

การกลายพันธุ์ของไมโครแซทเทลไลต์ในการถ่ายทอดทางฝ่ายพ่อที่ตำแหน่ง CSF1PO :
กรณีศึกษาจำนวน 3 กรณีที่อัลลีลของพ่อไม่ตรงกับลูก*

Microsatellite mutation in the paternally transmitted CSF1PO locus :
Three cases study of paternal allele mismatch in the child

นงลักษณ์ ศิลพันธ์**

บทคัดย่อ

ในปัจจุบัน การตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ พ่อ แม่และลูก เป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากสามารถนำผลที่ได้นั้นมาใช้ในการตรวจสอบทางกฎหมาย ซึ่งในประเทศไทยได้ทำการตรวจโดยใช้ STR 16 ตำแหน่ง ซึ่งจากการสำรวจที่สถาบันนิติเวชวิทยา โรงพยาบาลตำรวจ สำนักงานตำรวจแห่งชาติ พบว่า การวิเคราะห์โดยใช้น้ำยา AmpFSTR® Identifier kits มีกรณีศึกษาจำนวน 3 ครอบครัวที่ให้ผลขัดแย้งกัน คือ อัลลีลของลูกไม่เข้ากันกับผู้ที่ยืนยันว่าเป็นพ่อ 1 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่ง CSF1PO จึงได้มีการตรวจเพิ่มเติมโดยใช้น้ำยา AmpFSTR® Yfiler™ kits นอกจากนี้ได้ทำการวิเคราะห์การเรียงตัวของลำดับเบสในตำแหน่ง CSF1PO เพื่อการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในกรณีที่เกิดการกลายพันธุ์ (Mutation) เกิดขึ้น

ผลการศึกษา พบว่า กรณีศึกษาที่ 1 ผลการตรวจ STR 16 ตำแหน่ง โดยใช้น้ำยา AmpFSTR® Identifier kits ที่ตำแหน่ง CSF1PO มีอัลลีล ดังนี้ พ่อ 11/12, แม่ 10/12, ลูก 12/13 และได้มีการตรวจเพิ่มเติมโดยใช้น้ำยา AmpFSTR® Yfiler™ kits พบว่า เข้ากันได้อย่างสมบูรณ์ กรณีศึกษาที่ 2 ผลการตรวจ STR 16 ตำแหน่ง โดยใช้น้ำยา AmpFSTR® Identifier kits ที่ตำแหน่ง CSF1PO มีอัลลีล ดังนี้ พ่อ 10/12, แม่ 10/10, ลูก 10/11 และได้มีการตรวจเพิ่มเติมโดยใช้น้ำยา AmpFSTR® Yfiler™ kits พบว่า เข้ากันได้อย่างสมบูรณ์ กรณีศึกษาที่ 3 ผลการตรวจ STR 16 ตำแหน่ง โดยใช้น้ำยา AmpFSTR® Identifier kits ที่ตำแหน่ง CSF1PO มีอัลลีล ดังนี้ พ่อ 11/13, แม่ 11/11, ลูก 11/12 และได้มีการตรวจยืนยันเพิ่มเติมโดยใช้น้ำยา AmpFSTR® Yfiler™ kits พบว่า เข้ากันได้อย่างสมบูรณ์ ส่วนการศึกษากการเรียงตัวของเบสในตำแหน่ง CSF1PO นั้น พบว่า กรณีศึกษาที่ 1, 2 และ 3 มีการเพิ่มจำนวนของเบส [AGAT] 1 ซ้ำ ทำให้อัลลีลของลูกไม่เข้ากันกับอัลลีลของผู้ที่ยืนยันว่าเป็นพ่อ จากกรณีศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่าทั้ง 3 ครอบครัวเป็นพ่อ แม่ ลูกกันจริง เนื่องจากได้มีการคำนวณค่าทางสถิติ (Paternity index) ความเป็นไปได้ที่จะเป็นพ่อ เท่ากับ 99.9962, 99.9865, 99.9649 ตามลำดับ นอกจากนี้ได้มีการตรวจยืนยันเพิ่มเติมด้วยวิธี Y-STR และดูการเรียงตัวของลำดับเบสที่ตำแหน่ง CSF1PO เป็นต้น

* 1. เพื่อศึกษาการกลายพันธุ์ทางสายพ่อที่ตำแหน่ง CSF1PO จากกรณีศึกษาจำนวน 3 กรณีที่อัลลีลของบุคคลที่สงสัยว่าเป็นพ่อเข้ากันไม่ได้ในลูก 2. เพื่อเป็นแนวทางการตรวจยืนยันพ่อลูก ในกรณีที่เกิดการกลายพันธุ์ของไมโครแซทเทลไลต์

** สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธงชัย เตโชติศัล
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

คำสำคัญ : ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ, การกลายพันธุ์, การตรวจพิสูจน์ความเป็นบิดา, Short tandem repeat (STR), Y-STR, CSF1PO

Abstract

Nowadays, the Parentage testing is well known, its result can use to be legislative investigation. In this study, the 16 short tandem repeats (STR) were used to analyzed the parental testing, which surveyed by the Institute of Forensic Science, Police Hospital, National Police using AmpF $\mathbb{R}$ STR $\mathbb{R}$ Identifier. Three case studies had the conflict on their alleles of the child which was incompatible with the suspected father at the position CSF1PO. These cases had been confirmed the parental analysis further by using AmpF $\mathbb{R}$ STR $\mathbb{R}$ Y-filer $\mathbb{TM}$ kits and also analyzed the nucleotide sequence of the CSF1PO position.

