**บทความพิเศษ**

# การพิสูจน์บุคคลในยุค ดีเอนเอ

ธาดา สืบหลินวงศ์* นันทนา ศิริทรัพย์**
วิไล อโนมะศิริ* นิชรี มะกรสาร***

**Sueblinvong T, Sirisup N, Anomasiri W, Makarasara N. Person identification in the DNA era. Chula Med J 1996 Nov; 40(11): 889-905**

*The laboratory methods used for person identification which involved the studies of various properties of red blood cell are : blood grouping, analysis of erythrocytic isoenzymes and hemoglobin polymorphism. At persent, molecular biology techniques contribute a major role in forensic medicine especially those concerning person identification. Commercially available kits for the studies of gene polymorphism either single locus : HLA DQα or multiple gene loci : Polygenic markers (PM kit, Perkin Elmer) contribute a convenient but expensive choice for forensic laboratory works. Besides, a certain polymorphic region of DNA within the human genome namely, short tandem repeats is now extensively explored and applied into forensic person identification works. Apart from the laboratory data presentation, statistic methods applicable for paternity testing and person identification have been reviewed and analysed.*

**Key word** : *Person identification.*

Reprint request : Sueblinvong T. Department of Biochemistry , Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

Received for publication . October 8, 1996.

* ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
** ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
*** ภาควิชาวิสัญญีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

งานด้านนิติเวชวิทยาส่วนหนึ่งจะเกี่ยวข้องกับการพิสูจน์บุคคลที่อาจจะยังมีชีวิตอยู่หรือเสียชีวิตแล้ว การพิสูจน์อาจจะใช้เพียงหลักฐานทางกฎหมาย ได้แก่ บัตรประจำตัวประชาชน ใบขับขี่รถยนต์ จักรยานยนต์ ซึ่งมีภาพถ่ายเจ้าของบัตรกำกับ หลักฐานทางกายภาพ ได้แก่ รูปพรรณสัณฐาน รูปร่างหน้าตา ซึ่งต้องมีพยานบุคคลที่สามารถชี้ระบุตัวได้ หรือลายพิมพ์นิ้วมือซึ่งต้องมีแฟ้มทะเบียนประวัติลายพิมพ์นิ้วมือให้เปรียบเทียบจึงจะพิสูจน์บุคคลได้

การพิสูจน์บุคคลโดยอาศัยหลักฐานทางชีวภาพ เช่น เส้นผม ขน คราบเลือด คราบน้ำลาย น้ำอสุจิ เศษชิ้นเนื้อ หรือชิ้นส่วนอวัยวะ เช่น ฟัน นิ้วมือ ที่เก็บตัวอย่างจากสถานที่เกิดเหตุ จากวัตถุพยานดังกล่าว ผู้เกี่ยวข้องในงานพิสูจน์บุคคลจะต้องชันสูตรว่า วัตถุพยานเป็นของเหยื่อ หรือของผู้กระทำ และผู้นั้นเป็นใคร หรือเมื่อสืบหาผู้ต้องสงสัยได้แล้ว วัตถุพยานนั้นชี้บ่งถึงตัวผู้ต้องสงสัยหรือไม่ การตรวจพิสูจน์จะต้องอาศัยวิธีการตรวจต่างๆ ทางห้องปฏิบัติการ เช่น ตรวจหมู่เลือด ตรวจรูปแบบต่างๆ ของโปรตีนหรือเอนไซม์ที่ปรากฏในเม็ดเลือดแดง เช่น adenylate deaminase (ADA), esterase D (EsD), erythrocyte acid phosphatase (EAP) และ phosphoglucomutase (PGM) และพิสูจน์บุคคลโดยอาศัยความหลากหลายรูปแบบ (polymorphism) ของโปรตีน เอนไซม์ที่พบในแต่ละบุคคลช่วยพิสูจน์ การตรวจเหล่านี้เป็นการตรวจ phenotype ซึ่งแต่ละตัวชี้วัด (marker) ที่นำมาใช้ไม่ว่าจะเป็นหมู่เลือดหรือเอนไซม์ล้วนมีขีดจำกัดในอำนาจจำแนกพิสูจน์บุคคลไม่เท่ากัน ในปัจจุบันเทคนิคทางอณูชีววิทยา (molecular biology) ได้ถูกประยุกต์เพื่อใช้กับงานนิติเวชวิทยามากขึ้น การจำแนกบุคคลจึงเป็นการจำแนกที่ระดับ genotype เช่น การตรวจพิสูจน์บุคคลโดยนำ DNA finger print หรืออาศัยความหลากหลายรูปแบบของอัลลีล (allele) ของยีน (gene) บางตำแหน่ง เช่น HLA DQα (HLA $DQA_1$) เป็นต้น การพิสูจน์บุคคลนอกจากจะจำเป็นและสำคัญในกรณีของคดีอาชญากรรมแล้ว ยังมีความสำคัญในการพิสูจน์ปัญหาครอบครัว ได้แก่การพิสูจน์ความเป็นพ่อ แม่ ลูก โดยเฉพาะการหาพ่อที่แท้จริงทางชีวภาพ (biological father) ซึ่งเป็นกรณีที่พบบ่อยที่สุด วิธีการตรวจพิสูจน์นิยมใช้การตรวจทางห้องปฏิบัติการดังกล่าวข้างต้น

## ตัวอย่างชีวภาพที่ห้องปฏิบัติการนิติเวชวิทยาได้รับ

ตัวอย่างชีวภาพได้แก่ เส้นผม ขน คราบเลือด หรือคราบของเหลวสิ่งคัดหลั่งอื่น กระทั่งเศษชิ้นเนื้อชิ้นส่วนอวัยวะ เป็นวัตถุพยานจากสถานที่เกิดเหตุคดีฆาตกรรม อาชญากรรมอื่นๆ สงครามตลอดจนภัยพิบัติทางธรรมชาติ (natural disasters) เช่น แผ่นดินไหว (earth quake) ภูเขาไฟระเบิด (volcanoic eruption) หรือภัยพิบัติจากวินาศภัย การวางระเบิดอาคาร รถไฟ เครื่องบิน เหล่านี้จะมีผู้เสียชีวิตจำนวนมาก และบ่อยครั้งต้องมีการพิสูจน์บุคคลเพื่อเป็นการยืนยันการเสียชีวิต หรือเพื่อสืบค้นหาศพผู้เสียชีวิตคืนให้ญาติที่ถูกต้อง ตัวอย่างที่ถูกส่งมาถึงห้องปฏิบัติการทางนิติเวชจึงมีลักษณะค่อนข้างเฉพาะดังนี้

ก. ขนาดของตัวอย่างมีปริมาณน้อยหรือน้อยมาก เช่น มีเพียงผม หรือ ขน 1 เส้น คราบเลือดเปื้อนผ้า 1 หยด เป็นต้น

ข. ตัวอย่างเก่า เนื่องจากเกิดเหตุหลายวันกว่าจะถูกพบและเก็บตัวอย่างส่งมายังห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างนั้นอาจจะเน่าเปื่อย หรือเสื่อมสลายจากสภาพแวดล้อม เช่น ความร้อนจากแสงแดด หรือความชื้น

ค. ตัวอย่างมีสิ่งปนเปื้อนจากสภาพแวดล้อม เช่น ดิน เชื้อรา แบคทีเรีย สี เศษผ้าและอื่นๆ มีผู้ศึกษาตัวอย่างที่เปื้อนดิน เช่น หยดเลือดที่หยดบนพื้นดิน เมื่อนำตัวอย่างเลือดปนดินมา สกัดดีเอนเอ อาจทำให้เกิดปัญหาไม่สามารถสกัด ดีเอนเอ ออกมาวิเคราะห์ต่อ

ทั้งนี้อาจเนื่องจากดิน มีสารหลายอย่าง ซึ่งมีประจุบวก จึงจับดีเอนเอซึ่งมีประจุลบไว้แน่น สกัดออกได้ยากหรือไม่ได้ ส่วนตัวอย่างเลือดที่ปนเปื้อนด้วย สี น้ำมันเครื่อง ยังพอสกัดดีเอนเอได้ ตัวอย่างคราบเลือดที่ถูกทิ้งให้สัมผัสความชื้นและตากแดดไม่เกิน 3 สัปดาห์ ยังสามารถถูกนำมาสกัด ดีเอนเอ และตรวจวิเคราะห์ได้

