ่งแปลกปลอมที่เกิดจากการสังเคราะห์ไพร์เมอร์ที่ไม่สมบูรณ์ ทำให้สารเรืองแสงที่ติดอยู่กับไพร์เมอร์ เข้ากระบวนการแยกขนาดด้วยเทคนิค CE ได้ จึงได้เป็นพีคที่มีฐานกว้าง แก้ไขโดย เลือกวิธีสังเคราะห์ไพร์เมอร์แบบอื่นที่ทำให้ไพร์เมอร์มีความบริสุทธิ์มากขึ้น (16)



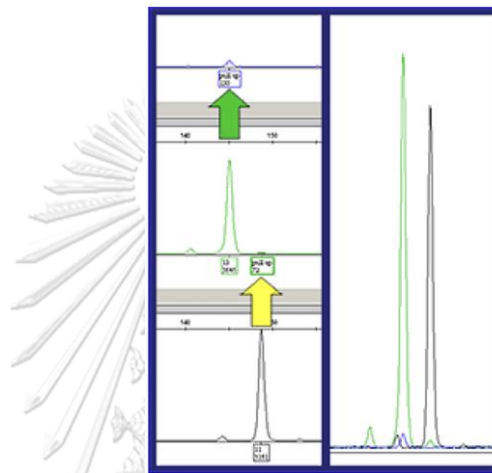
รูปที่ 2.15 ลักษณะของ dye blob แหล่งที่มาของรูปจากเว็บไซต์

<http://dna.gov/training/strdata> (49)

4. ขั้นตอนการแยกขนาดของ PCR Product ที่ได้ด้วยเทคนิค CE

- Pull up

คือ พีคที่เกิดจากความสามารถของการวัดความเข้มของแสงที่มีอยู่จำกัด ทำให้เกิดข้อผิดพลาดในการเปรียบเทียบกับสเปกตรัมมาตรฐาน จึงเกิดพีคของสีอื่นซ้อนทับในตำแหน่งเดียวกัน แก้ไขโดย เจือจางความเข้มข้นของ PCR product แล้ววิเคราะห์ด้วย CE อีกครั้ง (16, 49)

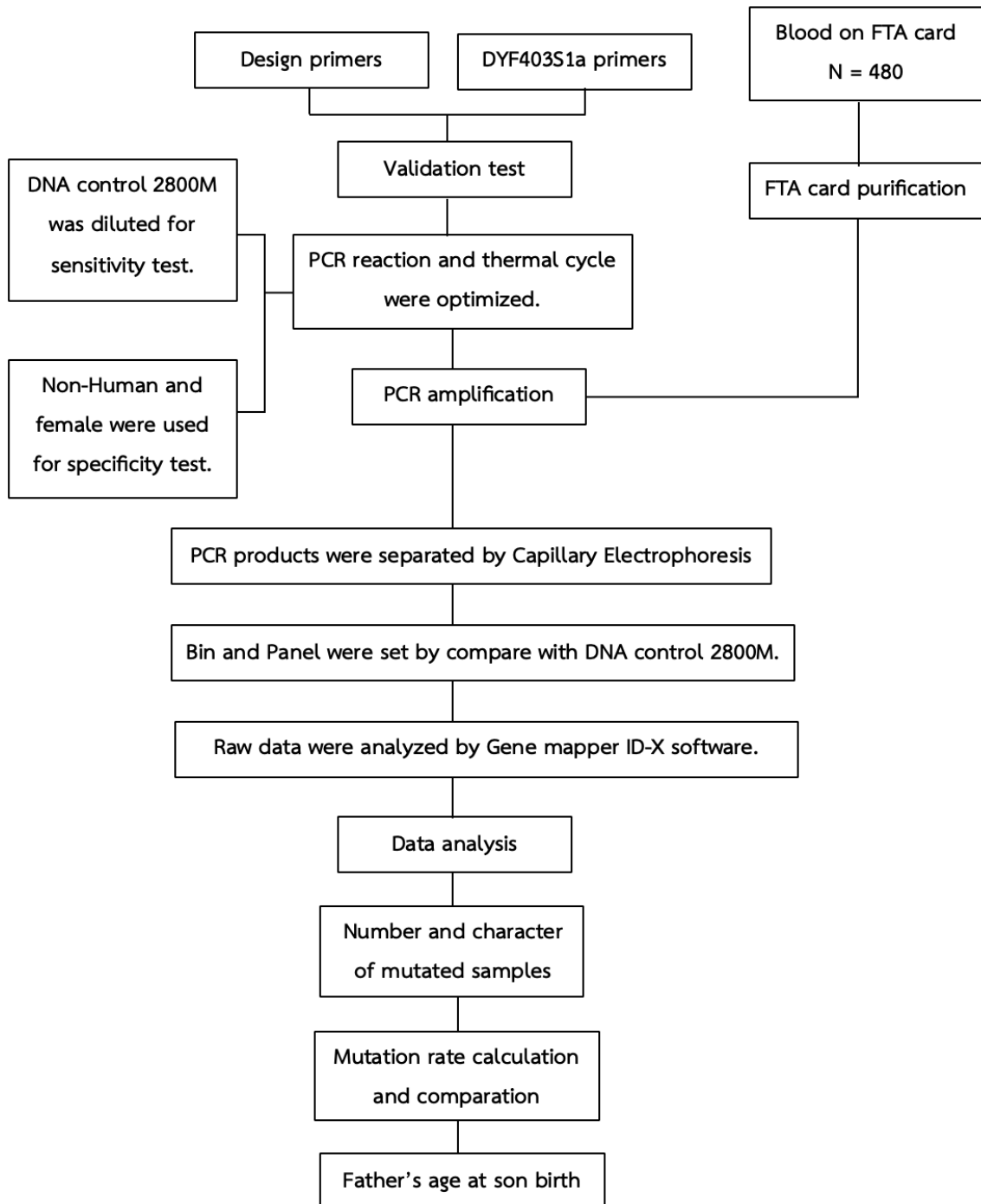


รูปที่ 2.16 ลักษณะของ pull up แหล่งที่มาของรูปจากเว็บไซต์

<http://dna.gov/training/strdata> (49)

### บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย

#### 3.1 รูปแบบการทดลอง



#### 3.2 รูปแบบการวิจัย (Research Design)

การวิจัยเชิงพรรณนา (Descriptive Study)

### 3.3 ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

#### 3.3.1 ตัวแปรในงานวิจัย (Variable)

##### 3.3.1.1 ตัวแปรอิสระ (Independent Variable) คือ

การกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย RM Y-STR ทั้ง 4 ตำแหน่ง

##### 3.3.1.2 ตัวแปรตาม (Dependent Variable) คือ

อัตราการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย RM Y-STR ในประชากรไทย

#### 3.3.2 กลุ่มประชากรเป้าหมาย (Target population)

##### 3.3.2.1 เกณฑ์คัดเข้า (Inclusion criteria)

- บิดาสัญชาติไทยที่มีเอกสารของรัฐรับรอง
- บิดาและบุตรชายได้รับการยืนยันความสัมพันธ์ทางสายเลือดโดยการตรวจ Autosomal STR โดยมีรูปแบบจีโนไทป์ครึ่งหนึ่งของบุตรชายเหมือนกับบิดา

##### 3.3.2.2 เกณฑ์คัดออก (Exclusion criteria)

- ผลการตรวจ Autosomal STR ปฏิเสธความสัมพันธ์
- ตัวอย่างกระดาษ FTA มีปริมาณของเลือดน้อยเกินไป หรือ อยู่ในสภาพที่ไม่สมบูรณ์ต่อการใช้งาน
- ตัวอย่างกระดาษ FTA ของคู่บิดาและบุตรชายนั้นไม่ครบ

#### 3.3.3 การคำนวณขนาดตัวอย่าง (Sample size)

จากสูตร (51)

$$\text{ดังนั้น } n = \frac{(Z_{\infty/2})^2 PQ}{d^2}$$

โดย n คือ ขนาดของกลุ่มตัวอย่าง

Z คือ ค่าระดับความเชื่อมั่นในการสรุปข้อมูล

P คือ อัตราการกลายพันธุ์

Q คือ 1 - อัตราการกลายพันธุ์

d คือ ค่าความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้

กำหนดให้ระดับความเชื่อมั่นในการสรุปข้อมูลเป็น 95%

แทนค่า  $Z = 1.960$   
 $P = 0.0667$  (เป็นค่าที่ได้จากการศึกษาอัตราการกลายพันธุ์ของคู่บิดาและบุตรชายในกลุ่มประชากรประเทศไทยของเครื่องหมายที่ได้อัตราการกลายพันธุ์ที่สูงที่สุดในจากการทดลอง (36))  
 $Q = 1 - 0.0667$   
 $d = 0.03335$  (กำหนดให้เป็นค่าร้อยละ 50 ของอัตราการกลายพันธุ์)

จะได้ค่า  $n = 215.315$

ดังนั้น จึงเลือกที่จะใช้จำนวนตัวอย่างเท่ากับ 240 คู่ เพื่อให้ได้จำนวนที่พอดีกับการทดลองในแต่ละครั้งและลดความลำเอียง (Bias) ในการคัดเลือกตัวอย่าง

### 3.4 วิธีการดำเนินการวิจัย

#### สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. FTA card Purification reagent ของบริษัท Whatman™, UK
2. TE Buffer ของบริษัท PanReac AppliChem, Spain
3. ชุดน้ำยาสำเร็จรูป AmpliTaq Gold™ 360 Master Mix ของบริษัท Thermo Fisher Scientific, USA
4. ผงแป้งอะกาโรส ของบริษัท VWR life science, USA
5. สารละลาย highly deionized formamide ของบริษัท Thermo Fisher Scientific, USA
6. สารละลาย Gene scan 600 (52) size standard v2.0 ของบริษัท Thermo Fisher Scientific, USA
7. พอลิเมอร์ Performance Optimize Polymer ที่มี linear, uncross-linked dimethyl polyacrylamide 4% (POP-4) ของบริษัท Thermo Fisher Scientific, USA
8. บัฟเฟอร์สำหรับรองรับประจุไฟฟ้าข้ามแอนดและแคโทด ของบริษัท Thermo Fisher Scientific, USA

9. ชุดน้ำยาสำเร็จรูป DyeEx 2.0 Spin kit ของบริษัท Axxygen bioscience, USA
10. น้ำยา QuantiFluor ONE dsDNA Dye ของบริษัท Promega, USA

#### เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. เครื่องชั่งสารเคมี รุ่น Precisa XT220A ของบริษัท Precisa, Switzerland
2. ที่เจาะกระดาษ FTA (FTA Puncher) ขนาด 1.2 มิลลิเมตร ของบริษัท Whatman™, UK
3. 96-well plate ของบริษัท Thermo Fisher Scientific, USA
4. ไมโครปิเปตต์และทิป รุ่น P10, P20, P100, P200, P1000 มิลลิลิตร ของบริษัท Eppendorf, Germany
5. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ แบบ Strip แถวละ 8 หลอด ขนาด 0.2 มิลลิลิตร ของบริษัท Axxygen bioscience, USA
6. หลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร ของบริษัท Axxygen bioscience, USA
7. ซิลิโคนสำหรับปิด 96-well plate (96-Well Silicone Septa Mat) ของบริษัท Thermo Fisher Scientific, USA
8. 3500 Genetic Analyzer Capillary ของบริษัท Thermo Fisher Scientific, USA
9. Qubit™ 4 Fluorometer ของบริษัท Thermo Fisher Scientific, USA
10. โปรแกรม GeneMapper ID-X v.1.6 ของบริษัท Thermo Fisher Scientific, USA

#### 3.4.1 การออกแบบไพรเมอร์ (Primer design)

ค้นหาไฟล์ FASTA ของเครื่องหมาย RM Y-STR ที่ได้คัดเลือกไว้ ได้แก่ DYF403S1a DYF339S1 DYS547 และ DYS612 ด้วย UCSC Genome browser จากนั้นใช้โปรแกรม Primer3 ออกแบบและตรวจสอบคุณสมบัติของไพรเมอร์ (Tm, GC content) นำไพรเมอร์ที่ได้ไปตรวจสอบการเกิด Self-dimer และ Multiplex primer โดยใช้ Multiple primer analyzer จึงได้ไพรเมอร์ที่จะใช้ในงานวิจัยนี้ ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ของแต่ละเครื่องหมาย RM Y-STR ที่ได้คัดเลือกไว้ ได้แก่ DYF399S1  
DYS547 และ DYS612

เครื่องหมาย	ไพรเมอร์	Tm(°C)	%GC
DYF399S1	F: CAAAAGCCCAACAGGAAAAA	54.3	40
	R: GGACCCAGGAGAAAAGAACC	60.5	55
DYS612	F: CCCCATGCCAGTAAGAATAAAA	58.4	41
	R: CTAGAGCCAAAAAGGGAAGTGA	60.3	45
DYS547	F: ATCCATGTTACTGCAAATACACA	58.4	33
	R: TGAGTGACAGAGCATAAACGTG	60.3	45

ส่วนเครื่องหมาย DYF403S1a จะเลือกใช้ไพรเมอร์อ้างอิงจากงานวิจัยอื่น ดังตารางที่ 3.2  
ตารางที่ 3.2 ไพรเมอร์ของเครื่องหมาย *DYF403S1a*

เครื่องหมาย	ไพรเมอร์	อ้างอิง
DYF403S1a	F: CAAAATTCATGTGGATAATGAG	Ballantyne et al., 2010
	R: GGYAACAGAGCAGGATTCCATCTA	Ralf et al., 2021

#### 3.4.1.1 การทดสอบหาสถานะ PCR reaction ที่เหมาะสมกับไพรเมอร์ที่ ออกแบบและอ้างอิง (Primer Test)

ทดสอบไพรเมอร์ของเครื่องหมายพันธุกรรมทั้งสิ้น โดยทดสอบ Singleplex PCR  
จากนั้นจึงจะทดสอบไพรเมอร์แบบ Multiplex PCR เพื่อหาจำนวนรอบ อุณหภูมิ และเวลาที่  
เหมาะสมกับชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบ จากนั้นจึงใช้ชุดไพรเมอร์แบบติดสารเรืองแสง

ตารางที่ 3.3 ไพรเมอร์แบบติดสารเรืองแสง

เครื่องหมาย	ไพรเมอร์ติดสี
DYF399S1	5'-FAM-CAAAAGCCCAACAGGAAAAA-3'
DYS612	5'-VIC-CCCCATGCCAGTAAGAATAAAA-3'
DYS547	5'-FAM-ATCCATGTTACTGCAAATACACA-3'
DYF403S1a	5'-VIC-GGYAACAGAGCAGGATTCCATCTA-3'

ตารางที่ 3.4 Thermal cycles ใช้จำนวนรอบ 30 รอบ

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา
Activation of amplitaq	95	5 นาที
Denaturation	95	30 วินาที
Annealing	58	30 วินาที
Extension	72	1 นาที
Final Extension	72	1 ชั่วโมง
Hold	4	∞

#### 3.4.1.2 ทดสอบความจำเพาะกับตัวอย่าง (Specificity Test)

เพื่อทดสอบว่าไพรเมอร์มีความจำเพาะกับตัวอย่างที่เป็นเพศชายเท่านั้นและมีความจำเพาะกับตัวอย่างที่เป็น DNA มนุษย์ จะทดสอบความจำเพาะต่อตัวอย่าง DNA มนุษย์เพศชายของชุดไพรเมอร์ โดยการทดสอบกับตัวอย่าง DNA ของเพศหญิง โดยใช้ตัวอย่างเลือดบนกระดาษ FTA ของตัวอย่างเพศหญิง นำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย FTA card purification reagent และทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อตัวอย่างที่เป็น DNA ของมนุษย์ โดยใช้ DNA สำเร็จรูปของสัตว์ของบริษัท MacroGen ได้แก่ หนูสายพันธุ์ *R. rattus*, *M. musculus* และหมู *S. domesticus* อย่างละ 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และทำการเตรียม PCR master mix ตามตารางที่ 3.5 ใช้ Thermal cycling ตามตารางที่ 3.4



### 3.4.1.3 ทดสอบความไวในการเพิ่มจำนวน DNA (Sensitivity Test)

เพื่อทดสอบความไวของไพรเมอร์เมื่อ DNA ตั้งต้นในเทคนิค PCR ลดลง จะทดสอบความไวต่อ DNA ของชุดไพรเมอร์ ทดสอบกับ DNA control 2800M ของบริษัท Promega มาวัดปริมาณความเข้มข้นด้วยเครื่อง Qubit™ 4 Fluorometer โดยใช้ DNA 2 ไมโครลิตร กับน้ำยา QuantiFluor ONE dsDNA Dye 200 ไมโครลิตร ผสมกันในหลอด ขนาด 1.5 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปอยู่ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดและอ่านผลในเครื่อง Qubit™ 4 Fluorometer ซึ่งได้ปริมาณ DNA เริ่มต้นเท่ากับ 12 นาโนกรัม ต่อไมโครลิตร จากนั้นเจือจางความเข้มข้นของ DNA โดยวิธี Two-fold serial dilution ได้ ปริมาณของ DNA เป็น 6, 3, 1.5, 0.750, 0.375, 0.188, 0.094 และ 0.047 นาโนกรัม และทำการเตรียม PCR master mix ตามตารางที่ 3.5 ใช้ Thermal cycling ตามตารางที่ 3.4 โดยทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

### 3.4.2 การเตรียมตัวอย่างเลือดบนกระดาษ FTA

คัดเลือกตัวอย่างที่เหลือจากการส่งตรวจของผู้มารับบริการการตรวจพิสูจน์ DNA จากหน่วย นิติเวชวิทยา ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2559 ถึง พ.ศ. 2565 โดยเป็นตัวอย่างเลือดของคู่บิดาและบุตรชาย สัญชาติไทย และถูกจัดเก็บอยู่บน กระดาษ FTA ตัวอย่างทั้งหมดได้รับการยืนยันว่ามีความสัมพันธ์กันจากการตรวจ Autosomal STR ซึ่งจีโนไทป์ครึ่งหนึ่งของบุตรชาย จะต้องเหมือนกับบิดาทุกตำแหน่ง โดยใช้ตัวอย่างทั้งหมด 240 คู่ (480 ตัวอย่าง) ซึ่งผู้วิจัยได้รับอนุญาตให้ใช้ตัวอย่างโดยมีบันทึกข้อความขออนุญาตใช้ตัวอย่างเพื่อ งานวิจัยจากหัวหน้าหน่วยนิติเวชโร ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย ตัวอย่างที่ใช้จะไม่ถูกเปิดเผยข้อมูลส่วนตัว และถูกกำหนดรหัสตัวอย่างแทน ทั้งนี้ งานวิจัยนี้ได้ปฏิบัติตามระเบียบ ข้อตกลงและผ่านการรับรองจริยธรรมการวิจัยจากคณะกรรมการวิจัย ในคน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย COA No. 0820/2022 และ IRB No. 0332/65

### 3.4.3 ทำตัวอย่างกระดาษ FTA ให้บริสุทธิ์ (FTA card Purification)

นำกระดาษ FTA ที่มีเลือดของคู่บิดาและบุตรชายมาเจาะด้วยที่เจาะขนาด 1.2 มิลลิเมตร จำนวน 1 ซึ้น มีเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 1.2 มิลลิเมตร แล้วล้างด้วย FTA card purification reagent 100 ไมโครลิตร ให้ท่วมกระดาษ FTA ทิ้งไว้ 15 นาที เพื่อชะล้างฮีโมโกลบิน ที่จะไปขัดขวางปฏิกิริยาในกระบวนการ PCR ออก จากนั้นดูดออก ทำซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นเติม TE buffer 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 15 นาที แล้วดูดออก ทำซ้ำ 2 ครั้ง แล้วเปิดฝาหลอด ทิ้งไว้ให้กระดาษ FTA แห้ง

### 3.4.4 เพิ่มจำนวนของชิ้นตัวอย่างในบริเวณที่สนใจด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR amplification)

นำชิ้นกระดาษ FTA card ที่ผ่านขั้นตอนในข้อ 3.4.3 มาเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้และไพรเมอร์ที่ได้จากการอ้างอิง ดังตารางที่ 3.1 และ 3.2 และทำการเตรียม PCR master mix ตามตารางที่ 3.5 โดยใช้ Thermal cycling condition ตามตารางที่ 3.4

#### ตารางที่ 3.5 PCR master mix ต่อกระดาษ FTA card 1 disc

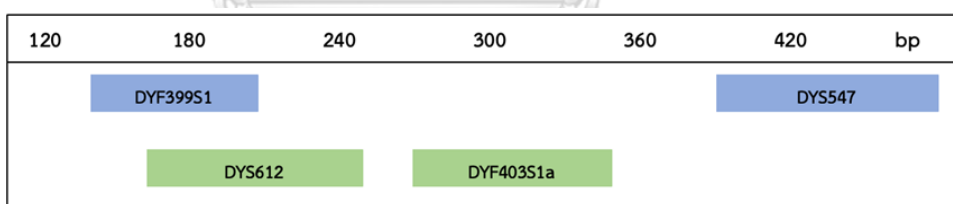
ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
AmpliTaq Gold™ 360 Master Mix	12.5	1X
10 pmol/μl DYF399S1 forward primer	1	0.4 ไมโครโมลาร์
10 pmol/μl DYF399S1 reverse primer	1	
10 pmol/μl DYF403S1a forward primer	2	0.8 ไมโครโมลาร์
10 pmol/μl DYF403S1a reverse primer	2	
10 pmol/μl DYS547 forward primer	1.25	0.5 ไมโครโมลาร์
10 pmol/μl DYS547 reverse primer	1.25	
10 pmol/μl DYS612 forward primer	0.375	0.15 ไมโครโมลาร์
10 pmol/μl DYS612 reverse primer	0.375	
PCR grade water	3.25	-
FTA card Punched	-	-
ปริมาตรรวม	25	-

### 3.4.4.1 ทำให้ PCR product บริสุทธิ์ด้วยชุด DyeEx 2.0

เพื่อทดสอบสมมติฐานว่าพีคแปลกปลอมที่เกิดขึ้นหน้าเครื่องหมาย DYF399S1 และ DYS612 เกิดจากความไม่บริสุทธิ์ของไพรเมอร์ โดยนำ PCR product 25 ไมโครลิตร มาแบ่งออกเป็น 2 ส่วนแบ่งเป็น 12.5 ไมโครลิตรที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด DyeEx และ 12.5 ไมโครลิตรไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด DyeEx จากนั้นโหลด PCR product ลงไปใน DyeEx 2.0 spin column อย่างระมัดระวังไม่ให้โดนหน้าเจลในคอลัมน์ แล้วปั่นเหวี่ยง 3 นาที จะได้ PCR Product ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จะไหลผ่านคอลัมน์ และนำไปแยกด้วยเทคนิค Capillary Electrophoresis ต่อไป

### 3.4.5 แยกขนาดของชิ้นตัวอย่างด้วยเทคนิค Capillary Electrophoresis (CE)

ผสม PCR Product 1 ไมโครลิตร กับ Highly deionized formamide (HiDi-Formamide) 8.7 ไมโครลิตร เพื่อช่วยลดความเข้มข้นของเกลือและป้องกันไม่ให้สายของ DNA กลับมาเข้าคู่กัน และเติม GeneScan 600 Size Standard (LIZ-600) 0.3 ไมโครลิตร เพื่อเป็นขนาดมาตรฐาน จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที และใส่ในกระบะน้ำแข็งเพื่อลดอุณหภูมิก่อนนำเข้าเครื่อง CE โดยขนาดของ PCR Product มีช่วงขนาดดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 ช่วงขนาดของ PCR Product ของแต่ละเครื่องหมาย เมื่อแยกด้วยเทคนิค CE

### 3.4.6 วิเคราะห์ข้อมูลดิบด้วยโปรแกรม GeneMapper™ ID-X Software v1.6

#### 3.4.6.1 การทดลองเพื่อกำหนดค่าการวิเคราะห์ต่างๆ

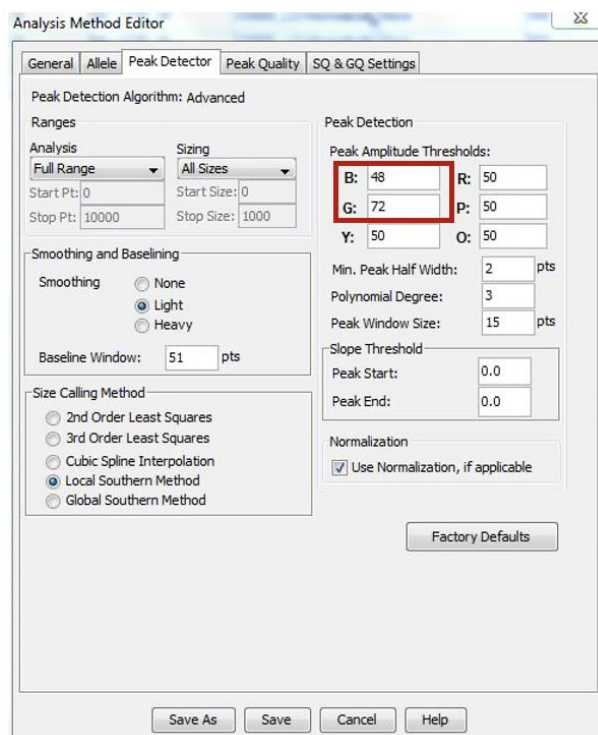
##### 3.4.6.1.1 การกำหนดค่า Analytical threshold

