บทที่ 1

ทฤษฎีพื้นฐาน และ กระบวนการในการศึกษาลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ
(The Underlying Theory and Principle of DNA Fingerprinting)

ลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ (DNA Fingerprinting)

เป็นคำที่ปรากฏอยู่ในกระบวนการยุติธรรมทางอาญาของต่างประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกาและประเทศอังกฤษ ในฐานะพยานหลักฐานที่นำไปสู่การพิสูจน์ความจริงเพื่อนำตัวผู้กระทำความผิดมาลงโทษในคดีอาญาที่รุนแรง[1]

ลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ จัดเป็นพยานหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ชนิดหนึ่งที่เกิดขึ้นจากการวิเคราะห์หรือ วิจัยทางชีวเคมี โดย อาศัยหลักการตรวจสอบความแตกต่างของรหัสพันธุกรรมในแต่ละบุคคลนำมาใช้ประโยชน์ในการพิสูจน์ความเกี่ยวพันระหว่างบุคคล และอาชญากรรมที่เกิดขึ้น ซึ่งในทางนิติศาสตร์ถือว่าพยานหลักฐานดังกล่าวก็เป็นพยานหลักฐานชนิดหนึ่ง ที่จะนำเข้าสู่กระบวนพิจารณา หรือจะนำเข้าสู่ความรู้ของศาลเพื่อให้ศาลวินิจฉัยว่าจำเลยมีความผิดหรือบริสุทธิ์นั่นเอง[2]

ในปัจจุบันพยานหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ ทวีความสำคัญมากขึ้นในการดำเนินคดีอาญาอันเนื่องมาจากสภาพสังคมที่สลับซับซ้อน ประกอบกับความเจริญก้าวหน้าทางเทคโนโลยีต่างๆ เป็นผลให้อาชญากรรมที่เกิดขึ้น มีความรุนแรง และเพิ่มความซับซ้อนมากขึ้น ยากที่จะหาบุคคลใดรู้เห็นเหตุการณ์นั้นได้ผู้กระทำความผิดเป็นจำนวนมาก รอดพ้นจากการถูกจับกุม เนื่องจากขาดพยานหลักฐาน หรือพยานหลักฐานอ่อนไป ในภาวะดังกล่าวศาสตร์แห่งพยานหลักฐานในเชิงกฎหมายที่แท้จริงจึงประสบกับปัญหาการบังคับใช้จำเป็นต้องอาศัยวิทยาศาสตร์เป็นเครื่องมือในการพิสูจน์ความจริง

การพิสูจน์ทางนิติเวชที่ใช้ในการดำเนินคดีอาญา ปัจจุบันได้แก่การตรวจหาหมู่เลือด (A, B, O blood group), การตรวจหาอสุจิ การตรวจเส้นขน ผม และการตรวจลายพิมพ์นิ้วมือ อย่างไรก็

---

[1]Easteal Simon and Mcleod Neil, DNA Profiling Principle, Pitfalls and Potential, 1991, p. 8.

[2]ประมูล สุวรรณศร, "พยานหลักฐานทางวิทยาศาสตร์", บทบัณฑิตย์ เล่ม 25 ตอน 1 มกราคม, 2511 หน้า 31

ดีวิธีการเหล่านี้ยังมีข้อจำกัดอยู่ที่เป็นการแบ่งบุคคลออกเป็นกลุ่มๆ เท่านั้น ไม่สามารถที่จะชี้เฉพาะลงไปได้ว่าเป็นบุคคลใด ตัวอย่างเช่น

ในคดี Shanks V. State อันเป็นคดีข่มขืนกระทำชำเราในปรเทศสหรัฐอเมริกาศาลยอมรับฟังพยานหลักฐานที่ว่ารอยเลือดที่เปื้อนเสื้อจำเลยอยู่ในหมู่ O และเลือดของหญิงที่ถูกทำร้ายก็อยู่ในหมู่ O เช่นเดียวกันจึงเป็นไปได้ว่า เลือดนั้นคือเลือดของผู้หญิงเจ้าทุกข์ในขณะเดียวกันจำนวนคนที่มีเลือดในหมู่ O ก็มีถึง 45% จึงไม่แน่ว่าเลือดดังกล่าวจะเป็นของจำเลย หรือไม่[3] จึงเห็นได้ว่าการพิสูจน์ด้วยวิธีดังกล่าว ยังไม่เพียงพอในการที่จะพิสูจน์ความผิดของจำเลยจนสิ้นสงสัยพยานหลักฐานดังกล่าว จึงเป็นแต่เพียงพยานแวดล้อมกรณีที่จะโยงเข้าไปถึงพยานอีกตอนหนึ่งที่ว่ามีผู้พบจำเลยใกล้ๆ ที่เกิดเหตุในระยะเวลากระชั้นชิดหรือไม่

อาศัยเหตุผลดังข้างต้นการตรวจเลือดเพื่อชี้ถึงบิดาเด็ก ก็บอกได้เพียงว่าพ่อและแม่ในหมู่ใดที่ถ่ายเลือดให้แก่เด็กเป็นโลหิตในหมู่ใดไม่ได้เท่านั้น อันเป็นการพิสูจน์ในทางปฏิเสธ มิใช่เป็นการพิสูจน์เพื่อชี้ตัว เช่น โลหิตของเด็กเป็นหมู่ A และโลหิตของบิดาหรือมารดาที่รู้จักตัว เป็นหมู่ O ดังนั้นโลหิตของบิดาหรือมารดาที่ต้องการพิสูจน์จะต้องเป็น A หรือ AB จะเป็น B หรือ O ไม่ได้ เมื่อเป็น A หรือ AB แล้วก็ไม่สามารถระบุได้แน่ชัด เพราะในมนุษย์มีบุคคลที่มีเลือดอยู่ในหมู่ A, และ AB ถึง 42% และ 3% ของพลเมืองส่วนการตรวจ ขน หรือผมนั้นใช้พิสูจน์ตัวบุคคลได้แต่ไม่มีความแน่นอนอาจบอกได้เพียงว่าเส้นผมหรือขนที่ตรวจคล้ายเส้นผม หรือ ขน คนใดคนหนึ่งแต่ไม่อาจยืนยันได้แน่นอน[4] เช่นเดียวกับการตรวจหาอสุจิในคดีข่มขืนกระทำชำเรา ซึ่งบอกได้เพียงว่าผู้เสียหายผ่านการถูกข่มขืนหรือไม่แต่ไม่สามารถที่จะพิสูจน์ได้ว่าอสุจิเป็นของผู้ใด ทำให้การพิจารณาคดีจำต้องอาศัยพยานหลักฐานอื่นประกอบ ลำพังแต่วิธีการพิสูจน์ทางนิติเวชที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน ยังไม่มีคุณค่าเพียงพอในการที่จะพิสูจน์ความผิดของจำเลยจนสิ้นสงสัย

ในปัจจุบันวิทยาศาสตร์สาขาอณูพันธุศาสตร์พันธุวิศวกรรมศาสตร์ ได้รับการพัฒนาเป็นอย่างมากนับตั้งแต่ เจ ดี วัตสัน (J.D. watson) และ เอช เอฟ ซี คริก (H.F.C. Crick) ได้เสนอโครงสร้างของ ดี เอ็น เอ ในปี คศ.1953 ว่าเป็นแบบสายเกลียวคู่ในลักษณะการคล้ายกับรูปบันไดเกลียวทรงกลมโดยมีสายเชื่อมระหว่างน้ำตาลกับฟอสเฟตสองสาย ทำหน้าที่เสมือนกับราวบันไดทั้งสองข้างส่วนคู่เบสที่ยื่นออกมาจากแต่ละสายและยึดต่อกันระหว่างคู่เบส A-T และ G-C ทำหน้าที่เสมือนเป็นขั้นบันได โครงสร้างของ ดี เอ็น เอ ตามแบบจำลองนี้ มีคุณสมบัติทางเคมีสอดคล้องกับ

---

[3] โอสถ โกสิน, คำอธิบายและเปรียบเทียบกฎหมายไทยกับต่างประเทศในเรื่องกฎหมายลักษณะพยานหลักฐาน. (กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์ไทยเขษม) ,2501, หน้า 114

[4] วิฑูรย์ อึ้งประพันธ์, "การพิสูจน์บุคคล," บทบัณฑิตย์ (เล่ม 30 ตอน 2 สิงหาคม) 2516 หน้า 247

คุณสมบัติทางชีววิทยาของยีนทุกประการไม่ว่าจะเป็นคุณสมบัติที่เกี่ยวกับข้อมูลข่าวสารของยีนในรูปแบบของรหัสที่เกิดขึ้นจากการเรียงลำดับเบสในโมเลกุล ดี เอ็น เอ การค้นพบดังกล่าวนับเป็นการเปิดศักราชใหม่ ของการศึกษาพันธุศาสตร์ในระดับโมเลกุล (molecular genetics) ที่เจาะลึกลงไปถึงความเร้นลับ ของรหัสพันธุกรรมที่ประกอบกันเข้าเป็นภาษาทางเคมีที่สะสมเป็นข้อมูลข่าวสารทางพันธุกรรมอย่างมากมายมหาศาล[5] นำไปสู่การค้นพบวิธีการหาลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ (DNA Fingerprinting) ที่สามารถบ่งบอกความเป็นปัจเจกบุคคลในตัวเองที่ไม่เหมือนใครได้เช่นเดียวกับลายพิมพ์นิ้วมือ ลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ จึงถูกนำมาประยุกต์ใช้ในงานนิติเวชเพื่อพิสูจน์ความเกี่ยวพันของบุคคลในคดีอาญาที่รุนแรง เช่น คดีฆาตรกรรม ทำร้ายร่างกาย และ การข่มขืนกระทำชำเราในต่างประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา และอังกฤษ

1.1 <u>ประวัติความเป็นมา ในการนำลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ (DNA Fingerprinting) มาประยุกต์ใช้ในการพิสูจน์พยานหลักฐาน</u>

ในราวปี คศ. 1983 นักวิทยาศาสตร์ชาวอังกฤษชื่อ Professer A.J.Jeffrey ได้พัฒนาเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมศาสตร์ในการหาลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ ของมนุษย์และถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบความเกี่ยวพันระหว่างบุคคลเป็นครั้งแรกในคดี Ghanaian โดยในปี คศ.1983 เด็กชายถูกปฏิเสธในการขอเข้าไปอยู่ในสหราชอณาจักร เนื่องจากสำนักงานตรวจคนเข้าเมืองของประเทศอังกฤษสงสัยว่าเด็กชายดังกล่าวจะมิใช่เป็นบุตรของ Ghanaian ซึ่งมีสิทธิที่จะตั้งรกรากในประเทศอังกฤษ เพราะคำร้องขอของ Ghanaian ต่อคณะกรรมการพิจารณาอุทธรณ์กองตรวจคนเข้าเมืองไม่ประสบผลสำเร็จจากการพิสูจน์ทางการแพทย์ และทางนิติเวชศาสตร์ในขณะนั้น (การตรวจหมู่เลือด) เนื่องจากการพิสูจน์ด้วยวิธีดังกล่าวไม่มีผลที่แตกต่างกันระหว่างบุตรชายและหลานชายทำให้ไม่สามารถพิสูจน์ได้แน่ชัด อย่างไรก็ตามก่อนการพิจารณาคำร้องอุทธรณ์ของ Ghanaian ปรากฏว่าได้มีการนำเทคนิคการตรวจหาลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ (DNA Fingerprinting) มาพิสูจน์ความเป็นแม่-ลูกระหว่าง Ghanaian กับบุตรชายจากผลการพิสูจน์พบว่าลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ ของเด็กชายดังกล่าวเหมือนกับของ Ghanaian ครึ่งหนึ่ง ซึ่งแสดงถึงความเป็นบุตรชายอย่างแน่นอน (จากการศึกษาทางสถิติพบว่า โอกาสของความน่าจะเป็นนั้น เท่ากับหนึ่งในสามหมื่นล้านที่บุคคลอื่นจะมีลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ เหมือนกับ Ghanaian ครึ่งหนึ่ง) เพราะลูกย่อมได้รับสารพันธุกรรม (DNA : Deoxyribonucleic acid) จากพ่อครึ่งหนึ่งและจากแม่ครึ่งหนึ่งลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ ของลูกจึงจะต้องเหมือนกับลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ ของพ่อครึ่งหนึ่งและของแม่ครึ่งหนึ่ง

---

[5] Watson, J.D, Gilman, M, Witkowski, J, Zoller, M, <u>Recombinant DNA Second</u> edition 1992 p. 33-45.