แม้ตัวอย่างทางนิติเวชวิทยาจะมีปัญหาต่างจากตัวอย่างผู้ป่วยที่ถูกส่งมาตรวจทางห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์อื่นๆ แต่ความคาดหวังในผลการวิเคราะห์ไม่ต่างจากผู้รับบริการอื่น นั่นคือต้องการผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง เที่ยงตรง แม่นยำ และรวดเร็ว เชื่อถือได้ ที่สำคัญกว่านั้นคือเรื่องความจำกัดของตัวอย่าง ซึ่งถือเป็นวัตถุพยานสำคัญนั้น อาจจะมีเพียงเส้นผม หรือ ขน 1 เส้น หรือคราบเลือดเพียง 1 หยด ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการนิติเวชวิทยา จึงต้องมีประสิทธิภาพเยี่ยมด้วย

งานพิสูจน์บุคคลนอกจากจะสำคัญในเรื่องคดีอาชญากรรมและอื่นๆ แล้ว งานพิสูจน์บุคคลยังเกี่ยวพันถึงการพิสูจน์ความเป็น พ่อ แม่ ลูก ซึ่งมักจะออกมาในเชิงการพิสูจน์หาพ่อทางชีวภาพ (biological father) หรือพิสูจน์ว่า เด็กเป็นลูกของพ่อ แม่ คู่ไหน เทคนิคที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการใช้หลักการเดียวกับในกรณีของคดีอาชญากรรมต่างๆ ในกรณีนี้จะมีข้อได้เปรียบกว่าคือ ถ้าการตรวจวิเคราะห์มีข้อสงสัย จะสามารถเรียกตัวคู่กรณีมาตรวจใหม่ได้ แต่ความสำคัญและเคร่งครัดในเรื่องความถูกต้อง แม่นยำ เชื่อถือได้ของผลวิเคราะห์ยังคงความสำคัญอยู่

## การพิสูจน์ความเป็น พ่อ แม่ ลูก (Parentage analysis) หมู่เลือด

ได้มีการนำวิธีตรวจทางห้องปฏิบัติการตรวจหมู่เลือดแบบต่างๆ เช่น ABO blood group, MNSs, Rh และอื่นๆ มาใช้ช่วยงานพิสูจน์ความเป็น พ่อ แม่ ลูก ในปี 1921, Ottenberg ได้เสนอแนะให้ใช้วิธีตรวจหมู่เลือด ABO (ABO blood group system) ในการพิสูจน์ความเป็น พ่อ แม่ ลูก เนื่องจากเหตุผล 3 ประการดังนี้

1. หมู่เลือด ABO ซึ่งมี antigen A หรือ B หรือ AB บนผิวเม็ดเลือดแดง และ antibody A (anti A) หรือ anti B หรือ anti A, B ในซีรัมของคนที่ค้นพบโดย Lansteiner นั้น สามารถตรวจพบได้ในทุกคนโดยธรรมชาติและเป็นสากลในทุกเชื้อชาติ

2. Von Dungern และ Hirschfeld พบว่าลักษณะหมู่เลือด ABO มีการสืบทอดทางพันธุกรรมแบบ Mendel จึงน่าจะเป็นประโยชน์ต่อการพิสูจน์พ่อ แม่ ลูก และการศึกษาในระยะต่อมา Bernstein แสดงให้เห็นว่า ลักษณะหมู่เลือด ABO มีการกระจายอยู่ใน Hardy Weinberg equilibrium นั่นคือความถี่ของการกระจาย (genotype frequencies) คงที่จากรุ่น (generation) หนึ่งสู่อีกรุ่นหนึ่ง

3. Ottenberg ตั้งสมมุติฐานว่า การแปลผลด้านพันธุกรรมที่อาศัยการตรวจหมู่เลือด ABO ซึ่งให้ผลต่างจากที่ควรจะเป็นนั้น เกิดจากความผิดพลาดด้านเทคนิค หรืออาจเนื่องจากมี genetic recombination ที่ผิดปกติ

## วิธีตรวจหมู่เลือด ABO แบ่งเป็น 2 วิธี

1. Cell grouping หรือ Direct grouping หมายถึง การตรวจ antigen A, B และ AB บนผิวของเม็ดเลือดแดงโดยตรง เทคนิคที่ทำมีได้ 2 แบบ

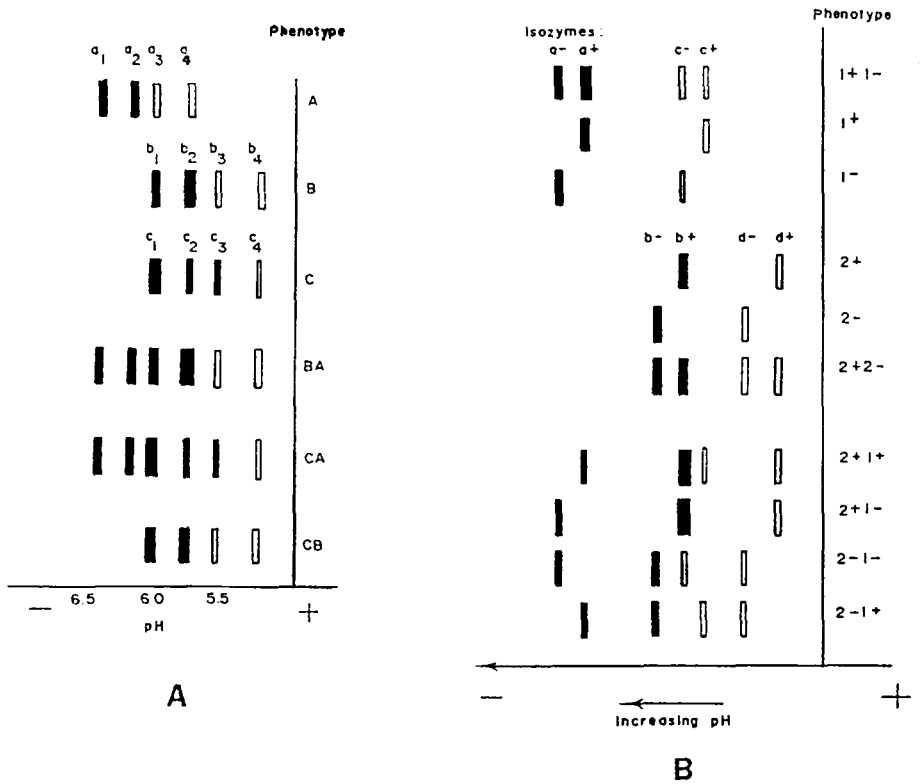
- slide method เป็นวิธีที่นิยมกันแพร่หลายที่ตรวจกันทั่วไป จะใช้ antisera เพียง 2 ตัว ได้แก่ Anti A (นิยมทำเป็นสารละลายสีฟ้า) และ Anti B (นิยมทำเป็นสารละลายสีเหลือง) โดยหยด Anti A และ Anti B บนสไลด์อย่างละ 1 หยด แล้วหยดเลือดของผู้ถูกตรวจไปผสมกับ Anti A 1 หยด Anti B อีก 1 หยด

คนให้เข้ากัน อ่านผลโดยดูการเกิด agglutination ภายใน 2 นาที

- test tube method แทนที่จะหยด Anti A และ Anti B ลงบนสไลด์อย่างละ 1 หยด จะเปลี่ยนไปหยดใส่หลอดทดลอง หลอดละ 1 หยด ส่วนเซลล์เม็ดเลือดแดงของผู้ถูกตรวจจะเตรียมเป็น 5% เม็ดเลือดในสารละลาย NSS (normal saline) ก่อน จึงนำมาใช้

2. Serum grouping หรือ reverse grouping หมายถึง นำซีรัมของผู้ต้องการตรวจหมู่เลือดมาทดสอบกับ standard cell (เซลล์เม็ดเลือดแดงมาตรฐาน) ซึ่งคือเม็ดเลือดแดงที่ทราบหมู่เลือดแน่นอนแล้ว