ค่า Analytical threshold เป็นค่าที่ใช้แยกพีคจริงออกจากพีคที่เกิดจากสัญญาณรบกวน โดยนำข้อมูลดิบที่ได้จากการทดลอง Negative control มาวิเคราะห์โดยกำหนดค่า Peak

detection เท่ากับ 1 RFU แล้วอ่านข้อมูลความสูงของพีคทั้งหมด จากนั้นหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของข้อมูลทั้งหมดและนำมาคำนวณตามสูตร (53) ดังนี้

$$\text{Limit of detection (LOD)} = \text{Average} + 10\text{SD}$$

ค่าที่ได้จาก LOD สามารถใช้พิจารณาในการกำหนดค่า Analytical threshold ของข้อมูลได้ ในงานวิจัยนี้ได้หาค่า Analytical threshold แยกตามช่องสี โดยการคำนวณจาก LOD จากการหาค่าเฉลี่ยของความสูงพีคของตัวอย่าง Negative control ที่ได้จากการกำหนดค่า Peak detection เท่ากับ 1 RFU จากการคำนวณจะกำหนดค่า Analytical threshold ของ FAM เท่ากับ 48 RFU และกำหนดค่า Analytical threshold ของ VIC เท่ากับ 74 RFU



รูปที่ 3.2 Analytical threshold ที่กำหนดในงานวิจัยนี้

#### 3.4.6.1.2 การกำหนดค่า Stochastic threshold

ค่า Stochastic threshold เป็นค่าความสูงของพีคที่ใช้ในการสันนิษฐานว่า จะไม่เกิดลักษณะของพีคที่ตรวจไม่พบอัลลีลใดอัลลีลหนึ่งในโลคัส หรือ allele dropout ในเครื่องหมายที่มีมากกว่า 1 copy (16, 53) ซึ่งอาจจะเกิดขึ้นได้จากปรากฏการณ์ Stochastics effect โดยการกำหนดค่า Stochastic threshold สามารถหาได้จากการทดลองทดสอบความไวในการเพิ่มจำนวน

DNA เมื่อมีปริมาณ DNA ที่ลดลง จากนั้นหาความสูงของพีคที่เกิด allele dropout (Method 1 Tallest false homozygous) (54)

ในงานวิจัยนี้ได้หาค่า Stochastic threshold จากวิธีดังกล่าว สามารถกำหนดค่า Stochastic threshold ของ FAM เท่ากับ 230 RFU และกำหนดค่า Stochastic threshold ของ VIC เท่ากับ 402 RFU

### 3.4.6.1.3 การกำหนดค่า Stutter threshold

Stutter เป็นพีครองที่มีลักษณะน้อยกว่าหรือมากกว่าพีคหลัก 1 ชุดซ้ำ ซึ่งค่า stutter threshold หรือ % stutter เป็นค่าที่ใช้กำหนดสัดส่วนของพีคที่เป็น stutter ที่มีโอกาสเกิดขึ้นได้มากที่สุด ในเครื่องหมายต่างๆ โดยสามารถคำนวณได้จากสูตร (53) ดังนี้

$$\%Stutter = \frac{\text{ความสูงของพีคที่เป็น Stutter}}{\text{ความสูงของพีคหลัก}} \times 100$$

โดยงานวิจัยนี้ได้คำนวณหา % stutter ของแต่ละเครื่องหมายและกำหนดค่าในการวิเคราะห์ ดังตารางที่ 3.6 และ 3.7

**ตารางที่ 3.6** ค่า % stutter ที่ใช้ในการกำหนดของเครื่องหมาย DYF399S1 DYS547 และ DYF403S1a

เครื่องหมาย	% stutter (N-4)
DYF399S1	4.19
DYS547	12.21
DYF403S1a	4.85

จากตารางที่ 3.6 stutter ที่เกิดขึ้นในเครื่องหมาย DYF399S1 DYS547 และ DYF403S1a มักเกิดเป็น reverse stutter หรือ เป็นพีครองที่มีจำนวนชุดน้อยกว่าพีคหลัก 1 ชุดซ้ำ (N-4) โดยจากค่า % stutter พบว่า เครื่องหมาย DYF399S1 สามารถเกิด stutter ในลักษณะที่น้อยกว่าพีคหลัก 1 ชุดซ้ำได้ 4.19 % เครื่องหมาย DYS547 สามารถเกิด stutter ในลักษณะที่น้อยกว่าพีคหลัก 1 ชุดซ้ำได้ 12.21 % และ เครื่องหมาย DYF403S1a สามารถเกิด stutter ในลักษณะที่น้อยกว่าพีคหลัก 1 ชุดซ้ำได้ 4.85 %

เนื่องจากเครื่องหมาย DYS612 เป็น Trinucleotide repeat ซึ่งถือว่าเป็น STR ที่มีจำนวนเบสซ้ำน้อยจะมีโอกาสเกิด stutter ได้มาก (50) ดังนั้น ผู้วิจัยจึงคำนวณหา % stutter และกำหนดค่าในการวิเคราะห์ ดังตารางที่ 3.7

**ตารางที่ 3.7** ค่า % stutter ที่ใช้ในการกำหนดของเครื่องหมาย DYS612

เครื่องหมาย	% stutter			
	% stutter (N-9)	% stutter (N-6)	% stutter (N-3)	% stutter (N+3)
DYS612	0.63	6.42	28.20	3.75

จากตารางที่ 3.7 เครื่องหมาย DYS612 มักจะเกิด reverse stutter ที่มีชุดซ้ำน้อยกว่าพีคหลัก 1 ชุดซ้ำ (N-3) เท่ากับ 28.20 % น้อยกว่าพีคหลัก 2 ชุดซ้ำ (N-6) เท่ากับ 6.42 % และน้อยกว่าพีคหลัก 3 ชุดซ้ำ (N-9) เท่ากับ 0.63 % อีกทั้งเครื่องหมาย DYS612 สามารถเกิด forward stutter ที่มีชุดซ้ำเพิ่มขึ้นจากพีคหลัก 1 ชุดซ้ำ (N+3) เท่ากับ 3.75 %

#### 3.4.6.2 การกำหนดขอบเขตของข้อมูลในการอ่านอัลลีล

เนื่องจากไม่มี allelic ladder ที่จะสามารถอ่านอัลลีลในตำแหน่ง RM Y-STR ทั้งสี่ได้ ดังนั้นจึงอ่านอัลลีลที่ได้ด้วยการเทียบกับข้อมูลของ control 2800M DNA ที่ทราบจีโนไทป์ที่แน่นอนของทั้ง 4 เครื่องหมาย และในแต่ละ bin ของแต่ละอัลลีลจะกำหนดพื้นที่โดยรอบของแต่ละอัลลีลเป็นบวกลบ 0.5 ดังตารางที่ 3.8 (55)

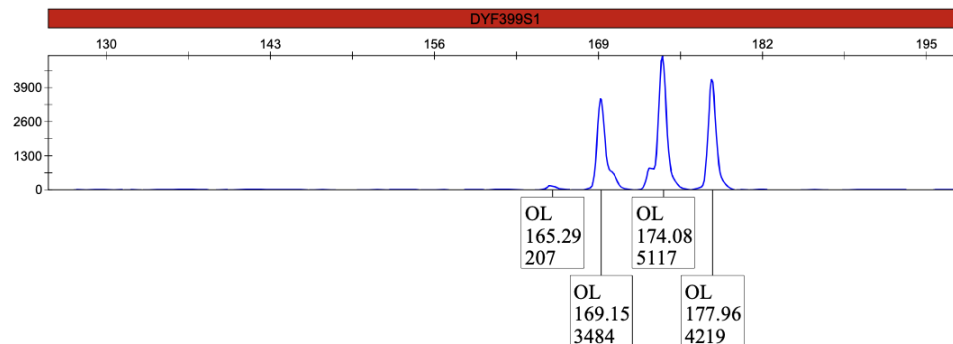
**ตารางที่ 3.8** จีโนไทป์ของ control 2800M DNA ของเครื่องหมาย DYF399S1 DYS547 DYF403S1a และ DYS612 (55)

เครื่องหมาย	DYF399S1	DYS547	DYF403S1a	DYS612
control 2800M DNA	24, 25.1, 26.1	45	11, 13, 17.1	29

#### 3.4.6.2.1 การกำหนดขอบเขตเพื่อสร้าง allelic bin ของเครื่องหมาย DYF399S1 และ DYF403S1a

เนื่องจากเครื่องหมาย DYF399S1 และ DYF403S1a เป็น Multi-copy จึงสามารถหาความต่างของค่าขนาดของแต่ละอัลลีล (Data size) ได้ และเปรียบเทียบหาระยะห่างของ 1 ชุดซ้ำได้ ซึ่งมีวิธีการสร้างดังนี้

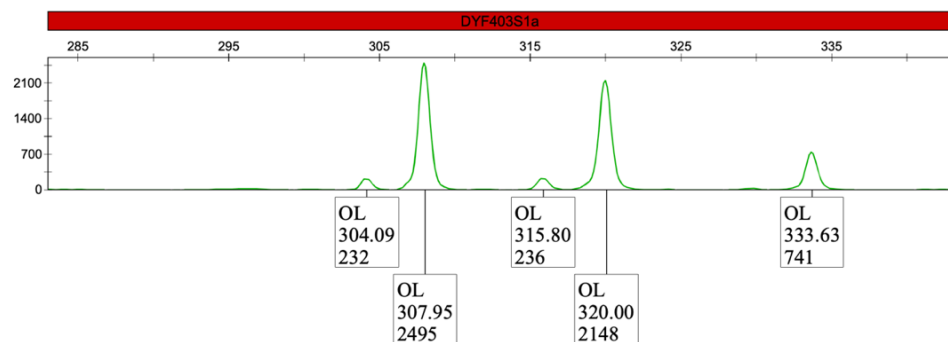
- การสร้างขอบเขต bin ของเครื่องหมาย DYF399S1



รูปที่ 3.3 เครื่องหมาย DYF399S1 ของ control 2800M DNA ที่ไม่มี bin

อัลลีลของเครื่องหมาย DYF399S1 ที่ทราบแน่นอน คือ 24, 25.1, 26.1 ซึ่งจากรูปที่ 3.2 พีคของอัลลีล 24 มีค่า Data Size เท่ากับ 169.15 และพีคของอัลลีล 25.1 มีค่า Data Size เท่ากับ 174.08 ซึ่ง DYF399S1 เป็น Tetranucleotide repeat โดย 1 ชุดซ้ำ จะมี 4 bp ดังนั้น อัลลีล 24 กับ อัลลีล 25.1 จะห่างกัน 1 ชุดซ้ำ กับอีก 1 เบส หรือ อัลลีล 24 กับ อัลลีล 25.1 จะห่างกัน 5 เบส ซึ่งจะได้ 5 bp จะมีค่า Data Size ห่างกัน 4.93 (174.08-169.15) ดังนั้น จะได้ 1 เบส เท่ากับ  $\frac{4.93}{5}$  เท่ากับ 0.986 ดังนั้น 4 เบส จะมีค่า Data Size ห่างกัน 3.94 จากนั้นสร้างไฟล์ Excel ที่ป้อนค่า ช่วงของอัลลีลที่สามารถเกิดขึ้นได้ของเครื่องหมาย DYF399S1 (56) แล้วกำหนดอัลลีล 24 ด้วยค่า Data Size เท่ากับ 169.15 ดังนั้น อัลลีล 23 ที่ห่างกัน 1 ชุดซ้ำจะได้จากการที่นำ Data Size ของอัลลีล 24 ลบกับ 3.94 และ อัลลีล 25 จะได้จากการที่นำ Data Size ของอัลลีล 24 บวกกับ 3.94 และนำค่า 3.94 บวกและลบไปทั้งช่วงก่อนและหลังอัลลีล 24

- การสร้างขอบเขต bin ของเครื่องหมาย DYF403S1a



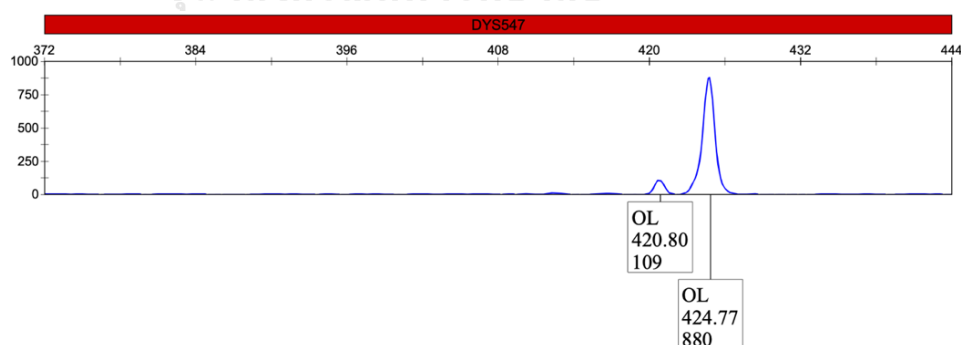
รูปที่ 3.4 เครื่องหมาย DYF403S1a ของ control 2800M DNA ที่ไม่มี bin

อัลลีลของเครื่องหมาย DYS403S1a ที่ทราบแน่นอน คือ 11, 14, 17.1 ซึ่งจากรูปที่ 3.3 พิคของ อัลลีล 11 มีค่า Data Size เท่ากับ 307.95 และพิกของอัลลีล 14 มีค่า Data Size เท่ากับ 320 ซึ่ง DYS403S1a เป็น tetranucleotide repeat ที่ 1 ชุดซ้ำจะมี 4 เบส ดังนั้น อัลลีล 11 กับ อัลลีล 14 จะห่างกัน 3 ชุดซ้ำ หรือ อัลลีล 11 กับ อัลลีล 13 จะห่างกัน 12 เบส ซึ่งจะได้ 12 เบส จะมีค่า Data Size ห่างกัน 12.05 (320.00-307.95) ดังนั้น จะได้ 1 เบส เท่ากับ  $\frac{12.05}{12}$  จะมีค่า Data Size ห่างกัน 1.00 ดังนั้น 4 เบส จะมีค่า Data Size ห่างกัน 4.00 จากนั้นสร้างไฟล์ Excel ที่ป้อนค่า ช่วงของอัลลีลที่สามารถเกิดขึ้นได้ของเครื่องหมาย DYS403S1a (56) แล้วกำหนดอัลลีล 11 ด้วยค่า Data Size เท่ากับ 307.95 ดังนั้น อัลลีล 10 ที่ห่างกัน 1 ชุดซ้ำจะได้จากการที่นำ Data Size ของอัลลีล 11 ลบกับ 4.00 และ อัลลีล 12 จะได้จากการที่นำ Data Size ของอัลลีล 11 บวกกับ 4.00 และ นำค่า 4.00 บวกและลบไปทั้งช่วงก่อนและหลังอัลลีล 11

### 3.4.6.2 การกำหนดขอบเขตเพื่อสร้าง allelic bin ของเครื่องหมาย DYS547 และ DYS612

เนื่องจากเครื่องหมาย DYS547 และ DYS612 เป็น Single-copy จึงจะหาความต่างของค่า Data Size ของแต่ละอัลลีลพิกเทียบกับ Stutter และเปรียบเทียบหาระยะห่างของ 1 ชุดซ้ำ ได้ เนื่องจาก Stutter ที่เกิดขึ้นเป็น PCR product ที่จะมีจำนวนชุดซ้ำห่างกับพิกจริงบวกลบ 1 ชุดซ้ำ โดยมีวิธีการสร้างดังนี้

- การสร้างขอบเขต bin ของเครื่องหมาย DYS547



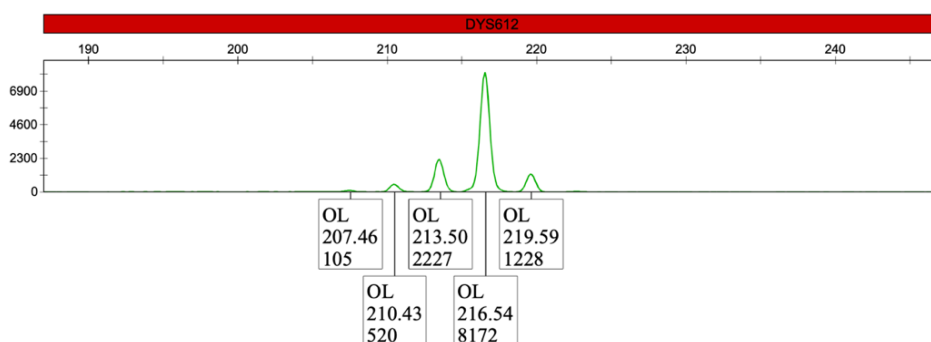
รูปที่ 3.5 เครื่องหมาย DYS547 ของ control 2800M DNA ที่ไม่มี bin

อัลลีลของเครื่องหมาย DYS547 ที่ทราบแน่นอน คือ 45 ซึ่งจากรูปที่ 3.4 พิกของอัลลีล 45 มีค่า Data Size เท่ากับ 424.77 และพิกของ Stutter มีอัลลีล คือ 44 มีค่า Data Size เท่ากับ 420.80 ซึ่ง DYS547 เป็น Tetranucleotide repeat ที่ 1 ชุดซ้ำจะมี 4 เบส ดังนั้น อัลลีล 44 กับ อัลลีล 45



จะห่างกัน 1 ซุดซ้ำ ซึ่งจะได้ 4 เบส จะมีค่า Data Size ห่างกัน 3.97 (424.77-420.80) จากนั้นสร้างไฟล์ Excel ที่ป้อนค่าช่วงของอัลลีลที่สามารถเกิดขึ้นได้ของเครื่องหมาย DYS547 (56) แล้วกำหนดอัลลีล 45 ด้วยค่า Data Size เท่ากับ 424.77 ดังนั้น อัลลีล 46 ที่ห่างกัน 1 ซุดซ้ำ จะได้จากการที่นำ data size ของอัลลีล 45 บวกกับ 3.97 และนำค่า 3.97 บวกและลบไปทั้งช่วงก่อนและหลังอัลลีล 45

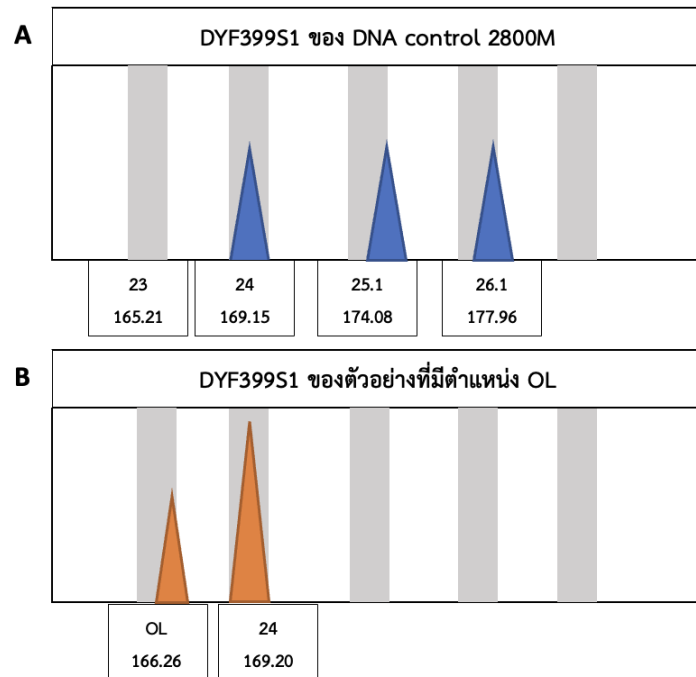
- การสร้างขอบเขต bin ของเครื่องหมาย DYS612



รูปที่ 3.6 เครื่องหมาย DYS612 ของ control 2800M DNA ที่ไม่มี bin

อัลลีลของเครื่องหมาย DYS612 ที่ทราบแน่นอน คือ 29 ซึ่งจากรูปที่ 3.5 พีคของอัลลีล 29 มีค่า Data Size เท่ากับ 216.54 และพีคของ Stutter มีอัลลีล คือ 28 มีค่า Data Size เท่ากับ 213.50 ซึ่ง DYS612 เป็น Trinucleotide repeat ที่ 1 ซุดซ้ำจะมี 3 เบส ดังนั้น อัลลีล 29 กับ อัลลีล 28 จะห่างกัน 1 ซุดซ้ำ กล่าวคือ ห่างกัน 3 เบส ดังนั้น จะมีค่า Data Size ห่างกัน 3.04 (216.54-213.50) จากนั้นสร้างไฟล์ excel ที่ป้อนค่าช่วงของอัลลีลที่สามารถเกิดขึ้นได้ของเครื่องหมาย DYS612 (56) แล้วกำหนดอัลลีล 29 ด้วยค่า Data size เท่ากับ 216.54 ดังนั้น อัลลีล 30 ที่ห่างกัน 1 ซุดซ้ำ จะได้จากการที่นำ Data Size ของอัลลีล 29 บวกกับ 3.04 และนำค่า 3.04 บวกและลบไปทั้งช่วงก่อนและหลังอัลลีล 29

### 3.4.6.2 การอ่านอัลลีลที่ตำแหน่งไม่อยู่ใน bin ที่กำหนดไว้ (16)



รูปที่ 3.7 ตัวอย่างการอ่านอัลลีลของตำแหน่งที่ไม่อยู่ใน bin ที่กำหนดไว้ โดยมีวิธีการอ่าน ดังนี้

1. หาผลต่างระหว่าง data size ของอัลลีลของ DNA control 2800M ที่ใช้เทียบเป็น allelic ladder ในการศึกษาเกี่ยวกับอัลลีลในตัวอย่างที่สนใจ กล่าวคือ  $169.20 - 169.15 = 0.05$
2. หาผลต่างระหว่าง data size ของอัลลีล OL ของตัวอย่างที่สนใจ กับ data size ของอัลลีลที่ทราบ กล่าวคือ  $166.26 - 165.21 = 1.05$
3. หาค่าผลต่างสัมบูรณ์ของข้อ 1 และข้อ 2 จะได้  $|0.05 - 1.05| = 1$  นิวคลีโอไทด์ ซึ่งประมาณ 1 นิวคลีโอไทด์ จะอ่านอัลลีล OL ได้เป็น 23.1

### 3.4.6.3 การวิเคราะห์ข้อมูลดิบที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยเครื่อง CE มีดังนี้

1. นำข้อมูลดิบที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง CE เข้าโปรแกรม GeneMapper™ ID-X Software v.1.6
2. สร้าง Bin ของข้อมูลที่ได้อ้างอิงช่วงอัลลีลที่สามารถเกิดขึ้นได้ของแต่ละเครื่องหมาย (56)
3. สร้าง Panel ของทั้ง 4 เครื่องหมาย
4. เข้า Panel manager ในโปรแกรม GeneMapper™ ID-X Software v1.6 จากนั้นนำเข้าไฟล์ Panel และ Bin
5. สร้าง Analysis Method ใหม่ แล้วตั้งชื่อ Analysis Method เลือก Bin ที่นำเข้าไฟล์ เข้ามา จากนั้นกำหนดช่วง กำหนด Analytical threshold
6. กดเลือก Analysis Method ที่สร้างในข้อ 5 และเลือก Panel ที่นำเข้ามาแล้วกด run
7. ข้อมูลที่ได้จะออกมาเป็น Electropherogram แสดงพีคและอัลลีลของแต่ละเครื่องหมาย

### 3.4.7 การพิจารณาการเกิดการกลายพันธุ์ของแต่ละตัวอย่างและคำนวณอัตราการกลายพันธุ์

เปรียบเทียบโปรไฟล์ของ Candidate RM Y-STR ระหว่างบิดาและบุตรชาย เพื่อตรวจหาการเปลี่ยนแปลงของอัลลีลในตำแหน่งที่สนใจโดยหากมีการกลายพันธุ์เกิดขึ้น การกลายพันธุ์นั้นจะต้องเป็นการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของชุดเบสซ้ำและคำนวณอัตราการกลายพันธุ์ โดยใช้สูตร (23) ดังนี้

$$\text{อัตราการกลายพันธุ์} = \frac{\text{จำนวนตัวอย่างที่พบการกลายพันธุ์}}{\text{จำนวนประชากรทั้งหมดที่ใช้ในการทดลอง}}$$