The case 1, results of 16 STR from AmpF $\mathbb{R}$ STR $\mathbb{R}$ Identifier at the CSF1PO position as follow: Suspected father 11/12, Mother 10/12 and Questioned child 12/13. A complete match with father at Y-STR

The case 2, results of 16 STR from AmpF $\mathbb{R}$ STR $\mathbb{R}$ Identifier at the CSF1PO position as follow: Suspected father 10/12, Mother 10/10 and Questioned child 10/11 A complete match with father at Y-STR

The case 3, results of 16 STR from AmpF $\mathbb{R}$ STR $\mathbb{R}$ Identifier at the CSF1PO position as follow: Suspected father 11/13, Mother 11/11, and Questioned child 11/12. A complete match with father at Y-STR

The nucleotide sequence analysis of the CSF1PO locus was found that the case studies 1, 2 and 3, increased the number of bases [AGAT] 1 duplication in their allele of the child which was incompatible with their suspected father's allele. These results suggest that their insertion mutation of bases [AGAT] 1 duplication have been occurred in the child's allele of the CSF1PO locus. These results conclusively determined that the mother and suspected father are the biological parents of the questioned child in three case study because the probability of paternity index were 99.9962, 99.9865, 99.9649 respectively. These cases had been confirmed the parental analysis further by using AmpF $\mathbb{R}$ STR $\mathbb{R}$ Y-filer $\mathbb{TM}$ kits and also analyzed the nucleotide sequence of the CSF1PO position.

Keywords : DNA typing, Mutation, Paternity testing, Short tandem repeat (STR), Y-STR, CSF1PO,

บทนำ

มนุษย์ทุกคนจะมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA : Deoxyribonucleic acid) ที่ได้รับจากถ่ายทอดมาจากพ่อและแม่ โดยจะต้องได้รับสารพันธุกรรมจากพ่อและแม่อย่างละครึ่ง ดีเอ็นเอของคนทุกคนจะไม่เหมือนกัน แต่ละคนจะมีดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ของตนเอง แม้แต่พี่น้องที่เกิดจากพ่อแม่เดียวกัน ก็มีดีเอ็นเอไม่เหมือนกัน ยกเว้น ในกรณีของฝาแฝดที่เกิดจากไข่ใบเดียวกัน จึงจะมีดีเอ็นเอที่เหมือนกันทุกประการ

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA typing) มีความหลากหลายมาก (polymorphism) ดังนั้นในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ทำได้จากการทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณ DNA ตรงบริเวณที่มีท่อนของ DNA ซ้ำกันประมาณ 2-7 เบสอยู่หลายชุดเรียก บริเวณนี้ว่า “STR” ย่อมาจาก Short tandem repeat ซึ่งมีได้หลายตำแหน่ง (locus) บนสาย DNA การใช้ STR เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมจะทำให้สามารถรู้ลักษณะของจำนวนซ้ำของท่อน DNA แต่ละชุดในแต่ละตำแหน่งบนสาย DNA ของแต่ละบุคคลได้ ฉะนั้นจึงสามารถใช้ความแตกต่างกันของจำนวนการซ้ำกันของท่อน DNA แต่ละชุดนี้บ่งบอกถึงข้อมูลพันธุกรรมเฉพาะของแต่ละบุคคลได้

ในปัจจุบัน ประเทศไทยได้มีการนำเทคโนโลยี ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA typing) มาประยุกต์ใช้กันอย่างแพร่หลาย ไม่ว่าจะเป็นการตรวจพิสูจน์บุคคล การตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือด ซึ่งมีหลายกรณีที่เกิดขึ้นในสังคม เช่น การตรวจพิสูจน์บุคคลเพื่อหาตัวผู้ต้องสงสัย ในคดีต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นคดีฆาตกรรม ช่มชู้ ทำร้ายร่างกาย เป็นต้น นอกจากนี้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอยังถูกนำมาใช้ในการสนับสนุนการตรวจสอบความถูกต้องตามกฎหมาย เช่น การพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดเพื่อเปลี่ยนจากสัญชาติอื่นมาเป็นสัญชาติไทย ตามกฎหมายตรวจคนเข้าเมือง มาตรา กรณีการรับมรดก บางครั้งอาจมีการร้องเรียนความเป็นทายาทโดยสายเลือด กรณีที่เรียกร้องให้มีการรับบุตรตามกฎหมาย กรณีที่สงสัยว่าไม่ใช่บุตรของตัวเอง เช่น คิดว่าอาจมีการสับกันในโรงพยาบาล หรือเด็กที่เกิดในประเทศไทยไม่ได้แจ้งเกิดตั้งแต่ต้นและต้องการขอใบแจ้งเกิดย้อนหลังจะต้องทำการตรวจดีเอ็นเอเช่นกัน

ในงานวิจัยชิ้นนี้จะกล่าวถึงการตรวจพิสูจน์ความเป็นบิดา หรือที่เรียกว่า DNA paternity testing ซึ่งเป็นรู้จักกันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน ซึ่งมีจุดประสงค์หลักเพื่อพิสูจน์ความเป็นพ่อ-ลูก ในกรณีที่เกิดปัญหาขึ้นและต้องการหลักฐานทางพันธุกรรมเข้ามาพิสูจน์ทางวิทยาศาสตร์ การตรวจดีเอ็นเอเพื่อพิสูจน์ความเป็นบิดา อาศัยหลักการที่ว่า ดีเอ็นเอของลูกครึ่งหนึ่งจะมาจากพ่อ และอีกครึ่งหนึ่งมาจากแม่

เนื่องจากในการแปลผลการตรวจพิสูจน์ความเป็นบิดา (DNA paternity testing) ในปัจจุบันจะต้องตรวจหาชนิดของ DNA โดยใช้เครื่องมืออัตโนมัติ ตรวจ 16 ตำแหน่ง คือ D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, THO1, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, Amelogenin, D5S818, FGA ถ้า DNA ของลูกตรงกับ DNA ของพ่อและแม่ทั้ง 16 ตำแหน่ง ถือได้ว่า ไม่ปฏิเสธความสัมพันธ์ พ่อ แม่ ลูก แต่ถ้า DNA ของลูกไม่ตรงกับ DNA ของพ่อ 1 ตำแหน่งขึ้นไป ถือได้ว่าปฏิเสธความสัมพันธ์ พ่อ แม่ ลูก นอกจากนี้ยังพบว่าถ้า DNA ของลูกไม่ตรงกับ DNA ของพ่อ หรือ ไม่ตรงกับ DNA ของแม่ เพียงตำแหน่งเดียว อย่าเพิ่งสรุปว่า ปฏิเสธความสัมพันธ์พ่อ แม่ ลูก เพราะอาจเกิดเกิดมิวเทชัน (Mutation) หรือ การกลายพันธุ์ เกิดขึ้นก็ได้ ดังนั้น จึงต้องนำมาตรวจเพิ่มเติมด้วยวิธีอื่น เช่น การตรวจ ดีเอ็นเอบนโครโมโซม (Y-Chromosomal DNA) หรือ การตรวจไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ

(Mitochondrial DNA) ที่ตำแหน่ง HV1, HV2 เพื่อยืนยันว่าตำแหน่งที่มีอัลลีลเข้ากันไม่ได้ 1 ตำแหน่งนั้น ไม่ได้ปฏิเสธความสัมพันธ์พ่อ แม่ ลูก แต่เป็นพ่อ แม่ ลูก กันจริง และสามารถนำมาวิเคราะห์ทางสถิติ คำนวณค่าความน่าจะเป็น หรือที่เรียกว่า Probability of paternity ในกรณีที่ Probability of paternity เป็นศูนย์แสดงว่า ปฏิเสธความสัมพันธ์ พ่อ-ลูก หรือไม่ใช่พ่อ-ลูกกัน แต่ถ้าในกรณีที่ Probability of paternity เท่ากับร้อยละ 99.9999 แสดงว่า ไม่ปฏิเสธความสัมพันธ์พ่อ-ลูก หรือเป็น พ่อ-ลูกกันจริง

จากการสำรวจ ที่สถาบันนิติเวชวิทยา โรงพยาบาลตำรวจ สำนักงานตำรวจแห่งชาติได้มีผู้ที่เข้ารับการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์พ่อ แม่ ลูก โดยตรวจ Short Tandem Repeats (STR) 16 ตำแหน่ง ตั้งแต่ปี พ.ศ.2550 – 2552 จำนวน 629 ครอบครัว มีครอบครัวที่เกิดมิวเทชัน (Mutation) หรือ การกลาย จำนวน 22 ครอบครัว ผู้ทำการวิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาการกลายพันธุ์ของไมโครแซทเทลไลต์ในการถ่ายทอดทางฝ่ายพ่อโดยเลือกตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์ หรือ มิวเทชัน (Mutation) คือ ตำแหน่ง CSF1PO จำนวน 3 ครอบครัวมาเป็นกรณีศึกษาโดยจะทำการตรวจเพิ่มเติมด้วยวิธี Y – STR เพื่อยืนยันความสัมพันธ์พ่อ-ลูก นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาการเรียงตัวของลำดับเบส (DNA sequencing) ในตำแหน่ง CSF1PO เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในกรณีที่เกิดการกลายพันธุ์ หรือ มิวเทชัน (Mutation) เกิดขึ้น

การดำเนินการวิจัย

การศึกษาในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการกลายพันธุ์ของไมโครแซทเทลไลต์ในการถ่ายทอดทางฝ่ายพ่อ ที่ตำแหน่ง CSF1PO จากกรณีศึกษาจำนวน 3 กรณีที่อัลลีลของพ่อไม่เข้ากันกับลูก โดยใช้วิธีการวิจัยเชิงทดลอง โดยมีขั้นตอนการดำเนินการวิจัย คือ สืบค้นข้อมูลจากครอบครัวที่เข้ารับการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์พ่อ แม่ ลูก ที่มีลักษณะการเกิด มิวเทชัน หรือ การกลายพันธุ์ ซึ่งในงานวิจัยขั้นนี้ผู้วิจัยเลือกครอบครัวที่เกิดการเกิดมิวเทชัน หรือ การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง CSF1PO จำนวน 3 ครอบครัว เป็นกรณีศึกษา โดยแต่ละครอบครัวมีอัลลีลของพ่อไม่เข้ากันกับลูก ซึ่งทั้ง 3 ครอบครัวเป็นลูกชายทั้งหมด

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาคือ เยื่อข้างแก้ม ซึ่งทำการเก็บโดยใช้กระดาษ FTA Cards และทำการสกัดด้วยการล้างกระดาษโดยใช้สารละลาย FTA Purification Reagent ซึ่งตัวอย่างที่สกัดแล้วจะอยู่ในรูปของกระดาษ

ในกรณีที่ตรวจ STR 16 ตำแหน่ง ให้นำตัวอย่างที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี PCR โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป AmpF[®]STR[®] Identifier™ PCR Amplification Kit

ในกรณีที่ตรวจ Y-STR ให้นำตัวอย่างที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี PCR โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป AmpF[®]STR[®] Y-filer™ kits จากนั้นนำสารพันธุกรรมที่เพิ่มปริมาณแล้วไปวิเคราะห์ผลโดยใช้เครื่อง Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzers และใช้โปรแกรม GeneScan Analysis 3.1.2 ในการวิเคราะห์ผล

ในกรณีที่ศึกษาการเรียงตัวของลำดับเบส (DNA sequencing) ให้นำตัวอย่างที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี PCR ที่ตำแหน่ง CSF1PO โดยใช้ Forward primer 5'-AACCTGAGTCTGCCAAGGACTAGC- 3' และ Reward primer 5'-TTCCACACACCACTGGCCATCTTC- 3' มาทำการ