ห้องปฏิบัติการนิติเวชวิทยาซึ่งใช้วิธีตรวจหมู่เลือดเป็นเทคนิคในการตรวจพิสูจน์บุคคลหรือพิสูจน์ความเป็นพ่อ แม่ ลูก จะทำการตรวจทั้งวิธี cell grouping และ reverse grouping หรือบางทีเรียกอีกว่า backtyping ควบคู่กัน เพื่อยืนยันผล นอกจากนี้การทำ cell grouping จะใช้ antisera 4 ตัว ได้แก่ Anti A, Anti B, Anti AB และ Anti H (Anti O) บางห้องปฏิบัติการอาจจะตรวจละเอียดยิ่งกว่านี้ คือ บอกเป็น $A_1$, $A_2$ ด้วย Phenotype ของหมู่เลือดระบบ ABO แบ่งคร่าวๆ เป็น 4 แบบ ( A, B, AB และ O) แบ่งละเอียดเป็น 6 และอาจมี rare type เช่น $O_h$ โดยมี genotype และ phenotype ดังแสดงในตารางที่ 1 แต่การจำแนกบุคคลโดยใช้ระบบหมู่เลือด ABO นั้น เมื่อคำนวณจากความถี่ของการกระจายและสถิติด้านพันธุศาสตร์ประชากร (population genetics) แล้ว ระบบ ABO มีอำนาจจำแนกเพียง 13% (0.13) หรือใช้ชี้บ่งว่าในจำนวนผู้ต้องสงสัย 100 คน จำนวน 13 คน ไม่ใช่ผู้กระทำผิด ตัวเลขนี้ได้จากการศึกษาชาวผิวขาว แต่ในคนไทย ผลการศึกษาตัวอย่างเลือด 367 ตัวอย่าง คำนวณค่า PE = 0.132 (13.2%)




**รูปที่ 1.** Diagram แสดง phenotype ของ EAP (A) และ PGM (B) ซึ่งแยกโดย isoelectrofocusing electrophoresis

นอกจาก ABO แล้ว ยังมีระบบ MNSs, Rh, Kell, Daffy และอื่นๆ ถูกนำมาใช้จำแนกบุคคล ที่นิยมใช้พิสูจน์ความเป็นพ่อ แม่ ลูก จะเป็น ABO, MNSs และ Rh ซึ่งยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์แอนติเจนหมู่เลือดเหล่านี้ไม่ขึ้นต่อกัน (independent) หมู่เลือดระบบ MNSs มีความหลากหลายรูปแบบ (polymorphism) ดังแสดงในตารางที่ 2 และมีค่า PE (probability of exclusion) = 0.24 (24%) ถ้าใช้การตรวจระบบ ABO ร่วมกับ MNSs จะคำนวณค่า CPE (combined probability of exclusion) = 0.34 ส่วนค่า CPE ของระบบ ABO, MNSs และ Rh = 0.5 (50%) สามารถคำนวณค่า CPE ดังนี้

$$CPE = 1.0 - (1-P_1)(1-P_2)(1-P_3)-----(1-Pn)$$

P = PE ของแต่ละ locus

## เอนไซม์ในเม็ดเลือดแดง (Red blood cell enzymes)

การวิเคราะห์หมู่เลือดมีขีดจำกัดด้านอำนาจจำแนก ดังจะเห็นจากค่า CPE ของหมู่เลือดระบบ ABO, MNSs, Rh, Kell, Daffy และ Kidd รวมกันมีค่า 0.60 (60%) แม้เทคนิคการตรวจหมู่เลือดแต่ละระบบจะไม่ยุ่งยากนักในสมัยปัจจุบัน แต่การตรวจหลายๆ ระบบย่อมสิ้นเปลืองทั้งเวลาและค่าใช้จ่ายโดยที่ผลลัพธ์คืออำนาจจำแนกค่อนข้างต่ำ จึงทำให้มีผู้นำความหลากหลายรูปแบบ (polymorphism) ของเอนไซม์ โดยเฉพาะเอนไซม์ในเม็ดเลือดแดงมาใช้ในการพิสูจน์บุคคล เอนไซม์ในเม็ดเลือดแดงที่ถูกนำมาใช้ในงานพิสูจน์บุคคลและพิสูจน์ความเป็น พ่อ แม่ ลูก ได้แก่ PGM1, $ACP_1$, ESD และ EAP เป็นต้น ซึ่งห้องปฏิบัติการหน่วยนิติเซโรวิทยา ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ให้บริการตรวจความเป็น พ่อ แม่ ลูก โดยอาศัยการตรวจความหลากหลายรูปแบบของเอนไซม์ PGM และ EAP ในเม็ดเลือดแดง

PGM (Phosphoglucomutase; EC 2.7.5.1; α-D-glucose-1, 6 diphosphate; α-D-glucose-1-phosphate phosphotransferase) พบในเม็ดเลือดแดง เป็นเอนไซม์ที่คงทน สามารถตรวจวิเคราะห์ได้จากคราบเลือดที่ทิ้งในอุณหภูมิห้องได้นานไม่น้อยกว่าสัปดาห์ ยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์ PGM มี 3 loci ได้แก่ $PGM_1$, $PGM_2$, และ $PGM_3$ แต่ละ locus ยังพบได้หลายอัลลีล (allele) สำหรับ $PGM_1$ มี 4 อัลลีล เรียก $PGM_1^{1+}$, $PGM_1^{1-}$, $PGM_1^{2+}$, และ $PGM_1^{2-}$ ดังนั้นจึงได้ไอโซไซม์ (isozymes) ซึ่งแยกด้วยเทคนิค isoelectrofocusing ใน polyacrylamide gel pH 5-7 จำนวน 10 phenotypes จากเดิมที่แยกด้วย Starch gel electrophoresis พบเพียง 3 phenotypes ดังในตารางที่ 3 เมื่อศึกษาการกระจายของ PGM1 ในตัวอย่างเลือดคนไทย 168 ตัวอย่างที่ได้ศึกษาการกระจายของหมู่เลือด ABO ด้วย คำนวณค่า Power of exclusion หรือ Probability of exclusion ค่า PE ของ PGM1 = 0.301 (30.1%) แต่ถ้าคำนวณเพื่อดู haplotype distribution ในประชากรที่ไม่ได้เป็นเครือญาติจะได้ PE = 0.107

ตารางที่ 1. ABO phenotypes และ genotypes

| genotype | Phenotype |
|---|---|
| $A^1O$, $A^1A^1$, $A^1A^2$ | $A_1$ (A) |
| $A^2O$, $A^2A^2$ | $A_2$ (A) |
| BO, BB | B |
| $A^1B$ | $A_1B$ (AB) |
| $A^2B$ | $A_2B$ (AB) |
| OO | O |

ตารางที่ 2. Genotypes และ Phenotypes ของระบบ MNSs

| genotype | Phenotype |
|---|---|
| MS/MS | MS |
| MS/Ms | MSs |
| Ms/Ms | Ms |
| MS/NS | MNS |
| MS/Ns, Ms/NS | MNSs |
| Ms/Ns | MNs |
| NS/NS | NS |
| NS/Ns | NSs |
| Ns/Ns | Ns |

Erythrocyte acid phosphatase (EAP; EC 3.1.3.2) ที่พบในเม็ดเลือดแดงถูกควบคุมโดยยีน $EAP_1$ ($ACP_1$; acid phosphatase) ส่วน tissue acid phosphatase พบได้ในเนื้อเยื่อ เช่น รก (placenta) ต่อมลูกหมาก, fibroblast ถูกควบคุมจากยีน $ACP_2$, $ACP_3$ แต่ละโมเลกุลของ EAP ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย (dimers) phenotypes ของ EAP ที่แยกโดย starch gel electrophoresis พบได้ 6 แบบ คือ A, B, BA, C, CA และ CB แต่เมื่อแยกโดย isoelectrofocusing A จะแยกเป็น 4 แบบ คือ $a_1$ - $a_4$, B แยกเป็น $b_1$-$b_4$ และ C เป็น $c_1$-$c_4$ ในทางปฏิบัติแม้จะใช้เทคนิค isoelectrofocusing แยก EAP, phenotypes ที่พบได้บ่อยมีเพียง 6 แบบดังแสดงในรูปที่ 1 ผลการวิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์ของ EAP ในตัวอย่างเลือดคนไทยจำนวน 175 ตัวอย่างไม่พบ phenotype C, CA และ CB คงพบเพียง A, B และ BA ซึ่งคำนวณค่า PE = 0.164 (16.4%) ส่วน haplotype distribution ในคนที่ไม่ใช่เครือญาติ จะคำนวณค่า PE = 0.042