ถึงแม้ว่าผลการพิสูจน์ลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ ในขณะนั้นจะสรุปได้ว่า เด็กชายดังกล่าวเป็นบุตรของ Ghanaian อย่างแน่นอน แต่ในการพิจารณาคำร้องอุทธรณ์ของ คณะกรรมการพิจารณาอุทธร ณ์กองตรวจคนเข้าเมืองกลับมิได้นำผลการพิสูจน์ลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ มาพิจารณาเนื่องจากยังไม่มีความเชื่อถือในทฤษฎีของการพิสูจน์ลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ จนกระทั่ง ปีคศ.1986 จึงเริ่มนำการพิสูจน์ลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ มาใช้ในการตรวจสอบกรณีร้องขอเข้ามาอยู่ในสหราชอณาจักรในกองตรวจคนเข้าเมือง[6] และถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการดำเนินคดีอาญาเป็นครั้งแรก ในคดี Regina V. Pithchfork[7] อันเป็นคดีข่มขืนกระทำชำเราในประเทศอังกฤษ

ในปี ค.ศ 1983 หญิงสาววัยรุ่นได้ถูกข่มขืน และฆ่า เหตุเกิดใกล้กับหมู่บ้าน เอ็น เดอ บี (Enderby) และคดีนี้เจ้าหน้าที่ตำรวจไม่สามารถหาตัวผู้กระทำความผิดได้เนื่องจากขาดพยานหลักฐานที่จะโยงไปสู่ตัวผู้ต้องสงสัย

3 ปี ต่อมา (คศ 1986) เด็กหญิง Regina ในหมู่บ้าน เอ็น เดอ บี ได้ถูกข่มขืน และฆ่าในบริเวณใกล้เคียงอีกพนักงานตำรวจได้ร้องขอเพื่อนำการพิสูจน์ลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ (DNA Fingerprinting) มาใช้ในการสืบสวนหาร่องรอยผู้กระทำความผิดและพบว่าน้ำอสุจิที่เก็บได้จากเหยื่อฆาตรกรรมทั้งสองคดี เป็นของบุคคลคนเดียวกัน (ลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ ที่สกัดได้จากน้ำอสุจิในทั้งสองคดีเหมือนกัน) แสดงว่าผู้กระทำความผิดเป็นบุคคลคนเดียวกัน เจ้าหน้าที่ตำรวจจึงได้นำตัวอย่างเลือดจากผู้ต้องหาเป็นชายอายุ 17 ปี มาตรวจหาลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ ปรากฏว่าให้ผลที่แตกต่างกัน แสดงว่าผู้ต้องสงสัยมิใช่ผู้กระทำความผิดเขาจึงถูกปล่อยตัวไปอย่างรวดเร็ว

เจ้าหน้าที่ตำรวจได้ร้องขอให้ผู้ชายในหมู่บ้าน และบริเวณใกล้เคียงในช่วงอายุ 13 - 30 ปี ให้ตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจหาลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ ซึ่งได้มีการตรวจประมาณ 5,000 คน โดยความสมัครใจในการให้ตัวอย่างเลือด ในการตรวจครั้งแรกเจ้าหน้าที่ตำรวจไม่พบตัวผู้กระทำความผิดเนื่องจากผลการตรวจลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ ให้ผลไม่เหมือนกันในขณะที่เจ้าหน้าที่ตำรวจกำลังพิจารณาขยายขอบข่ายการตรวจหาลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ ในกลุ่มผู้ชายที่มีอายุมากกว่านี้ และอยู่ในพื้นที่ที่ไกลออกไปปรากฏว่าเจ้าหน้าที่ตำรวจได้ทราบจากสายลับว่า มีคนงานมาคุยในผับว่าตนได้ให้ตัวอย่างเลือด 2 ครั้ง แทนเพื่อนร่วมงานเพราะถูกว่าจ้าง จึงทำการสอบสวนและสามารถจับกุม นาย Pitchfork ได้ในที่สุดและจากผลการตรวจลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ ของนาย Pitchfork จากตัวอย่างเลือดปรากฏว่าเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอเดียวกับที่ตรวจได้จากอสุจิในทั้งสองคดี

---

[6] Kelly K.F., "Method and Application of DNA Fengerprinting : A Guide for the Non - Scientist," Criminal Law Review, 1987, p. 62.

[7] Tand M. Clare, "DNA Typing : A New Investigatory Tool," Duke Law Journal Aprill 1989, p. 474 - 475

1.2 การนำลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ (DNA Fingerprinting) มาประยุกต์ใช้ในการดำเนินคดีอาญา

ในการสืบสวนปัจจุบัน นอกจากใช้วิธีการโดยการคัดเลือกตัวบุคคลผู้จะทำการสืบสวน หรือหาพยานหลักฐานโดยบุคคลดังกล่าวแล้ว การใช้วิทยาการตำรวจ (Utilization of Scientific Evidence) เข้าช่วยอันได้แก่ การอาศัยพยานหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และความรู้ทางนิติเวชศาสตร์เข้ามาช่วยในการตัดสินและวินิจฉัยร่องรอยแห่งคดีที่เกิดขึ้นเป็นวิธีการหนึ่งที่เป็นที่นิยมในต่างประเทศ

การนำลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ มาใช้ในการกลั่นกรองมูลคดีในชั้นสืบสวน-สอบสวนถือว่าเป็นการใช้วิทยาการตำรวจเกี่ยวกับการพิสูจน์หลักฐานเข้าช่วยในการคลี่คลายคดี โดยเฉพาะในคดีที่ขาดประจักษ์พยานเพราะโดยสภาพของคดีอาญาที่รุนแรง พยานหลักฐานที่พบในสถานที่เกิดเหตุมักได้แก่ เลือด เส้นผม ขน น้ำอสุจิ อาวุธ และเสื้อผ้าของผู้เสียหายหรือของผู้กระทำความผิด สิ่งคัดหลั่งดังกล่าวจะมีสารพันธุกรรม คือ ดี เอ็น เอ (DNA : Deoxyribonucleic Acid) เป็นส่วนประกอบที่สามารถจะสกัด ดี เอ็น เอ ออกมาเพื่อตรวจดูลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ เปรียบเทียบกับลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ ของผู้ต้องสงสัยที่ได้จากการเจาะเลือดตรวจพิสูจน์ ถ้าเป็นลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ เดียวกันก็แสดงว่า เลือด อสุจิ เส้นผม หรือขน ในที่เกิดเหตุเป็นของผู้ต้องสงสัยอย่างแน่นอนเพราะจากการศึกษาทดลองทางสถิติพบว่าโอกาสของความน่าจะเป็นที่คนจะมีลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ ซ้ำกัน โดยบังเอิญเท่ากับ 1 ใน 100 ล้านล้านคนจะมียกเว้นก็เฉพาะในคู่แฝดที่เกิดจากไข่ใบเดียวกันเท่านั้นที่จะมีลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ เหมือนกัน[8] ซึ่งก็ไม่ใช่เรื่องยากที่จะสืบสวน-สอบสวน เพราะการนำลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ มาช่วยในกระบวนการกลั่นกรองมูลคดีในชั้นพนักงานสืบสวนทำให้แนวทางการสืบสวนแคบลงจนถึงตัวผู้กระทำความผิดในขณะที่วิธีการพิสูจน์บุคคลทางนิติเวชแบบดั้งเดิม เช่น การหาหมู่เลือด (A B O blood Group) เส้นผม ขน ยังมีข้อจำกัดอยู่ที่เป็นการแยกบุคคลออกเป็นกลุ่มๆ เท่านั้น ลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ จึงมีความสำคัญเป็นอย่างมากต่อการสืบสวนคดีอาญา คือ

1.2.1 ลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ (DNA Fingerprinting) ช่วยเชื่อมโยงระหว่างสถานที่เกิดเหตุ ผู้ต้องหาและเหยื่ออาชญากรรม

จากรายงานเกี่ยวกับการนำลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ มาใช้ในการสืบสวนคดีอาญาในคดี R V. Mclias[9] พบว่า ผลการตรวจลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ จากตัวอย่างเลือดที่เจาะจากผู้ต้องหา

---

[8]จินตนา ศิรินาวิน, "ลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ," บทสัมภาษณ์ในหมอชาวบ้าน ฉบับที่ 17 ปีที่ 15,2537, หน้าที่ 6 - 8

[9] Time, November 14, 1987

โดยความยินยอมเหมือนกับลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ ที่สกัดได้จากคราบอสุจิบนเสื้อผ้าของผู้เสียหายที่ถูกข่มขืนพยานหลักฐานดังกล่าวประกอบกับความแม่นยำของทฤษฎีการตรวจหาลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ มากเพียงพอที่จะทำให้ผู้ต้องหารับสารภาพความผิดเมื่อต้องเผชิญกับผลการพิสูจน์ลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ ที่ยากจะหาข้อมูลโต้แย้ง และคดีในประเทศสหรัฐอเมริกา เมือง Tacoma[10] ผู้หญิงอายุ 57 ปี เป็นโรค Alzheimer's disease ไม่สามารถจำผู้ที่ข่มขืนได้ แต่จากผลการตรวจลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ จากคราบอสุจิที่พื้นรถประจำทางบริเวณที่มีการข่มขืนพบว่าเหมือนกับลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ ของผู้ต้องหา ซึ่งเป็นพนักงานขับรถประจำทางคันนั้น ซึ่งได้ให้การรับสารภาพในที่สุด คดี The United States of America Case of Zambrana[11] : พบว่าลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ ที่สกัดได้จากคราบเลือดบนมีดของผู้ต้องหาเหมือนกับลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ ของผู้เสียหาย

1.2.2 ลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ (DNA Fingerprinting) เป็นพยานหลักฐานพิสูจน์ความบริสุทธิ์ของ บุคคล เพื่อให้ผู้ที่มิได้เกี่ยวข้องได้รับการปล่อยตัวโดยเร็ว

คดี Hamrick v. Carolinas[12] : ปี 1989 Hamrick ตกเป็นผู้ถูกกล่าวหาในคดีลักพาและข่มขืนกระทำชำเรา หญิงอายุ 25 ปี โดย Hamrick ตกเป็นผู้ต้องสงสัย เมื่อผู้เสียหายชี้ตัวจากภาพเสก็ตซ์ว่าเป็นผู้ทำร้ายเธอภายหลังที่เกิดเหตุการณ์ 3 อาทิตย์ แต่จากผลการพิสูจน์ลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ เปรียบเทียบระหว่างลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ ที่ได้จากการเจาะเลือด Hamrick เปรียบเทียบกับเลือดจากที่เกิดเหตุให้ผลที่แตกต่างกัน แสดงว่าเป็นของคนละคน ด้วยเหตุผลดังกล่าวเป็นเหตุให้อัยการมีคำสั่งไม่ฟ้อง Hamrick และปล่อยตัวเป็นอิสระทันที่จะเห็นได้ว่าการพิสูจน์ลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ นอกจากจะเป็นการพิสูจน์เพื่อชี้ตัวผู้กระทำผิดแล้ว ยังใช้เพื่อพิสูจน์ความบริสุทธิ์ของบุคคลอีกด้วย

1.2.3 ลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ (DNA Fingerprinting)ใช้พิสูจน์ความเกี่ยวพันธ์ระหว่างบุคคลที่มีความใกล้ชิดกันทางสายเลือด

ในคดี Caldwell V. State of Georgia คศ 1990 อันเป็นคดีที่น่าสลดใจและสะเทือนขวัญสำหรับชาวอเมริกัน ซึ่งหากยังไม่มีการนำวิธีการพิสูจน์ลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ มาใช้ใน

---

[10] Time, October 31, 1988.

[11] Walke Clive, "DNA Profiling and Police Power," Criminal Law Review. 1990. at p. 480

[12]Joseph G. Petrosinelli, "The Admissibility of DNA Typing : A New methodology," Georgetown Law Journal. 79 (2, 1990) p. 313

การดำเนินคดีอาญาก็ไม่แน่ว่าผู้กระทำผิดที่แท้จริงจะเป็นใคร เพราะผลของคดีย่อมจะต้องขึ้นอยู่กับข้อต่อสู้ระหว่างโจทก์กับจำเลยเป็นสำคัญ ในคดีดังกล่าวเป็นคดีข่มขืนกระทำชำเรา และฆ่า เหตุเกิดที่ มลรัฐจอเจียร์ โดยพี่ชายและน้องสาวถูกแทงในขณะที่น้องสาวถูกข่มขืนด้วยและถึงแก่ความตาย Cald well ซึ่งเป็นบิดาของเด็กทั้งสองถูกฟ้องต่อศาลในฐานะผู้กระทำความผิด Cald well ได้ปฏิเสธข้อกล่าวหาและต่อสู้คดีว่าผู้ข่มขืนและฆ่าน้องสาวคือพี่ชายนั่นเอง และถูกแทงในระหว่างการต่อสู้กันเองซึ่งเด็กทั้งสองเป็นบุตรของ Cald well จากคดีดังกล่าว การตรวจหมู่เลือดไม่สามารถนำมาใช้ได้เนื่องจากความเกี่ยวพันใกล้ชิดทางสายเลือด ส่วนการตรวจอสุจินั้นไม่สามารถระบุได้แน่ชัดว่าเป็นของผู้ใดในขณะที่การตรวจลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ จากตัวอย่างอสุจิที่พบในช่องคลอดของน้องสาวสามารถระบุได้แน่ชัดว่าเป็นของบุคคลใด เพราะถึงแม้ว่าลูกจะได้รับสารพันธุกรรม คือ ดี เอ็น เอ จากพ่อแม่ คนละครึ่งแต่ในการดำรงเผ่าพันธ์มนุษย์นั้น ลูกยังเป็นส่วนผสมที่เกิดขึ้นใหม่ซึ่งเมื่อ Interaction กับสิ่งแวดล้อมด้วยส่วนหนึ่งแล้วจะมีรหัสแห่งพันธุกรรม คือลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ ซึ่งมีลักษณะเป็นปัจเจกเฉพาะที่แตกต่างกันในแต่ละบุคคลยกเว้นในฝาแฝดไข่ใบเดียวกันเท่านั้น ผลการพิสูจน์ลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ จากตัวอย่างอสุจิ จึงพบว่าเป็นลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ ของ Cald well และให้ผลที่แตกต่าง กับลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ ของบุตรชาย Cald well จึงถูกตัดสินให้จำคุกตลอดชีวิตในความผิดฐานข่มขืนและฆ่าบุตรสาวและพยายามฆ่าบุตรชายของตนเอง[13]

จากตัวอย่างคดีในต่างประเทศจะเห็นได้ว่ากระบวนการในชั้นก่อนฟ้องโดยเฉพาะในชั้นของพนักงานสืบสวนจะมีกระบวนการในการกลั่นกรองมูลคดี และมีการนำความรู้ทางวิทยาการตำรวจเข้าช่วยในการวินิจฉัยคดีเป็นอย่างมาก

ในขณะที่ประเทศไทยเป็นที่ปรากฏว่า ในส่วนที่เกี่ยวกับการใช้วิทยาการตำรวจเข้าช่วยในการสืบสวนสอบสวนนี้ ตามที่เป็นอยู่ในปัจจุบันของกรมตำรวจ ปรากฏว่ายังไม่ค่อยนิยมที่จะกระทำกันเหตุที่เป็นเช่นที่กล่าวก็อาจมีสาเหตุเนื่องมาจากการขาดแคลนเครื่องมือเครื่องใช้หรือเจ้าหน้าที่ผู้เชี่ยวชาญในการพิสูจน์ประการหนึ่ง และอีกประการหนึ่งก็อาจจะเนื่องมาจากการไม่สนใจที่จะกระทำการของพนักงานสืบสวน หรือพนักงานสอบสวนในคดีนั้นๆ ที่จะขอให้ทำการตรวจสอบ ทำให้การใช้ประโยชน์จากการใช้วิทยาการตำรวจในปัจจุบันไม่มากเท่าที่ควร ซึ่งจะต้องได้รับการปรับปรุงแก้ไขต่อไปในอนาคต[14]

---

[13]McElfresh C. Kevin, "DNA - based Identity Testing," Forensic Science March 1993, p. 149

[14]กองบัญชาการตำรวจนครบาล, สรุปผลการสัมมนาตามโครงการอบรมสัมมนาพนักงานสอบสวนระดับสารวัตร. หน้า 22. พ.ศ..2522..