โดยมีเกณฑ์การพิจารณาจัดระดับอัตราการกลายพันธุ์ ได้แก่

- อัตราการกลายพันธุ์น้อยกว่า  $10^{-3}$  จัดเป็นกลายพันธุ์ระดับต่ำ
- อัตราการกลายพันธุ์เท่ากับ  $10^{-3}$  จัดเป็นกลายพันธุ์ระดับกลาง
- อัตราการกลายพันธุ์มากกว่าหรือเท่ากับ  $10^{-2}$  จัดเป็นกลายพันธุ์ระดับสูง

### 3.4.8 การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยค่าทางสถิติ

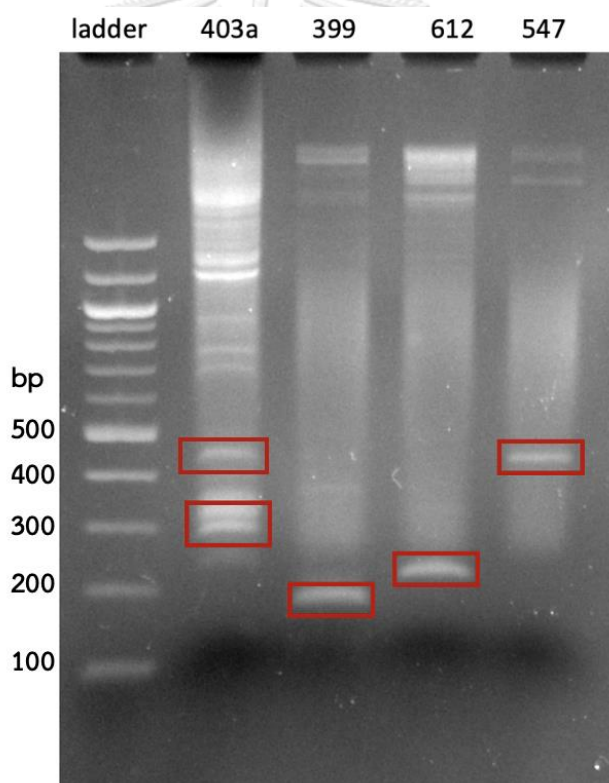
อัตราการกลายพันธุ์ที่ได้ในการศึกษานี้จะถูกนำไปเปรียบเทียบกับอัตราการกลายพันธุ์ของกลุ่มประชากรเอเชียและยุโรปที่ใช้ตัวอย่างเป็นคู่บิดาและบุตรชายว่าแตกต่างหรือไม่แตกต่างกับกลุ่มประชากรอื่นโดยใช้การทดสอบ Binomial test และเปรียบเทียบอายุเฉลี่ยของบิดาขณะที่บุตรชายเกิดที่เกิดการกลายพันธุ์กับอายุเฉลี่ยของบิดาขณะที่ให้กำเนิดบุตรชายที่ไม่เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้การทดสอบ Mann-Whitney U test จะวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 ผลการทดลองหาสภาวะ PCR reaction ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR

ตรวจสอบไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ด้วย 2% Agarose Gel Electrophoresis โดยใช้ไพรเมอร์ที่ไม่ติดสีเรืองแสง โดยมีขนาดที่คาดคะเนไว้ของแต่ละเครื่องหมาย (Expected size) ดังตารางที่ 4.1 พบว่าทุกโลคัสได้ตรงตามขนาดที่คาดคะเน (รูปที่ 4.1) แต่อย่างไรก็ตามเครื่องหมาย DYF40S1a มี band ที่มีขนาดประมาณ >400 เบส ซึ่ง PCR Product ดังกล่าวคือ DYF403S1b เนื่องจากบริเวณที่ไพรเมอร์เข้าจับของทั้งสอง subtype เหมือนกัน ทำให้สามารถจับในช่วง DYF403S1b ได้เช่นกัน

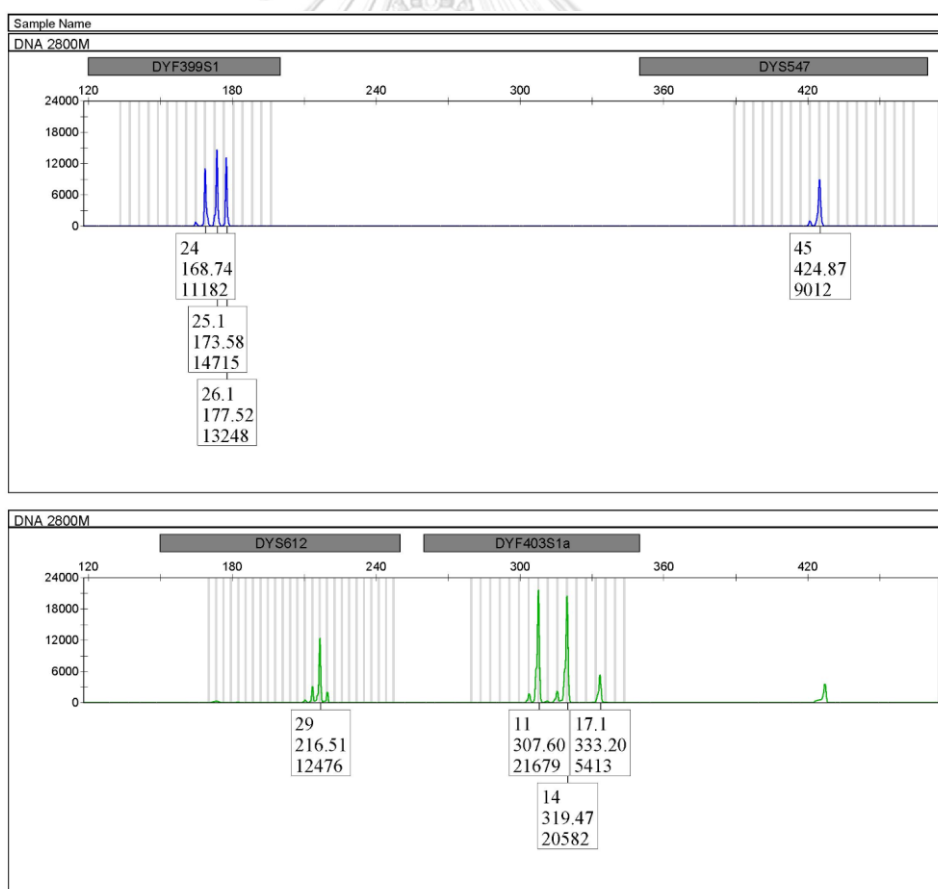


รูปที่ 4.1 ตรวจสอบ PCR product ด้วย 2% agarose gel electrophoresis ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ 60 นาที

ตารางที่ 4.1 ขนาดของ PCR Product ที่คาดคะเนของแต่ละเครื่องหมาย

เครื่องหมาย	ขนาดของ PCR Product ที่คาดคะเนไว้ (เบส)	ขนาดของ PCR Product ที่ได้ (เบส)
DYF403S1a	308, 320, 333	>300
DYF399S1	184, 189, 193	<200
DYS612	207	>200
DYS547	416	>400

นำไพรเมอร์ของแต่ละตำแหน่งมาทดสอบ Multiplex PCR โดยจะหาสภาวะที่เหมาะสมแล้วใช้ไพรเมอร์ที่ติดสีเรืองแสง และใช้ PCR condition และ reaction ดังกล่าวเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR แล้วแยกขนาดของ DNA ด้วยเทคนิค Capillary Electrophoresis ใช้ DNA control 2800M ที่ทราบจีโนไทป์และใช้เป็น Positive control ของงานวิจัยนี้



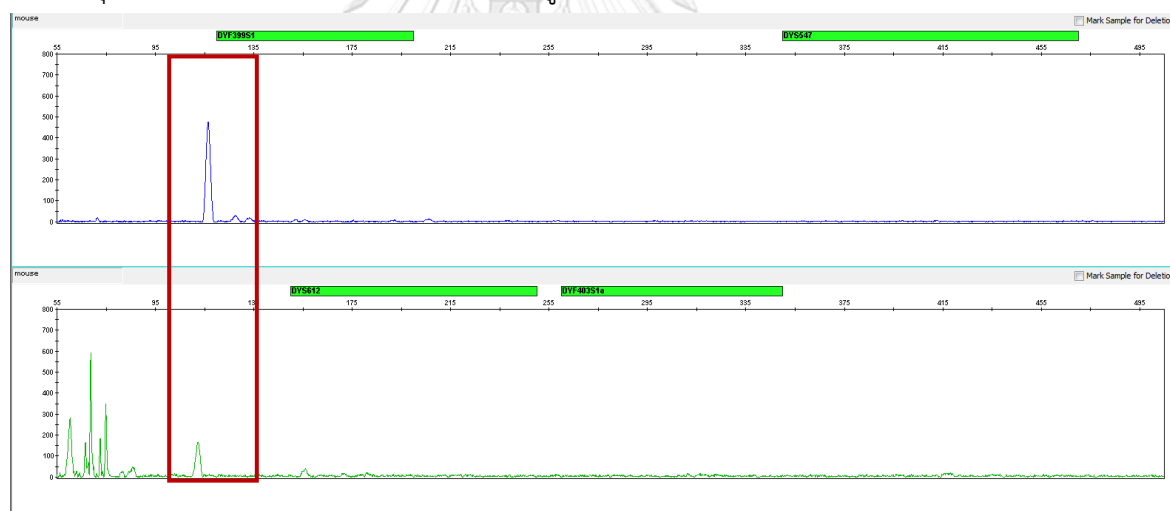
รูปที่ 4.2 Electropherogram ของ DNA control 2800M

ไพรเมอร์ของเครื่องหมาย DYF399S1 และ DYS547 ติดสีเรืองแสงสีน้ำเงิน (FAM) จะได้พีคของเครื่องหมายดังกล่าวเป็นสีน้ำเงิน ส่วนไพรเมอร์ของเครื่องหมาย DYS612 และ DYF403S1a ติดสีเรืองแสงสีเขียว (VIC) จะได้พีคของเครื่องหมายดังกล่าวเป็นสีเขียว จากรูปที่ 4.2 เป็น Electropherogram ของ DNA control 2800M โดยช่องสีน้ำเงินสามารถอ่านอัลลีลของเครื่องหมาย DYF399S1 ได้อัลลีล 24, 25.1, 16.1 และ DYS547 ได้อัลลีล 45 ส่วนช่องสีเขียวสามารถอ่านอัลลีลของเครื่องหมาย DYS612 ได้อัลลีล 29 และ DYF403S1a ได้อัลลีล 11, 14 และ 17.1

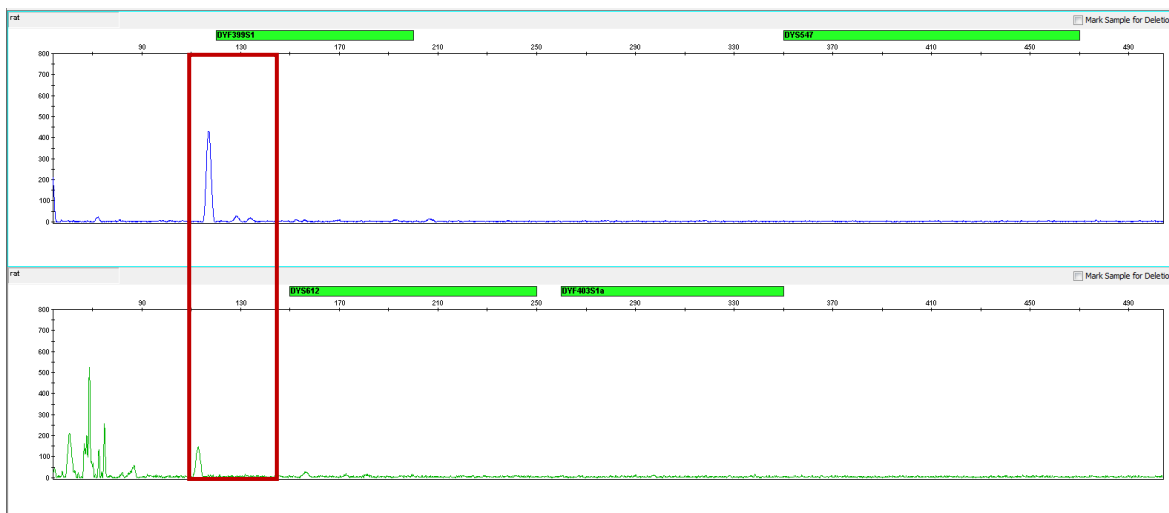
## 4.2 ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ (Specificity Test)

### 4.2.1 ทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อตัวอย่าง DNA มนุษย์ (Human Specificity Test)

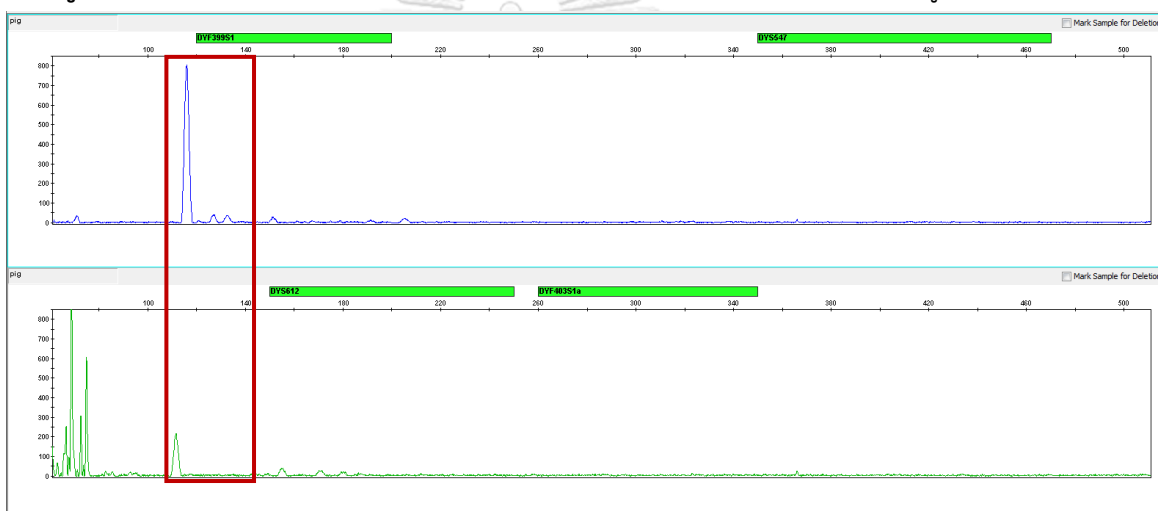
จากการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อตัวอย่าง DNA มนุษย์ โดยใช้ตัวอย่างหนูสองสายพันธุ์ (*M. musculus* และ *R. rattus*) และหมู (*S. domesticus*) ได้ผลการทดลอง ดังนี้



รูปที่ 4.3 ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์เมื่อใช้ตัวอย่าง DNA ของหนู *M. musculus*



รูปที่ 4.4 ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์เมื่อใช้ตัวอย่าง DNA ของหนู *R. rattus*



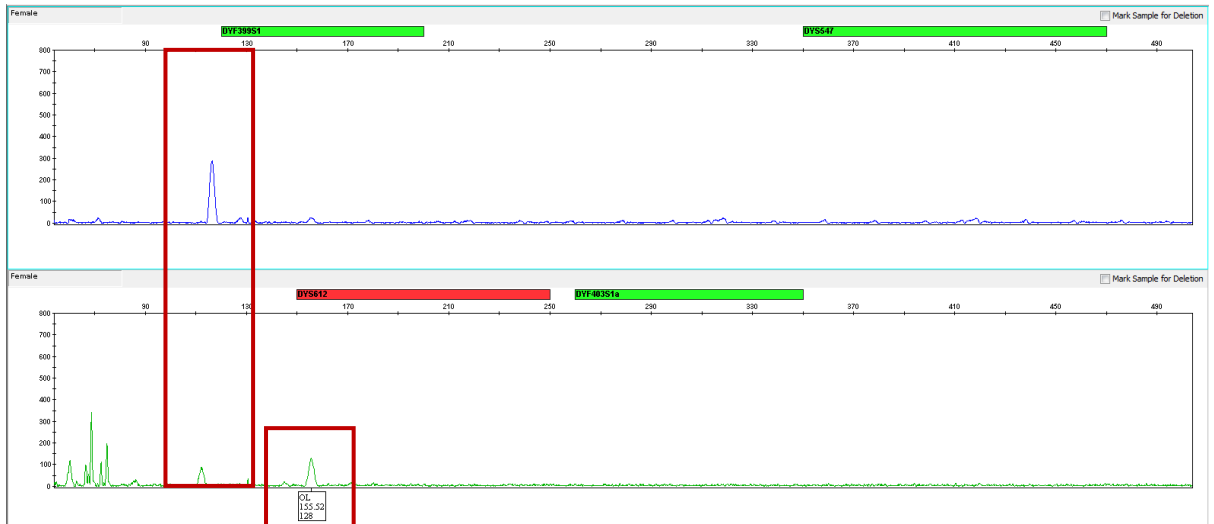
รูปที่ 4.5 ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์เมื่อใช้ตัวอย่าง DNA ของหมู *S. domesticus*

จากการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อตัวอย่าง DNA มนุษย์ พบว่า มีพีคแปลกปลอมเกิดขึ้นในช่องสีน้ำเงินและสีเขียว บริเวณใกล้กับ panel ของเครื่องหมาย DYF399S1 และ DYF612 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับผล Negative control ที่ทดลองโดยใช้น้ำแทน DNA ดังรูปที่ 4.7 พบว่า มีพีคดังกล่าวปรากฏอยู่เช่นกัน



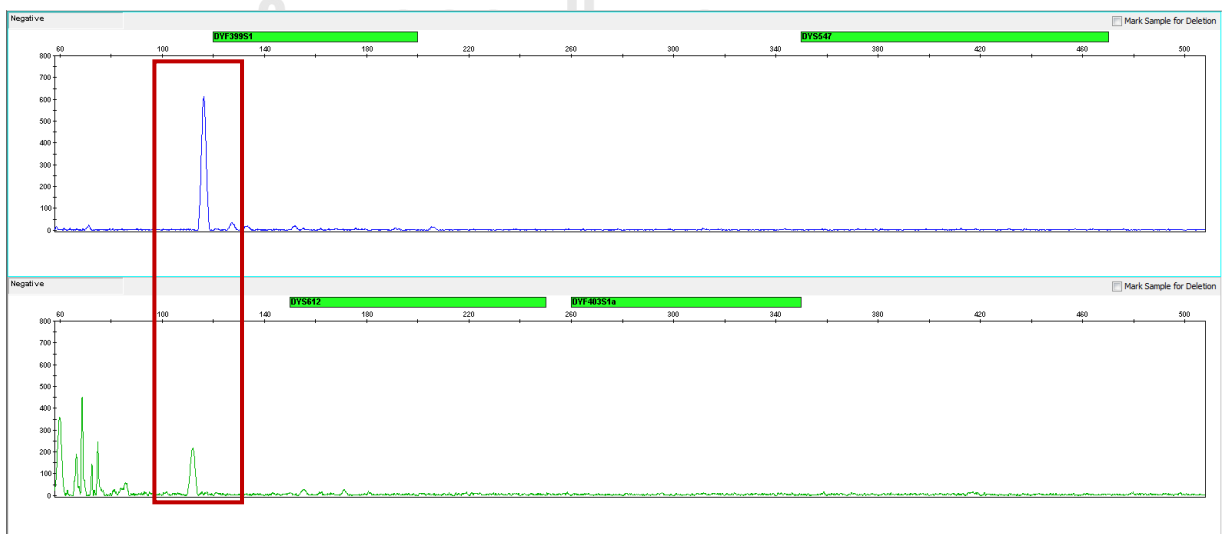
#### 4.2.2 ทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อตัวอย่างเพศชาย (Male Specificity Test)

จากการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อตัวอย่างเพศชาย โดยใช้ตัวอย่าง DNA เพศหญิง ได้ผลการทดลอง ดังนี้



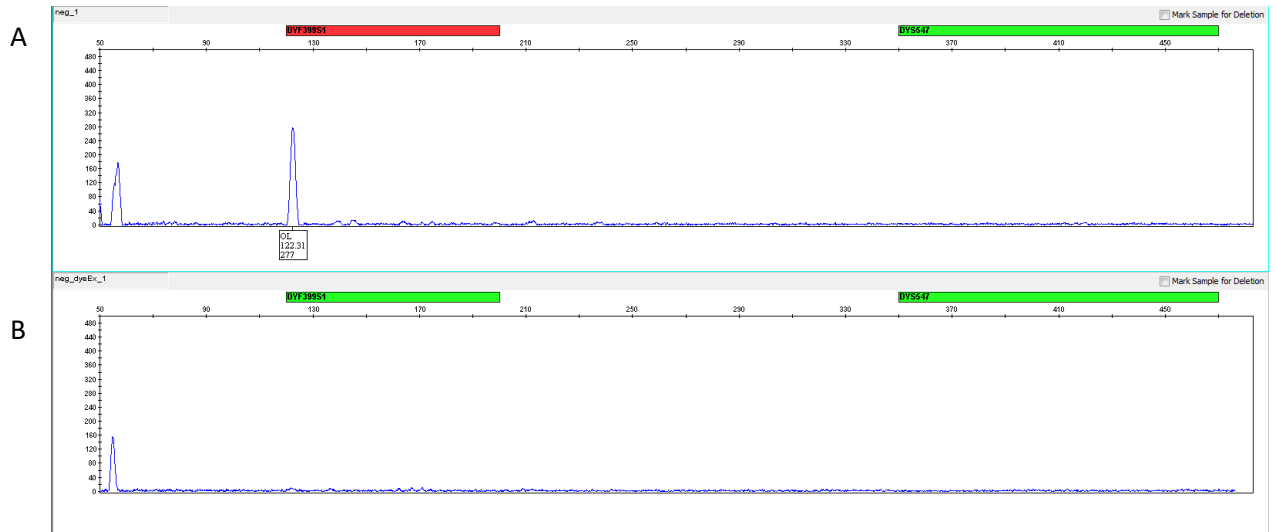
รูปที่ 4.6 ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อตัวอย่าง DNA เพศชาย โดยใช้ตัวอย่างที่เป็น DNA ของเพศหญิง

จากการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อตัวอย่าง DNA เพศชาย พบว่า มีพีคแปลกปลอมเกิดขึ้นในช่องสีน้ำเงินและสีเขียว บริเวณใกล้กับ panel ของเครื่องหมาย DYS399S1 และ DYS612 เช่นเดียวกับการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ของตัวอย่าง DNA มนุษย์ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับผล Negative control ที่ทดลองโดยใช้น้ำแทน DNA ดังรูปที่ 4.7 พบว่า มีพีคดังกล่าวปรากฏอยู่เช่นกัน นอกจากนี้ยังพบพีคอาจจะเกิดขึ้นจาก Non-specific ของไพรเมอร์ในตำแหน่งที่มี Data Size เท่ากับ 155.52