ตัวเลขทางสถิติเหล่านี้แปรตามเชื้อชาติ ความถี่ของการกระจายของอัลลีล จำนวนอัลลีลที่พบของแต่ละ locus จำนวนตัวอย่างที่นำมาศึกษา เทคนิคการสุ่มตัวอย่างและวิธีคำนวณที่ใช้

## โปรตีนอื่น ๆ

ความหลากหลายรูปแบบ (polymorphism) ของโปรตีนซึ่งแยกได้ด้วยกระแสไฟฟ้า(electrophoresis) ไม่ว่าจะเป็นโปรตีนในซีรัมหรือในเม็ดเลือด ได้ถูกนำมาใช้ในงานจำแนกพิสูจน์บุคคลในปี 1955, Smithies นำการแยกความหลากหลายรูปแบบของ haptoglobin โปรตีนที่จับฮีโมโกลบินอิสระไว้ในซีรัมมาใช้ นอกจากนี้โปรตีนในเม็ดเลือดแดงที่สำคัญคือ ฮีโมโกลบินก็ถูกนำมาใช้เช่นกัน ผู้เขียนและคณะได้ทำการศึกษาความหลากหลายรูปแบบของฮีโมโกลบินด้วยเทคนิค isoelectrofocusing ใช้ polyacrylamide gel ในตัวอย่างเลือดคนไทยจำนวน 365 ตัวอย่าง (Sueblinvong และ คณะ, 1996) ตัวอย่างเหล่านี้ได้ถูกตรวจวิเคราะห์หมู่เลือดและเอนไซม์ควบคู่กัน ผลการศึกษาในตัวอย่างเลือดซึ่งไม่ได้เป็นโรคเลือด นอกจากจะพบ HbA, $A_2$ แล้วยังพบ HbAE และ EE จากการคำนวณค่า PE โดยใช้ phenotype ของฮีโมโกลบินเป็น marker ได้ค่า PE = 0.337 (33.7%) ถ้าดู haplotype distribution (A $A_2$ & E) ในคนไทย โดยคำนวณค่า PE (no parent) จะได้ 0.168 (16.8%)

จึงเห็นได้ว่าการพิสูจน์บุคคลโดยใช้แอนติเจนต่างๆ บนผิวเม็ดเลือด เอนไซม์ในเม็ดเลือด โปรตีนอื่นๆ ทั้งในเม็ดเลือดหรือซีรัมร่วมกันนั้น ค่า combined power of exclusion (CPE) อาจจะสูงถึง 90% แต่การวิเคราะห์หลายๆประการ นอกจากจะสิ้นเปลืองทรัพยากรต่างๆ แล้ว ความจำกัดของตัวอย่างหรือวัตถุพยาน เช่น กรณีอาชญากรรมจะทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์มากวิธี

ได้สรุปค่า PE ของ red blood cell markers ซึ่งใช้สำหรับงาน parentage testing ในคนไทยเปรียบเทียบกับเชื้อชาติ caucasian ไว้ในตารางที่ 4

ตารางที่ 3. PGM, phenotypes

| Starch gel electrophoresis | | Polyacrylamide gel isoelectrofocusing |
|---|---|---|
| PGM-1 | | $1^+$ |
| | | $1^-$ |
| | | $1^+, 1^-$ |
| PGM-2 | | $2^+$ |
| | | $2^-$ |
| | | $2^+, 2^-$ |
| PGM 2-1 | | $2^+, 1^+$ |
| | | $2^+, 1^-$ |
| | | $2^-, 1^+$ |
| | | $2^-, 1^-$ |
| Total phenotypes | 3 | 10 |

ตารางที่ 4. ค่า PE ของ red blood cell markers ซึ่งใช้สำหรับงาน parentage testing ในคนไทยกับเชื้อชาติอื่น (Wenk และคณะฯ 1992)

| Population | | PE (power of exclusion) ของ red blood cell markers | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | ABO | MNSs | PGM | EAP | Hemoglobin |
| Thais | No Parent | n = 367 | | n = 168 | n = 175 | n = 365 |
| | | 0.132 | | 0.107 | 0.042 | 0.168 |
| | | (13.2%) | - | (10.7%) | (4.2%) | (16.8%) |
| | One Parent | 0.297 | | 0.301 | 0.164 | 0.337 |
| | | (29.7%) | | (30.1%) | (16.4%) | (33.7%) |
| Caucasians | | 0.13 | 0.24 | 0.35 | 0.35 | - |
| | | (13%) | (24%) | (35%) | (35%) | |

## ดีเอนเอและยีน (DNA and Gene)

การพิสูจน์บุคคลโดยอาศัยความหลากหลายรูปแบบของแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดง เอนไซม์ โปรตีนของเม็ดเลือดและซีรัม นั้นเป็นการวิเคราะห์ระดับ phenotype แล้วแปลผลย้อนสู่อัลลีลที่ควบคุม เมื่อเทคโนโลยีก้าวหน้าขึ้น การศึกษาความหลากหลายรูปแบบของยีนจึงเป็นการวิเคราะห์ในระดับ genotype ซึ่งได้รับความเชื่อถือ และนำมาใช้งานพิสูจน์บุคคลแพร่หลายมากขึ้น การวิเคราะห์อาจทำโดยศึกษา ดีเอนเอ โดยไม่สนใจว่า ดีเอนเอนั้นทำหน้าที่ใด ได้แก่ การทำ DNA finger prints แบบต่างๆ หรือศึกษาบริเวณเฉพาะของดีเอนเอตำแหน่งเดียว (single gene locus) เช่น HLA DQα หรือศึกษายีนหลายๆ ตำแหน่ง (multiple gene loci) เช่น HBB, GC, GYPA เป็นต้นเมื่อนำความหลากหลายรูปแบบ (polymorphism) ของดีเอนเอ และยีนมาเปรียบเทียบพิสูจน์บุคคล ตำแหน่งของดีเอนเอ หรือยีนที่เลือกมาใช้นี้จะมีความหลากหลายรูปแบบสูง ดังนั้นโอกาสที่รูปแบบดีเอนเอหรือยีนของคนสองคนจะเหมือนกันทุกประการมีน้อย ดังตัวอย่างลายพิมพ์นิ้วมือซึ่งใช้พิสูจน์บุคคลกันอยู่

## HLA DQα

ในปี 1970 Terasaki พบว่าระบบ HLA บนเม็ดเลือดขาวเป็นแอนติเจนของเนื้อเยื่อซึ่งมีความหลากหลายรูปแบบมาก สามารถนำมาใช้เป็น marker ในการพิสูจน์บุคคลและพิสูจน์พ่อ แม่ ลูก โดยมี power of exclusion สูงกว่า 0.92 (92%) จึงได้มีการพัฒนาเทคนิคด้านอณูชีววิทยามาใช้สำหรับตรวจวิเคราะห์ ปัจจุบันนิยมเพิ่มขยายดีเอนเอตำแหน่งเฉพาะของ HLA DQα อัลลีลในหลอดทดลองโดย polymerase chain reaction (PCR) แล้วแยกรูปแบบของ HLA DQα โดยนำ PCR product ไปทำ dot blot hybridization กับ allelic specific probes ตรวจสอบผล hybridization โดยการเกิดสี