1.3 ทฤษฎีและวิธีการตรวจหาลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ (DNA Fingerprinting)

1.3.1 ทฤษฎีการพิสูจน์ลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ (DNA Fingerprinting)

การพิสูจน์ลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ ตั้งอยู่บนทฤษฎีพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพที่ว่า ในร่างกายของมนุษย์ประกอบขึ้นด้วยเซลล์เป็นจำนวนมากนับล้านๆ เซลล์ที่มีลักษณะเฉพาะและขนาดแตกต่างกันไป แล้วแต่ชนิด เช่น เซลล์ของเม็ดเลือด เซลล์ประสาท เซลล์กล้ามเนื้อ เซลล์ของไขกระดูกและเซลล์สืบพันธุ์เป็นต้น เซลล์แต่ละชนิดที่แตกต่างกันก็จะทำหน้าที่แตกต่างกันด้วย และมีขนาดเฉพาะของแต่ละเซลล์ เช่น เซลล์สมองจะมีขนาด 4 μm ในขณะที่เซลล์ประสาทจะมีขนาดยาว 1 cm แต่โดยเฉลี่ยเซลล์แต่ละชนิดจะมีขนาดประมาณ 20 μm[15]

เซลล์โดยทั่วไปจะมีความคล้ายคลึงกันในองค์ประกอบใหญ่ 2 ชนิดคือ

1) ไซโตปลาสซึม (Cytoplasm)

2) นิวเคลียส (nucleus)

นิวเคลียส (nucleus) เป็นองค์ประกอบขนาดใหญ่ภายในเซลล์ที่มองเห็นได้เด่นชัดด้วยกล้องจุลทัศน์ และเป็นศูนย์กลางควบคุมกิจกรรมต่างๆ ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ ภายในนิวเคลียสจะประกอบไปด้วยเส้นใยขนาดเล็ก ที่ย้อมติดสีจำเพาะจำนวนมากมายขดม้วนซ้อนกันเหมือนร่างแห เรียกว่า เส้นใยโครมาติน ซึ่งก็คือ โครโมโซมนั่นเอง เส้นใยโครมาตินหรือ โครโมโซม จะประกอบไปด้วยสารพันธุกรรมซึ่งก็คือ ดี เอ็น เอ นั่นเองที่มีบทบาทสำคัญในขบวนการถ่ายทอดทางพันธุกรรม

ขบวนการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม

เนื่องจากลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ เป็นสิ่งที่ธรรมชาติได้สร้างสรรค์ให้แก่มวลมนุษยชาติเพื่อให้แต่ละชีวิตแต่ละบุคคลมีความเป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัว ในทางวิทยาศาสตร์นั้น ความแตกต่างของลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ เกิดขึ้นจากความแตกต่างของลำดับเบสที่สลับซับซ้อนบน ดี เอ็น เอ ซึ่งเป็นสารพันธุกรรมที่อยู่ภายในเซลล์ ดังนั้นการจะศึกษาถึงรายละเอียดในการหาลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ จึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาเกี่ยวกับ กระบวนการถ่ายทอด ดี เอ็น เอ ในร่างกายซึ่งก็คือการถ่ายทอดทางพันธุกรรมนั่นเอง

ในสิ่งมีชีวิต จำนวนโครโมโซมในเซลล์ที่ประกอบเป็นอวัยวะต่างๆ จะคงที่และเป็นลักษณะประจำของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น รวมตลอดไปจนถึงสารพันธุกรรม คือ ดี เอ็น เอ ที่จะมีลำดับของเบสเป็นรหัสที่แน่นอนคงที่ และเหมือนกันทุกเซลล์ในร่างกาย ดังนั้นทั้งโครโมโซม และ ดี เอ็น เอ จะต้องมีวิธีการในการดำรงสภาพที่เหมือนเดิม ที่สามารถจะถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกต่อไปได้อันเป็นกลไกในการดำรงอยู่ของสิ่งมีชีวิตนั้น

---

[15]Easteal Simon and McLeod Neil, DNA Profiling Principle , Pitfalls and Potential, 1991, p. 15.

ขบวนการแบ่งตัวของเซลล์ (Cell Division)

การแบ่งตัวของเซลล์มีอยู่ 2 แบบ แบบหนึ่งเรียกว่า Mitosis ทำให้เกิดเซลล์ใหม่ 2 เซลล์ โดยมีจำนวน Chromosome และข้อมูลทางพันธุกรรม เหมือนเซลล์ต้นแบบทุกประการ ส่วนอีกแบบหนึ่งเรียกว่า Meiosis ซึ่งจะเกิดขึ้นเฉพาะกับการแบ่งตัวของเซลล์สืบพันธุ์เท่านั้น เซลใหม่ที่เกิดขึ้นมีจำนวน Chromosome และข้อมูลทางพันธุกรรม ลดลงเหลือเพียงครึ่งหนึ่งของเซลเดิม เช่นในเซลล์ของคนมี 46 chromosome เป็น diploid number เมื่อมีการแบ่งตัวแบบนี้ เซลล์ใหม่ที่เกิดขึ้นจะมี 23 chromosome เป็น haploid number ซึ่งเมื่อมีการปฏิสนธิระหว่างเซลล์สืบพันธุ์ จากเพศหญิงและเพศชายจะเกิดเซลล์แรกของร่างกาย (zygote) ซึ่งมี 46 chromosome มีการผสมผสานของข้อมูลทางพันธุกรรมจากพ่อและแม่ซึ่งเป็นหลักการขั้นพื้นฐานของ Chromosome Theory of Inheritance.[16]

การแบ่งเซลล์ แบบไมโทซิส (mitosis)

เป็นขบวนการแบ่งเซลล์ล์ร่างกาย โดยเริ่มต้นจากเซลล์ล์เดิม 1 เซลล์ผ่านกระบวนการแบ่งเซลล์จนเสร็จสิ้นสมบูรณ์ได้เซลล์ใหม่ 2 เซลล์ ที่มีองค์ประกอบทางพันธุกรรมเหมือนเดิมทุกประการ ถือเป็นขบวนการพื้นฐานของชีวิต แบ่งออกเป็นระยะต่างๆ (ดูรูปที่ 1) ได้แก่

ระยะ อินเทอร์เฟส (Interphase) เป็นระยะที่ยาวที่สุดในวงชีวิตของเซลล์ ในช่วงนี้จะเห็นนิวเคลียสได้ชัดเจนที่สุด ซึ่งภายในจะบรรจุด้วยร่างแหของเส้นใยโครมาตินขนาดเล็กบางและยาวเต็มไปหมด ในระยะนี้จะมีกิจกรรมต่างๆ ของเซลล์มากที่สุดเพราะเป็นช่วงที่มีการเตรียมสะสมวัตถุดิบที่จำเป็นสำหรับการสังเคราะห์สารต่างๆ เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการแบ่งเซลล์ขบวนการที่สำคัญของระยะอินเทอร์เฟสคือการสร้างจำลองแบบ ดี เอ็น เอ* และโครโมโซมจาก 1 ให้เป็น 2

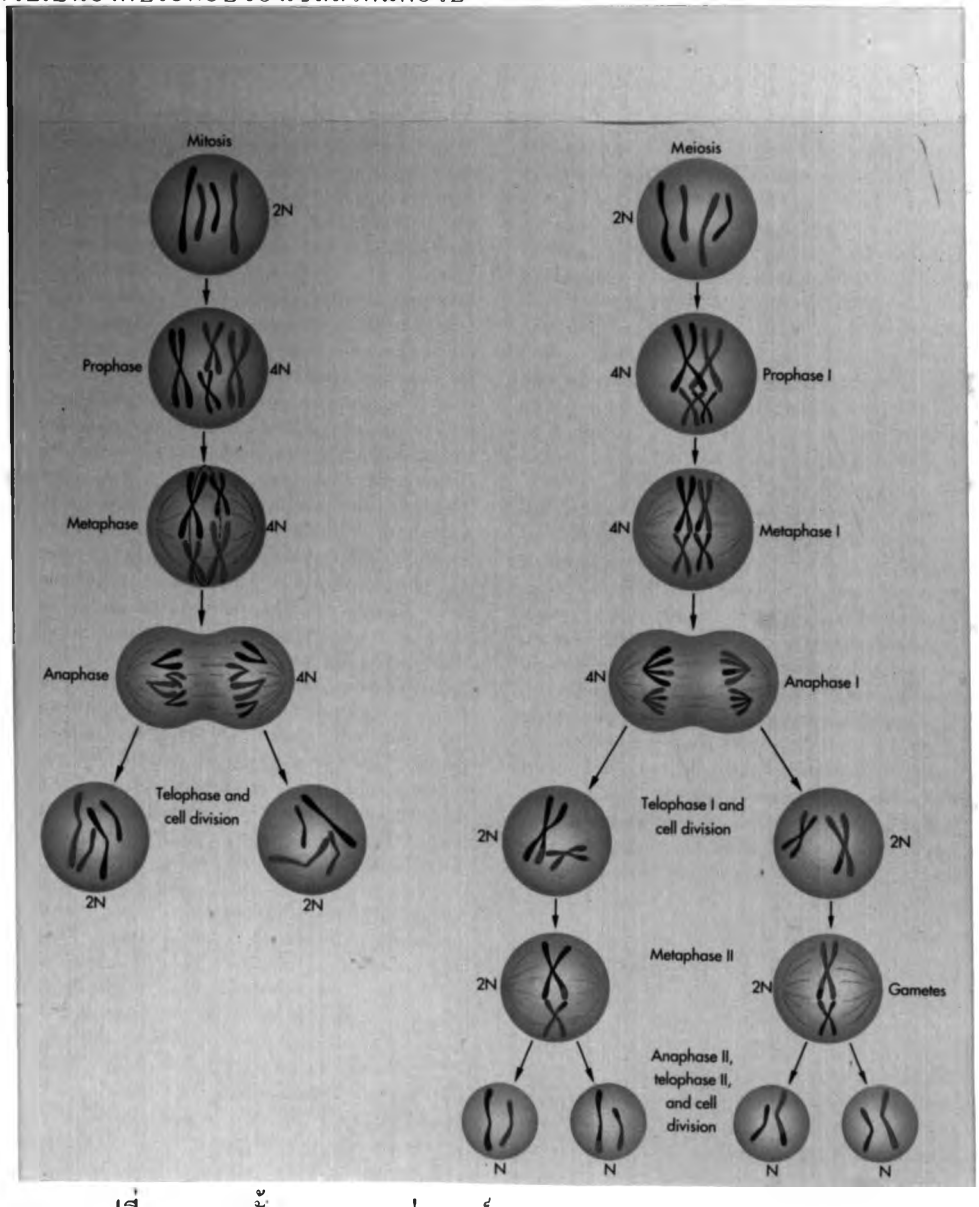
---

[16]Scientific American Introduction to Molecular Medicine Edited by Leder, P., Clayton, D.A, Rubenstein, E. 1994, p.5

* DNA Replication : การจำลองแบบ ดี เอ็น เอ เป็นขบวนการสำคัญในการคงสภาพสารพันธุกรรมในร่างกายให้มีสภาพเหมือนเดิมทุกประการ ในทุกเซลล์ภายในร่างกายอันเป็นกลไกหนึ่งของการดำรงอยู่ ของสิ่งมีชีวิต

การเกิด replication เส้น polynucleotide 2 เส้นของ ดี เอ็น เอ ซึ่งพันรอบซึ่งกันและกันเป็นลักษณะเกลียวคู่ที่มีการเกาะกันระหว่างเบสคู่สม A-T และ G-C ที่เป็นแม่พิมพ์จะคลายเกลียวออกจากกันโดยเริ่มจากปลายข้างหนึ่งก่อน ในขณะเดียวกันจะมีการสร้างเส้น ดี เอ็น เอ ที่เข้าคู่กับ

โดยแต่ละหน่วยจะมีองค์ประกอบทางพันธุกรรมเหมือนเดิมทุกประการเพื่อที่แต่ละหน่วยจะสามารถแบ่งแยกไปเป็นองค์ประกอบของเซลล์ใหม่ต่อไป[17]



รูปที่ 1 แสดงขั้นตอนการแบ่งเซลล์แบบ mitosis และ แบบ meiosis

มันได้ขึ้นใหม่ เมื่อ ดี เอ็น เอ ที่เป็นแม่พิมพ์แยกออกจากกันโดยเด็ดขาดก็จะได้โมเลกุลของ ดี เอ็น เอ 2 โมเลกุลที่เหมือนกันทุกประการและเหมือนกับ ดี เอ็น เอ ที่เป็นแม่พิมพ์ด้วย ขบวนการ DNA replication เป็นคำตอบที่ว่า ดี เอ็น เอ เก็บรักษาและถ่ายทอดตัวเอง (DNA) ไปยังลูกหลานได้อย่างไร อ้างใน Biochemistry. Fourth edition by Stryer, L 1995 p. 83-84.

[17] Watson, J.D., Gilman, M, Witkowski, J, Zoller, M. Recombinant DNA Second edition 1992 p. 8-9.