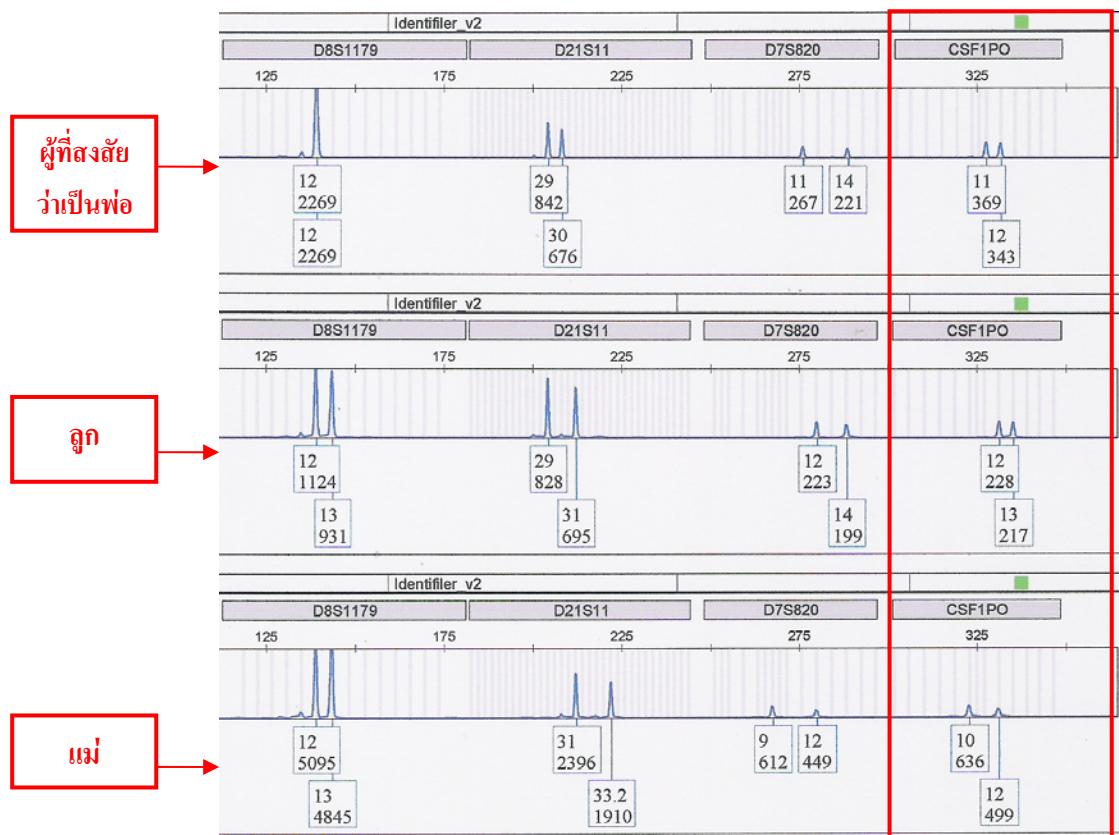
ทดสอบโดยส่วนประกอบของ Reaction mixture 50 μ l ประกอบด้วย 10X PCR buffer 5 μ l, 50mM $MgCl_2$ 1.5 μ l, dNTP 0.5 μ l, Forward primer 0.5 μ l, Reward primer 0.5 μ l, Tag DNA Polymerase 0.5 μ l, H_2O 41.5 μ l นำ Reaction mixture ที่ได้เข้าเครื่อง Thermal cycle โดยตั้งโปรแกรม ดังนี้ 1st Denaturation 94 °C 3 นาที (Denaturation 94 °C 30 วินาที, Annealing 65 °C 30 วินาที, Extension 72°C 30 วินาที) 35 รอบ Final Extension 72 °C 1 นาที ความยาวของ PCR product ที่ได้คือ 315 bp จากนั้นนำไปตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR โดยวิธี Agarose gel electrophoresis แล้วนำไปสกัด DNA ออกจาก Agarose gel ด้วยชุดสกัด Gel/PCR purification kit

จากนั้นนำ DNA ที่ได้ไปทำการ sequencing เพื่อดูลำดับเบส โดยได้ส่งที่หน่วยนิติเวชโรวิทยา ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และนำผลที่ได้ทำการเปรียบเทียบกันในแต่ละครอบครัว และดูการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในกรณีที่เกิดการกลายพันธุ์ หรือมิวเทชัน (mutation) เกิดขึ้น

ผลการวิจัย

ผลการวิจัยพบว่า ในการตรวจ STR 16 ตำแหน่งของกรณีศึกษาทั้ง 3 ครอบครัว มีตำแหน่งที่น่าสนใจ 1 ตำแหน่ง คือ CSF1PO ที่มีอัลลีลของลูกไม่ตรงกับผู้ที่สงสัยว่าเป็นพ่อ ส่วนตำแหน่งอื่นๆ อัลลีลของลูกเข้ากันกับแม่และผู้ที่ยสงสัยว่าเป็นพ่อได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

ครอบครัวที่ 1 อัลลีลของผู้ที่สงสัยว่าเป็นพ่อ, แม่ และลูก มีดังนี้ 11/12, 10/12, 12/13 (ภาพที่ 1) ซึ่งในครอบครัวที่ 1 ถ้าผู้ที่สงสัยว่าเป็นพ่อและแม่เป็นพ่อแม่ที่แท้จริง ลูกควรมีอัลลีลมากกว่าหนึ่ง คือ 10/11, 10/12, 11/12 และ 12/12 แต่ในครอบครัวนี้ลูก มีอัลลีล 12/13 ซึ่งต่างจากที่ตั้งไว้ จากการคำนวณค่าทางสถิติ (Paternity index) และความน่าจะเป็นที่จะเป็นพ่อ ของครอบครัวนี้ เท่ากับ 99.9962 (ตารางที่ 1) นอกจากนี้ได้มีการตรวจเพิ่มเติมด้วยวิธี Y-STR 16 ตำแหน่งในลูกและผู้ที่ยสงสัยว่าเป็นพ่อ เพื่อยืนยันผลว่าเป็นพ่อ ผลปรากฏว่า อัลลีลของลูกและพ่อเข้ากันได้อย่างสมบูรณ์ (ตารางที่ 2)



ภาพที่ 1 ผลการตรวจพิสูจน์ของครอบครัว ที่ 1 ที่อัลลีลของของผู้ที่สงสัยว่าเป็นพ่อไม่ตรงกับลูก
ที่ตำแหน่ง CSF1PO