Human leukocyte antigen (HLA) แบ่งเป็น 2 classes ดังนี้

1. HLA Class I : ยีนที่ควบคุมมี 3 loci เรียก HLA-A, HLA-B และ HLA-C

2. HLA Class II : มี 3 loci คือ HLA DQ, HLA DR และ HLA DP

แต่ละตำแหน่งยังมีหลายอัลลีล เฉพาะ HLA DQα เท่านั้นที่จะถูกนำมาใช้พิสูจน์บุคคล ซึ่ง WHO กำหนดให้เรียก HLA DQα เป็น HLA $DQA_1$, alleles ของตำแหน่ง HLA DQα หรือ HLA $DQA_1$ ที่ได้รับการขึ้นทะเบียนแล้วมี 8 alleles ดังแสดงการเรียกชื่อระบบใหม่และเก่าในตารางที่ 5 นอกจากนี้คณะผู้เขียนได้ดำเนินการศึกษาการกระจายของอัลลีลของ HLA DQα จากจำนวนตัวอย่างเลือดคนไทย 357 ตัวอย่าง โดยใช้ชุดวิเคราะห์ของ Perkin Elmer ซึ่งแยก alleles ของ HLA DQα ออกเป็น 6 alleles และคำนวณ genotype frequencies ไว้ในตารางที่ 5 ซึ่งจะเห็นว่าค่าที่คาดคะเนทางสถิติกับที่ตรวจได้จริงใกล้เคียงกัน genotypes ของ HLA DQα ที่พบบ่อยในตัวอย่างเลือดคนไทยได้แก่ 1.1,1.2; 1.2, 4; 1.1, 4 และ 1.2, 1.2 โดยมีความถี่ 13.31%; 10.76%; 10.48% และ 10.48% ตามลำดับ genotypes ที่ไม่พบเลยในตัวอย่างที่ศึกษา คือ 1.3, 1.3 และ 1.3, 2 เมื่อเปรียบเทียบ allelic frequency ของคนไทยจากการศึกษา 357 ตัวอย่าง (Anomasiri, Sueblinvong, 1996) กับตัวเลขที่พบในประชากร SE Asian จำนวน 174 ตัวอย่าง ศึกษาโดย Helmuth และคณะ, 1990 ตัวเลขจะใกล้เคียงกันมาก ทั้งนี้ได้เปรียบเทียบ paternity parameters ที่ใช้ HLA DQ( เป็น marker ระหว่างคนไทยกับชนชาติอื่นๆ ในตารางที่ 6

ตารางที่ 5. HLA DQα alleles, % observed และ expected HLA DQα genotype frequencies ในคนไทย

| NEW SYSTEM | OLD SYSTEM | HLA-DQα GENOTYPE | % OBSERVED | % EXPECTED |
|---|---|---|---|---|
| 0101 | 1.1 | 1.1, 1.1 | 6.80 | 5.59 |
| | | 1.1, 1.2 | 13.31 | 13.60 |
| | | 1.1, 1.3 | 0.57 | 0.94 |
| | | 1.1, 2 | 1.70 | 3.42 |
| | | 1.1, 3 | 7.37 | 7.03 |
| | | 1.1, 4 | 10.48 | 11.12 |
| 0102 | 1.2 | 1.2, 1.2 | 10.48 | 8.27 |
| | | 1.2, 1.3 | 0.57 | 1.14 |
| | | 1.2, 2 | 3.12 | 4.15 |
| | | 1.2, 3 | 9.07 | 8.55 |
| | | 1.2, 4 | 10.76 | 13.52 |
| 0103 | 1.3 | 1.3, 1.3 | 0 | 0.04 |
| | | 1.3, 2 | 0 | 0.29 |
| | | 1.3, 3 | 1.42 | 0.59 |
| | | 1.3, 4 | 1.42 | 0.93 |
| 0201 | 2 | 2, 2 | 1.13 | 0.52 |
| | | 2, 3 | 1.13 | 2.15 |
| | | 2, 4 | 6.23 | 3.39 |
| 0301 | 3 | 3, 3 | 1.42 | 2.21 |
| | | 3, 4 | 7.93 | 6.99 |
| 0501 | 4.1 | 4, 4 | 5.10 | 5.53 |
| 0401 | 4.2 | - | - | - |
| 0601 | 4.3 | - | - | - |

**ตารางที่ 6.** เปรียบเทียบตัวเลขสถิติ paternity parameters ซึ่งใช้ HLA DQα เป็น marker ในคนไทยกับชนชาติอื่น (ข้อมูลจาก Helmuth และคณะ)

| Parameters | Population | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Thai | Caucasian | Black | Hispanic | Indonesian | Japanese |
| number of sample | 357 | 174 | 172 | 146 | 144 | 92 |
| allelic diversity (h) | 0.78 | 0.80 | 0.79 | 0.78 | 0.69 | 0.72 |
| power of discrimination (PD; %) | 0.92 | 0.93 | 0.90 | 0.91 | 0.86 | 0.87 |
| power of exclusion (PE; %) | 59.53 | 62.69 | 59.22 | 58.75 | 47.18 | 52.41 |
| mean paternity index (PI) | 3.56 | 1.79 | 2.97 | 3.02 | 4.71 | 7.42 |
| probability of paternity (W; %) | 70.07 | 64.16 | 74.81 | 74.87 | 82.49 | 88.12 |

allelic diversity = a genetic diversity or the mean heterozygosity.
PD = power of discrimination of each genotype in the system
PE = chance of exclusion of non fathers is a measure of the efficacy of individual system in determining paternity and is dependent on the number of alleles in the system.
P. cumulative = cumulative chances of excluding a falsely accused man from paternity.
PI = paternity index (X/Y) or the likelyhood ratio represents the chance of paternity of a putative-father with an observed phenotype could transmit the paternal genes compare to-a man with the random population.
Probability of paternity is a relative chance of probability.

## Polygenic markers (PM markers)

เพื่อเพิ่มอำนาจจำแนกบุคคลให้มากขึ้น แทนที่จะดูความหลากหลายรูปแบบของอัลลีลจากยีนเพียงตำแหน่งเดียว เช่น HLA DQα จึงเพิ่มตำแหน่งของยีนมากตำแหน่งขึ้น โดยที่ยีนตำแหน่งต่างๆ ไม่ขึ้นแก่กัน ตัวอย่างเช่น ชุด Amplitype PM system ซึ่งวิเคราะห์ยีน 5 ตำแหน่ง ดังนี้

1. LDLR (low density lipoprotein receptor) ยีนดังกล่าวอยู่บน chromosome 19 มี 2 อัลลีล เมื่อเพิ่มขยายดีเอนเอในหลอดทดลองโดยใช้ primer เฉพาะตำแหน่ง จะให้ PCR product ขนาด 214 bp

2. GYPA (glycophorin A) อยู่บน chromosome 4 มี 2 อัลลีล ให้ PCR product ขนาด 190 bp

3. HBGG (hemoglobin G gamma globin) ตำแหน่งอยู่บน chromosome 11 ให้ PCR product ขนาด 172 bp มี 3 อัลลีล

4. $D_7S_8$ ตำแหน่งอยู่บน chromosome 7 ใกล้ cystic fibrosis locus ให้ PCR product ขนาด 151 bp มี 2 อัลลีล

5. GC (group specific component) อยู่บน chromosome 4 มี 3 อัลลีล, PCR product ขนาด 138 bp

ยีน 5 ตำแหน่งมี 12 อัลลีล ดังนั้นย่อมสามารถเพิ่มอำนาจจำแนกได้สูงขึ้น

## ขั้นตอนการวิเคราะห์ PM markers

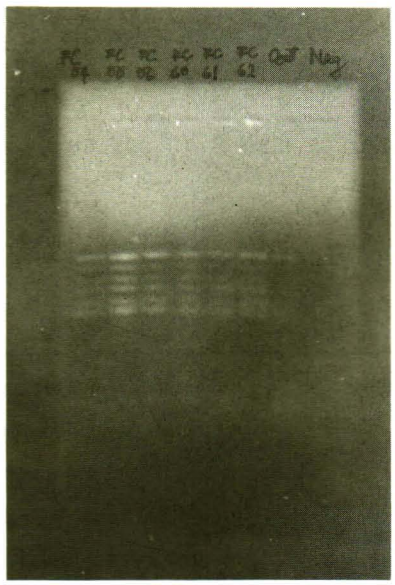
ก. สกัด ดีเอนเอ โดยใช้ Chelex-100 ซึ่งสามารถสกัดจากเลือดเพียง 1 µl เท่านั้น ในทางปฏิบัติจะใช้ 50 µl heparinized whole blood และ 5% Chelex-100 ปริมาตร 200 µl สกัดตามขั้นตอนของ Walsh และคณะ 1991 สารละลายดีเอนเอที่ได้จะถูกนำไปใช้เพื่อเพิ่มขยาย (PCR) โดยใช้ตัวอย่างละเพียง 5 µl หรืออาจเก็บไว้ที่ 4°C จนกว่าต้องการ