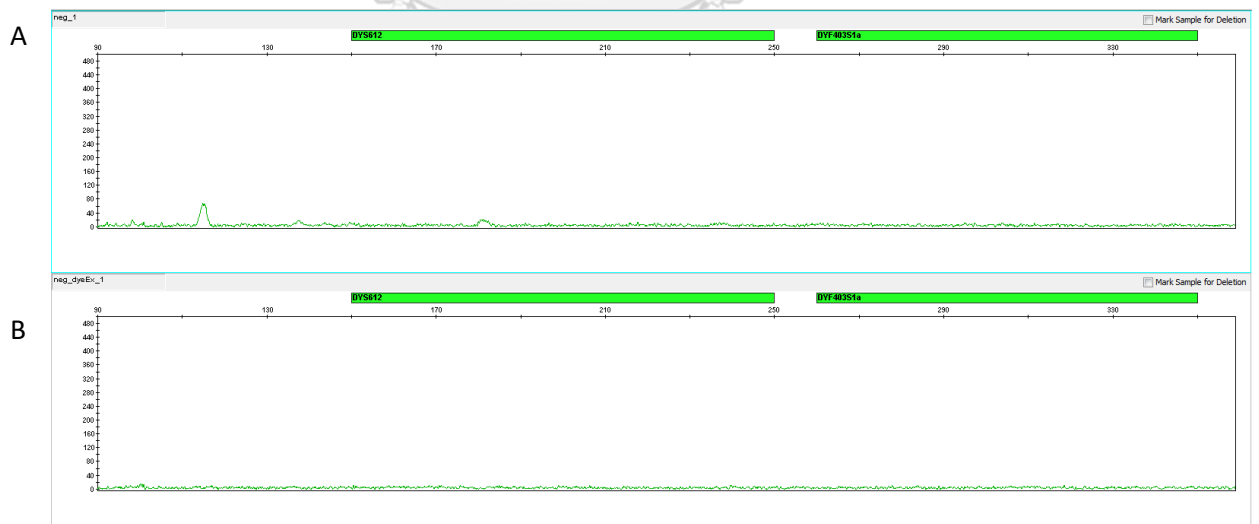


รูปที่ 4.7 ผล Electropherogram ของ negative control โดยใช้น้ำแทน DNA

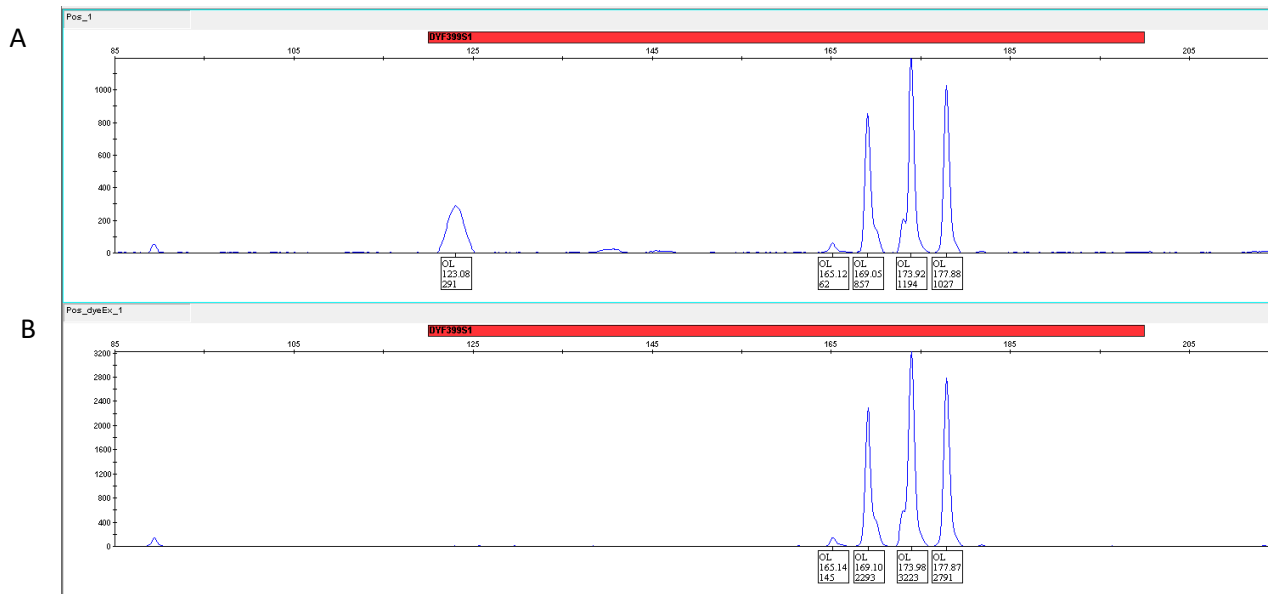
สาเหตุที่ก่อให้เกิดพีคในรูปที่ 4.3 - 4.7 อาจเกิดจากความไม่บริสุทธิ์ของไพรเมอร์หรือเศษสี่ของสารเรืองแสงที่ติดมากับไพรเมอร์ ทำให้เกิดเป็นสัญญาณรบกวน ดังนั้น เพื่อทดสอบสมมติฐานดังกล่าว ผู้วิจัยจึงทำการทดลองโดยการทำให้ PCR Product มีความบริสุทธิ์โดยการล้างเศษของสารเรืองแสงส่วนเกินที่ติดอยู่ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ไม่ถูกเพิ่มจำนวนในกระบวนการ PCR โดยใช้ชุดน้ำยา DyeEx พบว่า สามารถกำจัดพีคแปลกปลอมดังกล่าวออกไปได้ (รูปที่ 4.8-4.11)



รูปที่ 4.8 ผล Electropherogram ของช่องสีน้ำเงินของตัวอย่าง negative control โดยใช้ น้ำแทน DNA ตั้งต้น A) negative control ที่ไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยา DyeEx B) negative control ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยา DyeEx



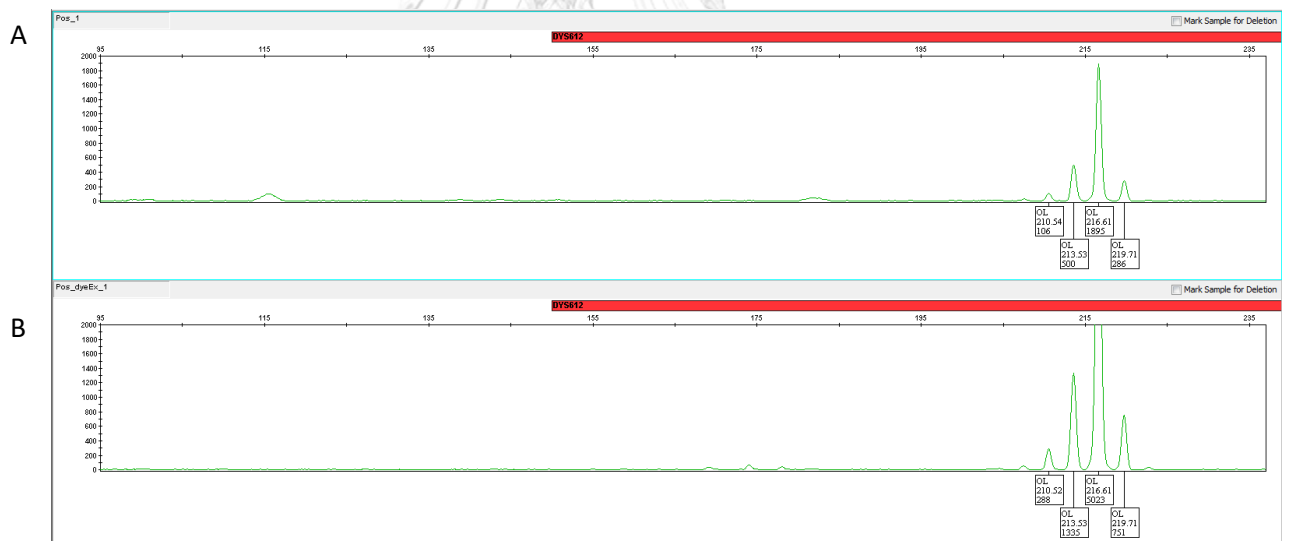
รูปที่ 4.9 ผล Electropherogram ของช่องสีเขียวของตัวอย่าง negative control โดยใช้ น้ำแทน DNA ตั้งต้น A) Negative control ที่ไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยา DyeEx B) Negative control ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยา DyeEx



รูปที่ 4.10 ผล Electropherogram ของช่องสีน้ำเงินของ Control DNA 2800M

A) PCR Product ของ Control DNA 2800M ที่ไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยา DyeEx

B) PCR Product ของ Control DNA 2800M ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยา DyeEx



รูปที่ 4.11 ผล Electropherogram ของช่องสีเขียวของ control DNA 2800M

A) PCR Product ของ Control DNA 2800M ที่ไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยา DyeEx

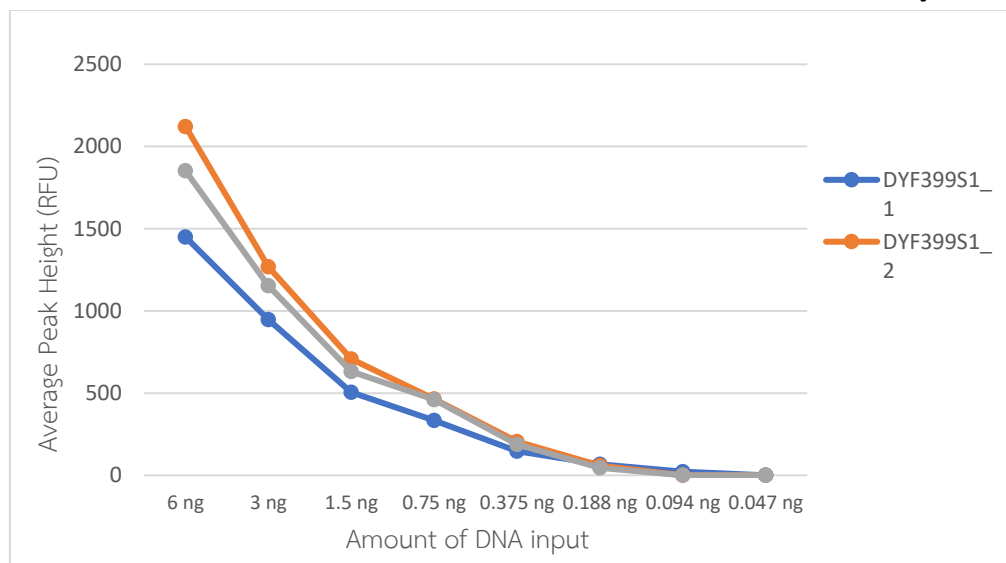
B) PCR Product ของ Control DNA 2800M ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยา DyeEx

จึงสรุปได้ว่า พีดั้งกล่าวเกิดจากเศษสีฟลูออเรสเซนต์ที่อาจจะเกิดขึ้นได้จากขั้นตอนการสังเคราะห์ไพรเมอร์ ดังนั้น ไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้จึงมีความจำเพาะกับ DNA ที่เป็นตัวอย่างมนุษย์ และ DNA เพศชาย

#### 4.3 ผลการทดสอบความไวของไพรเมอร์ (Sensitivity Test)

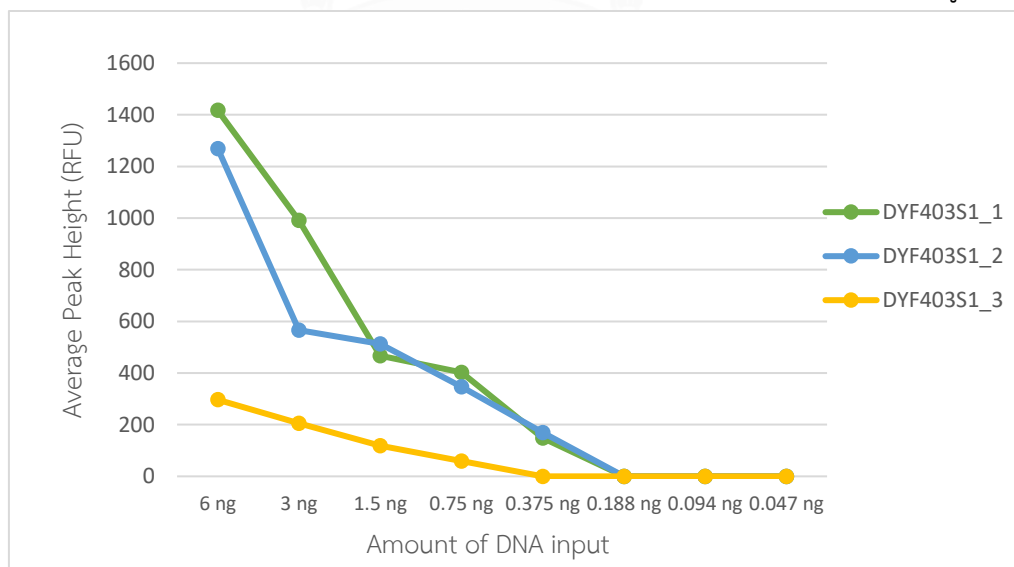
จากการทดสอบความไวของไพรเมอร์โดยใช้ความเข้มข้น DNA Control 2800M ในช่วงความ ปริมาณ DNA เท่ากับ 6 ถึง 0.047 นาโนกรัม ทดลองซ้ำสามครั้ง และพิจารณาค่าเฉลี่ยความสูงของพีคแต่ละอัลลีล ถ้าปริมาณ DNA input ใด แล้วอัลลีลใดอัลลีลหนึ่งของเครื่องหมายนั้นไม่สามารถ amplify ได้ จะแปลผลว่าเกิด allele dropout ที่ปริมาณ DNA input นั้น

DYF399S1 จะเริ่มเกิด allele drop-out ที่ปริมาณ DNA เท่ากับ 0.188 นาโนกรัม (รูปที่ 4.12)



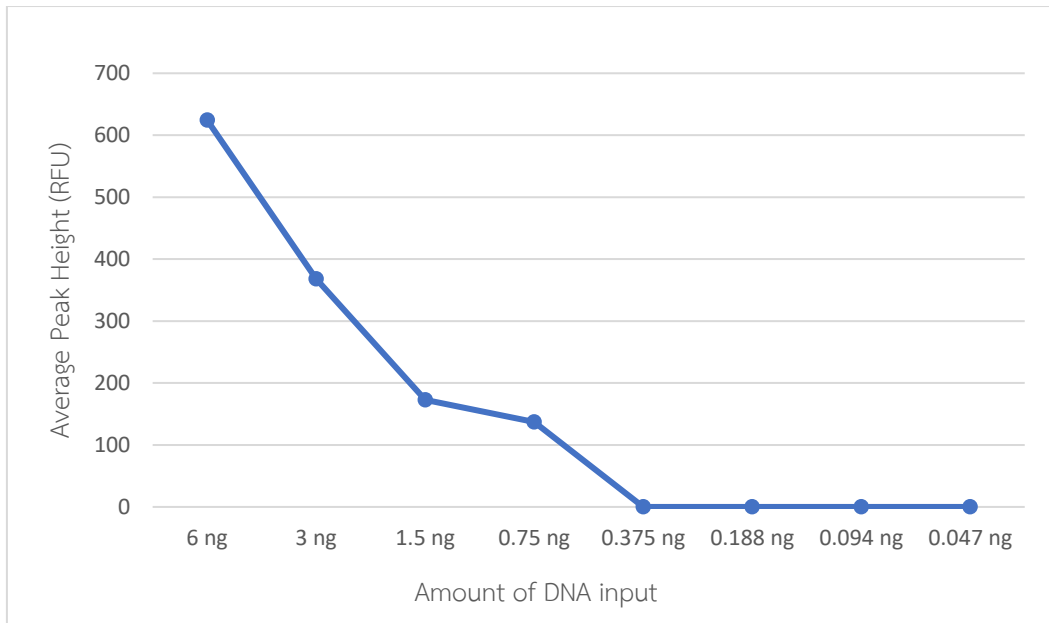
รูปที่ 4.12 ความสูงพีคเฉลี่ยของแต่ละอัลลีลของเครื่องหมาย DYF399S1 ที่ปริมาณของ DNA ตั้งต้นลดลง

DYF403S1a เริ่มเกิด allele drop-out เมื่อปริมาณของ DNA เท่ากับ 0.375 นาโนกรัม (รูปที่ 4.13)



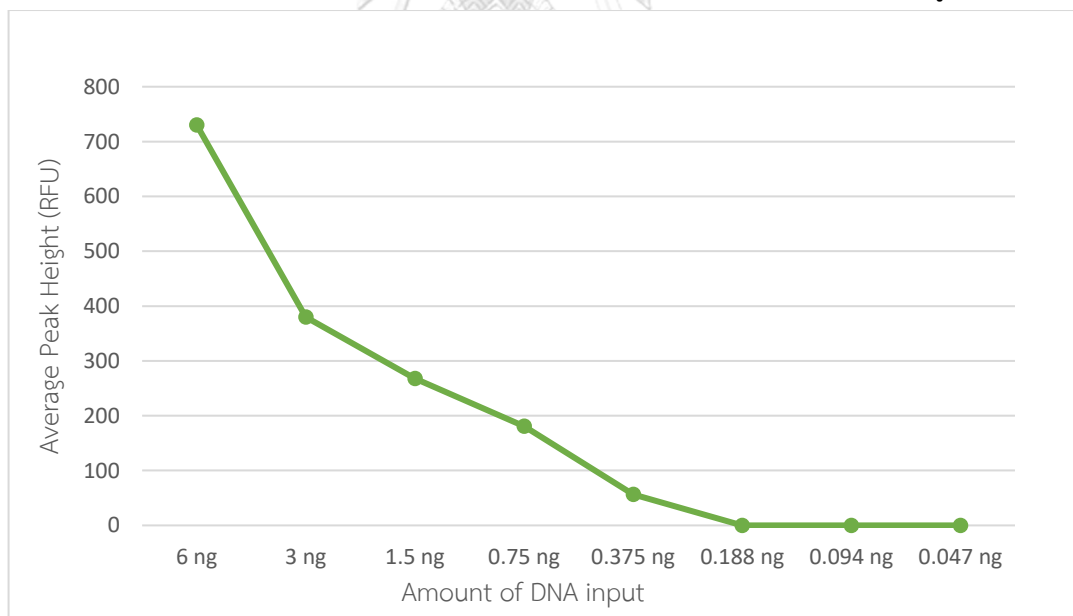
รูปที่ 4.13 ความสูงพีคเฉลี่ยของแต่ละอัลลีลของเครื่องหมาย DYF403S1a ที่ปริมาณของ DNA ตั้งต้นลดลง

DYS547 เกิด allele drop-out ที่เมื่อปริมาณของ DNA เท่ากับ 0.375 นาโนกรัม (รูปที่ 4.14)



รูปที่ 4.14 ความสูงพีคเฉลี่ยของอัลลีลของเครื่องหมาย DYS547 ที่ปริมาณของ DNA ตั้งต้นลดลง

DYS612 เกิด allele drop-out เมื่อปริมาณของ DNA เท่ากับ 0.188 นาโนกรัม (รูปที่ 4.15)



รูปที่ 4.15 ความสูงพีคเฉลี่ยของอัลลีลของเครื่องหมาย DYS612 ที่ปริมาณของ DNA ตั้งต้นลดลง

#### 4.4 ผลการกลายพันธุ์และลักษณะการกลายพันธุ์ที่พบในแต่ละเครื่องหมายที่ได้จากตัวอย่างคูบิดาและบุตรชาย

จากการหาการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย DYF399S1 DYS547 DYF403S1a และ DYS612 ในตัวอย่างคูบิดาและบุตรชาย จำนวน 240 คู่ พบการกลายพันธุ์ทั้งหมด 27 ตัวอย่าง สามารถสรุปจำนวนรูปแบบ และลักษณะได้ดังตารางที่ 4.2

**ตารางที่ 4.2** จำนวน รูปแบบ และลักษณะการกลายพันธุ์ที่พบในการศึกษานี้

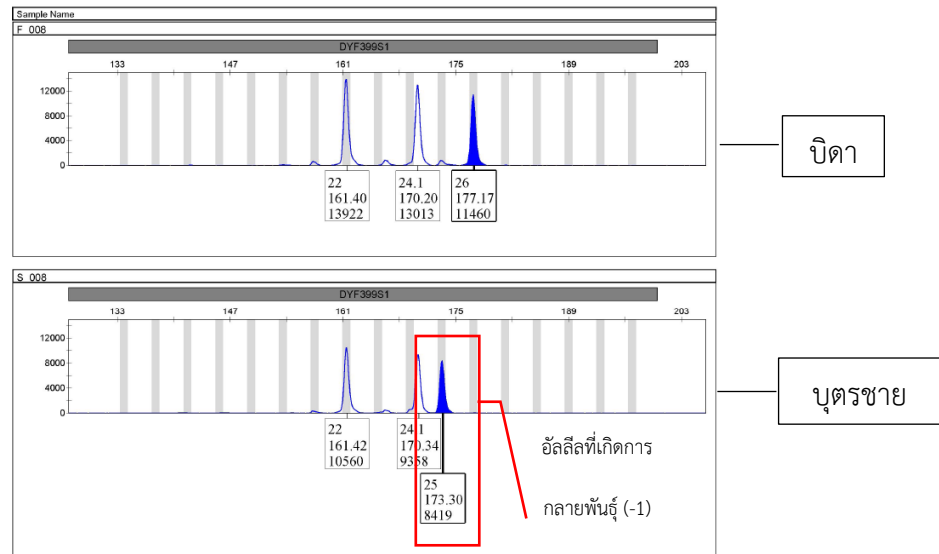
เครื่องหมาย	จำนวนตัวอย่างที่พบการกลายพันธุ์	รูปแบบการกลายพันธุ์		ลักษณะการกลายพันธุ์	
		เพิ่มขึ้น หรือลดลง 1 ซุดซ้ำ	เพิ่มขึ้นหรือลดลง 2 ซุดซ้ำ	เพิ่มขึ้น	ลดลง
DYF399S1	16	16	-	7	9
DYS547	1	1	-	0	1
DYF403S1a	5	4	1	3	2
DYS612	5	5	-	4	1
รวม	27	26	1	14	13

จากตารางที่ 4.2 ในการศึกษานี้เครื่องหมาย DYF399S1 พบจำนวนตัวอย่างที่มีการกลายพันธุ์มากที่สุด และเครื่องหมาย DYS547 พบจำนวนตัวอย่างที่มีการกลายพันธุ์น้อยที่สุด ส่วนใหญ่เป็นการกลายพันธุ์รูปแบบการกลายพันธุ์แบบเพิ่มขึ้นหรือลดลง 1 ซุดซ้ำ (Single-step mutation) พบ 26 ตัวอย่าง และพบรูปแบบการกลายพันธุ์แบบเพิ่มขึ้นหรือลดลง 2 ซุดซ้ำ (Two-step mutation) 1 ตัวอย่าง และลักษณะการกลายพันธุ์เป็นแบบเพิ่มขึ้นของซุดซ้ำ 14 ตัวอย่าง และแบบลดลงของซุดซ้ำ 13 ตัวอย่าง

#### 4.4.1 ผล Electropherogram และลักษณะการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย DVF399S1

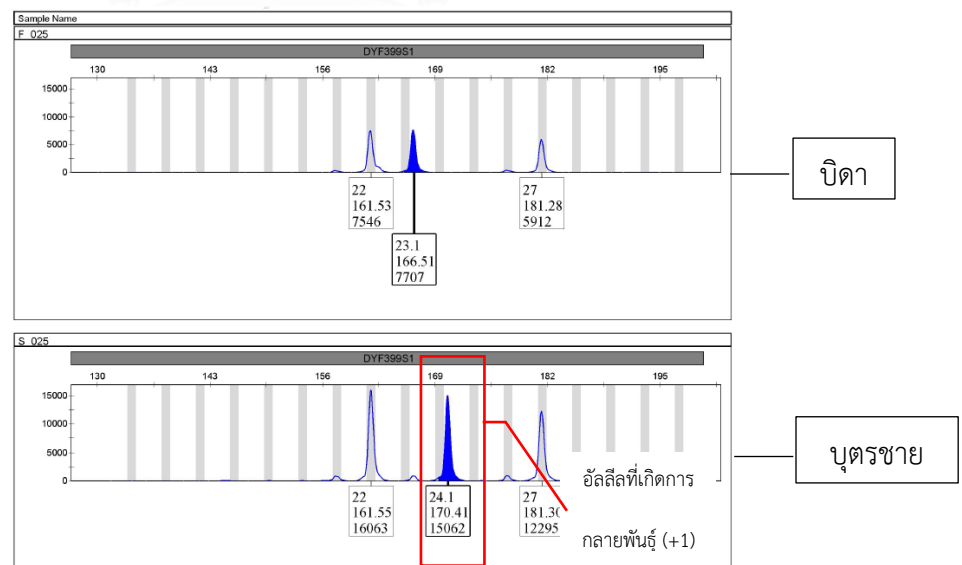
โดยสามารถแสดงผล Electropherogram ของแต่ละตัวอย่าง ดังนี้

ตัวอย่างที่ 008 อัลลีล 22 และ 24.1 ของบุตรชายตรงกับของบิดาแต่อัลลีล 25 ของบุตรลดลง 1 ชุดซ้ำ (รูปที่ 4.16) เมื่อเทียบกับอัลลีล 26 ของบิดา ดังนั้น อัลลีล 25 ถือว่าเกิดการกลายพันธุ์แบบลดลง 1 ชุดซ้ำ



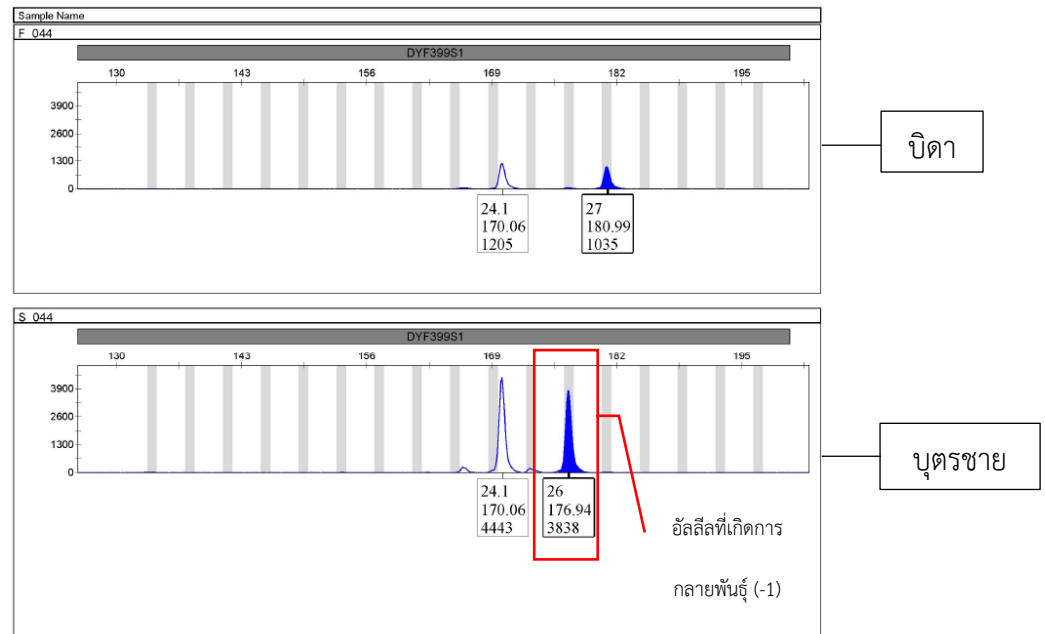
รูปที่ 4.16 Electropherogram แสดงการกลายพันธุ์ของคู่บิดาและบุตรชายไทยตัวอย่างที่ 008