ตารางที่ 1 แสดงผลการคำนวณค่า Paternity Index ของ ครอบครัวที่ 1

ครอบครัว ที่ 1 ตำแหน่ง	ผู้ที่สงสัยว่า เป็นพ่อ	ลูก	แม่	Paternity Index
D8S1179	12, 12	12, 13	12, 13	3.12055
D21S11	29, 30	29, 31	31, 33.2	2.00000
D7S820	11, 14	12, 14	9, 12	49.98831
CSF1PO*	11, 12	12, 13	10, 12	0.00455
D3S1358	16, 17	16, 16	14, 16	1.31297
THO1	9, 9	8, 9	7, 8	2.77292
D13S317	8, 11	8, 9	9, 11	1.71627
D16S539	9, 12	12, 12	11, 12	2.47477
D2S1338	19, 23	18, 23	18, 18	2.98793

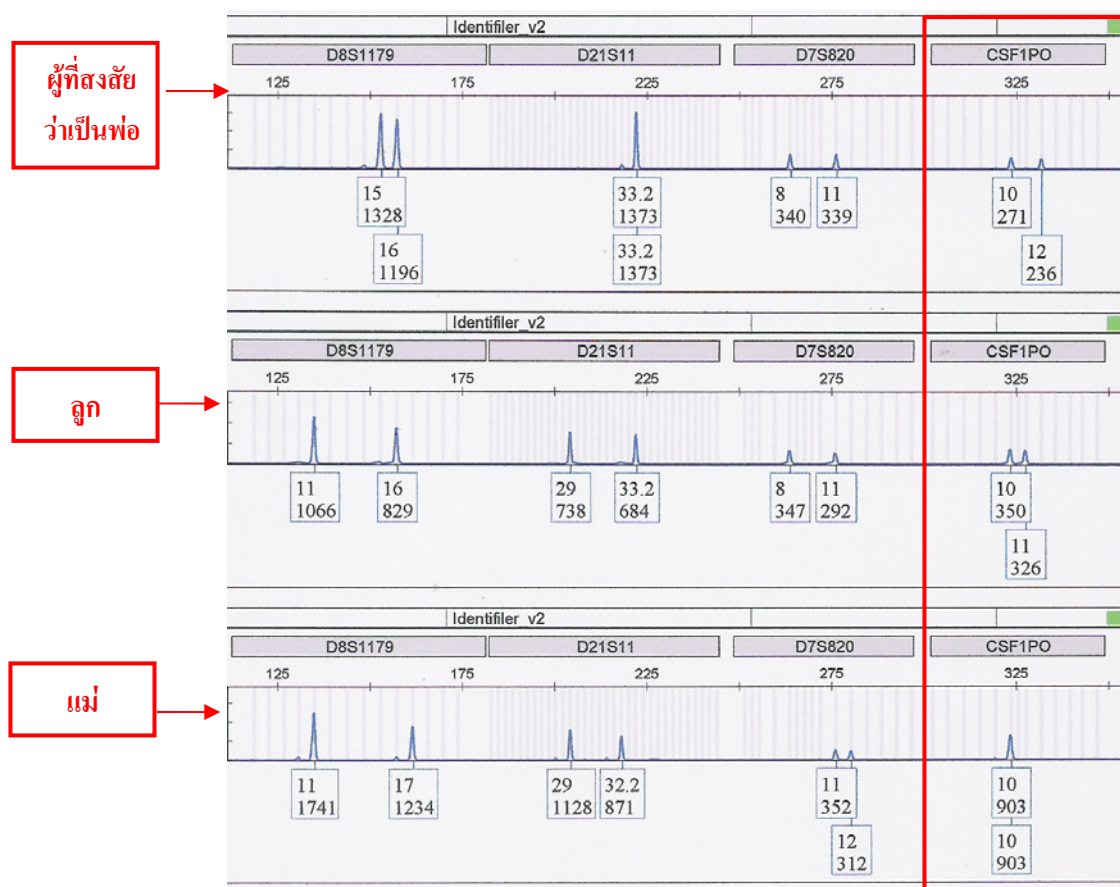
D19S433	13, 15.2	11.2, 15.2	11.2, 15	2.82563
vWA	18, 19	14, 18	14, 16	2.39613
TPOX	10, 11	8, 10	8, 8	12.65667
D18S51	13, 17	16, 17	15, 16	5.71017
Amelogenin	X, Y	X, Y	X, X	
D5S818	10, 11	10, 10	10, 12	2.22117
FGA	23.2, 24	24, 24.2	23, 24.2	4.33137

*ตำแหน่ง CSF1PO ของครอบครัวที่ 1 ที่อัลลีลของผู้ที่สงสัยว่าเป็นพ่อไม่ตรงกับลูก

ตารางที่ 2 แสดงผลการตรวจ Y-STR 16 ตำแหน่ง ของครอบครัวที่ 1

ตำแหน่ง	ผู้ที่สงสัยว่าเป็นพ่อ	ลูก
DYS456	16	16
DYS389I	14	14
DYS390	24	24
DYS389II	30	30
DYS458	15	15
DYS19	15	15
DYS385	16, 20	16, 20
DYS393	14	14
DYS391	10	10
DYS439	11	11
DYS635	21	21
DYS392	13	13
Y_GATA_H4	11	11
DYS437	14	14
DYS438	10	10
DYS448	18	18