โดยทั่วไปภาคอินเทอร์เฟสจะแบ่งได้เป็น 3 ระยะคือ

(1) ระยะ G1 - phase เป็นระยะที่ต่อเนื่อง หลังจากเสร็จสิ้นการแบ่งเซลล์เรียบร้อยแล้ว และเป็นระยะทิ้งช่วงก่อนที่จะมีการสร้างจำลองแบบ ดี เอ็น เอ นิวเคลียสของเซลล์ในระยะ G1 นี้จะมีปริมาณ ดี เอ็น เอ เท่ากับเซลล์ร่างกายทั่วไป

(2) ระยะ S (Synthesis) เป็นระยะต่อเนื่องจากระยะ G1 โดยเริ่มมีการสังเคราะห์ ดี เอ็น เอ เพื่อสร้างจำลองแบบ ดี เอ็น เอ และโครโมโซม ในระยะนี้ปริมาณ ดี เอ็น เอ จะเป็น 2 เท่าของเซลล์ร่างกาย

(3) ระยะ G2 phase เป็นระยะพักช่วงอีกครั้งหนึ่งหลังจากที่เสร็จสิ้นการสังเคราะห์ ดี เอ็น เอ และโครโมโซมก่อนที่จะเริ่มมีการแบ่งนิวเคลียส เมื่อเสร็จสิ้นระยะ G2 แล้วนิวเคลียสจะเริ่มแบ่งโดยกระบวนการไมโทซิส และติดตามด้วยการแบ่ง Cytoplasm ที่เรียกว่า Cytokinesis หลังจากนั้นก็จะได้เซลล์ 2 เซลล์ที่เหมือนกันทุกประการ

เมื่อพ้นระยะ G2 phase อันเป็นการเสร็จสิ้นขบวนการจำลองแบบ ดี เอ็น เอ จาก 1 เป็น 2 แล้วก็จะเข้าสู่กระบวนการ แบ่งนิวเคลียสแบบไมโทซิส ซึ่งประกอบด้วยช่วงต่างๆ 4 ช่วงที่ต่อเนื่องกันคือ

ระยะโปรเฟส (Prophase) เป็นระยะเริ่มแรกของกระบวนการไมโทซิส โครมาทิน จะม้วนหดตัวมากขึ้นจนปรากฏเป็นรูปร่างโครโมโซม แต่ละโครโมโซมประกอบด้าย 2 สายของโครมาทิดอันเป็นผลมาจากการสร้างจำลองแบบโครโมโซม ในภาคอินเทอร์เฟส ในระยะนี้เยื่อหุ้มนิวเคลียสจะสลายตัวไปทำให้โครโมโซมกระจายออกทั่วเซลล์และ เริ่มเคลื่อนที่สู่บริเวณกลางเซลล์ พร้อมกันนั้นก็จะปรากฏสายใย สปินเดิล (Spindle Fiber) ออกมาจาก เซนทริโอล (Centriole) ที่ขั้วเซลล์แต่ละขั้ว

ระยะเมทาเฟส (Metaphase) เป็นระยะที่โครโมโซมม้วนหดตัวสั้นมากที่สุดจนสามารถเห็นโครโมโซม มีรูปร่างสั้น และหนาชัดเจนที่สุด โครโมโซมจะมาเรียงรายกันอยู่บริเวณแนวกลางเซลล์ โดยมีเส้นใย (Spindle Fiber) ยึด Centromere กับขั้วของเซลล์ ในช่วงท้ายของระยะเมทาเฟส สายโครมาทิด 2 สายของโครโมโซมแต่ละแท่งจะขาดหลุดออกจากกัน ตามแนวยาวของเซนโทรเมียร์ ทำให้โครมาทิดแต่ละสายแยกออกเป็นอิสระ และกลายเป็นโครโมโซมใหม่ (daughter Chromosome) โดยสมบูรณ์

ระยะอะนาเฟส (Anaphase) เป็นระยะที่โครโมโซมใหม่ทั้งคู่ที่เกิดจากโครโมโซมสายเดิมเคลื่อนที่แยกออกจากกัน และกันเข้าสู่ขั้วตรงกันข้ามอย่างรวดเร็วโดยการหดตัวของเส้นใยสปินเดิล (Spindle Fiber)

ระยะเทโลเฟส (Telophase) เป็นระยะที่โครโมโซมใหม่แต่ละสายเคลื่อนที่เข้าสู่ขั้วแต่ละขั้วของเซลล์โครโมโซมจะยืดตัวยาวขึ้น ขอบของนิวเคลียสจะถูกสร้างขึ้นมาใหม่ล้อมรอบ

Chromosome แต่ละชุดพร้อมๆ กันนั้น Cytoplasm จะแบ่งเป็น 2 ส่วน เกิดเซลล์ใหม่ 2 เซลล์ ที่มีส่วนประกอบเหมือนเซลล์ต้นแบบ

การแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (Meiosis)

MEIOSIS : เป็นการแบ่งตัวจำเพาะของเซลล์สืบพันธุ์ เพื่อจะมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์สืบพันธุ์ Primary oocyte และ Spematocyte ซึ่งเป็น diploid Cell ให้เป็น Ova (ไข่) และ Sperm (อสุจิ) ที่จะสามารถสืบพันธุ์ได้ต่อไปดังนั้นทั้ง Ova (ไข่) และ Sperm (อสุจิ) จึงมีจำนวนโครโมโซม และ ดี เอ็น เอ เป็นครึ่งหนึ่งของเซลล์ร่างกาย ซึ่งเมื่อมีการปฏิสนธิระหว่าง Sperm กับ Ovum จะเกิดเป็นเซลล์ใหม่ที่เรียกว่า Zygote ที่มีจำนวน Chromosome และ ดี เอ็น เอ เท่ากับเซลล์ร่างกายที่จะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นแบบ ไมโทซิส ต่อไป และเมื่อถึงวัยเจริญพันธ์ก็จะมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ และมีการแบ่งเซลล์แบบ ไมโอซิส จาก 1 เป็น 4 ที่มีจำนวนโครโมโซม และ ดี เอ็น เอ เป็นครึ่งหนึ่งของเซลล์ร่างกาย ลูกจึงเป็นส่วนผสมใหม่ระหว่างสารพันธุกรรมคือ ดี เอ็น เอ ของ พ่อ และ แม่ ที่มีลักษณะเฉพาะตัว

กระบวนการไมโอซิสเป็นกลไกสำคัญที่ทำให้เซลล์สืบพันธุ์มีจำนวนโครโมโซมเพียงครึ่งหนึ่งของเซลล์เดิมหรือที่เรียกว่าแฮพลอยด์เซลล์ (n) การแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซิสแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนต่อเนื่องกัน แต่ทว่าการแบ่งแยกโครโมโซมคู่เหมือนกันเกิดขึ้นเพียงครั้งเดียวเท่านั้น ในแต่ละขั้นตอนยังแบ่งออกเป็นระยะย่อยๆ เพื่อความสะดวกและความเข้าใจดังนี้

1. ไมโอซิส-1 (หรือ MI) เป็นกระบวนการแบ่งนิวเคลียสที่ทำให้จำนวนโครโมโซมลดลงครึ่งหนึ่ง (2n → n) โดยที่โครโมโซมคู่เหมือนกันในเซลล์เดิมแยกออกจากกันไปอยู่ในนิวเคลียสใหม่ตามขั้นตอนดังนี้

<u>ระยะโพรเฟส-1</u> หลังจากที่เซลล์มีการเตรียมพร้อมเกี่ยวกับการสังเคราะห์สารอินทรีย์ต่างๆ เช่นเดียวกับระยะ อินเทอร์เฟสของการแบ่งแบบไมโทซิสแล้ว เหตุการณ์สำคัญที่เกิดขึ้นในระยะโพรเฟส 1 ซึ่งแตกต่างไปจากระยะโพรเฟสของการแบ่งแบบไมโทซิสคือ

(1) การเข้าคู่แนบชิดกันของโครโมโซมคู่เหมือนเรียกว่า ไซแนบซิส (synapsis)

(2) การแลกเปลี่ยนส่วนของโครมาทิด

(3) การแยกตัวของโครโมโซมคู่เหมือนกันออกจากกัน

ระยะโพรเฟส-1 ยังแบ่งออกเป็นขั้นตอนย่อยๆ 5 ขั้นตอนดังนี้

ก. เลปโททีน (leptotene) โครมาทินเริ่มม้วนหดตัวทำให้ปรากฏเป็นโครโมโซมสายยาวและบาง แต่ยังไม่สามารถมองเห็นสายโครมาทิดได้ถนัดในระยะนี้

ข. ไซโกทีน (zygotene) โครโมโซมม้วนหดตัวมากขึ้น โครโมโซมคู่เหมือนกันจับคู่ประกบแนบชิดหรือไซแนบซิสซึ่งกันและกัน ในลักษณะการคล้ายกับการรูดซิบปิด การเข้าคู่แนบชิดกันของโครโมโซมคู่เหมือนกันจะเริ่มต้นตรงจุดเซนโทรเมียร์เสมอ

ค. พะคิทีน (pachytene) โครโมโซมม้วนหดตัวมากยิ่งขึ้น การไซแนปซิสเสร็จสิ้นโดยสมบูรณ์ ในระยะนี้ทำให้โครโมโซมคู่เหมือนเข้าคู่กันสนิทและเริ่มเห็นโครมาทิดชัดขึ้น เรียกแต่ละคู่โครโมโซมนี้ว่า ไบวาเลนต์ (bivalent) หรือบางครั้งเรียกว่า เทแทรดโครโมโซม (tetrad chromosome) เพราะโครโมโซมคู่เหมือนกันที่จับคู่กันเป็นไบวาเลนต์นั้น ประกอบด้วยโครมาทิด 4 สายด้วยกัน

ง. ไดโพลทีน (diplotene) โครโมโซมยังคงม้วนหดตัวสั้นลงต่อไปทำให้โครโมโซมมีความหนามากขึ้น โครมาทิดที่ไซแนปซิสกันอยู่เริ่มแยกตัวออกจากกันในลักษณะการคล้ายกับการรูดซิปเปิดบางกรณีอาจจะคงเหลือไว้ให้เห็นเป็นรอยไขว้บางจุดระหว่างโครมาทิดของโครโมโซมแต่ละแท่ง เรียกรอยไขว้นี้ว่า ไคแอสมา ซึ่งเป็นผลจากการแลกเปลี่ยนส่วนของโครมาทิดของโครโมโซมแต่ละแท่งที่แนบชิดกันอยู่เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า ครอสซิ่งโอเวอร์ (crossingover) อันเป็นผลทำให้เกิดการสลับที่ของยีนในโครโมโซมคู่เหมือนกัน หรือเรียกว่า ยีน รีคอมบิเนชั่น (gene recombination)

จ. ไดอะไคเนซิส (diakinesis) โครโมโซมม้วนหดตัวจนเกือบถึงที่สุด สามารถเห็นโครมาทิดชัดเจน โครโมโซมคู่เหมือนกันหรือไบวาเลนต์จะเคลื่อนตัวเข้าสู่บริเวณแนวกลางเซลล์กระบวนการผ่านเข้าสู่ระยะ เมทาเฟส-1 ต่อไป ในขณะเดียวกัน เยื่อหุ้มนิวเคลียสจะสลายตัวไป

<u>ระยะเมทาเฟส-1</u> โครโมโซมม้วนหดตัวสั้นมากที่สุดในระยะนี้โครมาทิดที่แนบชิดกันแยกตัวออกจากกันโดยสิ้นเชิง โครโมโซมคู่เหมือน หรือ ไบวาเลนต์ยังคงอยู่ข้างเคียงกันและเรียงตัวตามแนวอีเควทอเรียลเพลต อันเป็นการเรียงตัวในสภาพที่พร้อมที่จะแยกตัวออกจากกันและกัน ไปสู่ขั้วตรงข้ามโดยการทำงานของสายใย สปินเดิล การแยกตัวของโครโมโซมในแต่ละไบวาเลนต์เป็นไปแบบสุ่มทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการหมุนเรียงตัวของโครโมโซมคู่เหมือนแต่ละคู่

<u>ระยะอะนาเฟส-1</u> โครโมโซมคู่เหมือนที่ประกอบกันเป็นไบวาเลนต์ในโพรเฟส-1 และเมทาเฟส-1 นั้นแยกตัวออกจากกันในทิศทางตรงข้ามกัน อย่างไรก็ตามโครโมโซมแต่ละแท่งยังประกอบด้วย 2 โครมาทิด ซึ่งเรียกว่า ไดแอดโครโมโซม (dyad chromosome) หรือยูนิวาเลนต์ (univalent)

<u>ระยะเทโลเฟส-1</u> สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันบ้างในระยะเทโลเฟส-1 โดยทั่วไปที่ขั้วตรงกันข้ามของเซลล์เดิมจะมีไดแอดโครโมโซมต่างๆ ที่เคลื่อนที่เข้าสู่ขั้วเดียวกันและจะรวมกันอยู่ภายในเยื่อหุ้มนิวเคลียสเดียวกันทำให้เซลล์นั้นมีนิวเคลียส 2 นิวเคลียส ซึ่งแต่ละ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นิวเคลียสจะมีจำนวนโครโมโซม เพียงครึ่งหนึ่ง (n) ของนิวเคลียสเดิม (2n) แต่ละนิวเคลียสจะผ่านเข้าสู่ระยะพักนี้อย่างรวดเร็ว ซึ่งบางครั้งเรียกช่วงต่อเนื่องนี้ว่า อินเทอร์ไคเนซิส (interkinesis) ก่อนที่จะผ่านเข้าสู่กระบวนการไมโอซิส-2 ต่อไป