ตัวอย่างที่ 025 อัลลีล 22 และ 27 ของบุตรชายตรงกับของบิดาแต่อัลลีล 24.1 ของบุตรเพิ่มขึ้น 1 ชุดซ้ำ (รูปที่ 4.17) เมื่อเทียบกับอัลลีล 23.1 ของบิดา ดังนั้น อัลลีล 24.1 ถือว่าเกิดการกลายพันธุ์แบบเพิ่มขึ้น 1 ชุดซ้ำ



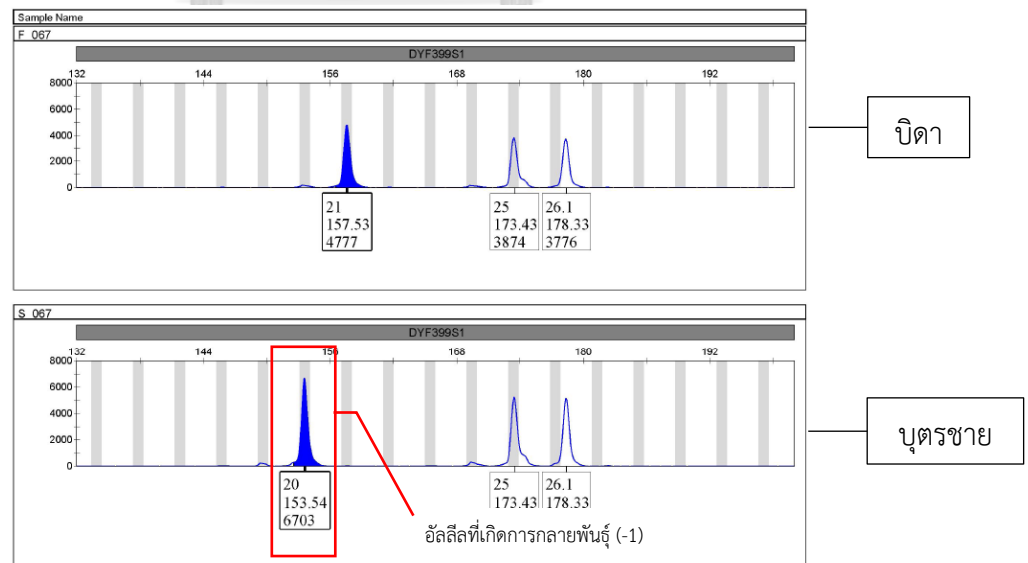
รูปที่ 4.17 Electropherogram แสดงการกลายพันธุ์ของคู่บิดาและบุตรชายไทยตัวอย่างที่ 025

ตัวอย่างที่ 044 อัลลีล 24.1 ของบุตรชายตรงกับของบิดาแต่อัลลีล 26 ของบุตรลดลง 1 ชุดซ้ำ (รูปที่ 4.18) เมื่อเทียบกับอัลลีล 27 ของบิดา ดังนั้น อัลลีล 26 ถือว่าเกิดการกลายพันธุ์แบบลดลง 1 ชุดซ้ำ



รูปที่ 4.18 Electropherogram แสดงการกลายพันธุ์ของคู่บิดาและบุตรชายไทยตัวอย่างที่ 044

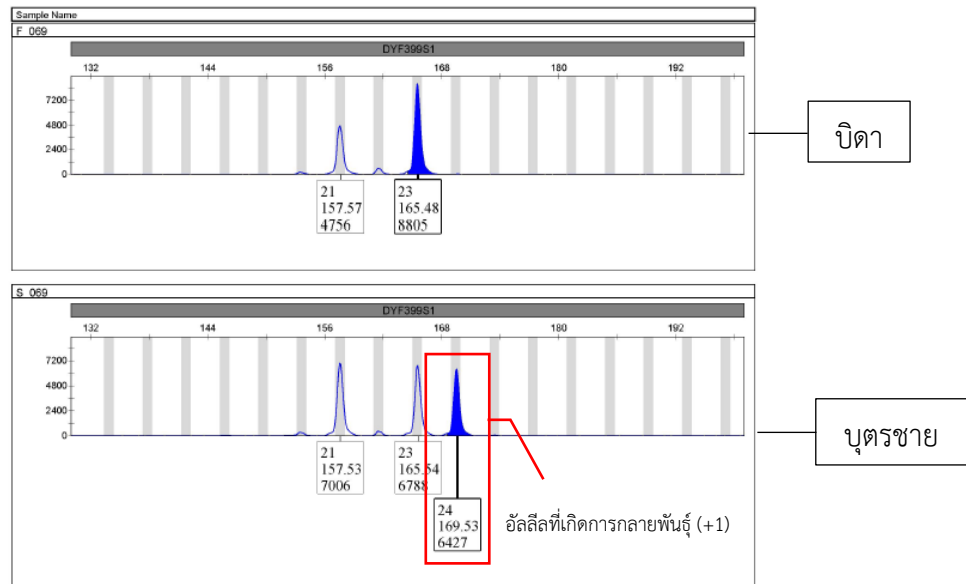
ตัวอย่างที่ 067 อัลลีล 25 และ 26.1 ของบุตรชายตรงกับของบิดาแต่อัลลีล 20 ของบุตรลดลง 1 ชุดซ้ำ (รูปที่ 4.19) เมื่อเทียบกับอัลลีล 21 ของบิดา ดังนั้น อัลลีล 20 ถือว่าเกิดการกลายพันธุ์แบบลดลง 1 ชุดซ้ำ



รูปที่ 4.19 Electropherogram แสดงการกลายพันธุ์ของคู่บิดาและบุตรชายไทยตัวอย่างที่ 067

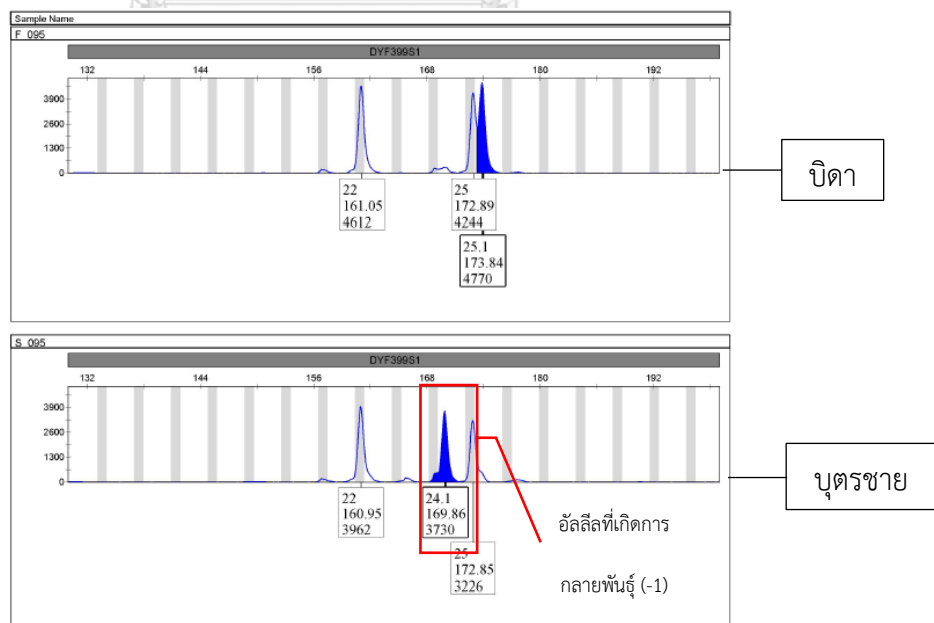


ตัวอย่างที่ 069 อัลลีล 21 และ 23 ของบุตรชายตรงกับของบิดาแต่อัลลีล 24 ของบุตรเพิ่มขึ้น 1 ชุดซ้ำ (รูปที่ 4.20) เมื่อเทียบกับอัลลีล 23 ของบิดา ดังนั้น อัลลีล 24 ถือว่าเกิดการกลายพันธุ์แบบเพิ่มขึ้น 1 ชุดซ้ำ



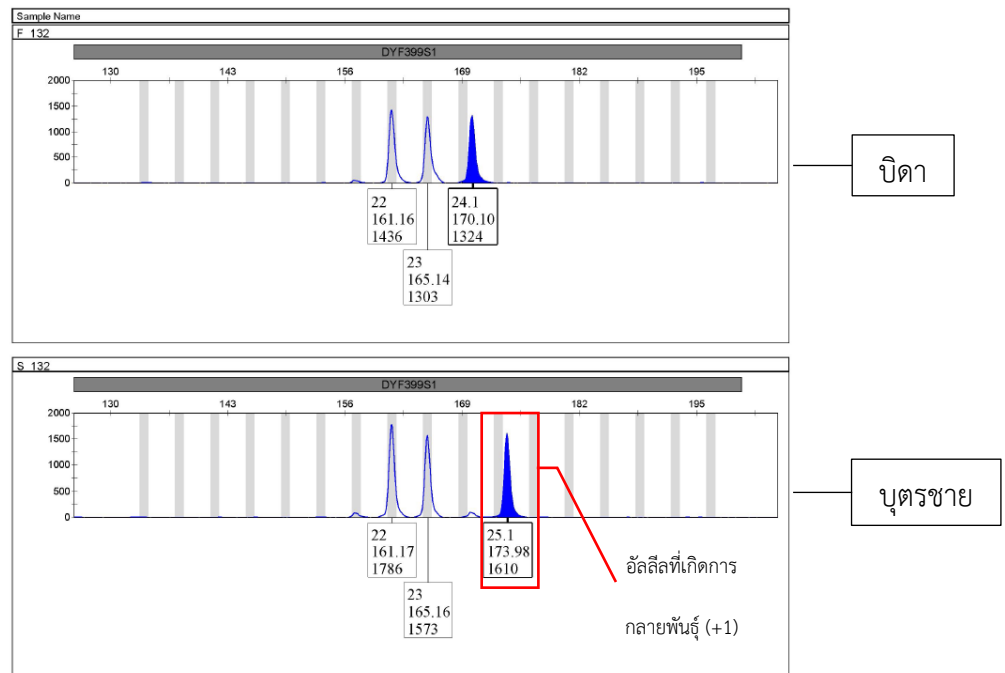
รูปที่ 4.20 Electropherogram แสดงการกลายพันธุ์ของคู่บิดาและบุตรชายไทยตัวอย่างที่ 069

ตัวอย่างที่ 095 อัลลีล 22 และ 25 ของบุตรชายตรงกับของบิดาแต่อัลลีล 24.1 ของบุตรลดลง 1 ชุดซ้ำ (รูปที่ 4.21) เมื่อเทียบกับอัลลีล 25.1 ของบิดา ดังนั้น อัลลีล 24.1 ถือว่าเกิดการกลายพันธุ์แบบลดลง 1 ชุดซ้ำ



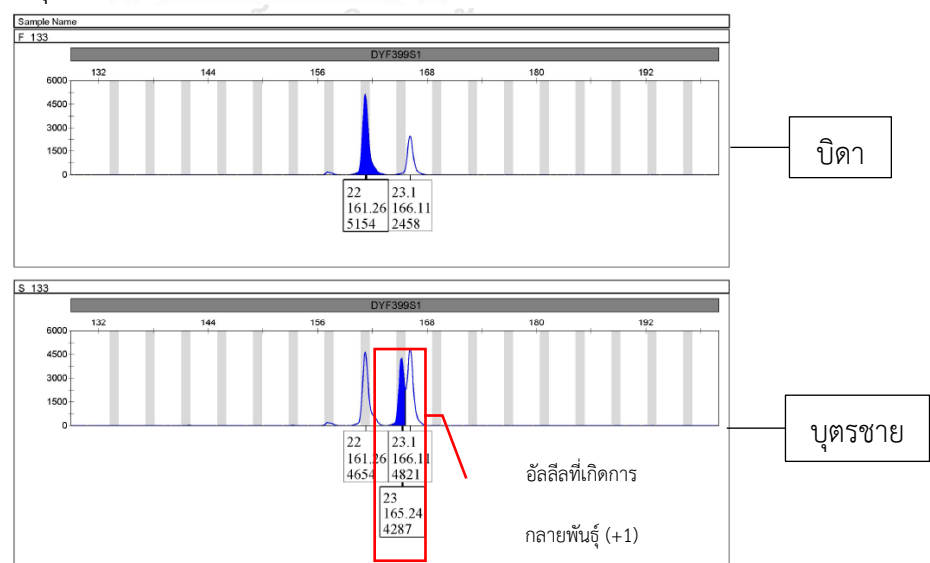
รูปที่ 4.21 Electropherogram แสดงการกลายพันธุ์ของคู่บิดาและบุตรชายไทยตัวอย่างที่ 095

ตัวอย่างที่ 132 อัลลีล 22 และ 23 ของบุตรชายตรงกับของบิดาแต่อัลลีล 25.1 ของบุตรเพิ่มขึ้น 1 ชุดซ้ำ (รูปที่ 4.22) เมื่อเทียบกับอัลลีล 24.1 ของบิดา ดังนั้น อัลลีล 25.1 ถือว่าเกิดการกลายพันธุ์แบบเพิ่มขึ้น 1 ชุดซ้ำ



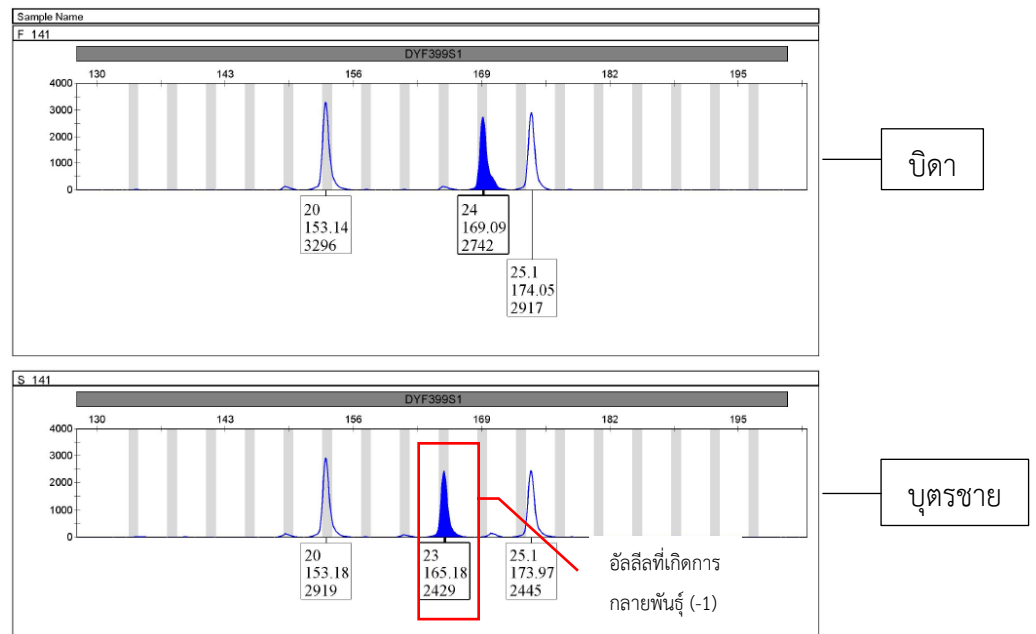
รูปที่ 4.22 Electropherogram แสดงการกลายพันธุ์ของคู่บิดาและบุตรชายไทยตัวอย่างที่ 132

ตัวอย่างที่ 133 อัลลีล 22 และ 23.1 ของบุตรชายตรงกับของบิดาแต่อัลลีล 23 ของบุตรเพิ่มขึ้น 1 ชุดซ้ำ (รูปที่ 4.23) เมื่อเทียบกับอัลลีล 22 ของบิดา ดังนั้น อัลลีล 23 ถือว่าเกิดการกลายพันธุ์แบบเพิ่มขึ้น 1 ชุดซ้ำ



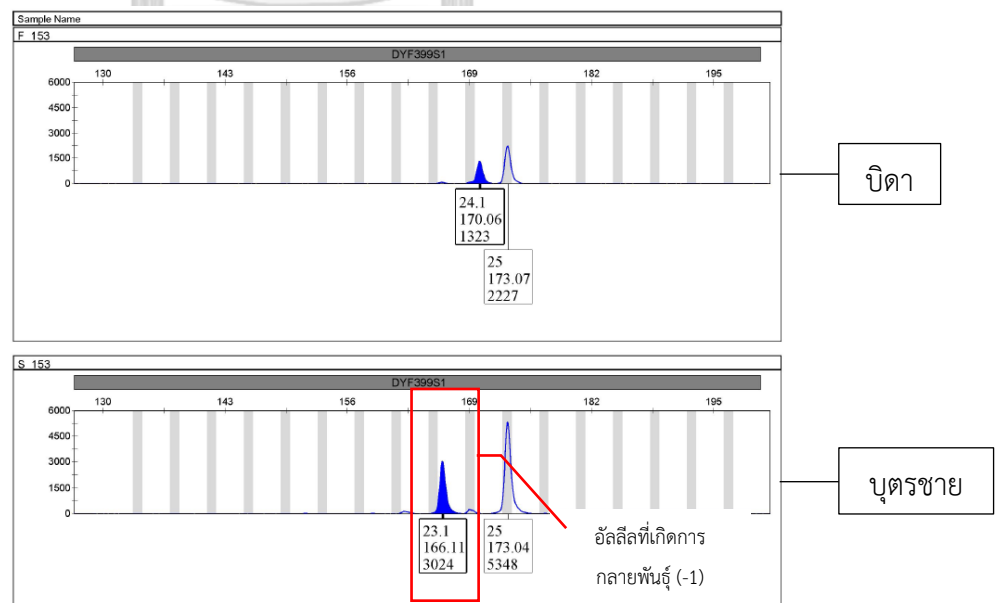
รูปที่ 4.23 Electropherogram แสดงการกลายพันธุ์ของคู่บิดาและบุตรชายไทยตัวอย่างที่ 133

ตัวอย่างที่ 141 อัลลีล 20 และ 25.1 ของบุตรชายตรงกับของบิดาแต่อัลลีล 23 ของบุตร  
ลดลง 1 ชุดซ้ำ (รูปที่ 4.24) เมื่อเทียบกับอัลลีล 24 ของบิดา ดังนั้น อัลลีล 23 ถือว่าเกิดการกลาย  
พันธุ์แบบลดลง 1 ชุดซ้ำ



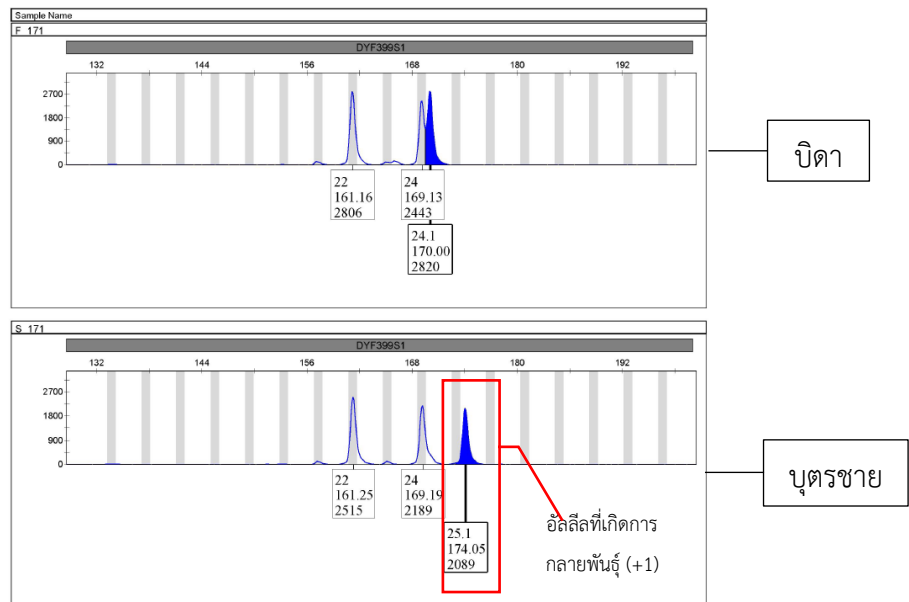
รูปที่ 4.24 Electropherogram แสดงการกลายพันธุ์ของคู่บิดาและบุตรชายไทยตัวอย่างที่ 141

ตัวอย่างที่ 153 อัลลีล 25 และ 25 ของบุตรชายตรงกับของบิดาแต่อัลลีล 23.1 ของบุตร  
ลดลง 1 ชุดซ้ำ (รูปที่ 4.25) เมื่อเทียบกับอัลลีล 24.1 ของบิดา ดังนั้น อัลลีล 23.1 ถือว่าเกิดการกลาย  
พันธุ์แบบ ลดลง 1 ชุดซ้ำ



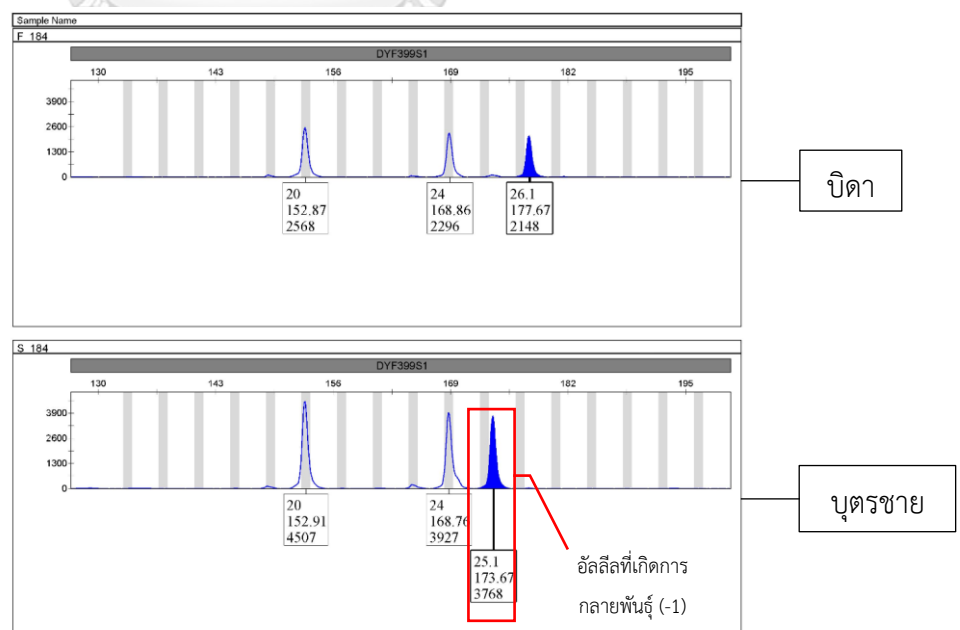
รูปที่ 4.25 Electropherogram แสดงการกลายพันธุ์ของคู่บิดาและบุตรชายไทยตัวอย่างที่ 153

ตัวอย่างที่ 171 อัลลีล 22 และ 24 ของบุตรชายตรงกับของบิดาแต่อัลลีล 25.1 ของบุตรเพิ่มขึ้น 1 ชุดซ้ำ (รูปที่ 4.26) เมื่อเทียบกับอัลลีล 24.1 ของบิดา ดังนั้น อัลลีล 25.1 ถือว่าเกิดการกลายพันธุ์แบบเพิ่มขึ้น 1 ชุดซ้ำ