ครอบครัวที่ 2 อัลลีลของผู้ที่สงสัยว่าเป็นพ่อ, แม่และลูก มีดังนี้ 10/12, 10/10, 10/11 (ภาพที่ 2) ซึ่งในครอบครัวที่ 2 ถ้าผู้ที่สงสัยว่าเป็นพ่อและแม่เป็นพ่อแม่ที่แท้จริง ลูกควรมีอัลลีล ดังนี้ 10/10 และ 10/12 แต่ในครอบครัวนี้ลูก มีอัลลีล 10/11 ซึ่งต่างจากที่ตั้งไว้ จากการคำนวณค่าทางสถิติ (Paternity index) และความน่าจะเป็นที่จะเป็นพ่อ ของครอบครัวนี้ เท่ากับ 99.9865 (ตารางที่ 3) นอกจากนี้ได้มีการตรวจเพิ่มเติมด้วยวิธี Y-STR 16 ตำแหน่งในลูกและผู้ที่ยืนยันผลว่าเป็นพ่อ ผลปรากฏว่า อัลลีล ของลูกและพ่อเข้ากันได้อย่างสมบูรณ์ (ตารางที่ 4)



ภาพที่ 2 ผลการตรวจพิสูจน์ของครอบครัว ที่ 2 ที่อัลลีลของผู้ที่สงสัยว่าเป็นพ่อไม่ตรงกับลูก ที่ตำแหน่ง CSF1PO

ตารางที่ 3 แสดงผลการคำนวณค่า Paternity Index ของ ครอบครัวที่ 2

ครอบครัว ที่ 2 ตำแหน่ง	ผู้ที่ยสงสัยว่า เป็นพ่อ	ลูก	แม่	Paternity Index
D8S1179	15, 16	11, 16	11, 17	5.5870
D21S11	33.2, 33.2	29, 33.2	29, 32.2	12.35605
D7S820	8, 11	8, 11	11, 12	3.02266
CSF1PO*	10, 12	10, 11	10, 10	0.00231
D3S1358	15, 16	15, 17	17, 17	1.75684
THO1	9, 9	9, 9	6, 9	2.70022
D13S317	8, 10	10, 10	10, 11	3.48656
D16S539	10, 11	10, 11	10, 12	1.68841
D2S1338	19, 24	16, 24	16, 19	3.24921
D19S433	13, 14	13, 14	13, 15.2	2.29062
vWA	17, 18	16, 18	16, 20	2.39613
TPOX	8, 18	8, 8	8, 8	1.72137
D18S51	16, 21	14, 16	13, 14	2.53632
Amelogenin	X, Y	X, Y	X, X	
D5S818	10, 10	10, 13	13, 13	4.44234
FGA	24, 25	23, 24	23, 24	1.59423

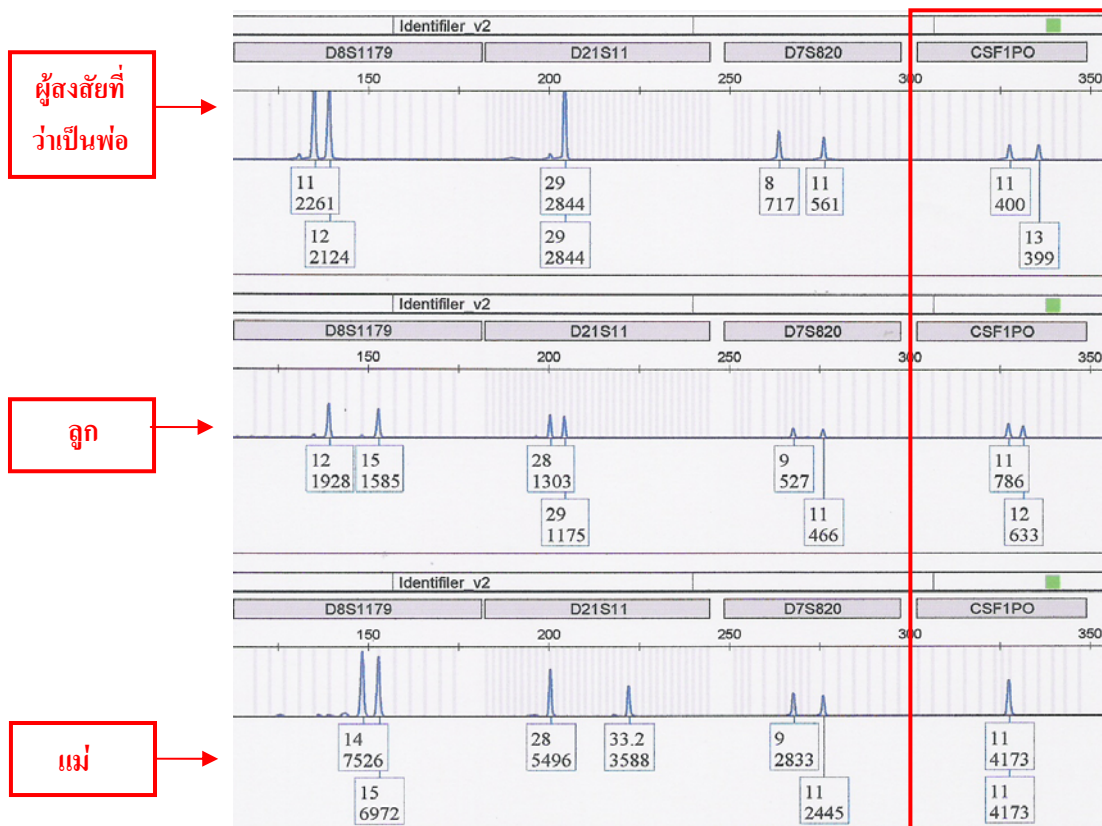
*ตำแหน่ง CSF1PO ของครอบครัวที่ 2 ที่อัลลีลของผู้ที่ยสงสัยว่าเป็นพ่อไม่ตรงกับลูก

ตารางที่ 4 แสดงผลการตรวจ Y-STR 16 ตำแหน่ง ของครอบครัวที่ 2

Locus	ผู้ที่ยสงสัยว่าเป็นพ่อ	ลูก
DYS456	15	15
DYS389I	12	12
DYS390	24	24
DYS389II	28	28
DYS458	18	18
DYS19	15	15
DYS385	14, 18	14, 18
DYS393	12	12