ข. การเพิ่มขยายดีเอนเอในหลอดทดลอง ใช้ชุดน้ำยา Amplitype PM system ซึ่ง reaction mix ประกอบด้วย

| | |
|---|---|
| Amplitype primer | 20 µl |
| Taq mixture | 20 µl |
| Unknown DNA | 5 µl |
| Distilled $H_2O$ | 5 µl |
| Total volume | 50 µl |

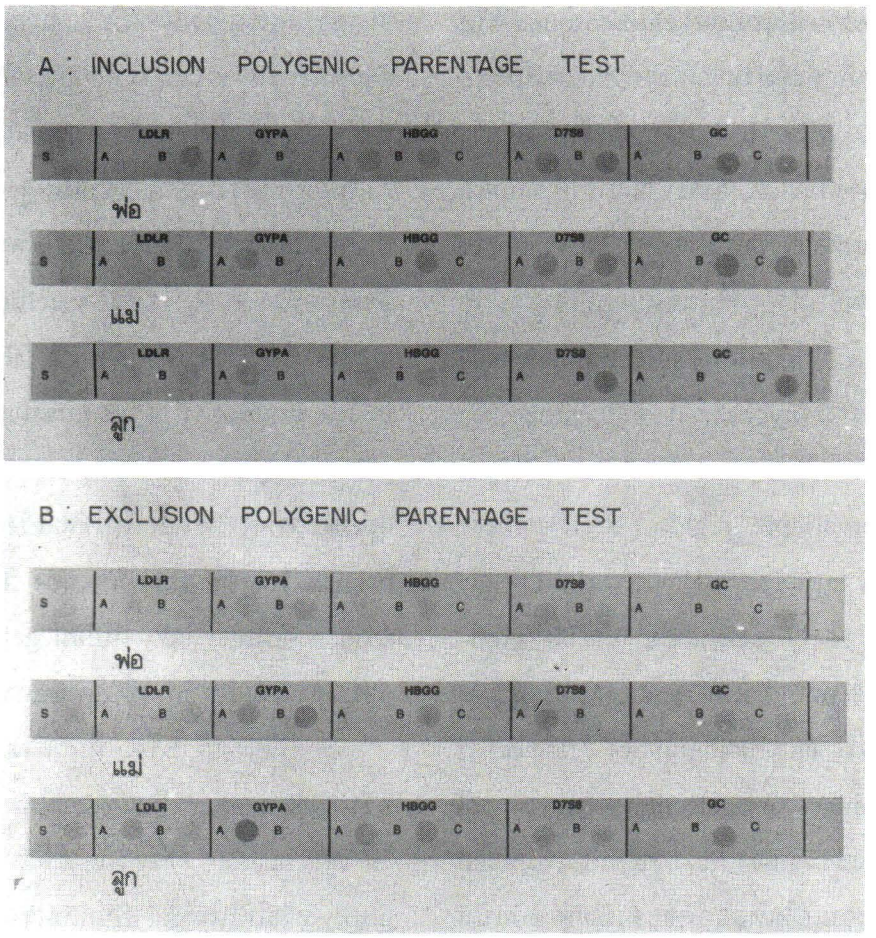
แต่ละครั้งที่ทำ PCR จะต้องมีหลอดควบคุมอีกอย่างน้อย 2 หลอด คือ หลอด positive control ซึ่งใช้ control DNA ที่มากับชุด 10 µl และ หลอด negative control ใส่ $H_2O$ 10 µl แทนตัวอย่าง

ส่วนการเพิ่มขยายดีเอนเอทำในเครื่อง thermal cycler โดยแต่ละรอบประกอบด้วย 94°C 1 min, 60°C 30 sec, 72°C 30 sec รวม 32 รอบ ในรอบสุดท้ายเพิ่มช่วง 72°C นานเป็น 7 min วิเคราะห์ผล PCR โดยใช้ 5 µl PCR product มาแยกด้วย 3% NuSive agarose gel electrophoresis ใน 1 x TBE ถ้าให้ผลบวกหรือมีการเพิ่มขยายดีเอนเอ จะเห็นแถบ 6 แถบหลังจากย้อมด้วย ethidium bromide ดังรูปที่ 2 ส่วน PCR product ที่เหลือใช้แยกชนิด allele โดยวิธี reverse dot blot hybridization ซึ่ง allelic specific oligonucleotide probes ถูก fixed บน membrane strip ตรวจผล hybridization โดยอาศัยปฏิกิริยาเกิดสีโดย HRP-SA (Horseradish peroxidase-streptavidin) enzyme conjugate และใช้ 3, 3', 5, 5' tetramethylbenzidine เป็น chromogen



**รูปที่ 2.** PCR product 6 แถบหลังการเพิ่มขยายยีน ด้วย primers ของ PM kit

รูปที่ 3 แสดงผลวิเคราะห์พ่อ แม่ ลูก โดยใช้ polygenic markers ใน 2 ครอบครัว โดยครอบครัวแรกให้ผลสรุปว่าไม่พบข้อขัดแย้งต่อความเป็นพ่อแม่ ลูก ส่วนครอบครัวที่สองนั้น ในตำแหน่งของยีน GC ซึ่งพบอัลลีลได้ 3 แบบ A, B และ C รูปแบบอัลลีลที่พบในพ่อเป็น CC ในแม่เป็น BC ดังนั้นอัลลีลที่จะพบได้ในลูกมี 2 รูปแบบคือ CC หรือ BC เท่านั้น แต่ผลการวิเคราะห์ที่ได้ อัลลีลในลูกเป็น BB ซึ่งไม่เข้ากับพ่อ แม่ คู่นี้




**รูปที่ 3.** ผลการวิเคราะห์ด้วย PM kit ในครอบครัวคนไทย 2 ครอบครัว
A : Inclusion family, B : Exclusion family

## Short tandem repeat markers (STR markers)

บนทุกแขนของโครโมโซมของคน จะมีส่วนของดีเอนเอซึ่งมีลำดับเบสซ้ำๆ ปรากฏเป็นหย่อมๆ ขนาดความยาวตั้งแต่ 6-10 bp ถึง 2 kb มีชื่อเรียกต่างๆ กันขึ้นกับขนาดดังนี้

1. VNTR (Variable number of tandem repeat) ขนาดความยาวของดีเอนเอที่มีลำดับเบสซ้ำๆ กันนั้น มีขนาดตั้งแต่ 15-80 bp แต่อาจยาวได้ถึง 2 kb

2. Minisatellite บริเวณที่มีลำดับของเบสซ้ำๆ กัน มีขนาดความยาวระหว่าง 20-30 bp

3. Microsatellite หรือ short tandem repeat (STR) ขนาดความยาวของลำดับเบสที่ซ้ำๆ กันตั้งแต่ 2-20 bp

ลำดับของเบสที่ซ้ำอาจประกอบด้วยเบส 2 ตัว (dimer) เรียงติดต่อกัน เช่น -CACACA- ซึ่งเป็นลำดับซ้ำของเบสที่พบได้บ่อยที่สุด ถึงแม้จะวิเคราะห์ลำดับได้ใน sequencing gel แต่ไม่นิยมใช้ในการพิสูจน์บุคคล ที่นิยมคือ tetramer tandem repeat ซึ่งมีเบส 4 ตัว เรียงซ้ำไปมา เช่น -ATGCATGCATGC- ในปี 1985 Jeffrey และคณะ และในปี 1987 Nakumura และคณะ เป็นผู้ริเริ่มนำการวิเคราะห์ความหลากหลายรูปแบบของ microsatellite และ VNTR มาใช้ในงานพิสูจน์บุคคลและงานด้านนิติเวชวิทยา

การศึกษาความหลากหลายรูปแบบของ tandem repeat เช่น VNTR และ minisatellite DNA ที่มีขนาดค่อนข้างใหญ่ จะใช้หลักการเช่นเดียวกับการ