2. ไมโอซิส-2 (หรือ M II) นิวเคลียสทั้ง 2 หน่วยที่ยังอยู่ภายในเซลล์เดียวกันจะผ่านกระบวนการแบ่งต่อไป คล้ายกับกระบวนการไมโทซิสโดยผ่านระยะโพรเฟส-2 เมดาเฟส-2 อะนาเฟส-2 ตามลำดับ ในขณะเดียวกันจะเกิดกระบวนการ ไซโทไคเนซิสอย่างรวดเร็วจนกระทั่งเสร็จสิ้นกระบวนการแบ่งเซลล์โดยสมบูรณ์ ได้ผลลัพธ์เป็นแฮพลอยด์เซลล์จำนวน 4 เซลล์

กระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ เริ่มต้นจากการแบ่งเซลล์แบบพิเศษไมโอซิสทำให้เกิดเซลล์ใหม่ 4 เซลล์ แต่ละเซลล์มีจำนวนโครโมโซมเพียงครึ่งหนึ่งของเซลล์เดิมและของเซลล์ร่างกายทั่วไปเซลล์ใหม่ นี้จะผ่านขั้นตอนการเจริญ (development) และการพัฒนาการเปลี่ยนแปลง (differentiation) ต่อไป จนได้เซลล์สืบพันธุ์ที่สมบูรณ์ กระบวนการแบ่งแบบไมโอซิสเป็นพื้นฐานสำคัญยิ่งสำหรับการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเพราะก่อให้เกิดผลลัพธ์สำคัญ 3 ประการ คือ

1.จำนวนโครโมโซมลดลงครึ่งหนึ่ง ($2n \rightarrow n$) ในขั้นตอนแรกของการแบ่งนิวเคลียสแบบ ไมโอซิส ซึ่งเป็นกลไกที่สำคัญยิ่งในอันที่จะรักษาสภาพจำนวน โครโมโซมของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดให้คงที่เสมอ เพราะมิเช่นนั้นจำนวน โครโมโซม ของ ไซโกตที่เกิดจากเซลล์สืบพันธุ์จากพ่อและแม่นั้นจะเพิ่มขึ้นในทุกๆ ชั่วอายุ

2.กระบวนการที่นำไปสู่การลดจำนวนโครโมโซมลงครึ่งหนึ่งนั้นมิได้เป็นไปแบบสุ่มแต่เป็นการแบ่งแยกคู่โครโมโซมคู่ที่เหมือนกันออกไปอยู่ในเซลล์ใหม่แต่ละเซลล์ ซึ่งจะเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์สืบพันธุ์ต่อไป จะเห็นว่ากระบวนการดังกล่าวทำให้เกิดเซลล์สืบพันธ์ ที่มีโครโมโซมตัวแทนเท่ากันทุกเซลล์และมีปริมาณยีนเท่าๆ กันในทุกๆ เซลล์ด้วย มิฉะนั้นแล้วเซลล์สืบพันธุ์ที่มีจำนวนโครโมโซมและยีนที่แตกต่างแปรผันกันอย่างมากก็จะไม่สามารถทำงานหรือมีชีวิตอยู่ต่อไปได้อย่างปกติ อย่างไรก็ตามการแยกคู่ออกจากกันของโครโมโซมคู่เหมือนกันแต่ละคู่จะเป็นไปแบบสุ่มหรือเป็นอิสระต่อกันและกัน (independent assortment) ทำให้เซลล์สืบพันธุ์ที่สร้างขึ้นมานั้นอาจมีโครโมโซมที่มาจากพ่อบ้างและจากแม่บ้างปะปนกันอย่างไม่มีแบบแผนแน่นอน

3. การแยกคู่ของโครโมโซมคู่เหมือน ในกระบวนการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซิสเกิดขึ้นโดยการเข้าคู่แนบชิดกันของโครโมโซมแต่ละคู่ ซึ่งเป็นกลไกที่เปิดโอกาสให้มีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนระหว่างโครโมโซมคู่เหมือนกันนั้น โดยปรากฏการณ์ที่เรียกว่า ครอสซิ่งโอเวอร์ อันเป็นผลให้เกิดมีการรวมตัวกันใหม่ของยีนหรือยีนรีคอมบิเนชันที่จะถ่ายทอดผ่านเซลล์สืบพันธุ์ไปยังรุ่นลูกต่อไป ดังนั้นยีนในโครโมโซมที่ปรากฏอยู่ในรุ่นลูกจึงไม่จำเป็นต้องเหมือนกับยีนในโครโมโซมที่มีอยู่ใน ตัวพ่อ หรือ ตัวแม่

จะเห็นได้ว่ากระบวนการไมโอซิส เปิดโอกาสให้มีการสลับแลกเปลี่ยนส่วนของโครโมโซมและ ยีนเสมอดังกล่าวไว้ในตอนต้น ปรากฏการณ์ทั้งสองอย่างที่เกิดขึ้นในไมโอซิสจะช่วยเสริมซึ่งกันและกันควบคู่กับการเกิดยีนมิวเทชันและการปฏิสนธิแบบสุ่มระหว่างเซลล์สืบพันธุ์จากพ่อและจากแม่ ล้วนแต่มีส่วนส่งเสริมให้เกิดความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรม (genetic variation) อย่างมากมายในสิ่งมีชีวิตที่สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศซึ่งพร้อมเสมอที่จะตอบสนองต่อสภาพการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมตามกาลเวลาจึงไม่เป็นเรื่องที่น่าแปลกประหลาดแต่อย่างไร ที่พบว่าคนทุกคนไม่เหมือนกันเลยแต่ละคนจะมีเอกลักษณ์เป็นของตนเอง แม้กระทั่งพี่น้องที่เกิดจาก พ่อแม่คู่เดียวกันยกเว้นในกรณีลูกแฝดเหมือน (Identical twin) เท่านั้นที่เกิดจากไซโกตเดียวกัน

โครงสร้าง และหน้าที่ของ DNA

DNA (Deoxyribonucleic Acid) เป็นสารเคมีโมเลกุลใหญ่ประกอบด้วย

1) น้ำตาล Deoxyribose

2) เบส (base)

3) หมู่ ฟอสเฟต (phosphate)

รวมกันเข้าเป็นนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเชื่อมโยงกันเป็นอนุกรมโดยมีความยาวเป็นหมื่นๆ ล้านๆ นิวคลีโอไทด์ ขึ้นกับชนิดของสิ่งมีชีวิตเนื่องจากชนิดของเบสจะมีความแตกต่างกัน 4 ชนิด คือ Adenine (A), Cytocine (C), Guanine (G) และ Thymine (T) นิวคลีโอไทด์ที่เรียงตัวเชื่อมโยงกันจะเกิดความแตกต่างกันเมื่อลำดับเบสทั้ง 4 ชนิด ที่เรียงตัวสลับซับซ้อนแตกต่างกันไป ความสลับซับซ้อนจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีลำดับเบสบน ดี เอ็น เอ มากขึ้น เช่น แบคทีเรียจะมีลำดับเบสเรียงตัวกันเป็นหมื่นๆ ตัวในขณะที่คนจะมีลำดับเบสเรียงตัวกันเป็นล้านๆ ตัว

<u>ความสำคัญของ ดี เอ็น เอ</u> คือ

1. โมเลกุลของดีเอ็นเอ (DNA) จะประกอบด้วยสายบันไดเวียน (เวียนขวา) พันกัน 2 สาย (double right handed helix)

2. สายของบันไดเวียนจะประกอบด้วย 2 ส่วนคือ

ก. ส่วนที่ประกอบเป็นเส้น (รูปที่ 2 ก) ได้แก่โมเลกุลของน้ำตาล deoxyribose เชื่อมต่อกันด้วยกรดฟอสฟอริค

ข. ส่วนที่ยื่นออกจากเส้น ได้แก่ base A,T,G และ C

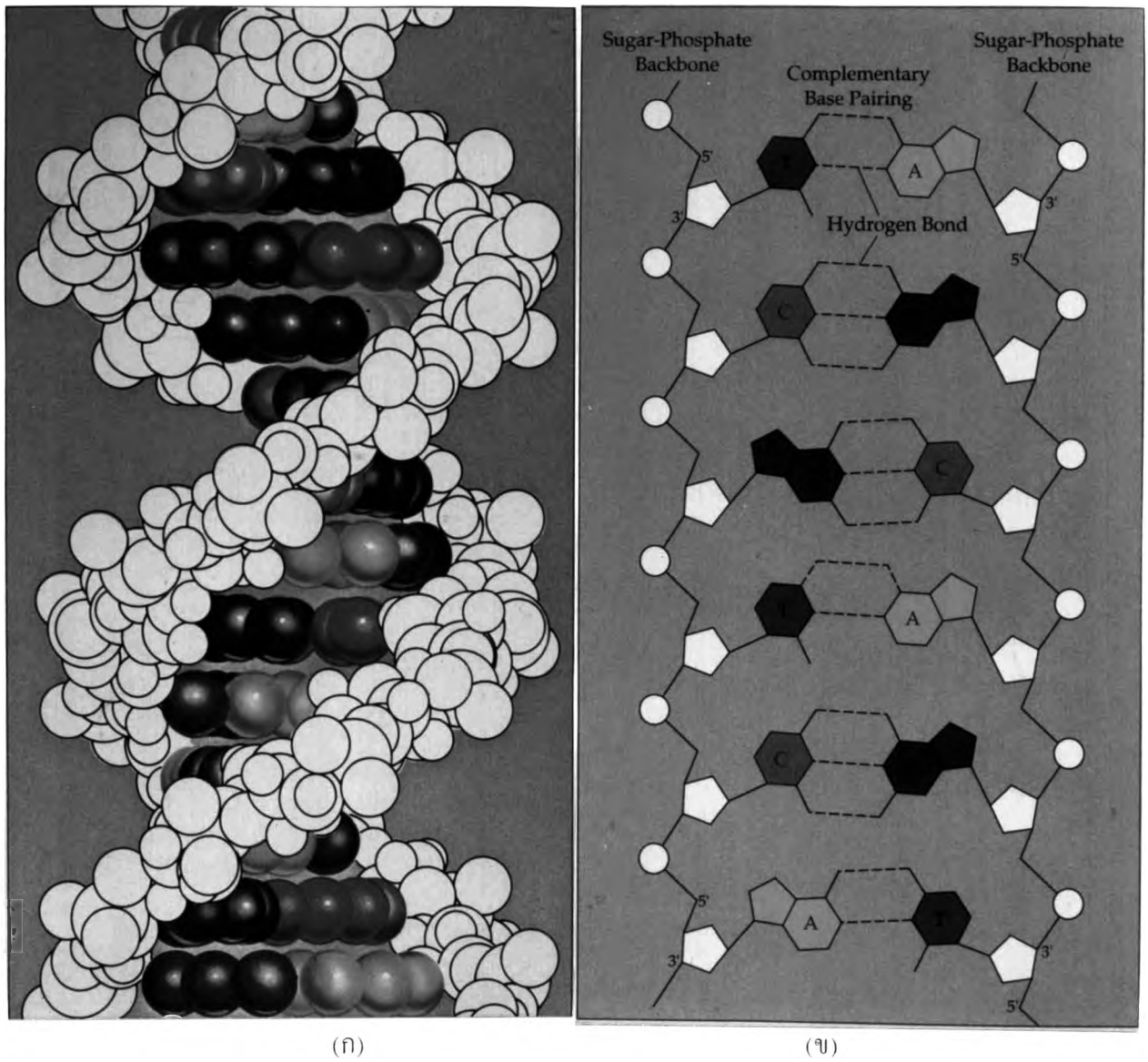
3. base ที่ยื่นออกจากแต่ละเส้น สามารถจะเกาะกันได้ด้วยแรงดึงดูดไฮโดรเจนอย่างอ่อนๆ ซึ่งจะทำให้เส้นบันไดเวียนคงที่อยู่ได้ และการเกาะกันของ base จะเป็นไปดังนี้เท่านั้น

A จะเกาะกับ T

G จะเกาะกับ C [18] (รูปที่ 2 ข)

---

[18] Stryer, L. Biochemistry Fourth edition 1995 p. 81.



(ก) (ข)

รูปที่ 2 แสดงลักษณะโมเลกุล ดีเอ็นเอ (DNA) มีลักษณะเป็นสายบันไดเวียนขวาพันกัน 2 สาย (รูป ก) ประกอบด้วยน้ำตาล deoxyribose กรดฟอสฟอริค และ base ซึ่งจะเกาะกันด้วยพันธะไฮโดรเจน (รูป ข)

เนื่องจาก ดี เอ็น เอ เป็นสารพันธุกรรมที่สามารถถ่ายทอดคุณสมบัติต่างๆ ของสิ่งมีชีวิตหนึ่งๆ ไปยังลูกหลาน ลักษณะเกลียวคู่ของสาย ดี เอ็น เอ นี้เองที่ทำหน้าที่เป็นแม่พิมพ์หรือแม่แบบในการถ่ายทอดลักษณะโดยที่ลูกผู้ได้รับสารพันธุกรรมจะได้รับส่วนของ ดี เอ็น เอ แม่แบบจากพ่อ 1 สายผสมเข้ากับ ดี เอ็น เอ แม่แบบจากแม่อีก 1 สาย ลูกจึงเป็นสิ่งมีชีวิตที่ได้รับสารพันธุกรรมจากพ่อและแม่ แต่ยังคงแสดงความเป็นปัจเจกบุคคลในตัวเอง เพราะเป็นส่วนผสมใหม่ระหว่างสารพันธุกรรมของพ่อและแม่ อย่างไรก็ตาม แบบแผนและลำดับของ ดี เอ็น เอ โดยรวมๆ ของทุกคนจะเหมือนกัน

จะมีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่มีความแตกต่างกันในแต่ละบุคคล ซึ่งเป็นรายละเอียดที่เล็กลงไปแต่จะมีผลที่ทำให้ แต่ละบุคคลมีลักษณะที่แตกต่างกัน (polymorphism) เกิดขึ้น

1.3.2 วิธีการตรวจหาลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ (DNA Fingerprinting)