DYS391	10	10
DYS439	12	12
DYS635	20	20
DYS392	14	14
Y_GATA_H4	12	12
DYS437	15	15
DYS438	11	11
DYS448	20	20

ครอบครัวที่ 3 อัลลีลของผู้ที่สงสัยว่าเป็นพ่อ, แม่และลูก มีดังนี้ 11/13, 11/11, 11/12 (ภาพที่ 3) ซึ่งในครอบครัวที่ 3 ถ้าผู้ที่สงสัยว่าเป็นพ่อและแม่เป็นพ่อแม่ที่แท้จริง ลูกควรมีอัลลีล ดังนี้ 11/11 และ 11/13 แต่ในครอบครัวนี้ลูก มีอัลลีล 11/12 ซึ่งต่างจากที่ตั้งไว้ จากการคำนวณค่าทางสถิติ (Paternity index) และความน่าจะเป็นที่จะเป็นพ่อ ของครอบครัวนี้ เท่ากับ 99.9649 (ตารางที่ 5) นอกจากนี้ได้มีการตรวจเพิ่มเติมด้วยวิธี Y-STR 16 ตำแหน่งในลูกและผู้ที่ยืนยันผลว่าเป็นพ่อ ผลปรากฏว่าอัลลีลของลูกและพ่อเข้ากันได้อย่างสมบูรณ์ (ตารางที่ 6)



ภาพที่ 3 ผลการตรวจพิสูจน์ของครอบครัว ที่ 3 ที่อัลลีลของผู้ที่สงสัยว่าเป็นพ่อตรงกับลูก ที่ตำแหน่ง CSF1PO

ตารางที่ 5 แสดงผลการคำนวณค่า Paternity Index ของ ครอบครัวที่ 3

ครอบครัว ที่ 3 ตำแหน่ง	ผู้ที่สงสัยว่า เป็นพ่อ	ลูก	แม่	Paternity Index
D8S1179	11, 12	12, 15	14, 13	3.82218
D21S11	29, 29	28, 29	28, 33.2	3.85047
D7S820	8, 11	9, 11	9, 11	1.22891
CSF1PO*	11, 13	11, 12	11, 11	0.00183
D3S1358	16, 17	16, 17	15, 16	2.29062
THO1	7, 9	7, 7	7, 9	1.57541
D13S317	8, 13	11, 13	11, 14	10.81478
D16S539	10, 11	9, 10	9, 11	2.87244
D2S1338	19, 25	19, 20	19, 20	1.32602
D19S433	14.2, 15.2	14, 15.2	12, 14	5.04556
vWA	14, 17	17, 18	18, 20	2.07997
TPOX	8, 8	8, 8	8, 8	1.72137
D18S51	15, 17	14, 17	14, 15	5.71017
Amelogenin	X, Y	X, Y	X, X	
D5S818	12, 13	12, 13	10, 13	2.11377
FGA	23, 25	23, 24.2	22, 24.2	2.65272

*ตำแหน่ง CSF1PO ของครอบครัวที่ 3 ที่อัลลีลของผู้ที่สงสัยว่าเป็นพ่อไม่ตรงกับลูก

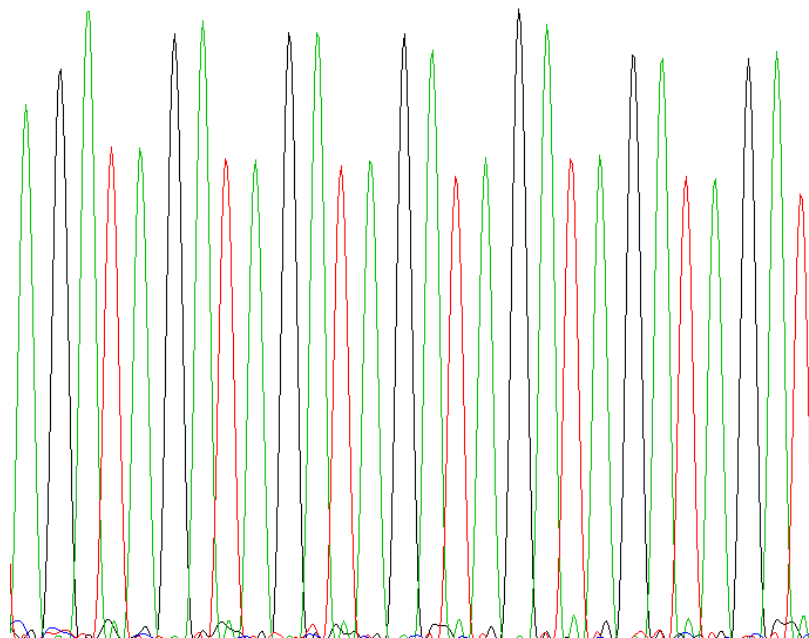
ตารางที่ 6 แสดงผลการตรวจ Y-STR 16 ตำแหน่ง ของครอบครัวที่ 3

Locus	ผู้ที่สงสัยว่าเป็นพ่อ	ลูก
DYS456	15	15
DYS389I	13	13
DYS390	24	24
DYS389II	29	29
DYS458	16	16
DYS19	15	15
DYS385	15, 19	15, 19

DYS393	14	14
DYS391	11	11
DYS439	12	12
DYS635	22	22
DYS392	13	13
Y_GATA_H4	12	12
DYS437	14	14
DYS438	10	10
DYS448	18	18

ในการศึกษาการเรียงตัวของลำดับเบส (DNA sequencing) ที่ตำแหน่ง CSF1PO พบว่า การเรียงตัวของลำดับเบสที่ตำแหน่ง CSF1PO คือ เบส [AGAT] (ภาพที่ 4) ซึ่งในครอบครัวที่ 1, 2 และ 3 มีการซ้ำของเบส [AGAT] เพิ่มขึ้นมา 1 ซ้ำ

A G A T A G A T A G A T A G A T A G A T A G A T A G A T



ภาพที่ 4 การเรียงตัวของลำดับเบส (DNA sequencing) ที่ตำแหน่ง CSF1PO คือ เบส [AGAT]