ศึกษาความหลากหลายรูปแบบของ chromosomal หรือ genomic DNA คือถ้ามีปริมาณของตัวอย่างเพียงพอ เช่น กรณีพิสูจน์ความเป็น พ่อ แม่ ลูก นั้นสามารถเจาะเลือด 5-10 มล. มาตรวจแล้ว หลังจากสกัดได้ ดีเอนเอจะศึกษาความหลากหลายรูปแบบโดยทำ DNA finger printing ซึ่งประกอบด้วย ขั้นตอนย่อยดีเอนเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction endonuclease) Southern blot และ hybridized ด้วย probe ซึ่งจำเพาะต่อ VNTR loci ต่างๆ เช่น D16S85 (alpha globin 3' hypervariable region, HVR), 1q21 (mucin HVR), 11p 15.5 (Ha-ras HVR) และ DXYS14 (MR 24/1) ซึ่งเป็นกลุ่ม VNTR probe ผลิตโดย Amersham เป็นต้น แล้วตรวจสอบผล hybridization โดย autoradiography อาจจะใช้สารรังสีหรือ chemiluminescent detection ก็ได้ ในกรณีที่ตัวอย่างดีเอนเอมีปริมาณจำกัด อาจใช้การเพิ่มขยายปริมาณตัวอย่างดีเอนเอในหลอดทดลองซึ่งมีความเป็นไปได้สำหรับ short VNTR และ Short minisatellite loci แต่ในทางปฏิบัติแม้ VNTR และ minisatellite loci จะให้ข้อมูลทางสถิติในการจำแนกบุคคลได้ดี แต่มีข้อจำกัดได้แก่

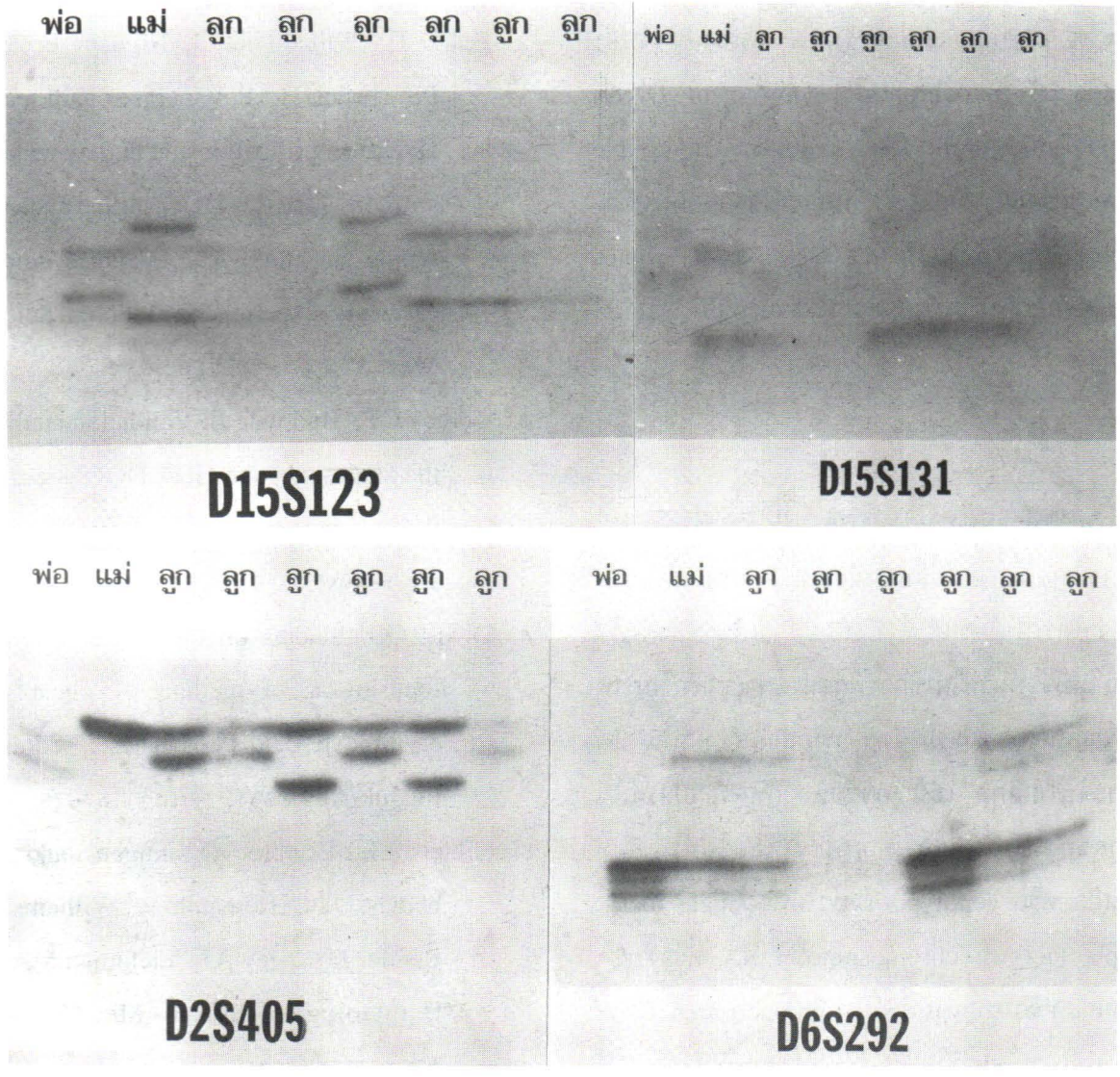
1. ต้องการปริมาณดีเอนเอมาก และโมเลกุลดีเอนเอต้อง intact หรือโมเลกุลคงสภาพสมบูรณ์
2. ขั้นตอนวิเคราะห์มีหลายขั้นตอนใช้เวลามาก
3. ค่าใช้จ่ายสูง

โดยข้อจำกัดดังกล่าวทำให้การวิเคราะห์ VNTR และ minisatellite loci ไม่สามารถให้ประโยชน์เต็มที่ ในกรณีฆาตกรรมที่พบวัตถุพยานปริมาณน้อย หรือวัตถุพยานเสื่อมสลายจากสภาพแวดล้อม จึงได้หันมาสนใจ tandem repeat ที่มีขนาดเล็กหรือ short tandem repeat หรือ microsatellite DNA

short tandem repeat DNA มีกระจายทั่วทุกโครโมโซม อาจพบได้ถี่ 1 ตำแหน่งต่อทุก 10 kb แม้ขนาดจะสั้นเช่น $DIS^{80}$ มีขนาดเพียง 16 bp แต่ STR ตำแหน่งดังกล่าวมีความหลากหลายในขนาดความยาว ซึ่งทำให้พบอัลลีลได้สูงถึง 22 อัลลีล เมื่อนำมาใช้งานจำแนกบุคคลจะมีอำนาจจำแนกสูง ขั้นตอนวิเคราะห์ประกอบด้วยการเพิ่มขยายตำแหน่งที่ต้องการศึกษาด้วยเทคนิค PCR โดยมี specific oligonucleotide primer ซึ่งอาจติดฉลากด้วยสารรังสี $S^{35}$ หรือ $P^{33}$ นำ PCR product ที่ได้ไปแยกขนาดใน Sequencing polyacrylamide gel ทำ autoradiography วิเคราะห์แถบที่ปรากฏ หรือถ้าไม่ใช้สารรังสี ไม่ต้องติดฉลาก primer หลังจากแยกขนาดของ PCR product ใน sequencing gel แล้ว ให้ย้อม gel ด้วย silver stain และวิเคราะห์แถบที่เกิดขึ้นได้โดยตรง

เนื่องจาก STR ที่ถูกนำมาใช้มีมากมาย บ่อยครั้ง STR marker เดียวอาจจะให้ผลใช้จำแนกบุคคลไม่ได้ เช่น marker ตำแหน่งดังกล่าว มี low heterozygosity หรือเห็นใน gel เป็นแถบเดียว (homozygosity) เราเรียกเป็น noninformative result ต้องหา STR ตำแหน่งอื่น ดังนั้นการใช้ STR markers จึงมักทำเป็นชุด หรือ battery ซึ่งแต่ละชุดจะมี STR markers สำหรับ loci ต่างๆ 6-7 ตำแหน่ง การจะเลือกใช้ STR markers ชุดใด เพื่อให้ได้ผลการจำแนกที่ละเอียดถูกต้อง แม่นยำ เชื่อถือได้นั้น จำเป็นต้องทำการศึกษาในประชากรกลุ่มเป้าหมาย เช่น ในกรณีนี้คือ ประชากรที่อยู่อาศัยในประเทศไทย ไม่ควรนำชุด STR markers ที่ใช้ได้ผลในชนผิวขาว (caucasian) มาใช้ในคนไทยโดยไม่ได้ทำ population genetic study นอกจากนี้แม้ชุด STR marker ที่นำมาใช้ในกลุ่มคนที่ไม่ได้เป็นญาติสนิทจะให้ informative result แต่อาจจะใช้จำแนกพี่ น้อง จาก พ่อ แม่ ท้องเดียวกันออกจากกันไม่ได้ ดังตัวอย่างในรูปที่ 4 ซึ่งเป็นครอบครัวคนไทย พ่อ แม่ ยืนยันว่าลูกทั้ง 6 คน เป็นลูกแท้ๆ ของทั้งคู่ แต่เนื่องจากเดิมไม่ได้ จดทะเบียนสมรสและไม่ได้แจ้งเกิด