การสร้างลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ ใช้หลักการตรวจสอบความแตกต่างของรหัสพันธุกรรมของร่างกาย จากการศึกษาทางอณูพันธุศาสตร์พบว่า ลำดับของเบสบน ดี เอ็น เอ ในคนนั้นมี "ลำดับเบสจำเพาะ" ขนาดสั้นๆ ที่มีจำนวนซ้ำๆ กันกระจายไปทั่วบนเส้น ดี เอ็น เอ ลำดับเบสจำเพาะชุดซ้ำๆ นี้เองที่มีบทบาทสำคัญในการให้ลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ ของแต่ละบุคคลแตกต่างกันอันเป็นลักษณะเฉพาะบุคคล เพราะแต่ละบุคคลมีตำแหน่งการกระจายของลำดับเบสจำเพาะที่แตกต่างกัน และเมื่อทำการตัดย่อยเส้น ดี เอ็น เอ ให้เป็นชิ้นเล็กๆ ด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ที่เหมาะสมจะทำให้เกิดแบบแผนของการกระจายลำดับเบสจำเพาะนั้นอย่างเป็นเอกลักษณ์เฉพาะคนเรียกว่า Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ซึ่งหลังจากการนำไปวิเคราะห์โดยการนำเอาลำดับจำเพาะชุดซ้ำๆ นั้นมาเป็นตัวตรวจตาม (probe) จะปรากฏเป็นลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ ที่เป็นแถบเหมือนแถบ Bar Code ลำดับเบสจำเพาะที่นำมาใช้เป็นตัวตรวจตามนี้สามารถนำมาจาก ดี เอ็น เอ ของคนโดยวิธีการทางพันธุวิศวกรรมได้ แต่ในปัจจุบันพบว่าลำดับเบสจำเพาะใน ดี เอ็น เอ ของไวรัสชนิดหนึ่ง (M13) ที่มีขนาดประมาณ 15 นิวคลีโอไทด์สามารถนำมาใช้เป็นตัวตรวจตาม และให้ลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ ของคนได้เช่นกัน[19]

ดี เอ็น เอ ตรวจสอบ (DNA Probe) ขณะนี้ได้มีรายงานการใช้ลำดับเบสแบบซ้ำๆ เพื่อศึกษาลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ อยู่หลายชนิดด้วยกัน อย่างไรก็ดีมีคณะผู้วิจัยอยู่ 2 กลุ่มที่ได้รายงานการตรวจสอบลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ โดยกลุ่มแรกเป็นผลงานของ Professer A.J. Jeffrey และคณะได้ทำการศึกษาลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ โดยใช้ ดี เอ็น เอ ตรวจสอบ (DNA probe) ที่มีลำดับเบสแบบซ้ำๆ และได้เรียกชื่อลำดับเบสแบบซ้ำ นี้ว่า DNA minisatellite ซึ่งแยกได้จากยีน myoglobin ของคน

กลุ่มที่สองเป็นผลงานของ G. Vassart และคณะ พบว่าไวรัสชนิด M13 bacterio phage มี DNA minisatellite ที่สามารถตรวจพบ minisatellite ในคนได้

---

[19] สุมาลี ตั้งประดับกุล "ลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ" วารสาร**Up date** (มีนาคม 2537), หน้า 60-65.

1.3.2.1 วิธีการตรวจลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ ด้วยเทคนิค Restriction Fragment Length Polymerphism (RFLP)

การหาลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ ในทางปฏิบัติอาจแบ่งเป็นขั้นตอนต่างๆ (ดังรูปที่ 3) ได้ 6 ขั้นตอนคือ

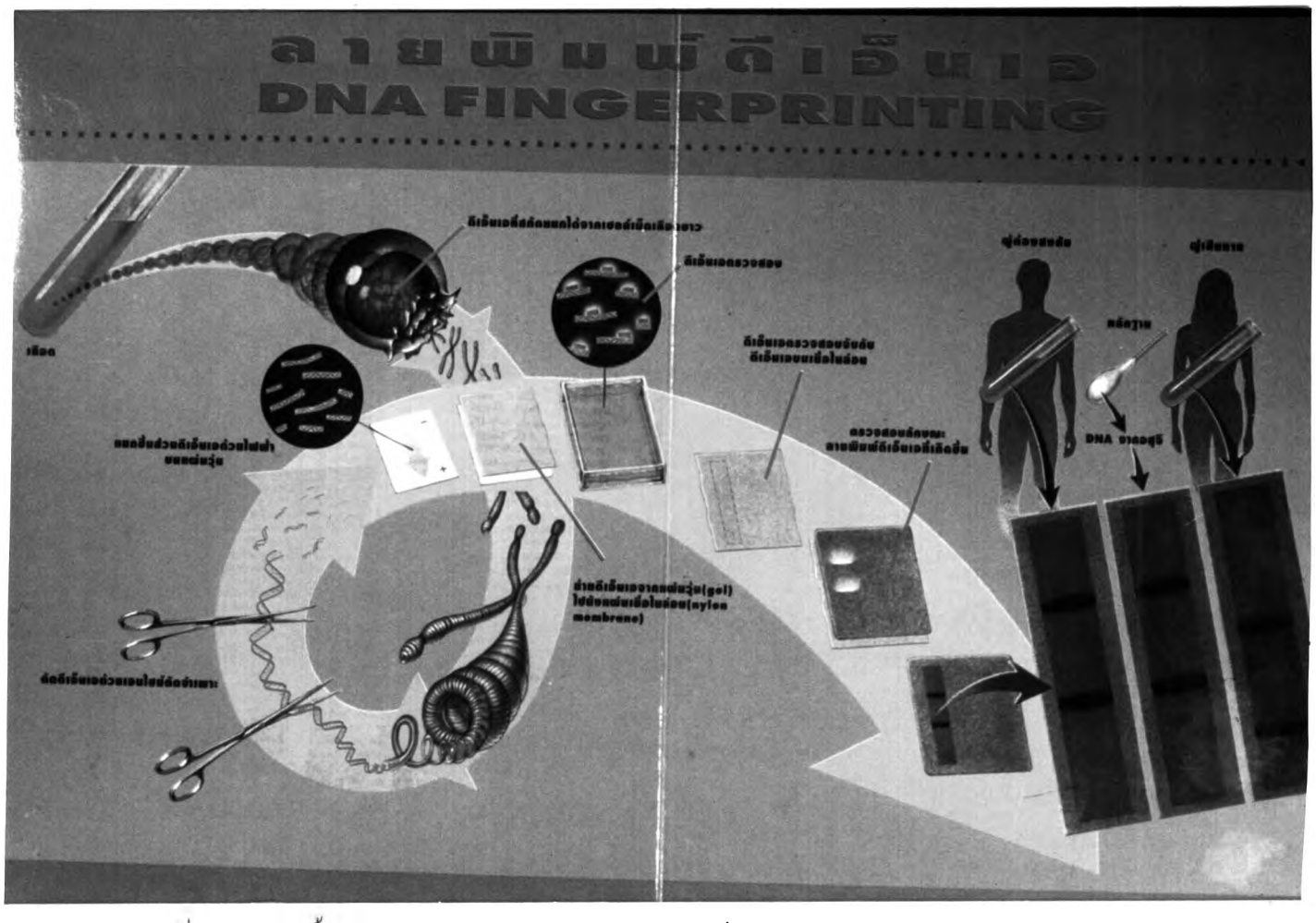
1) ขบวนการสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction) เป็นขั้นตอนการเตรียม ดี เอ็น เอ โดยการสกัดแยก ดี เอ็น เอ จากโครโมโซมของคนที่ได้จากเลือดตัวอย่างซึ่งมักจะใช้เม็ดเลือดขาว เป็นตัวอย่างตรวจเพราะเลือดเป็นส่วนของเซลล์ที่ร่างกายมีการสร้าง และทำลายอยู่ตลอดเวลาสามารถดึงหรือนำออกมาได้สะดวกและเป็นหลักฐานที่มักพบในที่เกิดเหตุ

วิธีการสกัดแยก ดี เอ็น เอ ที่ใช้โดยทั่วไปเริ่มจากการละลายเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell menbrane) ด้วยสารละลาย SDS (Sodium dodecyl Sulfate) และทำการย่อยโปรตีนที่ประกอบอยู่ในเซลล์เม็ดเลือดด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteinase) จากนั้นทำการแยกตะกอนโปรตีนที่ไม่ถูกย่อย และโปรตีนที่ยังย่อยไม่สมบูรณ์จากส่วนของ ดี เอ็น เอ โดยใช้ phenol-chloroform ตะกอนโปรตีนจะอยู่ใน ชั้นของ phenol-chloroform ส่วนสารละลาย ดี เอ็น เอ จะอยู่ในชั้นน้ำถึงแม้ว่าวิธีการสกัดแยก ดี เอ็น เอ จากเม็ดเลือดขาวโดยใช้ phenol-chloroformจะให้ผลที่ดีแต่เป็นวิธีที่ยุ่งยากใช้เวลานาน นอกจากนี้สารระเหย phenol และ chloroform ยังเป็นอันตรายต่อ ผิวหนังและเยื่อบุตาอีกด้วย วิธีที่นิยมใช้มากในปัจจุบันจึงได้แก่ การทำ salting out โดยอาศัยหลักการใช้เกลือเข้มข้นทำให้โปรตีนตกตะกอนแยกลงมาจากสารละลาย ดี เอ็น เอ วิธีการนี้สามารถสกัด ดี เอ็น เอ ได้คุณภาพและปริมาณ เทียบเท่ากับการสกัดด้วย phenol-chloroform และเป็นวิธีที่ง่าย ประหยัดเวลา และไม่เป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติการ

คุณภาพและปริมาณ ดี เอ็น เอ เป็นปัจจัยสำคัญประการแรกในการกำหนดความชัดเจน ความถูกต้องและแม่นยำของผลการตรวจสอบลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ โดยทั่วไปมักขึ้นอยู่กับลักษณะของตัวอย่างที่ส่งตรวจและความบริสุทธิ์ของ ดี เอ็น เอ ปริมาณเลือดที่น้อยที่สุดที่สามารถนำมาวิเคราะห์ลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ คือประมาณ 0.5 มิลิลิตร หรือประมาณ ครึ่งซีซี

2) ขบวนการตัดสายดีเอ็นเอ (DNA Digestion) เป็นการนำ ดี เอ็น เอ ที่สกัดได้จากสิ่งส่งตรวจเช่นเลือดหรืออสุจิและนำมาตัดด้วยเอมไซม์ ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ชนิดต่างๆ เพื่อให้ ดี เอ็น เอ มีขนาดเล็กลงและแตกต่างกันเนื่องจาก ดี เอ็น เอ ที่สกัดได้จะมีลักษณะเป็นเส้นยาวๆ จึงต้องนำมาตัดย่อยเพื่อศึกษาเฉพาะส่วนที่ต้องการ ในทางปฏิบัติ ดี เอ็น เอ ที่สกัดได้จะถูกนำมาตัดย่อยด้วยเอ็นไซม์จำเพาะชนิดต่างๆ ในสภาวะที่เหมาะสม ส่วนใหญ่มักใช้เอนไซม์ที่จับลำดับนิวคลีโอไทด์ 4 ตัว เช่น Hae III, Sau 3 AI หรือ Hinf I เป็นต้น เอ็นไซม์ เหล่านี้จะต้องไม่

เข้าไปตัดย่อยภายในส่วนของ VNTR หรือจะต้องไม่เข้าไปตัด-ย่อยภายในส่วนของ minisatellite* ผลจากการตัดย่อยจะได้ชิ้นส่วน ดี เอ็น เอ ขนาดต่างๆ จำนวนนับล้านชิ้นและในจำนวนนี้ก็มีส่วนของ VNTR** ขนาดต่างๆ ประกอบอยู่ด้วย



รูปที่ 3 แสดงขั้นตอนการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เพื่อใช้ตรวจสอบบุคคลในคดีข่มขืนในงานนิติเวชศาสตร์[20]

---

*"minisatellite" เป็นกลุ่มของรหัสพันธุกรรมที่มีลำดับเบสซ้ำ ๆ กันกระจายอยู่ในสาย ดี เอ็น เอ

**VNTR หมายถึง จำนวนครั้งของกลุ่มรหัสพันธุกรรมที่มีลำดับเบสซ้ำกันตัวอย่างของลำดับเบสที่ซ้ำกันนี้ อาจเขียนได้ $(GATA)_n$ ซึ่ง n แทนจำนวนครั้งของการซ้ำ และความแตกต่างของจำนวน n บน สาย DNA เรียกว่า Variable Nunber Tandem repeat ซึ่งก็คือ VNTR นั้นเอง

[20] แผ่นพับเรื่องลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ โดย วิชัย บุญแสง และ สกล พันธุ์ยิ้ม 2538.

3) ขบวนการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (Gel Electrophoresis) เป็นการแยกชิ้นส่วน ดี เอ็น เอ ด้วยกระแสไฟฟ้าบนตัวกลางวุ้น (Agarose Gel Electrophoresis) อาศัยหลักการที่ ดี เอ็น เอ มีโครงสร้างที่ประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟต ทำให้มีประจุเป็นลบ เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าก็จะถูกผลักให้เคลื่อนที่จากขั้วลบไปสู่ขั้วบวกถ้า ดี เอ็น เอ มีขนาดใหญ่จะผ่านตัวกลางวุ้นได้ช้ากว่า ดี เอ็น เอ ขนาดเล็ก ทำให้ ดี เอ็น เอ ขนาดเล็กเคลื่อนที่ไปได้ไกลกว่า ดี เอ็น เอ ขนาดใหญ่ หลักการดังกล่าวนี้ ทำให้เกิดการจัดเรียงตัวของชิ้นส่วนของ VNTR ตามขนาดชิ้นส่วนของ ดี เอ็น เอ ที่ถูกตัด-ย่อย

4) ขบวนการ ติดฉลาก ดี เอ็น เอ การติดฉลาก ดี เอ็น เอ ในขบวนการตรวจสารพันธุกรรมโดยใช้ DNA Probe จำเป็นต้องมีการติดฉลาก ดี เอ็น เอ เพื่อติดตามผลการตรวจจับของ probe ซึ่งสามารถกระทำได้ทั้งวิธีการใช้สารกัมมันตรังสี (Radioactive Labeling) และสารปลอดกัมมันตรังสี (NonRadioactive Labeling) การติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีจะให้ความไว (Sensitivity) ในการตรวจสูง แต่เป็นวิธีที่อันตรายต้องการวิธีปฏิบัติอย่างถูกต้อง ส่วนการใช้สารปลอดรังสีให้ความไวที่ต่ำกว่า แต่เป็นวิธีที่ง่ายและปลอดภัย การใช้สารปลอดรังสีจึงเป็นวิธีการที่ได้รับความนิยมมาก ทั้งสองวิธีใช้การติดฉลากโดย primer Extension ซึ่งจะสามารถเลือกใช้ Primerแบบสุ่ม (Random Hexanucleotide Primer Labeling) และ Primer แบบจำเพาะ (specific prime- Labeling) ดังนี้

4.1 <u>ไพเมอร์ แบบสุ่ม</u>

เป็นการติดฉลาก ดี เอ็น เอ probe ด้วยไพรเมอร์แบบสุ่มจำนวน 6 เบส ได้จากการดัดย่อย ดี เอ็น เอ Calf thymus ด้วยเอ็นไซม์ DNase I หรืออาจได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี ไพรเมอร์จะไปจับกับ ดี เอ็น เอ ต้นแบบ (template) ที่มีลำดับเบสคู่สม (complementary) ไพรเมอร์นี้จะเป็นตัวตั้งต้นในการสร้าง ดี เอ็น เอ สายใหม่โดยใช้ เอ็นไซม์ Large (klenow) fragement of DNA polymerase

เอ็นไซม์ Large (klenow) fragment of DNA polymerase นี้เป็นส่วนของเอ็นไซม์ E.Coli DNA polymerase ที่ถูกย่อยโปรตีนส่วนที่เร่งปฏิกริยาที่ไม่เกี่ยวข้องออก จึงเหลือแต่ส่วนเร่งปฏิกริยาที่ทำให้เอ็นไซม์นี้สามารถสร้าง ดี เอ็น เอ ได้โดย ดี เอ็น เอ ต้นแบบเป็นตัวควบคุมลำดับเบส ดี เอ็น เอ สายใหม่ที่สร้างขึ้น

4.2 <u>ไพรเมอร์ แบบจำเพาะ</u>

การใช้ไพรเมอร์แบบจำเพาะเป็นวิธีที่ถูกพัฒนาขึ้นแทนการใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มไพรเมอร์จำเพาะนี้เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ขนาด 13 เบส คือ 5' AGCGTTTGCCATC 3' ซึ่งเข้าจับกับไวรัสbacteriophage M13 ณ ตำแหน่ง 2417 - 2429 จากนั้นจะทำการสร้าง ดี เอ็น เอ สายใหม่ขึ้นเช่นเดียวกับการใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม ดี เอ็น เอ M13 ที่ติดฉลากด้วยวิธีนี้จะให้แบบแผนของลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ ที่ดีกว่าการใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม และปัจจุบันได้นำเทคนิคการใช้ไพรเมอร์จำเพาะนี้

มาใช้ในการติดฉลาก ดี เอ็น เอ M13 โดยไม่ใช้สารกัมมันตรังสี ซึ่งทำให้อายุการใช้งานของ probe นานขึ้น และมีความปลอดภัยสำหรับผู้ปฏิบัติงานมากขึ้น

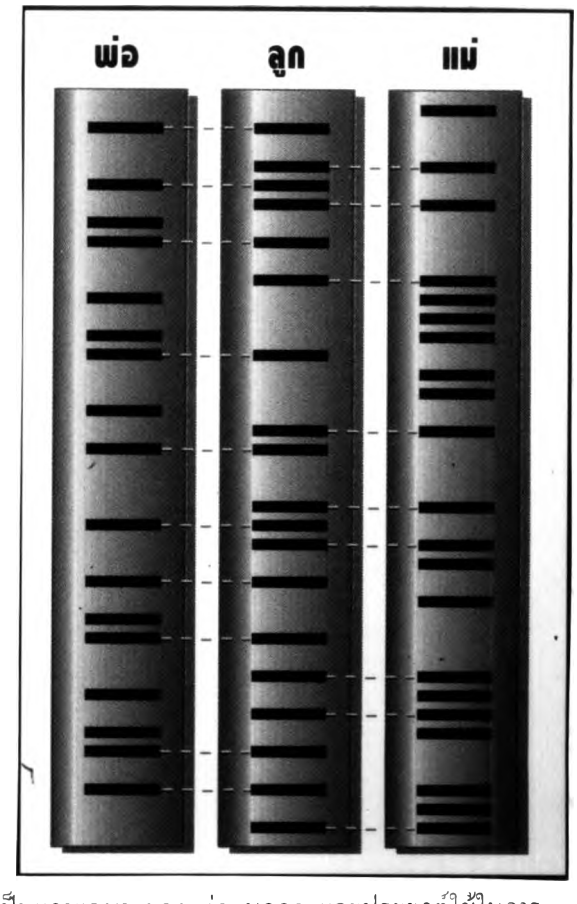
5) ขบวนการ DNA hybridization

Nucleic acid hybridization เป็นขบวนการสำคัญที่ใช้ในการตรวจสอบสารพันธุกรรมด้วย ดี เอ็น เอ probe การไฮบริดไดเซชั่นเกิดได้ทั้ง สภาวะที่ตัวตรวจสอบกับสารพันธุกรรมที่จะตรวจสอบต่างอยู่ในรูปของสารละลาย หรือตัวตรวจสอบละลายอยู่ในตัวทำละลาย ในขณะที่สารพันธุกรรมที่ตรวจสอบถูกตรึงติดกับแผ่นตัวค้ำจุนที่เป็นของแข็ง

ขบวนการนี้เริ่มจากการทำให้ ดี เอ็น เอ probe และ ดี เอ็น เอ ที่ถูกตรวจสอบเสียสภาพ (denatrue) กลายเป็น ดี เอ็น เอ สายเดี่ยว จากนั้นนำมาผสมและปล่อยให้ hybridize กันโดยหลักการของเบสคู่สมที่เบส A จับกับ T และ G จับกับ C

6) ขบวนการ Autoradiography

ขั้นตอนสุดท้ายในการสร้างลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ คือ การตรวจตามการทำ DNA hybridization ว่าเป็นอะไร ถ้าเป็นสารกัมมันตรังสีสามารถตรวจตามผลโดยประกบ filter ลงบนแผ่น X-ray จะปรากฏแบบแผนที่เป็นแถบเฉพาะของแต่ละบุคคลบนแผ่นเอกซ์เรย์ ซึ่งจะมีลักษณะเหมือน แถบ Bar Code ที่ติดอยู่ตามสินค้าต่างๆ ถ้าเป็นการใช้สารปลอดกัมมันตรังสีก็จะต้องมีสารเกาะติด Binding Component และสารรายงานผล Reporter Group ซึ่งปรากฏเป็นแบบแผนที่เฉพาะของแต่ละบุคคลเช่นเดียวกัน (ดูรูปที่ 4)



รูปที่ 4 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นแถบเฉพาะของแต่ละบุคคล และประยุกต์ใช้ในการตรวจความเป็นพ่อ แม่ ลูก

คือ ลักษณะแถบดีเอ็นเอของแต่ละคน

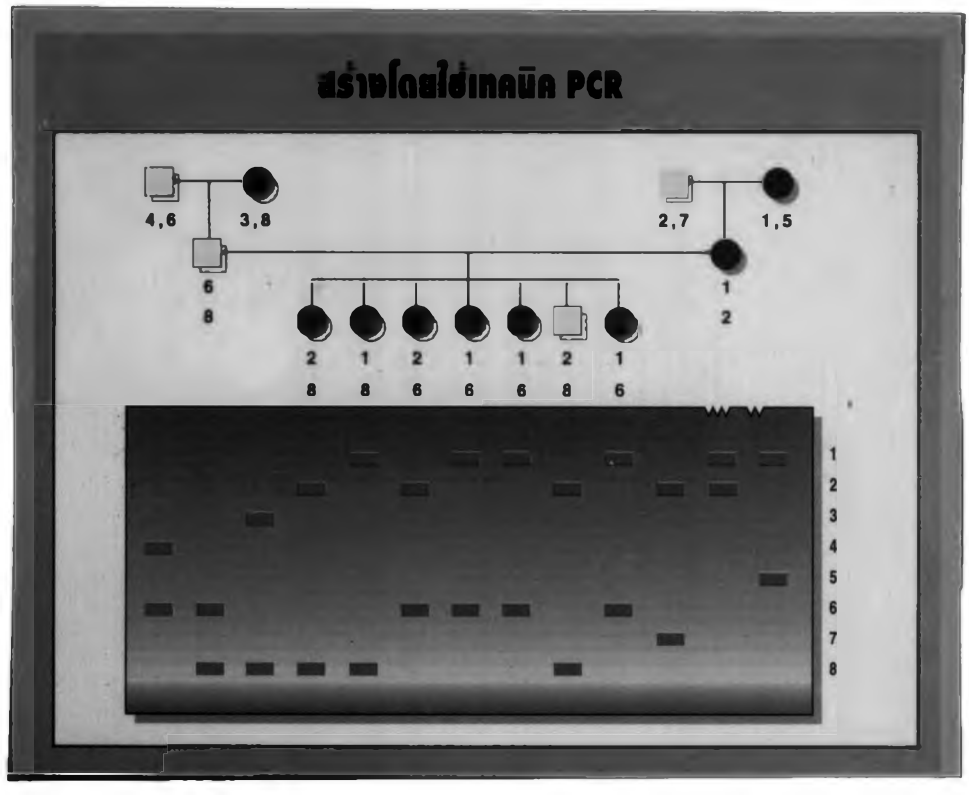
คือ แถบดีเอ็นเอของลูกที่ตรงกับพ่อ หรือแม่เสมอ ขณะที่แถบดีเอ็นเอของพ่อ และแม่จะต่างกัน

1.3.2.2 วิธีการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR)

การเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค Polymerase chain Reaction หรือที่นิยมเรียกสั้นๆ ว่า PCR เป็นการเพิ่มปริมาณ ดี เอ็น เอ แบบวงจรในหลอดทดลองโดยอาศัยเอ็นไซม์ DNA polymerase ที่ทนต่อความร้อน PCR ค้นพบโดย K. Mullis ในปี 2528 ทำให้เกิดวิธีการใหม่ในการเพิ่มปริมาณ ดี เอ็น เอ เป็นล้านๆ เท่าในเวลาอันสั้น ปัจจุบัน PCR ได้รับการนำมาประยุกต์ใช้เพิ่มปริมาณ ดี เอ็น เอ เพื่อการเสาะแสวงหายีน เพื่อการวินิจฉัยโรครวมทั้งการสร้างลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ

PCR มีหลักการและวิธีการที่ง่ายจึงได้รับการนิยมแพร่หลาย ปฏิกิริยามีองค์ประกอบ 3 อย่าง คือ DNA template, substrates และ เอ็นไซม์ โดย DNA template เมื่อเริ่มต้นเป็น ดี เอ็น เอ เกลี่ยวคู่ที่ถูกแยกเป็น ดี เอ็น เอ เส้นเดี่ยวด้วยความร้อน เมื่ออุณหภูมิลดลง primers ซึ่งเป็น oligonucleotide ขนาดประมาณ 20-30 เบส ซึ่งมีลำดับเบสเป็นคู่สมกับลำดับเบสใน ดี เอ็น เอ template ก็จะเข้ามาจับที่ตำแหน่งเบสคู่สมทำให้เอ็นไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาการเพิ่มเบสที่ปลายข้าง 3'-end ของ primers ทำให้เกิด ดี เอ็น เอ เส้นคู่ชุดใหม่จำนวน 2 ชุด เมื่อถูกความร้อน ดี เอ็น เอ 2 ชุด ก็จะแยกเป็น ดี เอ็น เอ เส้นเดียว 4 เส้น ซึ่งเมื่อลดอุณหภูมิลงก็จะจับกับ primers ซึ่งมีอยู่ในปริมาณมาก (มากกว่า ดี เอ็น เอ template ประมาณ 1 ล้านเท่า) ทำให้ เอ็นไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาการเพิ่มเบสที่ปลายข้าง 3'-end ของ primer จนเกิด ดี เอ็น เอ เส้นคู่ชุดใหม่จำนวน 4 ชุด เมื่อถูกความร้อน ดี เอ็น เอ ดังกล่าวจะแยกเป็นเส้นเดี่ยว 8 สาย ซึ่งจะจับกับ primer สร้างเป็น ดี เอ็น เอ เส้นคู่ 8 ชุด ในรอบการเกิดปฏิกิริยารอบที่ 3 เมื่อถึงรอบที่ 4 ก็จะได้ ดี เอ็น เอ เส้นคู่ 16 ชุด เป็นการเพิ่มปริมาณ ดี เอ็น เอ แบบทวีคูณในปริมาณ 2^n เมื่อ n เป็นจำนวนรอบของปฏิกิริยา เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปได้ 20 รอบ จะได้ ดี เอ็น เอ จำนวน 2^{20} ชุด หรือประมาณ 1 ล้านเท่าของ ดี เอ็น เอ เริ่มต้นนั่นเอง

ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิค PCR มาใช้ในการตรวจสอบบุคคลมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่ตัวอย่างส่งตรวจ เช่น คราบเลือด คราบอสุจิ หรือเส้นผม ซึ่งสิ่งส่งตรวจเหล่านี้มีปริมาณ ดี เอ็น เอ น้อยไม่สามารถนำมาใช้ในการตรวจลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ ตามวิธีปกติได้ แต่ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์สามารถตรวจและนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจความเป็นพ่อ แม่ ลูก ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ ดังแสดงในรูปที่ 5 (หน้าถัดไป)



รูปที่ 5 แสดงแผนภาพการตรวจลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ โดยใช้เทคนิค PCR กรณีตรวจสอบความเป็นพ่อแม่ลูก