สรุปและอภิปรายผล

จากการศึกษาการกลายพันธุ์ของไมโครแซทเทลไลต์ในการถ่ายทอดทางฝ่ายพ่อที่ตำแหน่ง CSF1PO จากกรณีศึกษาจำนวน 3 ครอบครัวที่อัลลีลของพ่อไม่ตรงกับลูก พบว่า ในการตรวจด้วยวิธี STR 16 ตำแหน่งนั้น ได้มีการคำนวณค่าทางสถิติ (Paternity index) ความเป็นไปได้ที่จะเป็นพ่อ ในครอบครัวที่ 1 เท่ากับ 99.9962 ครอบครัวที่ 2 เท่ากับ 99.9865 ครอบครัวที่ 3 เท่ากับ 99.9649 เป็นต้น และได้มีการตรวจเพิ่มเติมเพื่อยืนยันความสัมพันธ์พ่อ-ลูกด้วยวิธี Y-STR พบว่า ทั้ง 3 ครอบครัวมี DNA ที่เหมือนกัน นอกจากนี้ได้มีการศึกษาการเรียงตัวของลำดับเบสที่ตำแหน่ง CSF1PO เพื่อดูลำดับเบสที่เกิดมิวเทชัน (Mutation) หรือการกลายพันธุ์ พบว่าในครอบครัวที่ 1, 2 และ 3 มีการซ้ำของเบส [AGAT] เพิ่มขึ้นมา 1 ซ้ำ สาเหตุอาจเกิดมาจากการเลื่อนของเบส (Slippage base) แบบ Backward slippage causes insertion คือ เมื่อมีการเลื่อนแล้วทำให้มีการเพิ่มจำนวนเบสของ DNA สายที่สร้างใหม่ ทำให้สามารถสรุปได้ว่าทั้ง 3 ครอบครัวที่เกิดมิวเทชัน (Mutation) หรือการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง CSF1PO เป็นพ่อ แม่และลูกที่แท้จริง

จากการรวบรวมข้อมูลของ American Association of Blood Banks (AABB) จากห้องปฏิบัติการที่ตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ พ่อ แม่ และลูก (Paternity testing) จากหลายๆห้องปฏิบัติการ (AABB 2003 Annual Report /<http://www.cstl.nist.gov/strbase/mutation.htm>) มีอัตราการเกิดมิวเทชัน (Mutation) หรือ การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง CSF1PO เท่ากับ 0.16% มีมิวเทชัน (Mutation) ทางฝ่ายพ่อ เท่ากับ 0.15% มิวเทชัน (Mutation) ทางฝ่ายแม่ เท่ากับ 0.03% ซึ่งถือว่าตำแหน่งนี้มีอัตราการเกิดมิวเทชัน (Mutation) หรือ การกลายพันธุ์เป็นอันดับที่ 5 ซึ่งเท่ากับตำแหน่ง Penta E โดยมีตำแหน่งที่มีอัตราการเกิดมิวเทชัน (Mutation) มากที่สุดคือ ตำแหน่ง FGA เท่ากับ 0.28% ส่วนตำแหน่งที่เกิดมิวเทชัน (Mutation) น้อยที่สุด คือ ตำแหน่ง THO1 เท่ากับ 0.01%

จากงานวิจัยชิ้นนี้ ทำให้ทราบว่า การเกิดมิวเทชัน (Mutation) หรือ การกลายพันธุ์นั้น มีส่วนทำให้การเรียงตัวของลำดับเบสนั้นเปลี่ยนแปลงไปซึ่งอาจส่งผลต่อการแปลผลการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ พ่อ แม่ และลูกได้ ดังนั้นจึงควรมีการตรวจพิสูจน์เพิ่มเติมเพื่อยืนยันว่าเป็นพ่อกับลูกที่แท้จริง ในกรณีที่อัลลีลของพ่อไม่ตรงกับลูก

บรรณานุกรม

ภาษาไทย

วิชัย บุญแสง และคณะ. 2547. ปทุมธานี. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ...จากสารพันธุกรรมสู่เทคโนโลยีพิสูจน์บุคคล.

สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.

สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย และ สสวท. 2548. กรุงเทพฯ. สารานุกรมพันธุศาสตร์. บริษัท

เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด.

นำชัย ชิววิวรรณ และคณะ. 2546. ปทุมธานี. ดีเอ็นเอ ปริศนาลับรหัสชีวิต. ศูนย์พันธุวิศวกรรมและ

เทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ.

ไพศาล เหล่าสุวรรณ. 2535. กรุงเทพฯ. พันธุศาสตร์. บริษัท โรงพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช จำกัด.

วิสุทธิ ไบไม้. 2536. กรุงเทพฯ. พันธุศาสตร์. เอ็นพีซบพลายพริ้นติ้ง.

เอกดนัย กอกิมพงษ์. Thermal Cyclor เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยวิธี PCR [ออนไลน์]. เข้าถึงเมื่อได้
จาก http://www.thaiscience.com/lab_vol/p22/Thermal_Cycler.asp

ภาษาต่างประเทศ

Applied Biosystems. AmpF Φ STR[®] Identifier PCR Amplification Kit: User's Manual.
California: n.p., 2006.

Butler, John M. Forensic DNA Typing. 2nd ed. London: Elsevier Academic Press, 2005

Butler, John M. Fundamentals of forensic DNA Typing: London: Elsevier Academic, 2010

Venkanna Narkuti , Ravi N. Vellanki , K.P.C. Gandhi , Kiran K. Doddapaneni ,Pramila D.

Yelavarthi, Lakshmi N. Mangamoori b. Microsatellite mutation in the
maternally/paternally transmitted D18S51 locus: Two cases of allele
mismatch in the child. Clinica Chimica Acta 381 (2007) 171–175.

American Association of Blood Banks (AABB), Apparent Mutations Observed at STR Loci in
the Course of Paternity Testing [Online]. Accessed 25 August 2009.

Available from <http://www.cstl.nist.gov/strbase/mutation.html>.