ตอนนี้ต้องการทำหลักฐานใหม่จึงถูกสั่งให้มาเจาะเลือดยืนยัน ผลการตรวจโดย markers ต่างๆ ให้ผลสอดคล้องความเป็น พ่อ แม่ ลูก ของครอบครัวดังกล่าว เมื่อใช้ STR markers สำหรับตำแหน่ง : D15 S123, D2 S405, D6 S292 และ D15 S131 พบว่าไม่มีข้อขัดแย้งต่อ พ่อ แม่ ลูก ครอบครัวนี้ แต่ถ้าพิจารณาเพื่อแยกลูกแต่ละคนจะเห็นว่าไม่สามารถพิสูจน์แยกลูกแต่ละคนออกจากกันโดยผล STR loci ชุดเดิม จะต้องใช้ marker สำหรับ STR loci อื่น เป็นต้น




**รูปที่ 4.** ผลการศึกษา STRs (Short tandem repeat markers) ในครอบครัวคนไทย 1 ครอบครัว

อาจสรุปข้อได้เปรียบของการใช้ STR markers ในงานนิติเวชวิทยา โดยทั่วไปดังนี้

1. ขนาดของ short tandem repeat 2-20 bp ซึ่งค่อนข้างสั้น ดังนั้น การวิเคราะห์สามารถทำได้กับดีเอนเอ ทั้ง intact และไม่ intact หรือ partially degraded DNA

2. ถ้าปริมาณตัวอย่างไม่เพียงพอ สามารถเพิ่มโดย polymerase chain reaction ได้

3. STR loci ส่วนใหญ่มี allelic polymorphism สูง และถ่ายทอดตาม Mendelian law

4. ขั้นตอนสั้น สิ้นเปลืองน้อยลง

การพิสูจน์บุคคลในคดีอาชญากรรม ฆาตกรรม ซึ่งศพถูกฝังไว้นานจนเหลือแต่กระดูกนั้น การพิสูจน์หลักฐานคงต้องอาศัยการพิสูจน์ทางกายภาพ เช่น ลักษณะโครงกระดูก รูปกระโหลกศีรษะ ลักษณะฟัน ขากรรไกร แต่ถ้าต้องการพิสูจน์โดยเทคนิคทางอณู-ชีววิทยา จะทำโดยสกัดดีเอนเอจากเซลล์กระดูก ซึ่งอาจจะได้ chromosomal DNA แต่โดยทั่วไปจะนิยมวิเคราะห์ mitochrondrial DNA (mt DNA) มากกว่า เนื่องจาก mt DNA มีลักษณะเป็น double stranded circular DNA จึงทนต่อการสลาย และแต่ละ mitochrondria มีจำนวน mt DNA หลาย copies ควรจะได้ตัวอย่างมากพอที่จะใช้เพิ่มขยายและวิเคราะห์ต่อได้

## สรุป

การพิสูจน์ความเป็น พ่อ แม่ ลูก ซึ่งแท้จริงก็เป็นการพิสูจน์บุคคลที่ลึกซึ้งยิ่งขึ้น เพราะนอกจากพิสูจน์ว่าใครเป็นใครแล้ว ยังพิสูจน์ว่าเกี่ยวข้องกันได้หรือไม่ ในปัจจุบันไม่ได้ใช้การพิสูจน์เฉพาะทางกายภาพ รูปพรรณสัณฐาน สีผม สีตา หรือส่วนสูงเท่านั้น แต่ลงลึกระดับโมเลกุล เช่น ความหลากหลายรูปแบบในโมเลกุลของโปรตีนที่แสดงออกมาในเอนไซม์ในเลือด ในเนื้อเยื่อ หรือ genotype ซึ่งทำได้ทั้ง single locus, multiple loci บน chromosomol DNA หรือศึกษาความหลากหลายรูปแบบที่พบใน mitochrodrial DNA ก็ได้ แต่การเลือกวิธีใดเพียงวิธีเดียวอาจไม่สามารถให้คำตอบถูกต้องได้ร้อยเปอร์เซนต์ ดังนั้นผู้ปฏิบัติงานในด้านนี้จึงมักใช้หลายเทคนิคร่วมกัน ทั้งนี้เพื่อให้ได้ผลการตรวจที่ถูกต้องที่สุด เพื่อจะได้ไม่ทำให้อาชญากรตัวจริงลอยนวลแต่ผู้บริสุทธิ์กลับต้องรับโทษ

## อ้างอิง


1. Anomasiri W, Sueblinvong T. HLA DQα gene distribution in Thai population and the use in parentage testing. Abstract 14th Meeting of the International Association of Forensic Sciences (IAFS), 1996 : 183.
2. Blake E, Mihalovich J, Higuchi R, Walsh PS, Erlich H. Polymerase chain reaction (PCR) amplification and human leukocyte antigen (HLA)-DQα oligonucleotide typing on biological evidence samples: casework experience. J Foren Sci 1992 May; 37 (3) : 700-26
3. Comey CT, Budowle B. Validation studies on the analysis of the HLA DQα locususing the polymerase chain reaction J Foren Sci 1991 Nov; 36(6) : 1633-48
4. Divall GB. Studies on the use of isoelectric focusing as a method of phenotyping erythrocyte acid phosphatase. Foren Sci Int Jul-Aug 1981; 18 (1) : 67-78
5. Giblett ER. Erythrocyte antigens and anti-bodies. In: Hematology Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA, eds. Hematology. 4th ed. Mc Graw-Hill 1991 : 1595-606
6. Harris H, Hopkinson DA. Acid phosphatase. In: Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics Amsterdam, North-Holland, 1976 : 3.1.3.2

7. Herrin G Jr., Fildes N, Reynolds R. Evaluation of the Amplitype® PM DNA test system on forensic case samples. J Foren Sci 1994 Sep; 36(5) : 1247-53

8. Holland MM, Fisher DL, Mitchell LG, Rodriquez WC, Canick JJ, Merril CR, Weedn VW. Mitochondrial DNA sequence analysis of human skeletal remains: identification of remains from the Vietnam War. J Foren Sci 1992 May; 38(3) : 542-53

9. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Hyper-variable minisatellite regions in human DNA. Nature 1985 Mar 7-13; 314 (6006): 67-73

10. Nakamura Y, Leppert M, O'Connell P, Wolff R, Holm T, Culver M, Martin C, Fujimoto E, Hoff KE. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. Science 1987 Mar 27; 235 (4796) : 1616-22

11. Pena SDJ, Chakraborty R. Paternity testing in the DNA era. Trends in Genet 1994 Jun; 10(6) : 204-9

12. Piercy R, Sullivan KM, Benson N, Gill P. The application of mitochondrial DNA typing to the study of White Caucasian genetic information. Int J Legal Med 1993; 106 (2) : 85-90

13. Schlaphoff TE, Reavis SC, Rousseau J, Creemers PC, du Toit ED. The value of variable number of tandem-repeat polymorphisms in cases of disputed paternity not resolved by conventional markers : two case reports. Transfusion 1993 Sep; 33 (3) : 751-3

14. Sueblinvong T, Sirisup N, Anomasiri W. Blood group systems of ABO, hemoglobin, EAP and PGM in Thai population. Abstract 14th Meeting of the International Association of Forensic Sciences (IAFS), 1996 : 179

15. Turowska B, Nowicka L. Phosphoglucomutase subtyping in a south Polish population. Foren Sci Int 1987 May-Jun; 34(1-2) : 103-6

16. Wenk RE, Chiafari FA, Brooks MA, Houtz TD. Technical progress in parentage analysis. Clin Lab Med 1992 Sep; 12(3) : 621-42