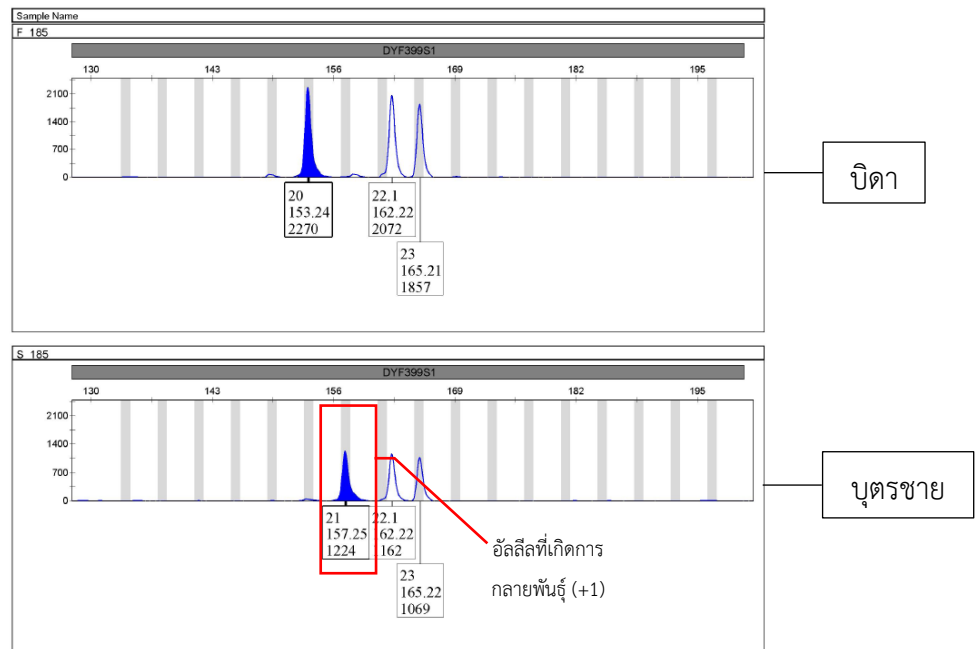
รูปที่ 4.26 Electropherogram แสดงการกลายพันธุ์ของคู่บิดาและบุตรชายไทยตัวอย่างที่ 171

ตัวอย่างที่ 184 อัลลีล 20 และ 24 ของบุตรชายตรงกับของบิดาแต่อัลลีล 25.1 ของบุตรลดลง 1 ชุดซ้ำ (รูปที่ 4.27) เมื่อเทียบกับอัลลีล 26.1 ของบิดา ดังนั้น อัลลีล 25.1 ถือว่าเกิดการกลายพันธุ์แบบ ลดลง 1 ชุดซ้ำ



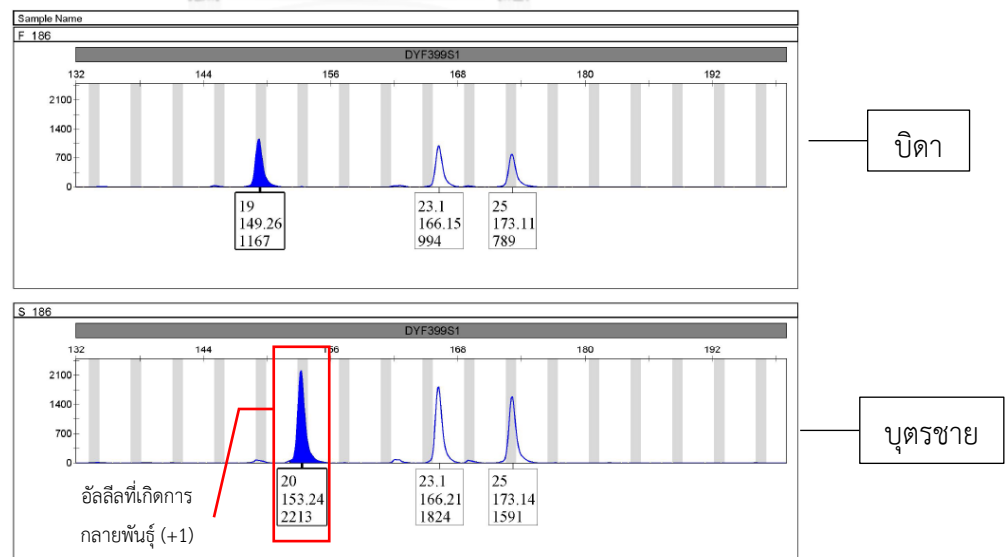
รูปที่ 4.27 Electropherogram แสดงการกลายพันธุ์ของคู่บิดาและบุตรชายไทยตัวอย่างที่ 184

ตัวอย่างที่ 185 อัลลีล 22.1 และ 23 ของบุตรชายตรงกับของบิดาแต่อัลลีล 21 ของบุตรเพิ่มขึ้น 1 ชุดซ้ำ (รูปที่ 4.28) เมื่อเทียบกับอัลลีล 20 ของบิดา ดังนั้น อัลลีล 21 ถือว่าเกิดการกลายพันธุ์แบบเพิ่มขึ้น 1 ชุดซ้ำ



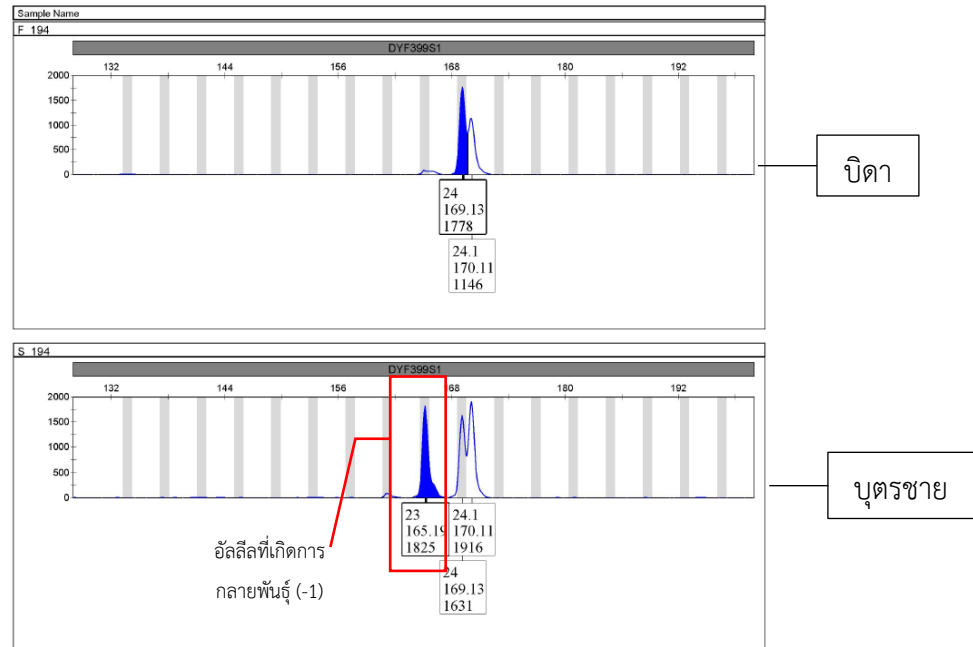
รูปที่ 4.28 Electropherogram แสดงการกลายพันธุ์ของคู่บิดาและบุตรชายไทยตัวอย่างที่ 185

ตัวอย่างที่ 186 อัลลีล 23.1 และ 25 ของบุตรชายตรงกับของบิดาแต่อัลลีล 20 ของบุตรเพิ่มขึ้น 1 ชุดซ้ำ (รูปที่ 4.29) เมื่อเทียบกับอัลลีล 19 ของบิดา ดังนั้น อัลลีล 20 ถือว่าเกิดการกลายพันธุ์แบบเพิ่มขึ้น 1 ชุดซ้ำ



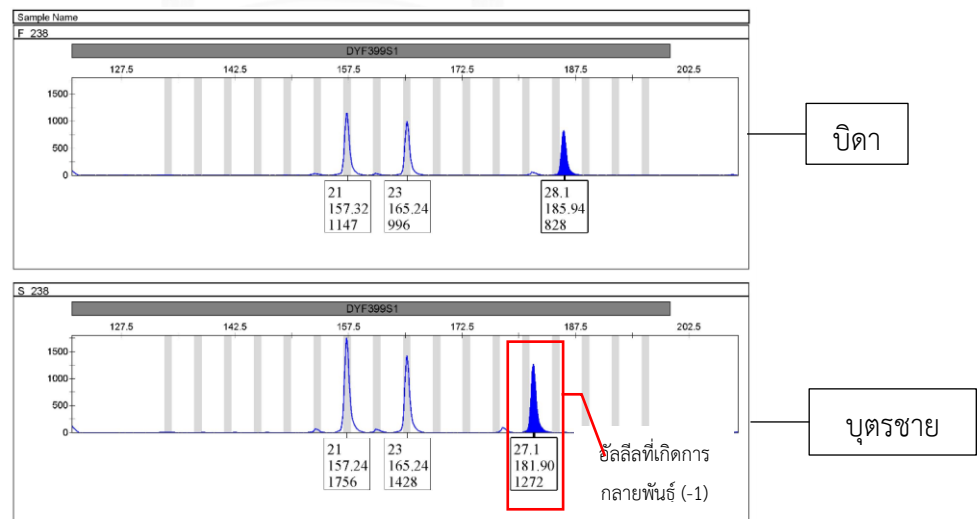
รูปที่ 4.29 Electropherogram แสดงการกลายพันธุ์ของคู่บิดาและบุตรชายไทยตัวอย่างที่ 186

ตัวอย่างที่ 194 อัลลีล 24 และ 24.1 ของบุตรชายตรงกับของบิดาแต่อัลลีล 23 ของบุตรลดลง 1 ชุดซ้ำ (รูปที่ 4.30) เมื่อเทียบกับอัลลีล 24 ของบิดา ดังนั้น อัลลีล 23 ถือว่าเกิดการกลายพันธุ์แบบลดลง 1 ชุดซ้ำ



รูปที่ 4.30 Electropherogram แสดงการกลายพันธุ์ของคู่บิดาและบุตรชายไทยตัวอย่างที่ 194

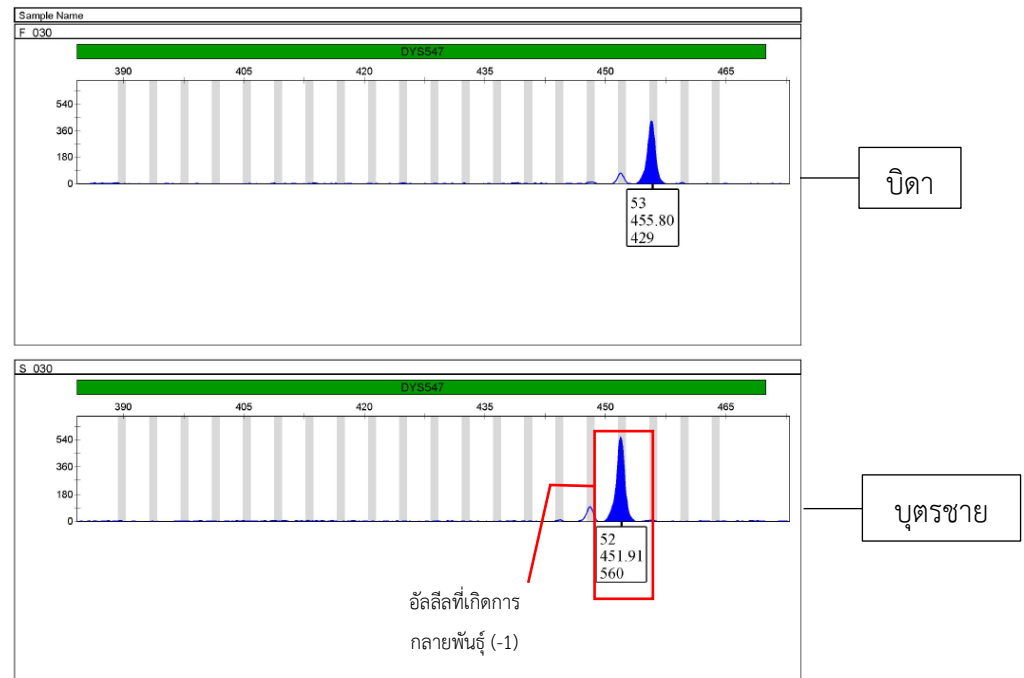
ตัวอย่างที่ 238 อัลลีล 21 และ 23 ของบุตรชายตรงกับของบิดาแต่อัลลีล 27.1 ของบุตรลดลง 1 ชุดซ้ำ (รูปที่ 4.31) เมื่อเทียบกับอัลลีล 28.1 ของบิดา ดังนั้น อัลลีล 27.1 ถือว่าเกิดการกลายพันธุ์แบบลดลง 1 ชุดซ้ำ



รูปที่ 4.31 Electropherogram แสดงการกลายพันธุ์ของคู่บิดาและบุตรชายไทยตัวอย่างที่ 238

#### 4.4.2 ผล Electropherogram และลักษณะการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย DYS547

ตัวอย่างที่ 030 โดยบิดามีอัลลีลเป็น 53 แต่บุตรชายมีอัลลีลเป็น 52 เป็นการลดลงแบบ 1 ชุดซ้ำ (รูปที่ 4.32)



รูปที่ 4.32 Electropherogram แสดงการกลายพันธุ์ของคู่บิดาและบุตรชายไทยตัวอย่างที่ 030

#### 4.4.3 ผล Electropherogram และลักษณะการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย

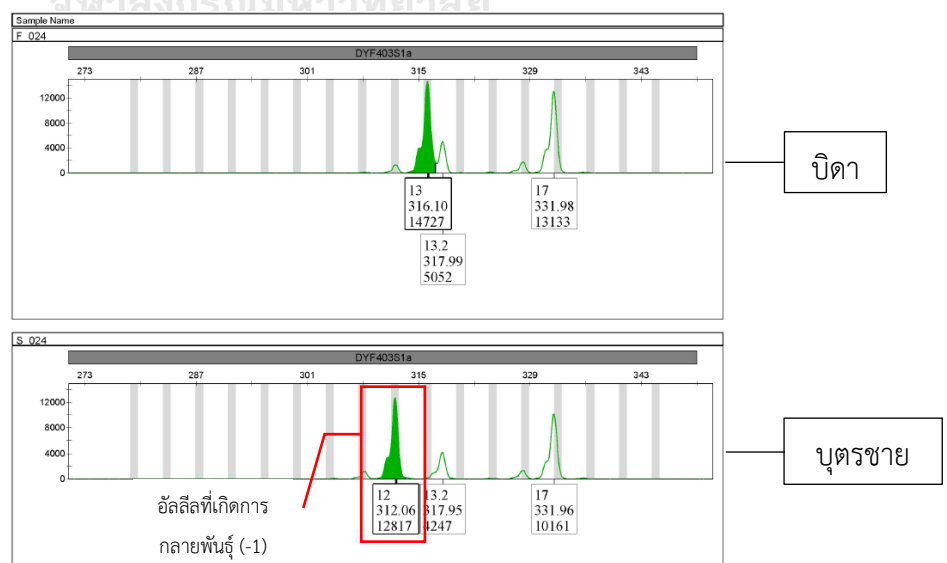
##### DYF403S1a

ตัวอย่างที่ 007 อัลลีล 12 และ 13 ของบุตรชายตรงกับของบิดาแต่อัลลีล 15.2 ของบุตรเพิ่มขึ้น 1 ซุดซ้ำ (รูปที่ 4.33) เมื่อเทียบกับอัลลีล 14.2 ของบิดา ดังนั้น อัลลีล 15.2 ถือว่าเกิดการกลายพันธุ์แบบเพิ่มขึ้น 1 ซุดซ้ำ



รูปที่ 4.33 Electropherogram แสดงการกลายพันธุ์ของคู่บิดาและบุตรชายไทยตัวอย่างที่ 007

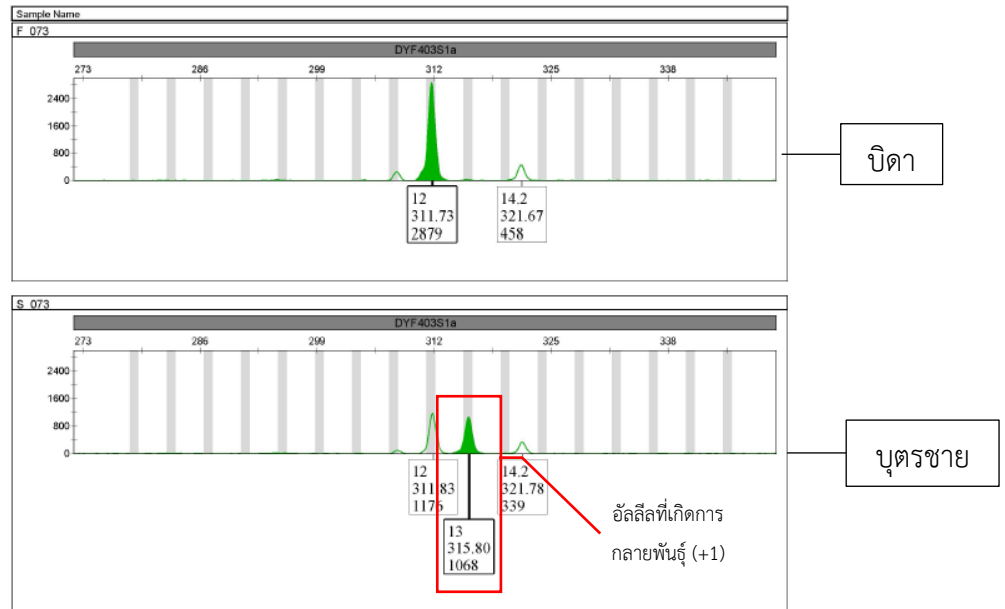
ตัวอย่างที่ 024 อัลลีล 13.2 และ 17 ของบุตรชายตรงกับของบิดาแต่อัลลีล 12 ของบุตรลดลง 1 ซุดซ้ำ (รูปที่ 4.34) เมื่อเทียบกับอัลลีล 13 ของบิดา ดังนั้น อัลลีล 12 ถือว่าเกิดการกลายพันธุ์แบบลดลง 1 ซุดซ้ำ



รูปที่ 4.34 Electropherogram แสดงการกลายพันธุ์ของคู่บิดาและบุตรชายไทยตัวอย่างที่ 024



ตัวอย่างที่ 073 อัลลีล 12 และ 14.2 ของบุตรชายตรงกับของบิดาแต่อัลลีล 13 ของบุตรเพิ่มขึ้น 1 ชุดซ้ำ (รูปที่ 4.35) เมื่อเทียบกับอัลลีล 12 ของบิดา ดังนั้น อัลลีล 13 ถือว่าเกิดการกลายพันธุ์แบบเพิ่มขึ้น 1 ชุดซ้ำ



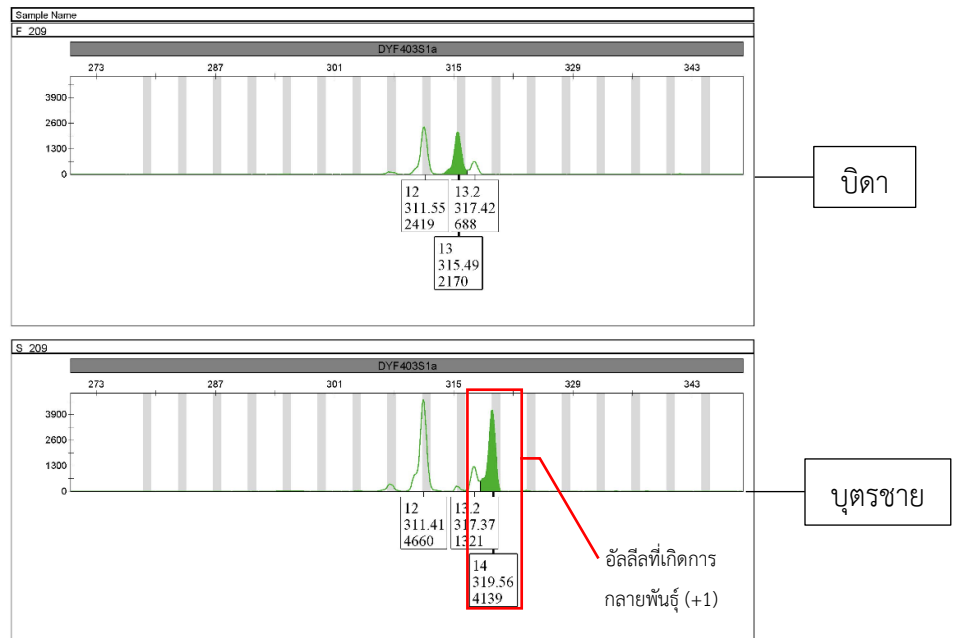
รูปที่ 4.35 Electropherogram แสดงการกลายพันธุ์ของคู่บิดาและบุตรชายไทยตัวอย่างที่ 073

ตัวอย่างที่ 132 อัลลีล 11 และ 13 ของบุตรชายตรงกับของบิดาแต่อัลลีล 12.2 ของบุตรลดลง 2 ชุดซ้ำ (รูปที่ 4.36) เมื่อเทียบกับอัลลีล 14.2 ของบิดา ดังนั้น อัลลีล 12.2 ถือว่าเกิดการกลายพันธุ์แบบลดลง 2 ชุดซ้ำ



รูปที่ 4.36 Electropherogram แสดงการกลายพันธุ์ของคู่บิดาและบุตรชายไทยตัวอย่างที่ 132

ตัวอย่างที่ 209 อัลลีล 12 และ 13.2 ของบุตรชายตรงกับของบิดาแต่อัลลีล 14 ของบุตรเพิ่มขึ้น 1 ชุดซ้ำ (รูปที่ 4.37) เมื่อเทียบกับอัลลีล 13 ของบิดา ดังนั้น อัลลีล 14 ถือว่าเกิดการกลายพันธุ์แบบเพิ่มขึ้น 1 ชุดซ้ำ



รูปที่ 4.37 Electropherogram แสดงการกลายพันธุ์ของคู่บิดาและบุตรชายไทยตัวอย่างที่ 209

#### 4.4.4 ผล Electropherogram และลักษณะการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย DYS612

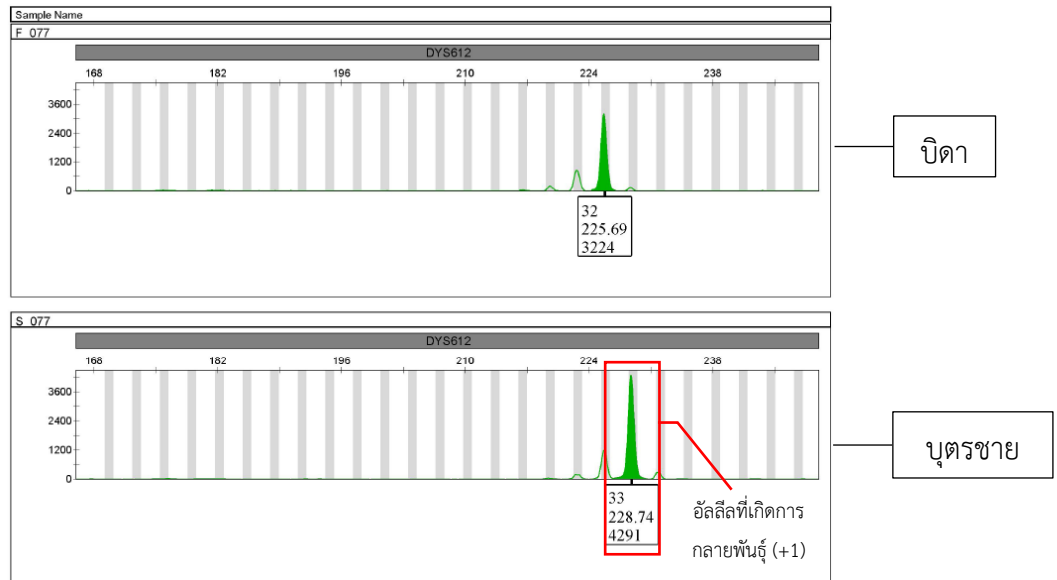
โดยสามารถแสดงผล Electropherogram ของแต่ละตัวอย่าง ดังนี้

ตัวอย่างที่ 065 บิดามีอัลลีลเป็น 29 แต่บุตรชายมีอัลลีลเป็น 30 เป็นการกลายพันธุ์แบบเพิ่มขึ้น 1 ชุดซ้ำ (รูปที่ 4.38)



รูปที่ 4.38 Electropherogram แสดงการกลายพันธุ์ของคู่บิดาและบุตรชายไทยตัวอย่างที่ 065

ตัวอย่างที่ 077 บิดามีอัลลีลเป็น 32 แต่บุตรชายมีอัลลีลเป็น 33 เป็นการกลายพันธุ์แบบ  
เพิ่มขึ้น 1 ชุดซ้ำ (รูปที่ 4.39)