ผู้ชาย

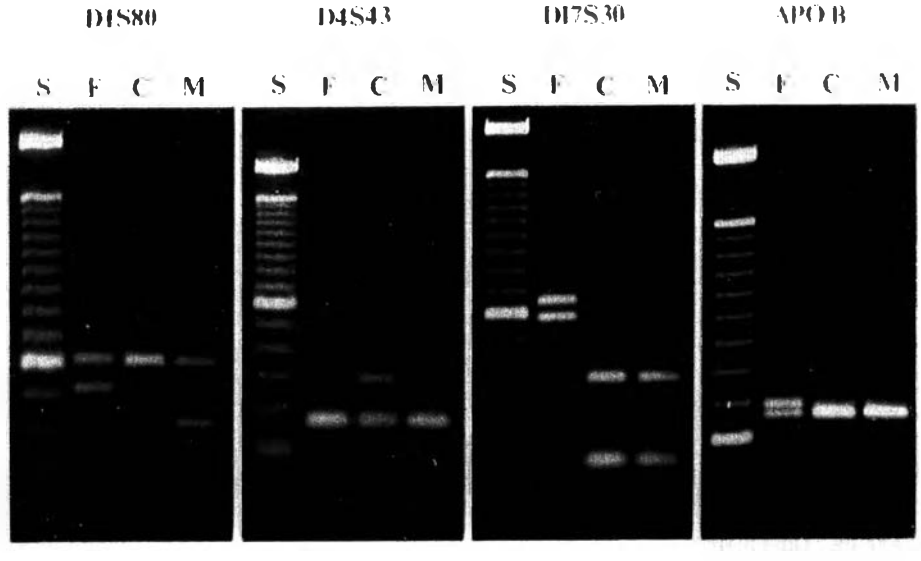
ผู้หญิง

แถบ ดี เอ็น เอ

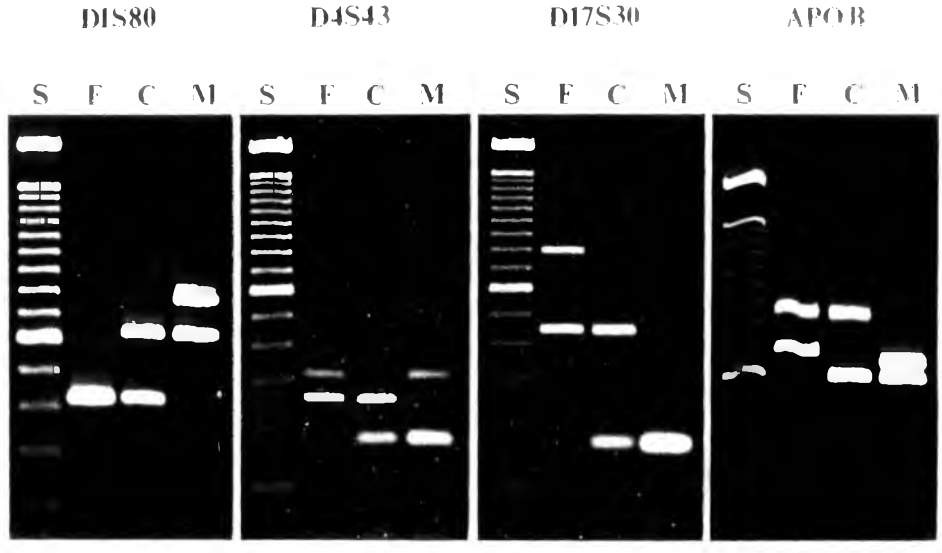
1.3.2.3 **ตัวอย่างการแปลผลการตรวจลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ และกรณีศึกษา**

ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้ทำการศึกษาและพัฒนางานวิจัย การตรวจลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ ทั้งวิธีการใช้เทคนิค PCR และ Probe โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ดร.วิชัย บุญแสงและคณะ ได้นำการพิสูจน์ลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ มาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบบุคคล และความเป็นพ่อ-แม่-ลูก ซึ่งในปัจจุบันได้มีการพิสูจน์ไปแล้วกว่า 30 ครอบครัว

วิธีการแปลผลการทดลองอาศัยหลักการที่ว่าแถบ ดี เอ็น เอ ของลูกจะต้องเหมือนกับแถบ ดีเอ็นเอ ของพ่อครึ่งหนึ่งและของแม่ครึ่งหนึ่ง ดังนั้นในการแปลผลการทดลองจะต้องปรากฏว่าแถบ ดี เอ็น เอ ของลูกจะต้องตรงกับ แถบ ดี เอ็น เอ ของพ่อหรือแถบ ดี เอ็น เอ ของแม่เสมอและแถบ ดี เอ็น เอ ใดของลูกที่ไม่ตรงกับของแม่จะต้องตรงกับของพ่อเสมอ หากแถบ ดี เอ็น เอ นั้นไม่ตรงกับของพ่อ แสดงว่าบุคคลดังกล่าวมิใช่ พ่อ-ลูกกัน



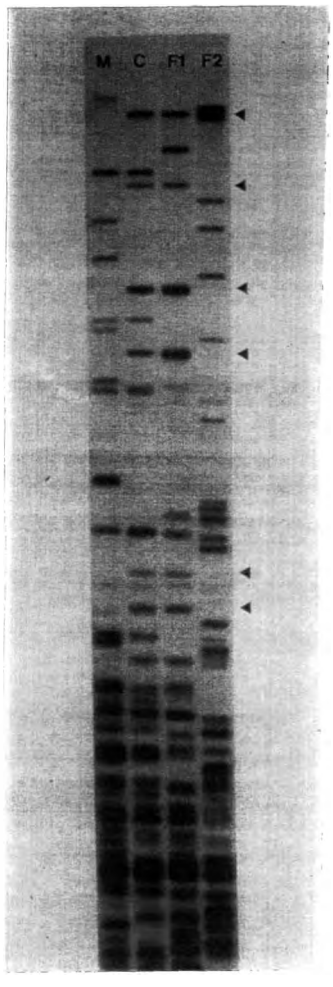
รูปที่ 7 แสดงผลการตรวจลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ โดยใช้เทคนิค PCR ตรวจสอบที่ตำแหน่ง DIS80 D4S43 D17S30 APOB ซึ่งผลการทดลองพบว่า ในบางตำแหน่งที่แถบ ดี เอ็น เอ ของลูกไม่เหมือนกับแถบ ดี เอ็น เอ ของแม่ แถบ ดี เอ็น เอนั้นก็ไม่เหมือนกับแถบ ดี เอ็น เอ ของพ่อที่ต้องการตรวจสอบ จึงแสดงว่า เด็กมิใช่บุตรของผู้ที่ต้องการพิสูจน์ (มิใช่พ่อลูกกัน) เชื่อถือได้ 100%



รูปที่ 8 แสดงผลการตรวจลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ โดยใช้เทคนิค PCR เพื่อพิสูจน์บุตรของครอบครัวหนึ่ง ซึ่งพบว่า แถบ ดี เอ็น เอ ของลูก จะตรงกับแถบ ดี เอ็น เอ ของพ่อหรือแม่เสมอ ควรจะเป็นบุตรที่แท้จริง แต่สรุป 100% ไม่ได้

ในการที่ให้ความเชื่อมั่นได้อย่างแน่นอน จึงจำเป็นต้องใช้ Multilocus Probe เช่น ใช้ ดี เอ็น เอ จาก M13 มาเป็นตัวตรวจสอบ (DNA probe) ซึ่งได้มีการวิจัยโดยกลุ่มของ ดร.วิชัย บุญแสง ที่ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้สร้างลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ โดยวิธีนี้ได้แถบ Bar Code ประมาณ 20 แถบ จากการคำนวณพบว่า โอกาสที่คนสองคนจะมีลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ เหมือนกันโดยบังเอิญจะมีน้อยกว่าหนึ่งในพันล้าน

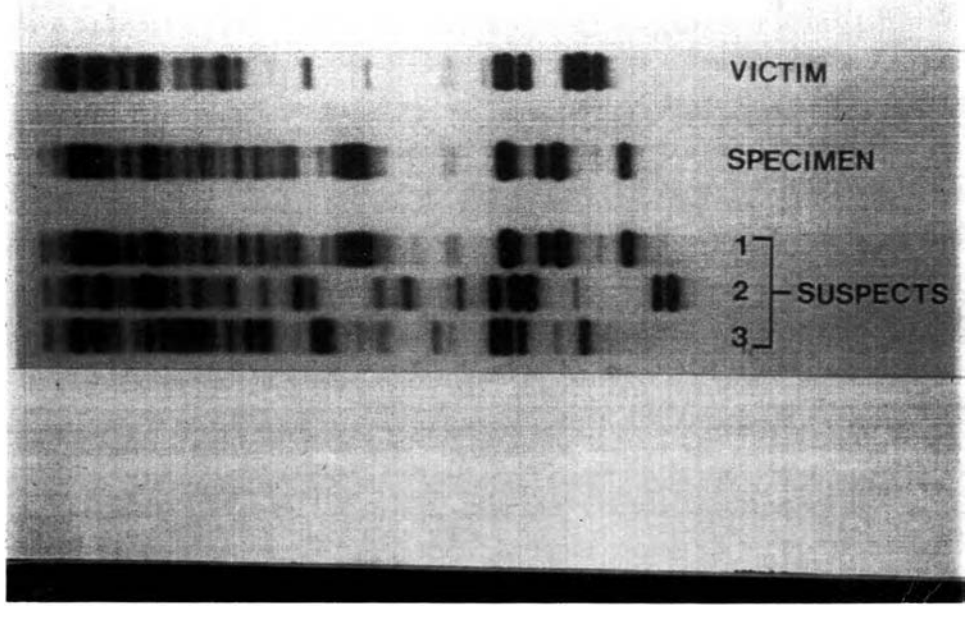
แม่ ลูก พ่อ? พ่อ?

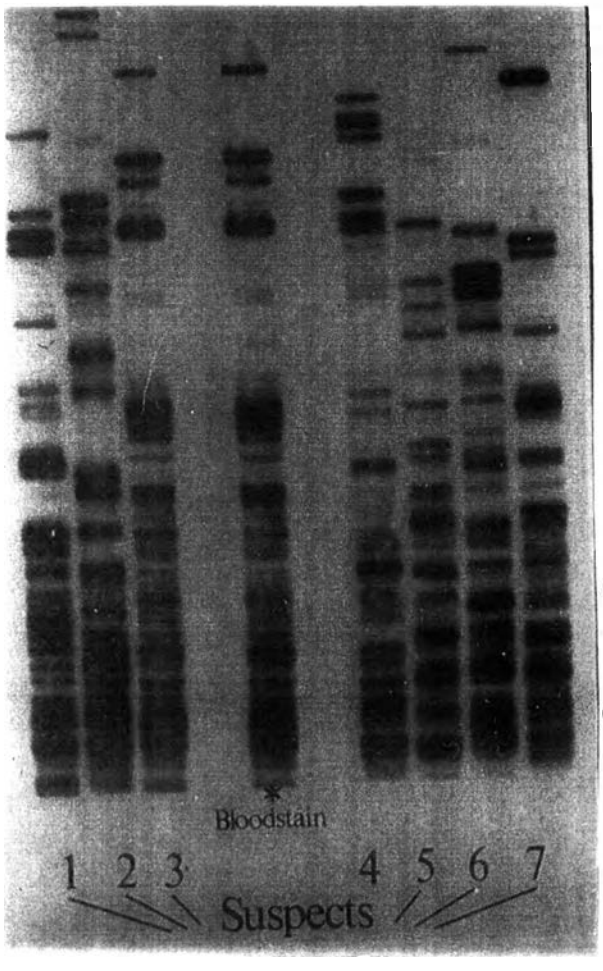


รูปที่ 9 แสดงผลการตรวจลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ เพื่อพิสูจน์ว่า บุตร (C) เป็นบุตรของพ่อ (F1) หรือ (F2) ผลการตรวจพบว่า แถบ ดี เอ็น เอ ของลูก (C) ในตำแหน่งที่ไม่ตรงกับ แถบ ดี เอ็น เอ ของแม่ จะตรงกับแถบ ดี เอ็น เอ ของ F1 เสมอ แต่บางตำแหน่งจะไม่ตรงกับ F2 ซึ่งแสดงว่า ลูก (C) เป็นบุตรของ F1 อย่างแน่นอน

⇦ แสดงแถบ ดี เอ็น เอ ของลูก ในตำแหน่งที่ไม่ตรงกับ แถบ ดี เอ็น เอ ของแม่ แต่จะตรงกับแถบ ดี เอ็น เอ ของ F1 เสมอ

รูปที่ 10ก แสดงผลการตรวจลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ จากคราบอสุจิที่พบบริเวณช่องคลอดของเหยื่อในสถานที่เกิดเหตุของผู้ต้องสงสัย (Suspect) 3 คน ซึ่งพบว่าคราบอสุจิในที่เกิดเหตุเป็นของผู้ต้องสงสัย คนที่ 1 เนื่องจากให้ลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ ที่เหมือนกัน





รูปที่ 10 ข แสดงผลการตรวจลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ จากคราบเลือดในที่เกิดเหตุ เปรียบเทียบกับลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ ที่ได้จากการตรวจเลือดของผู้ต้องสงสัย 7 คน พบว่าลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ ที่ได้จากการตรวจคราบอสุจิในที่เกิดเหตุเหมือนกับลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ ของผู้ต้องสงสัยคนที่ 3 แสดงว่าคราบเลือดในที่เกิดเหตุเป็นของผู้ต้องสงสัยคนที่ 3 โดยมีระดับความเชื่อมั่นที่โอกาสของบุคคลจะมีลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ ซ้ำกันโดยบังเอิญเท่ากับ 1 ใน 100 ล้านล้านคน

Y = แถบลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ ที่ได้จากการตรวจคราบเลือดในสถานที่เกิดเหตุ

(1-7) = แถบลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ ที่ได้จากการตรวจเลือดผู้ต้องสงสัย 7 คน