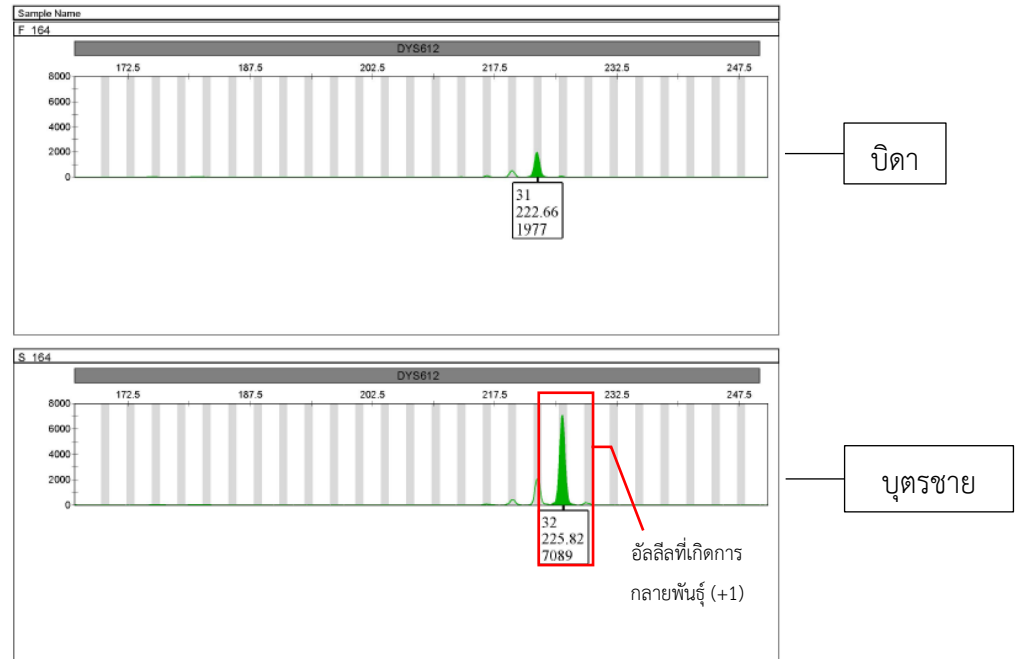
รูปที่ 4.39 Electropherogram แสดงการกลายพันธุ์ของคู่บิดาและบุตรชายไทยตัวอย่างที่ 077

ตัวอย่างที่ 123 บิดามีอัลลีลเป็น 31 แต่บุตรชายมีอัลลีลเป็น 30 เป็นการกลายพันธุ์แบบ  
ลดลง 1 ชุดซ้ำ (รูปที่ 4.40)

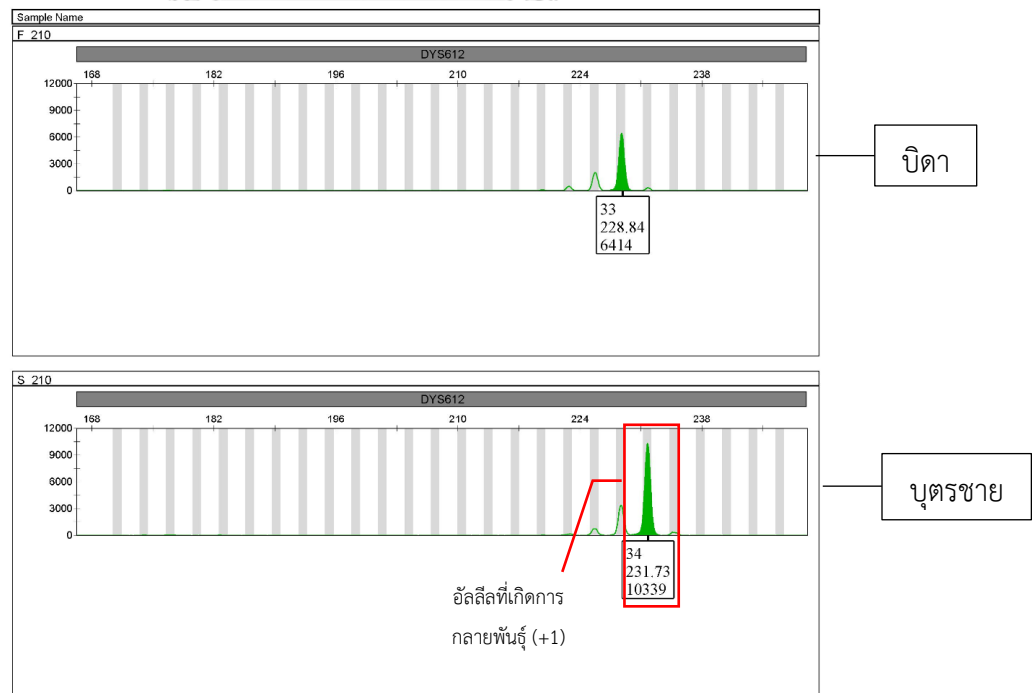


รูปที่ 4.40 Electropherogram แสดงการกลายพันธุ์ของคู่บิดาและบุตรชายไทยตัวอย่างที่ 123

ตัวอย่างที่ 164 บิดามีอัลลีลเป็น 31 แต่บุตรชายมีอัลลีลเป็น 32 เป็นการกลายพันธุ์แบบ  
ลดลง 1 ชุดซ้ำ (รูปที่ 4.41)



รูปที่ 4.41 Electropherogram แสดงการกลายพันธุ์ของคู่บิดาและบุตรชายไทยตัวอย่างที่ 164  
ตัวอย่างที่ 210 บิดามีอัลลีลเป็น 33 แต่บุตรชายมีอัลลีลเป็น 34 เป็นการกลายพันธุ์แบบ  
เพิ่มขึ้น 1 ชุดซ้ำ (รูปที่ 4.42)



รูปที่ 4.42 Electropherogram แสดงการกลายพันธุ์ของคู่บิดาและบุตรชายไทยตัวอย่างที่ 210

ตารางที่ 4.3 สรุปการกลายพันธุ์ที่พบในตัวอย่างคูบิตาและบุตรชายประชากรไทย จำนวน 240 คู่

เครื่องหมาย	รหัสตัวอย่าง	การเปลี่ยนแปลงของเลขอัลลีล	รูปแบบการกลายพันธุ์
DYF399S1	008	26 → 25	-1
	025	23.1 → 24.1	+1
	044	27 → 26	-1
	067	21 → 20	-1
	069	23 → 24	+1
	095	25.1 → 24.1	-1
	132	24.1 → 25.1	+1
	133	22 → 23	+1
	141	24 → 23	-1
	153	24.1 → 23.1	-1
	171	24.1 → 25.1	+1
	184	26.1 → 25.1	-1
	185	20 → 21	+1
	186	19 → 20	+1
	194	24 → 23	-1
	238	28.1 → 27.1	-1
DYS547	030	53 → 52	-1
DYF403S1a	007	14.2 → 15.2	+1
	024	13 → 12	-1
	073	12 → 13	+1
	132	14.2 → 12.2	-2
	209	13 → 14	+1
DYS612	065	29 → 30	+1
	077	32 → 33	+1
	123	31 → 30	-1
	164	31 → 32	+1
	210	33 → 34	+1

กำหนดให้ -1 คือ การกลายพันธุ์แบบลดลง 1 ชุดซ้ำ +1 คือ การกลายพันธุ์แบบเพิ่มขึ้น 1 ชุดซ้ำ

-2 คือ การกลายพันธุ์แบบลดลง 2 ชุดซ้ำ

#### 4.5 อัตราการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย DYF399S1 DYS547 DYF403S1a และ DYS612 ใน คู่บิดาและบุตรชาย

จากการคำนวณอัตราการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย DYF399S1 DYS547 DYF403S1a และ DYS612 ในคู่บิดาและบุตรชายไทยจำนวน 240 คู่ สามารถสรุปอัตราการกลายพันธุ์ของทั้ง 4 เครื่องหมายได้ดังตารางที่ 4.4

**ตารางที่ 4.4** อัตราการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย DYF399S1 DYS547 DYF403S1a และ DYS612 ในบิดาและบุตรชายไทย

เครื่องหมาย	อัตราการกลายพันธุ์ (ต่อตำแหน่งต่อเซลล์สืบพันธุ์ ต่อรุ่น)
DYF399S1	$6.7 \times 10^{-2}$
DYS547	$4 \times 10^{-3}$
DYF403S1a	$2.1 \times 10^{-2}$
DYS612	$2.1 \times 10^{-2}$

จากอัตราการกลายพันธุ์ของทั้ง 4 เครื่องหมายค่าเฉลี่ยเท่ากับ  $2.83 \times 10^{-2}$  ต่อตำแหน่งต่อเซลล์สืบพันธุ์ต่อรุ่น โดยเครื่องหมายที่มีอัตราการกลายพันธุ์มากที่สุดคือ DYF399S1 ( $6.7 \times 10^{-2}$ ) ตามด้วย DYF403S1a และ DYS612 ( $2.1 \times 10^{-2}$ ) และ DYS547 ( $4 \times 10^{-3}$ ) ตามลำดับ

#### 4.6 เปรียบเทียบอัตราการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย DYF399S1 DYS547 DYF403S1a และ DYS612 ของคู่บิดาและบุตรชายในกลุ่มประชากรประเทศไทยกับกลุ่มประชากรอื่น

จากการเปรียบเทียบอัตราการกลายพันธุ์ในงานวิจัยนี้กับงานวิจัยอื่นในกลุ่มตัวอย่างคู่บิดาและบุตรชาย โดยใช้การทดสอบ Binomial test ให้ผลการเปรียบเทียบดังตารางที่ 4.5

**ตารางที่ 4.5** เปรียบเทียบอัตราการกลายพันธุ์ของงานวิจัยนี้กับอัตราการกลายพันธุ์ในกลุ่มประชากรทวีปเอเชียและยุโรปด้วยสถิติ Binomial test

เครื่องหมาย	งานวิจัยนี้ (n=240)	ทวีปเอเชีย				ทวีปยุโรป	
		ปากีสถาน (n=428) (6)	$P_{value}$	จีน (n=180) (7)	$P_{value}$	ออสเตรีย (n=530) (57)	$P_{value}$
DYF399S1	0.07	0.06	0.45	0.05	0.15	0.08	0.32
DYS547	0.004	0.02	0.06	0.02	0.09	0.01	0.60
DYF403S1a	0.02	0.03	0.41	0.02	0.56	0.03	0.33
DYS612	0.02	0.03	0.19	0.02	0.37	0.02	0.30

\* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.05

จากการเปรียบเทียบ พบว่า อัตราการกลายพันธุ์ที่ได้ในกลุ่มประชากรไทยกับประชากรปากีสถานแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ อีกทั้งอัตราการกลายพันธุ์ที่ได้ในกลุ่มประชากรไทยกับกลุ่มประชากรจีนแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และอัตราการกลายพันธุ์ที่ได้ในกลุ่มประชากรไทยกับประชากรออสเตรียแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

#### 4.7 เปรียบเทียบอายุของบิดาที่เกิดการกลายพันธุ์กับอายุของบิดาที่ไม่เกิดการกลายพันธุ์

เมื่อทำการรวบรวมข้อมูลอายุของบิดาขณะที่บุตรชายกำเนิด ทั้งหมด 219 ตัวอย่าง (ไม่ทราบอายุบิดา 21 ตัวอย่าง) ซึ่งมีการกระจายของข้อมูลแบบไม่ปกติ จึงต้องใช้ค่ามัธยฐาน (Median) พบว่า ค่ามัธยฐานของอายุขณะที่บุตรชายกำเนิดของตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยนี้เท่ากับ 31.50 ปี จากจำนวนตัวอย่างที่ทราบอายุทั้งหมด 219 ตัวอย่าง แบ่งออกเป็นตัวอย่างบิดาที่เกิดการกลายพันธุ์ 23 ตัวอย่าง และไม่เกิดการกลายพันธุ์ 196 ตัวอย่าง ซึ่งค่ามัธยฐานของอายุบิดาที่มีการกลายพันธุ์ของตำแหน่ง DYF399S1 DYS547 DYF403S1a และ DYS612 เท่ากับ 38.08 ปี และอายุเฉลี่ยของบิดาที่ไม่มีการกลายพันธุ์เท่ากับ 30.50 ปี เมื่อทดสอบด้วย Mann-Whitney U test เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของอายุของบิดาที่เกิดการกลายพันธุ์กับอายุของพ่อที่ไม่เกิดการกลายพันธุ์ของข้อมูลที่มีการแจกแจงแบบไม่ปกติ พบว่า อายุของบิดาที่กลายพันธุ์และไม่เกิดการกลายพันธุ์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P=0.003$ )





## บทที่ 5

### อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

#### 5.1 ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ (Specificity Test)

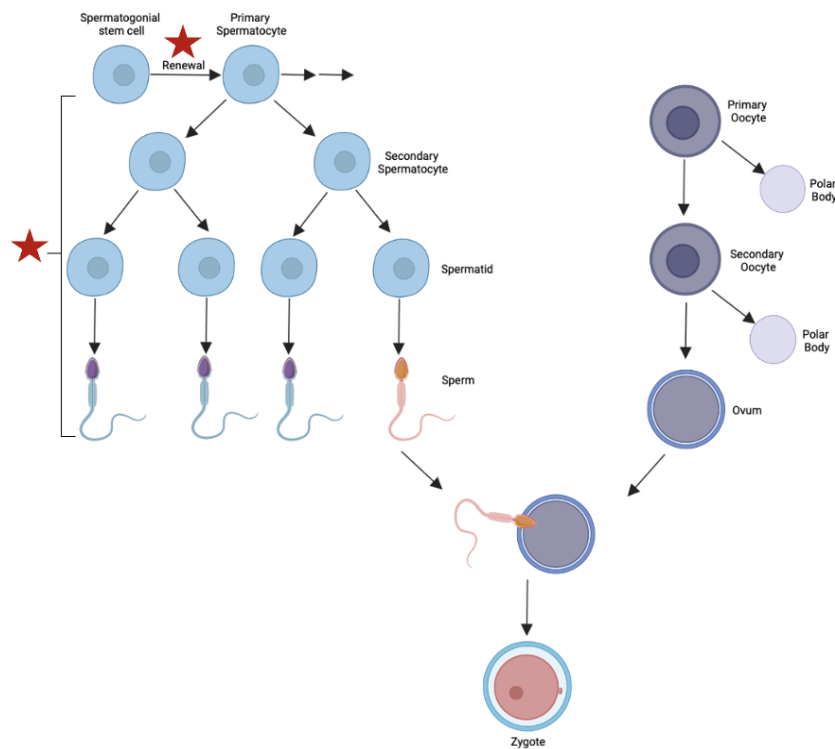
จากการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อตัวอย่าง DNA ของมนุษย์และความจำเพาะต่อ DNA เพศชาย พบว่า พิกัดแถบปลอมที่เกิดขึ้นบริเวณหน้า Panel ของเครื่องหมาย DYF399S1 และ DYS612 เกิดจากเศษสีของสารเรืองแสงที่ติดอยู่กับไพรเมอร์ เมื่อนำตัวอย่างเข้าเทคนิค Capillary Electrophoresis ทำให้เครื่องสามารถตรวจจับสารเรืองแสงดังกล่าวได้ ซึ่งหลังจากการทดลองทำให้บริสุทธิ์ พบว่า ไม่พบพิกัดดังกล่าว ดังนั้น ประสิทธิภาพของไพรเมอร์ติดสีเรืองแสง จะส่งผลต่อการตรวจจับของเทคนิค CE แนะนำให้ใช้ DyeEx ก่อนการวิเคราะห์ด้วย CE เพื่อกำจัดสัญญาณรบกวนดังกล่าว นอกจากนี้เมื่อพิจารณาความถี่ของอัลลีลของเครื่องหมาย DYF399S1 และ DYS612 ตามการศึกษาของ Ballantyne และคณะ ที่ได้รวบรวมช่วงอัลลีลที่เกิดขึ้นได้ของเครื่องหมายดังกล่าว จากข้อมูลที่มีทั้งหมดในประชากรโลก (58) พบว่า ช่วงอัลลีลที่เป็นไปได้ของเครื่องหมาย DYF399S1 คือ 14 ถึง 31.3 และ ช่วงอัลลีลที่เป็นไปได้ของเครื่องหมาย DYS612 คือ 25 ถึง 43 ซึ่งจากการกำหนดช่วงอัลลีลในการกำหนดขอบเขต BIN ของงานวิจัยนี้ได้กำหนดให้ DYF399S1 มีช่วงอัลลีล คือ อัลลีล 15 ถึง อัลลีล 31 และ DYS612 คือ อัลลีล 14 ถึง อัลลีล 39 ซึ่งพิกัดของสัญญาณรบกวนและ Non-specific ในตัวอย่างเพศหญิงที่เกิดขึ้น เป็นพิกัดที่เกิดขึ้นนอกเหนือจากช่วงของอัลลีลที่กำหนด พิกัดดังกล่าวจึงไม่ได้รับบวกรวมการวิเคราะห์อัลลีลในการทดลองนี้ และบริเวณอื่นภายใน Panel ทั้งตัวอย่าง DNA ของสัตว์สำเร็จรูป และ DNA ของเพศหญิง ไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ไม่ได้เกิดการจับเกิดขึ้น ดังนั้น ไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้จึงมีความจำเพาะกับตัวอย่าง DNA มนุษย์ที่เป็นเพศชาย

#### 5.2 ผลการทดสอบความไวของไพรเมอร์ (Sensitivity Test)

จากการทดสอบความไวของชุดไพรเมอร์โดยการลดปริมาณ DNA input ที่ใช้ในกระบวนการ PCR จากผลการทดลองควรใช้ DNA ตั้งต้นในเทคนิค PCR อย่างน้อย 1 นาโนกรัม โดยทั่วไปในการตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมทางนิติวิทยาศาสตร์นิยมใช้ DNA ปริมาณ 1 นาโนกรัม ดังนั้น ไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีความไว เหมาะกับตัวอย่างในงานทางนิติวิทยาศาสตร์

### 5.3 ผลการกลายพันธุ์และลักษณะการกลายพันธุ์ที่พบในแต่ละเครื่องหมายที่ได้จากตัวอย่างคูบิดาและบุตรชายไทย

จากการพบการกลายพันธุ์ทั้งหมด 27 ตัวอย่างจาก 240 คูบิดาและบุตรชายไทย โดยเป็นการกลายพันธุ์แบบเพิ่มขึ้นหรือลดลง 1 ชุดซ้ำ 26 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 96.30 และเป็นการกลายพันธุ์แบบเพิ่มขึ้นหรือลดลง 2 ชุดซ้ำ คิดเป็นร้อยละ 3.70 โดยการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้น แบ่งเป็นเพิ่มขึ้นของชุดซ้ำ 14 ตัวอย่าง และลดลงของชุดซ้ำ 13 ตัวอย่าง คิดเป็นอัตราส่วน 1.08 : 1 เป็นการบ่งชี้การกลายพันธุ์แบบเพิ่มขึ้นของชุดซ้ำมีจำนวนใกล้เคียงกับการกลายพันธุ์แบบลดลงของชุดซ้ำ (12, 59) ซึ่งการกลายพันธุ์รูปแบบนี้คาดว่าเกิดจากกระบวนการ Strand Slippage Polymerase เป็นกลไกหลักที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของ STR (60) ที่เป็นการผิดพลาดที่เกิดขึ้นได้ในระหว่างกระบวนการ Replication ของ DNA สามารถเกิดขึ้นได้ตามธรรมชาติ และเมื่อเปรียบเทียบกับ DNA sequence ชนิดอื่นๆ Repetitive DNA sequence มีแนวโน้มที่จะกลายพันธุ์ได้มากกว่า (61) โดยคาดว่าเหตุการณ์ที่การกลายพันธุ์เหล่านี้เกิดขึ้นสามารถเป็นไปได้ 3 เหตุการณ์ ดังรูปที่ 5.1 ได้แก่ 1. เกิดการกลายพันธุ์ในกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของบิดา แล้วส่งต่อการกลายพันธุ์นั้นมายังบุตรชาย (30) ทำให้ทุกเซลล์ในร่างกายของบุตรชายมีการกลายพันธุ์ของตำแหน่งดังกล่าวอยู่ โดยอาจจะเกิดกลายพันธุ์ตั้งแต่เป็น Spermatogonial stem cell หรือ อาจจะเกิดการกลายพันธุ์ขณะเปลี่ยนแปลงเซลล์ (Differentiation) ไปเป็นสเปิร์ม เหตุการณ์ที่ 2 อาจจะเกิดจากการกลายพันธุ์ขณะการแบ่งตัวหลังจากการผสมเป็นไซโกต (Zygote) แล้วกำลังพัฒนาเป็นตัวอ่อน (Embryo) เนื่องจากมีการแบ่งตัวและพัฒนาการเจริญเติบโตของเซลล์หลายครั้งจึงอาจจะเพิ่มโอกาสในการเกิดการกลายพันธุ์ระหว่างการเพิ่มจำนวนได้ (62)



★ = ขั้นตอนที่สามารถเกิดการกลายพันธุ์ขึ้นได้

Created in BioRender.com bto

รูปที่ 5.1 ขั้นตอนที่มีโอกาสในการเกิดการกลายพันธุ์ได้ระหว่างการสร้างเซลล์สืบพันธุ์

และเหตุการณ์ที่ 3 อาจจะเป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นภายหลังเมื่อบุตรชายมีการเจริญเติบโตขึ้น แล้วเผชิญกับปัจจัยภายนอกต่างๆที่อาจจะส่งผลต่อการกลายพันธุ์ได้เช่น สารเคมี สารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ หรือ การกลายพันธุ์ที่สามารถเกิดขึ้นเองได้ในขณะแบ่งตัวเมื่อมีการเจริญเติบโต (63)

จากงานวิจัยของคุณพิมพ์พิศมัยได้ศึกษาการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย DYF399S1 และ DYF403S1a/b (36) พบว่าในตัวอย่าง 150 คู่ชายที่มีความสัมพันธ์ทางสายบิดาของประชากรไทยพบการกลายพันธุ์แบบเพิ่มขึ้น 1 ชุดซ้ำเท่านั้น แต่งานวิจัยนี้พบตัวอย่างคู่บิดาและบุตรชายไทยที่เครื่องหมาย DYF403S1a เกิดการกลายพันธุ์แบบเพิ่มขึ้นหรือลดลง 2 ชุดซ้ำของตัวอย่าง 132 อีกทั้งตัวอย่างนี้ยังพบ มีการกลายพันธุ์เกิดขึ้น 2 ตำแหน่ง ได้แก่ DYF399S1 เป็นการกลายพันธุ์แบบเพิ่มขึ้น 1 ชุดซ้ำ และ DYF403S1a เป็นการกลายพันธุ์แบบลดลง 2 ชุดซ้ำในตัวอย่างเดียวกัน แต่อย่างไรก็ตามการกลายพันธุ์แบบเพิ่มขึ้นหรือลดลงที่มากกว่า 1 ชุดซ้ำ สามารถเกิดขึ้นได้ยากกว่าการกลายพันธุ์แบบเพิ่มขึ้นหรือลดลง 1 ชุดซ้ำ ดังนั้น การขยายจำนวนตัวอย่างเพิ่มขึ้นของงานวิจัยนี้ ทำให้พบความหลากหลายของรูปแบบการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย DYF399S1 และ DYF403S1a ในกลุ่มประชากรไทยมากขึ้น

นอกจากนี้เครื่องหมาย DYF399S1 ในการทดลองนี้สามารถพบได้มากกว่า 3 อัลลีล คือ พบ 4 อัลลีล จำนวน 5 ตัวอย่าง 6 อัลลีล จำนวน 1 ตัวอย่าง (ตัวอย่างนี้ได้ผ่านการทดลองซ้ำยืนยันแล้ว) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yuan และคณะ พบว่า เครื่องหมาย DYF399S1 สามารถพบได้มากกว่า 3 อัลลีลในประชากรชาวจีนชาติพันธุ์ฮั่น (11) และเครื่องหมายดังกล่าวเป็น multicopy ที่สามารถมีจำนวนอัลลีลได้ตั้งแต่ 1 อัลลีล ถึง 5 อัลลีล (64) แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้พบว่า มีตัวอย่างที่พบ 6 อัลลีล 1 ตัวอย่าง (ตัวอย่างที่ 202) อาจเกิดจากการ Duplication ของอัลลีลของเครื่องหมาย DYF399S1 เนื่องจาก DYF399S1 อยู่ในบริเวณ AZFs region บนโครโมโซม Y ที่มีโอกาสในการเกิดการ Duplication ได้ (65) เมื่อพิจารณาจากการศึกษาของคุณ Ghafri ได้พบ อัลลีลของ DYF399S1 ได้ 6 อัลลีล เช่นกัน (66) แต่อย่างไรก็ตามตัวอย่างนี้อาจจะต้องมีการตรวจเพื่อยืนยันว่าตัวอย่างดังกล่าวเกิด Duplication โดยใช้เทคนิค เช่น Fluorescence in situ Hybridization (FISH) ตรวจสอบตำแหน่งของการเกิด Duplication หรือ ใช้เทคนิค Comparative genomic hybridization

และยังพบอัลลีลที่มี Microvariant ซึ่งส่วนใหญ่พบในเครื่องหมาย DYF399S1 และ DYF403S1a คาดว่าเนื่องมาจากเครื่องหมายดังกล่าวมีลักษณะรูปแบบการซ้ำแบบซับซ้อนและเป็น Multi-copy นอกจากนี้ เนื่องจากว่าการวิเคราะห์เครื่องหมาย STR ด้วย CE และการรายงานเลขอัลลีลมีพื้นฐานมาจากขนาดของสาย DNA ผลการทดลองที่ค้นพบในงานวิจัยนี้บางส่วน อาจต้องมีการใช้เทคนิคอื่นในการตรวจวิเคราะห์เพื่อยืนยันผลดังกล่าว เช่น การใช้เทคนิค Sequencing เพื่อยืนยันการค้นพบอัลลีลใหม่ที่ไม่เคยมีใครรายงานมาก่อน หรือเพื่อศึกษาการเกิด Isoalleles ในกลุ่มเครื่องหมายทั้งสิ้น เป็นต้น

#### 5.4 อัตราการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย DYF399S1, DYS547, DYF403S1a และ DYS612

##### ในคู่บิดาและบุตรชายไทย

เครื่องหมาย DYF399S1 มีอัตราการกลายพันธุ์เท่ากับ  $6.7 \times 10^{-2}$  ต่อตำแหน่งต่อเซลล์สืบพันธุ์ต่อรุ่น สอดคล้องกับงานวิจัย Wang และคณะที่พบว่า DYF399S1 มีอัตราการกลายพันธุ์มากที่สุด (10) รองลงมาเป็น DYF403S1a และ DYS612 มีอัตราการกลายพันธุ์เท่ากับ  $2.1 \times 10^{-2}$  ซึ่งจัดว่ามีการกลายพันธุ์สูง และ DYS547 มีอัตราการกลายพันธุ์เท่ากับ  $4 \times 10^{-3}$  ซึ่งจัดว่าเป็นการกลายพันธุ์ระดับปานกลาง เนื่องจากเครื่องหมาย DYF399S1 เป็นเครื่องหมายที่มีโครงสร้างแบบซับซ้อน เป็นการเพิ่มโอกาสในการเกิดโครงสร้างลำดับที่สอง จึงมีโอกาสเกิดการกลายพันธุ์แบบ polymerase slippage ส่งผลให้มีอัตราการกลายพันธุ์สูงขึ้น (5) และยังเป็น Multi-copy ซึ่งในแต่ละ Copy มีโอกาสในการเกิดการกลายพันธุ์ที่เป็นอิสระต่อกัน (67) อีกทั้งภายในโครงสร้างของ เครื่องหมาย

DYF399S1 มีชุดซ้ำที่มีปริมาณเบส AT (AT content) จำนวนมาก อาจจะทำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่รวดเร็วกว่าชุดซ้ำที่มีปริมาณเบส CG (CG content) (67) อาจจะเป็นเพราะพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบส A กับ T ที่มีน้อยกว่าเบส C กับ T ทำให้ DNA บริเวณนั้นมีความเสถียรน้อยกว่า จึงทำให้เครื่องหมายที่ชุดซ้ำมีเบส A และ T มาก อาจจะมีโอกาสเกิดการกลายพันธุ์ได้มากกว่าเหตุผลดังกล่าวจึงสามารถใช้อธิบายการเกิดการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย DYF399S1 ได้มากกว่าอีกสามเครื่องหมาย

DYF403S1a เป็นเครื่องหมายที่มีรูปแบบซ้ำซ้อนและ Multi-copy Y-STR และเครื่องหมาย DYS612 เป็นเครื่องหมายที่มีรูปแบบซ้ำซ้อนและเป็น Trinucleotide repeat ซึ่งการที่มีจำนวนเบสซ้ำน้อย จะมีโอกาสที่สาย DNA จับได้ผิดเพิ่มขึ้น เนื่องจากมีลำดับเบสซ้ำที่เหมือนกันเรียงตัวติดกันจำนวนมาก ทำให้มีโอกาสการเกิดการกลายพันธุ์ได้มาก (5) แต่อย่างไรก็ตามเครื่องหมาย DYS547 มีอัตราการกลายพันธุ์ที่จัดว่าเป็นการกลายพันธุ์ปานกลางในกลุ่มประชากรไทย ซึ่งหากมีการขยายจำนวนตัวอย่าง อาจจะมีโอกาสในการพบการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย DYS547 เพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม หากในอนาคตเพิ่มจำนวนตัวอย่างแล้วไม่พบอัตราการกลายพันธุ์เพิ่มขึ้น อาจเป็นเพราะการเปลี่ยนแปลงอัลลีลของเครื่องหมาย DYS547 ในกลุ่มประชากรไทยยังมีการเปลี่ยนแปลงน้อย หากในอนาคตมีการเพิ่มเครื่องหมายดังกล่าวไปในชุดตรวจ เพื่อใช้แยกชายที่มีความสัมพันธ์กัน เครื่องหมาย DYS547 อาจจะใช้แยกไม่ได้ในชายไทยที่มีความสัมพันธ์ทางสายบิดากัน

ผลที่ได้จากงานวิจัยนี้ยังสนับสนุนงานวิจัยของคุณพิมพ์พิสมัย ที่ได้ศึกษาอัตราการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย DYF399S1 และ DYF403S1a/b ในชายไทยที่มีความสัมพันธ์กันจำนวน 150 คู่ (36) พบว่า DYF399S1 มีการกลายพันธุ์เกิดขึ้น 10 ตัวอย่าง คิดเป็นอัตราการกลายพันธุ์เท่ากับ  $6.67 \times 10^{-2}$  ต่อตำแหน่งต่อเซลล์สืบพันธุ์ต่อรุ่น และ DYF403S1a มีการกลายพันธุ์เกิดขึ้น 3 ตัวอย่าง คิดเป็นอัตราการกลายพันธุ์เท่ากับ  $2 \times 10^{-2}$  ต่อตำแหน่งต่อเซลล์สืบพันธุ์ต่อรุ่น ดังนั้น ข้อมูลของเครื่องหมาย DYF399S1 และ DYF403S1a ที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถนำไปรวมกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ เพื่อเพิ่มข้อมูลอัตราการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย DYF399S1 และ DYF403S1a ในกลุ่มประชากรไทย

### 5.5 เปรียบเทียบอัตราการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย DYF399S1 DYS547 DYF403S1a และ DYS612 ของคู่บิดาและบุตรชายในกลุ่มประชากรประเทศไทยกับกลุ่มประชากรอื่น

จากการเปรียบเทียบอัตราการกลายพันธุ์ระหว่างกลุ่มประชากร อัตราการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย DYF399S1 DYS547 DYF403S1a และ DYS612 ของกลุ่มประชากรไทย แตกต่างกับกลุ่มประชากรอื่นอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่มากกว่าหรือเท่ากับ 0.05 โดยในกลุ่มประชากรในประเทศในทวีปเอเชีย และกลุ่มประชากรไทยก็แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติกับในประเทศในทวีปยุโรปเช่นกัน ซึ่งการกลายพันธุ์ของ Y-STR เป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นได้ยาก (57) หากจำนวนตัวอย่างน้อย อาจจะทำให้โอกาสสับสนพบการกลายพันธุ์ได้น้อยกว่า ดังนั้น การขยายจำนวนตัวอย่างให้ใกล้เคียงกับจำนวนประชากร อาจจะทำให้พบการกลายพันธุ์มากขึ้น ส่งผลให้ค่าอัตราการกลายพันธุ์เปลี่ยนแปลง แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาอัตราการกลายพันธุ์เป็นเพียงการศึกษาส่วนหนึ่งก่อนการศึกษา Y- Haplotype เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของอัลลีล จะส่งผลต่อ Y- Haplotype ดังนั้น การศึกษานี้จึงเป็นจุดเริ่มต้น เพื่อที่จะศึกษาประชากรชายในประเทศไทยต่อไป

### 5.6 เปรียบเทียบอายุของบิดาที่เกิดการกลายพันธุ์กับอายุของบิดาที่ไม่เกิดการกลายพันธุ์

อายุเฉลี่ยของบิดาขณะที่ให้กำเนิดบุตรชาย เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่อาจจะส่งผลต่อการกลายพันธุ์แต่ไม่ใช่ปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของ Y-STR (5, 68) แต่อายุของบิดาขณะที่ให้กำเนิดบุตรชายก็เป็นปัจจัยที่น่าสนใจที่จะศึกษาเพิ่มเติมถึงความเชื่อมโยงกับอัตราการกลายพันธุ์ในกลุ่มประชากร (69) โดยจากจำนวนตัวอย่างของบิดาทั้งหมด 240 ตัวอย่าง ทราบอายุบิดาทั้งหมด 219 ตัวอย่าง ซึ่งค่ามัธยฐานของอายุเฉลี่ยของบิดาที่มีการกลายพันธุ์ของตำแหน่ง DYF399S1 DYS547 DYF403S1a และ DYS612 และค่ามัธยฐานอายุเฉลี่ยของบิดาที่ไม่มีการกลายพันธุ์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ (70) ที่พบว่าอายุของบิดาขณะที่ให้กำเนิดบุตรชายที่มากขึ้น จะส่งผลให้มีอัตราการกลายพันธุ์มากขึ้น อีกทั้งยังพบความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย DYF399S1 มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับอายุของบิดาขณะที่ให้กำเนิดบุตรชายและอัตราการกลายพันธุ์

### สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้คำนวณหาอัตราการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย D YF399S1 D YS547 D YF403S1a และ D YS612 ของกลุ่มประชากรไทยจำนวน 240 คู่บิดาและบุตรชายไทย โดยอัตราการกลายพันธุ์ของเครื่องหมาย D YF399S1 D YF403S1a และ D YS612 มีอัตราการกลายพันธุ์สูงในกลุ่มประชากรไทย และเครื่องหมาย D YS547 มีอัตราการกลายพันธุ์ปานกลางในกลุ่มประชากรไทย เมื่อพิจารณาโครงสร้างของ D YF399S1 D YF403S1a และ D YS612 เป็นไปตามปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ ได้แก่ จำนวนชุดซ้ำ รูปแบบของเบสซ้ำ และจำนวนของเบสซ้ำ และอัตราการกลายพันธุ์ของเครื่องหมายดังกล่าวไม่แตกต่างกับประชากรทั้งในทวีปเอเชีย และยุโรป และอายุของบิดาเมื่อลูกชายเกิดที่มีเครื่องหมายเหล่านี้เกิดการกลายพันธุ์แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอายุของบิดาที่ไม่มีเครื่องหมายที่เกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งปัจจัยเรื่องอายุของพ่ออาจจะเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่สามารถนำไปศึกษาต่อได้ในอนาคต ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงเป็นการยืนยันว่าเครื่องหมาย D YF399S1 D YS547 D YF403S1a เกิดการกลายพันธุ์สูงและและเครื่องหมาย D YS547 มีอัตราการกลายพันธุ์ปานกลาง ในกลุ่มประชากรไทย อีกทั้งยังเป็นฐานข้อมูลที่สามารถใช้ในการต่อยอดศึกษาการเปลี่ยนแปลง Y-Haplotype ของเครื่องหมาย D YF399S1 D YS547 D YF403S1a และ D YS612 ในประชากรไทยต่อไป

### ข้อเสนอแนะและการศึกษาในอนาคต

1. ข้อมูลเกี่ยวกับอายุของบิดาเป็นข้อมูลที่เป็นการศึกษาเพิ่มเติมในการศึกษานี้ว่า มีอิทธิพลต่ออัตราการกลายพันธุ์หรือไม่ แต่ยังไม่สมบูรณ์ เนื่องจากไม่ได้จัดกลุ่มอายุของบิดา ดังนั้น หากมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับอายุของบิดาในอนาคต ควรจะจัดกลุ่มและคัดเลือกตัวอย่างจากอายุของบิดา และยังมีปัจจัยอื่นที่มีอิทธิพลต่อการกลายพันธุ์หรือไม่ เช่น การที่บิดาเป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับโครโมโซม Y จะมีผลต่อการกลายพันธุ์ของเครื่องหมายทั้งสี่หรือไม่
2. ชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบและอ้างอิงมาในการศึกษานี้ ยังไม่ได้ทดลองในตัวอย่างที่มีทั้งตัวอย่างเพศชายและเพศหญิงในตัวอย่างเดียวกัน เพื่อเป็นการจำลองหากมีการนำชุดไพรเมอร์ไปใช้ในตัวอย่างจริง
3. เครื่องหมาย RM Y-STR ที่เป็น Multicopy อาจจะมีปัญหาเกิดขึ้นได้ในกรณีที่มีตัวอย่างเพศชายมากกว่า 1 คน อาจจะทำให้ยากต่อการแปลผลโปรไฟล์ของ DNA เนื่องจากมีหลายอัลลีลที่สามารถเกิดขึ้นได้ในหนึ่งเครื่องหมาย

## บรรณานุกรม

1. Delbridge ML, Graves JA. Origin and evolution of spermatogenesis genes on the human sex chromosomes. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 2007;65:1-17.
2. Kayser M. Forensic use of Y-chromosome DNA: a general overview. *Hum Genet.* 2017;136:621-35.
3. Xu X, Peng M, Fang Z, Xu X. The direction of microsatellite mutations is dependent upon allele length. *Nat Genet.* 2000;24:396-9.
4. Kayser M. Uni-parental markers in human identity testing including forensic DNA analysis. *BioTechniques.* 2007;43.
5. 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. *Am J Hum Genet.* 2010;87:341-53.
6. 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 Sci Int Genet.* 2016;25:45-51.
7. 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 Sci Int Genet Suppl Ser.* 2017;6:e346-e8.
8. 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. *Int J Legal Med.* 2018;132:1621-4.
9. Rakha A, Oh YN, Lee HY, Hussain S, Waryah AM, Adnan A, et al. Discriminating power of rapidly mutating Y-STRs in deep rooted endogamous pedigrees from Sindhi population of Pakistan. *Leg Med (Tokyo).* 2018;34:17-20.
10. Wang Q, Jin B, An G, Zhong Q, Chen M, Luo X, et al. Rapidly mutating Y-STRs study in Chinese Yi population. *Int J Legal Med.* 2019;133:45-50.
11. 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. *Int J Legal Med.* 2019;133:59-63.
12. 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.
13. Otagiri T, Sato N, Shiozaki T, Harayama Y, Hayashi T, Kobayashi K, et al. Mutation analysis for 25 Y-STR markers in Japanese population. *Leg Med (Tokyo).* 2021;50:101860.
  14. Butler JM. Chapter 2 - Basics of DNA Biology and Genetics. In: Butler JM, editor. *Fundamentals of Forensic DNA Typing.* San Diego: Academic Press; 2010. p. 19-41.
  15. Giersch ABS. Introduction to Cytogenetics. In: McManus LM, Mitchell RN, editors. *Pathobiology of Human Disease.* San Diego: Academic Press; 2014. p. 3304-10.
  16. ฤกษ์อำนาจโชค บ. วิทยาการก้าวหน้าทางนิติพันธุศาสตร์. 1, editor. คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล: บริษัท ปิยอนด์ เอ็นเทอร์ไพรซ์ จำกัด; 2561.
  17. 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.
  18. Urquhart A, Kimpton CP, Downes TJ, Gill P. Variation in Short Tandem Repeat sequences —a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers. *Int J Legal Med.* 1994;107:13-20.
  19. Gill P, Urquhart A, Millican E, Oldroyd N, Watson S, Sparkes R, et al. A new method of STR interpretation using inferential logic -development of a criminal intelligence database. *Int J Legal Med.* 1996;109:14-22.
  20. Gettings KB, Aponte RA, Vallone PM, Butler JM. STR allele sequence variation: Current knowledge and future issues. *Forensic Sci Int Genet.* 2015;18:118-30.
  21. 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.
  22. 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.
  23. R K. Mutations Effect on the Genetic constitution of a population Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology 2005 [Available from: <http://atlasgeneticsoncology.org/teaching/30080/mutations-effect-on-the-genetic-constitution-of-a-population>].
  24. Ohno M. Spontaneous de novo germline mutations in humans and mice: rates, spectra, causes and consequences. *Genes Genet Syst.* 2019;94(1):13-22.

25. Miles B, Tadi P. Genetics, Somatic Mutation. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing  
Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.; 2022.
26. Josephs W. Human Genetics: Concept and Application. 12 ed. New York 2018. 434 p.
27. Fan H, Chu JY. A brief review of short tandem repeat mutation. Genomics Proteomics Bioinformatics. 2007;5:7-14.
28. Clark DP, Pazdernik NJ, McGehee MR. Chapter 4 - Genes, Genomes, and DNA. In: Clark DP, Pazdernik NJ, McGehee MR, editors. Molecular Biology (Third Edition): Academic Cell; 2019. p. 95-131.
29. García-Rodríguez A, Gosálvez J, Agarwal A, Roy R, Johnston S. DNA Damage and Repair in Human Reproductive Cells. Int J Mol Sci. 2018;20.
30. Ohno M. Spontaneous de novo germline mutations in humans and mice: rates, spectra, causes and consequences. Genes Genet Syst. 2019;94:13-22.
31. Imam J, Rana AK, Reyaz R. Y-Chromosomal STR Typing and Case Studies. In: Dash HR, Shrivastava P, Mohapatra BK, Das S, editors. DNA Fingerprinting: Advancements and Future Endeavors. Singapore: Springer Singapore; 2018. p. 223-40.
32. 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 Sci Int Genet. 2012;6:208-18.
33. Shah SN, Hile SE, Eckert KA. Defective mismatch repair, microsatellite mutation bias, and variability in clinical cancer phenotypes. Cancer Res. 2010;70:431-5.
34. Kutanan WK, D. Y chromosome and the study of human evolution. Thai Journal of Genetics. 2014;7:69-86.
35. 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 Sci Int Genet. 2017;26:85-90.
36. Khaedon P. The mutation study of two rapidly mutating Y-STRs in closely related Thai males: Chulalongkorn University; 2021.
37. Amorim A. Population Genetics. In: Maloy S, Hughes K, editors. Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition). San Diego: Academic Press; 2013. p. 407-11.

38. Keats BJB, Sherman SL. Chapter 13 - Population Genetics. In: Rimoin D, Pyeritz R, Korf B, editors. Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics (Sixth Edition). Oxford: Academic Press; 2013. p. 1-12.
39. คำปวนสาย จ. พันธุศาสตร์กับการตามรอยบรรพชน: ดีเอ็นเอแห่งล้านนา. 2 ed. เชียงใหม่: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2563 มิถุนายน 2563. 212 p.
40. Claerhout S, Vanpaemel S, Gill MS, Antiga LG, Baele G, Decorte R. YMrCA: Improving Y-chromosomal ancestor time estimation for DNA kinship research. Hum Mutat. 2021;42:1307-20.
41. Rezaei N, Hedayat M. Allele Frequency. In: Maloy S, Hughes K, editors. Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition). San Diego: Academic Press; 2013. p. 77-8.
42. Butler JM, Decker AE, Vallone PM, Kline MC. Allele frequencies for 27 Y-STR loci with U.S. Caucasian, African American, and Hispanic samples. Forensic Sci Int. 2006;156:250-60.
43. D'Amato ME, Ehrenreich L, Cloete K, Benjeddou M, Davison S. Characterization of the highly discriminatory loci DYS449, DYS481, DYS518, DYS612, DYS626, DYS644 and DYS710. Forensic Sci Int Genet. 2010;4:104-10.
44. YHRD [Internet]. [cited 2022 Jan 20]. Available from: <https://yhrd.org/pages>.
45. Butler JM. Chapter 11 - DNA Profile Frequency Estimates and Match Probabilities. In: Butler JM, editor. Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Interpretation. San Diego: Academic Press; 2015. p. 281-308.
46. Butler JM. Chapter 4 - PCR Amplification: Capabilities and Cautions. In: Butler JM, editor. Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology. San Diego: Academic Press; 2012. p. 69-97.
47. Butler JM. Chapter 6 - Capillary Electrophoresis: Principles and Instrumentation. In: Butler JM, editor. Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology. San Diego: Academic Press; 2012. p. 141-65.
48. Biosystems A. GeneMapper® ID-X Software manual 2019.
49. INVESTIGATION FBO. STR Data Analysis & Interpretation for Forensic Analysts <http://dna.gov/training/strdata2008> [
50. Biosystems A. DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis 2012.

51. Pourhoseingholi MA, Vahedi M, Rahimzadeh M. Sample size calculation in medical studies. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* 2013;6:14-7.
52. Sánchez-Diz P, Alves C, Carvalho E, Carvalho M, Espinheira R, García O, et al. Population and segregation data on 17 Y-STRs: results of a GEP-ISFG collaborative study. *Int J Legal Med.* 2008;122:529-33.
53. Butler JM. Chapter 2 - Data, Models, Thresholds. In: Butler JM, editor. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Interpretation.* San Diego: Academic Press; 2015. p. 25-46.
54. Butler JM. Chapter 4 - STR Genotypes: Heterozygote Balance, Stochastic Thresholds, Allele, and Concordance Studies. In: Butler JM, editor. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Interpretation.* San Diego: Academic Press; 2015. p. 87-108.
55. Ralf A, Zandstra D, Weiler N, van Ijcken WFJ, Sijen T, Kayser M. RMplex: An efficient method for analyzing 30 Y-STRs with high mutation rates. *Forensic Sci Int Genet.* 2021;55:102595.
56. 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 Sci Int Genet.* 2012;6(2):208-18.
57. Neuhuber F, Dunkelmann B, Grießner I, Helm K, Kayser M, Ralf A. Improving the differentiation of closely related males by RMplex analysis of 30 Y-STRs with high mutation rates. *Forensic Sci Int Genet.* 2022;58:102682.
58. 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. *Hum Mutat.* 2014;35(8):1021-32.
59. Lee HY, Park MJ, Chung U, Lee HY, Yang WI, Cho SH, et al. Haplotypes and mutation analysis of 22 Y-chromosomal STRs in Korean father-son pairs. *Int J Legal Med.* 2007;121:128-35.
60. Ge J, Budowle B, Aranda XG, Planz JV, Eisenberg AJ, Chakraborty R. Mutation rates at Y chromosome short tandem repeats in Texas populations. *Forensic Sci Int Genet.* 2009;3:179-84.
61. Kühner F, Morfill J, Neher RA, Blank K, Gaub HE. Force-Induced DNA Slippage. *Biophysical Journal.* 2007;92:2491-7.
62. Paashuis-Lew YR, Heddle JA. Spontaneous mutation during fetal development

and post-natal growth. *Mutagenesis*. 1998;13:613-7.

63. Freed D, Stevens EL, Pevsner J. Somatic mosaicism in the human genome. *Genes (Basel)*. 2014;5:1064-94.
64. Westen AA, Kraaijenbrink T, Clarisse L, Grol LJW, Willemsse P, Zuniga SB, et al. Analysis of 36 Y-STR marker units including a concordance study among 2085 Dutch males. *Forensic Sci Int Genet*. 2015;14:174-81.
65. Li G, Henson C, editors. *DYF399S1: A Unique Three-Copy Short Tandem Repeat on the Human Y Chromosome* 2005.
66. Ghafri RA. Development, Validation and Applications of a Novel Multiplex Assay RM Yplex Amplifying 13 Rapidly Mutating Y Chromosome Short Tandem Repeat Regions: University of Central Lancashire 2014.
67. Berger B, Niederstätter H, Brandstätter A, Parson W. Molecular characterization and Austrian Caucasian population data of the multi-copy Y-chromosomal STR *DYS464*. *Forensic Sci Int*. 2003;137:221-30.
68. Claerhout S, Vandenbosch M, Nivellet K, Gruyters L, Peeters A, Larmuseau MHD, et al. Determining Y-STR mutation rates in deep-rooting genealogies: Identification of haplogroup differences. *Forensic Sci Int Genet*. 2018;34:1-10.
69. Goedbloed M, Vermeulen M, Fang RN, Lembring M, Wollstein A, Ballantyne K, et al. Comprehensive mutation analysis of 17 Y-chromosomal short tandem repeat polymorphisms included in the AmpFLSTR Yfiler PCR amplification kit. *Int J Legal Med*. 2009;123:471-82.
70. Čokić VP, Kecmanović M, Zgonjanin Bosić D, Jakovski Z, Veljković A, Katić S, et al. A comprehensive mutation study in wide deep-rooted R1b Serbian pedigree: mutation rates and male relative differentiation capacity of 36 Y-STR markers. *Forensic Sci Int Genet*. 2019;41:137-44.



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ฉมลวรรณ โชติกรณ์
วัน เดือน ปี เกิด	19 ตุลาคม 2541
สถานที่เกิด	สงขลา
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2562 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 55 หมู่ที่ 7 ตำบลชุมพล อำเภอสิงหนิง จังหวัดสงขลา 90120
ผลงานตีพิมพ์	บทความวิจัยเรื่อง A study of DYS612 mutation in Thai father-son pairs ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ International Congress on Science, Technology and Technology-based Innovation (STT) ครั้งที่ 48
รางวัลที่ได้รับ	พ.ศ. 2562 Pitching Competition, Hitachi Trophy 2020 คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2562 Silver Coin, Young Rising Stars of Science Award 2020 ของสมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยในราชูปถัมภ์ พ.ศ. 2564 นิสิตดีเด่น ระดับบัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย