บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความหลากหลายของดีออกซิไรโบนิวคลีอิก (DNA polymorphisms)

ความหลากหลายของดีออกซิไรโบนิวคลีอิก (DNA polymorphisms) เป็นความแตกต่างของลำดับเบสบนสายดีออกซิไรโบนิวคลีอิก (deoxyribonucleic acid; DNA) ที่ตำแหน่งต่างๆ ในจีโนม (genome) ของคน ซึ่งสามารถพบได้ทั้งภายในบุคคลเดียวกันและระหว่างบุคคล โดยคนจะมีโครโมโซม (chromosome) จำนวน 2 ชุด (2n) และในแต่ละบุคคลจะมีความแตกต่างใน DNA หรือ chromosome ทั้งสองชุดได้ทุก 500-1000 เบส สาเหตุของการเกิด DNA polymorphisms (กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ. 2549; คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2546; Buckingham. 2007) ได้แก่

- การเปลี่ยนของเบสตัวเดียว พบทั้งการแทนที่เบสปกติด้วยเบสอื่น และการเพิ่ม (insertion) หรือหายไป (deletion) ของเบสเพียง 1 ตัว สาเหตุสำคัญของการเปลี่ยนของเบสตัวเดียวกันเกิดจากความผิดพลาดระหว่างการจำลองตัวของ DNA หรือเกิดจากการกระตุ้นให้เปลี่ยนแปลงด้วยสารก่อการกลายพันธ์ (mutagen)

- การขาดหายไปหรือการสอดแทรกของ DNA ซึ่งการขาดหายไปของชิ้น DNA มักเป็นสาเหตุหรือเกี่ยวข้องกับโรคต่างๆ เช่น โรคธาลัสซีเมีย (thalassemia) ฮีโมฟีเลีย (hemophilia) และโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ (coronary artery disease; CAD) เป็นต้น เชื่อว่ามีสาเหตุจากความผิดปกติเมื่อมีการแลกเปลี่ยนส่วนของ DNA ในกระบวนการ recombination ส่วนการสอดแทรกของชิ้น DNA ที่เป็นสาเหตุของ DNA polymorphisms นั้น พบน้อยกว่าการขาดหายไปของชิ้น DNA

- การขาดหายไปหรือการขยายจำนวนของชิ้น DNA ในกระบวนการ recombination ซึ่งความผิดปกติของ DNA แบบนี้มักจะพบในส่วนของ multigene families เมื่อเกิดการแลกเปลี่ยนส่วนของ DNA ระหว่างการครอสซิงโอเวอร์ (crossing over) ของ chromosome คู่เหมือน อาจมีการเรียงตัวผิด (mis-align) ของลำดับเบสที่เหมือนหรือคล้ายกัน ทำให้มีการไขว้เปลี่ยนของซิสเตอร์โครมาทิด (sister chromatid) ที่ไม่เท่ากัน เป็นผลให้ชิ้น DNA ขาดหายไป หรือขยายจำนวนขึ้น

- การขยายจำนวนของชิ้น DNA ที่เกิดจากการเลื่อนของเบส (slippage bases) ในบริเวณเบสซ้ำที่มีเบสแกนขนาดเล็กเรียงตัวอยู่ด้วยกันหลายๆ หน่วยซ้ำนั้น อาจมีการเลื่อนของเบสทำให้เกิด

การกลายพันธุ์ (mutation) ของ DNA ได้ การเลื่อนของเบสทำให้เกิดการซ้ำกันของเบส และมีปลายยื่นออกมา

2.2 การแสดงออกของยีน (gene expression)

จีโนม (genome) ของคนประกอบด้วยยีน (gene) ประมาณ 30,000 ชนิด แต่จะมีเพียงบางยีนเท่านั้นที่สามารถใช้งานได้ในแต่ละเซลล์ เพราะมีการควบคุมการแสดงออกของยีนให้เกิดขึ้นเฉพาะส่วนที่ต้องการเท่านั้น เรียกกระบวนการในการควบคุมให้มีการแสดงออกเฉพาะยีนที่ต้องการว่า การควบคุมการแสดงออกของยีน (regulation of gene expression) ส่วนการแสดงออกของยีนหมายถึง การถอดรหัสพันธุกรรมของยีนจาก DNA เป็น mRNA แล้วเกิดการแปลรหัสเป็นโปรตีน รหัสพันธุกรรมของยีนใน DNA เป็นตัวกำหนดชนิดของโปรตีนที่เซลล์สร้าง โดยเริ่มต้นในนิวเคลียสจากกระบวนการถอดรหัสพันธุกรรม (transcription) ซึ่งเป็นการถอดรหัสพันธุกรรมที่อยู่ใน DNA เป็น mRNA จากนั้น mRNA จะเข้าสู่กระบวนการแปลรหัสพันธุกรรม (translation) เพื่อแปลรหัสจาก mRNA เป็นโปรตีนในไซโตพลาสซึม ซึ่งการควบคุมการแสดงออกของยีนเป็นการถ่ายทอดข้อความทางชีวภาพหรือข้อความทางพันธุกรรมที่บรรจุอยู่ใน DNA ไปยัง mRNA แล้วจึงแปลรหัสไปเป็นโปรตีน (หัทยา กากีวงศ์. 2549) ในเซลล์ร่างกายของสิ่งมีชีวิตทุกเซลล์มีข้อมูลทางพันธุกรรมหรือยีนเหมือนกัน แต่ในระหว่างการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนสภาพของแต่ละเซลล์มีกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนเหล่านี้แตกต่างกันไปตามช่วงเวลา ซึ่งแบ่งการควบคุมการแสดงออกของยีนเป็น 2 ช่วง คือ ช่วงระหว่างกระบวนการ transcription เป็นการควบคุมการสังเคราะห์ mRNA ซึ่งลำดับเบสที่อยู่บนสาย mRNA ถูกกำหนดโดยลำดับของเบสใน DNA template อีกช่วงจะเกิดระหว่างกระบวนการ translation มาเป็นโพลีเปปไทด์หรือโปรตีน การควบคุมการแสดงออกของยีนจะส่งผลต่อปริมาณของโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้น ขั้นตอนการควบคุมการแสดงออกของยีนมี 5 ขั้นตอนดังนี้ การควบคุมระดับจีโนม (genomic control) การควบคุมการถอดรหัส (transcriptional control) การควบคุมหลังการถอดรหัส (post-transcriptional control) การควบคุมการแปลรหัส (translation control) และการควบคุมหลังการแปลรหัส (post-translation control) เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน (กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ. 2549; คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2546)

2.3 ความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมในมนุษย์ (human genetic polymorphisms)

ความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic polymorphisms หรือ DNA polymorphisms) หมายถึง การเปลี่ยนแปลงรหัสพันธุกรรมที่ไม่ก่อให้เกิดโรค หรือเป็นความหลากหลายของ DNA ที่เป็นลักษณะปกติในประชากร หากพิจารณาที่ระดับยีน หมายถึง ความแตกต่างของเบสระหว่าง 2 chromosome ณ ตำแหน่งเดียวกัน คือมีมากกว่า 2 อัลลีล (allele) ที่ 1 โลคัส (locus) ซึ่ง DNA polymorphisms นี้พบได้มากกว่าร้อยละ 1 ในประชากรปกติ โดยมนุษย์จะมีลำดับเบสส่วนใหญ่ใน DNA เหมือนกันทุกคน จะแตกต่างกันเพียงร้อยละ 0.1 ของลำดับเบสทั้งหมดในจีโนมเท่านั้น จากความแตกต่างเพียงร้อยละ 0.1 นี้ส่งผลให้เกิดความแตกต่างทางพันธุกรรมที่ทำให้มนุษย์ทุกคนมีเอกลักษณ์ที่เป็นของตนเอง ยกเว้นจะเป็นฝาแฝดที่เป็นไข่ใบเดียวกัน กลไกที่ทำให้เกิดความแตกต่างทางพันธุกรรมดังกล่าว คือ การเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติในจีโนมมนุษย์ ทำให้แต่ละบุคคลมีลำดับเบสแตกต่างกัน ณ ตำแหน่งเดียวกันบน chromosome หนึ่งๆ ที่เรียกว่า มี allele ที่ต่างกัน (ตำแหน่งที่จำเพาะของลำดับเบสบน chromosome เรียกว่า locus) ซึ่งที่มาของความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมในมนุษย์มาจาก mutation แต่การเกิด mutation ที่เป็นโทษมักจะถูกคัดออกโดยกระบวนการคัดเลือกตามธรรมชาติ (negative selection) นอกจากนี้พบว่าการเกิด mutation ที่เป็นประโยชน์จะถูกเก็บและถ่ายทอดไปในรุ่นลูกจนมีความถี่ในประชากรมากกว่าร้อยละ 1 ซึ่งกลายเป็นความหลากหลายทางพันธุกรรม (กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ. 2549; คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2546)

การเกิด polymorphisms อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของชนิดของกรดอะมิโนในโครงสร้างของเอนไซม์ ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อปริมาณและระดับการทำงานเอนไซม์ ทำให้มีอัตราเสี่ยงต่อการเกิดโรคต่างๆ แตกต่างกันในแต่ละบุคคล การตรวจสอบความแตกต่างของ polymorphisms นั้นสามารถทำได้หลายวิธีอาศัยหลักการแตกต่างกันออกไป โดยวิธีที่เป็นที่นิยมได้แก่วิธี restriction fragment length polymorphisms (RFLP), single-stranded conformation polymorphisms (SSCP), denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) และ DNA hybridization (Buckingham. 2007) ซึ่งวิธีการดังกล่าวต้องอาศัยการเพิ่มจำนวน (amplification) DNA โดยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ก่อนทั้งสิ้น

2.4 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR) เป็นเทคนิคพื้นฐานทางอณูชีววิทยาที่นำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณ DNA ในหลอดทดลองจากปริมาณ DNA ที่ใช้เป็นแม่แบบ (DNA template) เพียงเล็กน้อยได้เป็นผลผลิตหลายล้านโมเลกุล โดยอาศัยหลักการการจำลอง DNA (DNA replication) ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สาย DNA สายใหม่จาก DNA template ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้อย่างจำเพาะเจาะจง โดยมีขั้นตอนการทำงานที่ใช้เวลาสั้น ปฏิกิริยา PCR คิดค้นและพัฒนาขึ้นโดย Kary Mullis และคณะ ซึ่งในปัจจุบันเทคนิค PCR ได้รับการปรับปรุงและพัฒนางานวิจัยทางชีวโมเลกุลและพันธุวิศวกรรม เช่น การสร้าง DNA ติดตาม (DNA probe) การเพิ่มปริมาณยีน (gene cloning) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน (gene sequencing) การศึกษาการแสดงออกของยีนจาก mRNA (gene expression) การสร้างยีนกลายพันธุ์ (*in vitro* mutagenesis) และการบ่งชี้ตำแหน่งกลายพันธุ์บนยีน (point mutations and deletions) เป็นต้น (คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2546; อุไรวรรณ วิจารณกุล. 2545)

ขั้นตอนแรกในการศึกษาโดยเทคนิค PCR คือการหาลำดับ nucleotide ของยีนหรือชิ้นส่วน DNA ที่สนใจ จากนั้นทำการสังเคราะห์สาย oligonucleotide สั้นๆ จำนวน 2 สายเพื่อใช้เป็นไพรเมอร์ (primer) โดยแต่ละสายมีเบสคู่สมกับส่วนปลาย 3' ของเส้น DNA ที่สนใจ primer ที่ใช้โดยทั่วไปจะมีความยาวประมาณ 18-30 เบส นำมาทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นที่สำคัญในการทำ PCR (หัทยา กากีวงศ์. 2549; อุไรวรรณ วิจารณกุล. 2545)

2.4.1 สารตั้งต้นที่สำคัญในการทำปฏิกิริยา PCR

- DNA แม่แบบ (DNA template) คือ DNA ต้นแบบ หรือยีนส่วนที่ต้องการเพิ่มปริมาณ หรือเป็นตัวอย่าง DNA ที่ต้องการนำมาตรวจหา DNA จำเพาะ เช่น DNA ที่สกัดจากเลือด เซลล์ที่มีนิวเคลียสของมนุษย์ หรือสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ซึ่งเป็น DNA ที่ทราบลำดับเบสแล้ว

- DNA สายเริ่มต้นขนาดสั้นๆ เรียกว่าไพรเมอร์ (primer) มีความยาวประมาณ 18-30 เบส สายหนึ่งเรียกว่า forward primer อีกสายหนึ่ง เรียกว่า reverse primer แต่ละสายจะมีลำดับเบสที่เข้าคู่ (complementary) กับลำดับเบสด้านปลาย 3' ของสาย DNA template แต่ละสาย และสามารถจับกับ DNA template ได้ โดยจับที่ตำแหน่งที่อยู่ขนาบข้าง (flanking region) กับส่วนที่ต้องการเพิ่มจำนวน สำหรับ primer ได้มาจากการสังเคราะห์ด้วยเครื่องสังเคราะห์ DNA (DNA synthesizer) ในการทำ PCR จึงต้องทราบลำดับเบสของ DNA ที่ต้องการจะเพิ่มจำนวนเพื่อใช้ในการสร้าง primer ที่จำเพาะ

- ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTP) เป็นนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นหน่วยย่อยสำหรับนำไปสังเคราะห์ DNA สายใหม่ nucleotide หรือเบส มี 4 ชนิด ได้แก่ adenine (A), guanine (G), cytosine (C) และ thymine (T) ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของโครงสร้าง DNA

- เอนไซม์ DNA โพลีเมอเรส (DNA polymerase) ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ DNA สายใหม่ ซึ่งเอนไซม์นี้มีหลายชนิดที่นิยมใช้กันทั่วไปเป็นเอนไซม์ที่สกัดได้จากแบคทีเรียชื่อ *Thermus aquaticus* จึงเรียกเอนไซม์นี้ว่า *Taq* DNA polymerase ซึ่งแบคทีเรียชนิดนี้อาศัยอยู่ในน้ำพุร้อน มีคุณสมบัติทนต่ออุณหภูมิสูงได้ถึง 95 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (optimum temperature) คือประมาณ 72 องศาเซลเซียส

- แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) เป็น co-factor ของเอนไซม์ DNA polymerase โดยแมกนีเซียมมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase เนื่องจากเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งช่วยเพิ่มปริมาณ PCR product และช่วยให้เกิดการจับกันของ primer กับ DNA template เกิดขึ้นอย่างจำเพาะ ส่งผลให้ได้ PCR product ที่มีความจำเพาะสูงขึ้น

- บัฟเฟอร์ (buffer) เป็นสารละลายที่ทำให้สภาวะความเป็นกรด-ด่างของสารละลายในหลอดทดลองมีความเหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา

- น้ำปราศจากอิออน (dH_2O) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ซึ่งใช้ผสมกับสารตั้งต้นดังกล่าวทั้งหมด

สารเคมีที่เป็นส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR จะผสมกันไว้ใน PCR tube และนำไปใส่ในเครื่อง PCR ที่ปรับอุณหภูมิได้ตามโปรแกรมที่กำหนด จะเกิดการสังเคราะห์ DNA สายใหม่ขึ้นใน PCR tube ซึ่งเมื่อเกิดปฏิกิริยาจนครบรอบและระยะเวลาที่กำหนดจะได้ PCR product เป็น DNA ของตำแหน่งที่ต้องการเป็นจำนวนมาก (คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2546; อุไรวรรณ วิจารณกุล. 2545)

2.4.2 ขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก คือ

- การแยกสาย DNA template (denaturation) โดยใช้อุณหภูมิสูง 94-95 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 30-60 วินาทีเพื่อให้ dsDNA คลายเกลียวออกจากกัน โดยเมื่อเริ่มต้น DNA template จะอยู่ในลักษณะที่เป็นเกลียวคู่ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิถึงประมาณ 94 องศาเซลเซียส จะทำให้พันธะไฮโดรเจนระหว่างคู่เบสของ DNA ถูกทำลาย ทำให้เส้น DNA แยกออกจากกัน ซึ่งขั้นตอนนี้จะแตกต่างจากการสังเคราะห์ DNA ในธรรมชาติ คือ ในสิ่งมีชีวิตจะมีเอนไซม์ helicase ช่วยใน

การแยกสายและคลายเกลียว DNA ในทางปฏิบัติเวลาที่ใช้อาจปรับเปลี่ยนตามความเหมาะสมกับลักษณะความซับซ้อน (complexity) ของ DNA template ลักษณะและขนาดของ PCR tube ปริมาตรของปฏิกิริยา PCR และชนิดของเครื่อง PCR ที่ใช้ โดยในกรณี DNA template มี GC content สูง อาจต้องใช้เวลาในขั้นตอน denaturation นานขึ้นหรือใช้อุณหภูมิที่สูงขึ้น อย่างไรก็ตามการใช้เวลานานและอุณหภูมิสูงเกินไป จะทำให้เอนไซม์และ nucleotide สูญเสียคุณสมบัติได้ แต่ถ้าใช้เวลาน้อยและอุณหภูมิต่ำเกินไปจะทำให้สาย dsDNA แยกออกจากกันไม่สมบูรณ์อาจทำให้ได้ PCR product ลดลง แต่การใช้อุณหภูมิที่สูงเกินไปและนานเกินไปจะทำให้ระดับการทำงานของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ลดลง (คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2546; หัทยา กากีวงศ์. 2549)

- การจับของสาย primer กับ DNA template (annealing) โดยใช้อุณหภูมิ 50-65 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 30-60 วินาที เพื่อให้ primer เข้าจับกับ DNA template ในบริเวณที่ลำดับเบสเข้าคู่กัน เมื่อแยกสาย dsDNA ออกจากกันแล้ว จะลดอุณหภูมิลงเหลือ 50-65 องศาเซลเซียส เพื่อให้ primer เข้ามาจับบริเวณที่มีลำดับเบสคู่สมกัน ในการสังเคราะห์ DNA ไม่สามารถที่จะเริ่มจากเบสตัวเริ่มต้นได้เนื่องจากเอนไซม์ DNA polymerase ต้องการปลาย -OH ทางด้าน 3' เพื่อนำ nucleotide มาต่อ ซึ่งในสิ่งมีชีวิตจะมีเอนไซม์ที่มีชื่อว่า primase เป็นตัวสร้าง RNA primer ขึ้น โดยทั่วไปใช้อุณหภูมิ annealing temperature ที่ต่ำกว่าจุดหลอมเหลว (melting temperature ; Tm) ของ primer ประมาณ 5 องศาเซลเซียส ซึ่งการใช้อุณหภูมิสูงในขั้นตอนนี้จะช่วยในการเพิ่มความจำเพาะในการจับคู่ โดยใช้เวลาในขั้นตอนนี้ประมาณ 30 วินาที ซึ่งขั้นตอนนี้มีความสำคัญต่อประสิทธิภาพและความจำเพาะในการทำ PCR โดยสามารถทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมจากการคำนวณค่า Tm ของ primer จากการใช้สูตรคำนวณดังนี้ Tm = 4 (จำนวนเบสของ G + จำนวนเบสของ C) + 2 (จำนวนเบสของ A + จำนวนเบสของ T) จากนั้นเปรียบเทียบการทำ PCR โดยใช้อุณหภูมิ annealing ที่ต่างกันประมาณ 2 องศาเซลเซียส หลายๆ อุณหภูมิโดยใช้ค่า Tm - 5 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิหลัก การใช้อุณหภูมิต่ำเกินไปทำให้การ annealing ของ primer เกิดอย่างไม่จำเพาะ แต่หากใช้อุณหภูมิสูงเกินไปการ annealing จะเกิดขึ้นน้อยหรือไม่มีเลย

- การสังเคราะห์ DNA สายใหม่โดยการต่อสาย primer extension ในทิศทาง 5' ไป 3' ใช้อุณหภูมิ 70-75 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 30-120 วินาที ในขั้นตอนนี้จะเป็นการสร้างสาย

DNA ต่อจาก primer โดยอุณหภูมิที่ใช้จะพอเหมาะกับการทำงานของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase โดยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase จะทำหน้าที่นำเบสที่เข้าคู่กับ DNA template มาต่อเข้าที่ปลายของสาย primer ทั้ง 2 เพื่อให้ได้ DNA สายใหม่ ส่วนเวลาที่ใช้ในขั้นตอนนี้จะขึ้นกับความเข้มข้นและความยาวของลำดับเบส DNA template รวมทั้งอุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยาด้วย โดยปกติเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase สามารถเพิ่มความยาวของสาย DNA ได้ประมาณ 6,000 nucleotide ต่อนาทีที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส การใช้เวลาที่มากในขั้นตอนแรกจะมีประโยชน์สำหรับ DNA template ที่มีจำนวนน้อย การสังเคราะห์จะดำเนินตามลำดับ 3 ขั้นตอนซ้ำกันเป็นจำนวน 35-40 รอบ ทำให้ได้ PCR product เป็น DNA สายใหม่เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก

ปฏิกิริยาทั้ง 3 ขั้นตอนหลักรวมเรียกว่า 1 รอบ PCR (PCR cycle) จะให้ผลผลิตเป็น DNA สายคู่ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับ DNA template เพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า จำนวนรอบของการทำ PCR มากขึ้นจะได้ dsDNA ที่สนใจจำนวนมาก เรียกการเพิ่มจำนวนแบบนี้ว่า “exponential amplification” ซึ่งคำนวณได้เท่ากับ 2n (n คือ จำนวนรอบในการทำ PCR cycle number) โดยการทำ PCR 20 รอบ สามารถเพิ่มปริมาณสาร dsDNA มากกว่า 100,000 เท่า จำนวนรอบในการทำ PCR ขึ้นกับปริมาณ DNA template ตั้งต้น แต่ถ้าใช้จำนวนรอบที่มากขึ้นโอกาสที่จะได้ผลผลิต PCR ที่ผิดพลาดมากขึ้นตามไปด้วย เนื่องจาก PCR product ที่ได้จะมีความจำเพาะลดลงและมี background มากขึ้น แต่ถ้าใช้จำนวนรอบน้อยเกินไปผลผลิตที่ได้ก็น้อยลงด้วย (คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2546; หัทยา กากีวงศ์. 2549)

2.5 การศึกษาความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมโดย restriction fragment length polymorphisms (RFLP)

เทคนิค restriction fragment length polymorphisms (RFLP) คือ เทคนิคที่ใช้ในการศึกษาความยาวของชิ้นส่วน DNA หลังการตัดโดย restriction endonuclease เพื่อใช้หาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางพันธุกรรมหรือโรคทางพันธุกรรมที่เกิดจาก mutation ซึ่ง mutation สามารถทำให้เกิด restriction site ใหม่ หรือทำให้ restriction site เดิมที่มีอยู่แล้วหายไป หลังจากการตัด DNA ด้วย restriction endonuclease แล้ว นำเอา DNA นั้นไปหาผังของ RFLP (Buckingham. 2007)

Restriction endonuclease คือ เอนไซม์ที่สามารถไปจับและตัด DNA สายคู่ที่ตำแหน่งจำเพาะของลำดับนิวคลิโอไทด์ (nucleotide) ที่เรียกว่า recognition sequence หรือ restriction site ส่วน

การเรียกชื่อ restriction endonuclease เรียกชื่อตามแบคทีเรียที่นำมาสกัดเอนไซม์ โดยนำอักษรตัวแรกมาจากชื่อ genus อักษรสองตัวถัดมาได้จากอักษรสองตัวแรกของ species อักษรตัวถัดมาเป็นอักษรตัวแรกของ strain และถัดมาจะเป็นตัวเลขโรมันที่ระบุถึงการค้นพบเอนไซม์ชนิดนั้น เช่น DdeI มาจากแบคทีเรีย genus *Desulfovibrio* species *desulfuricans* ซึ่งเอนไซม์นี้ถูกค้นพบเป็นตัวแรกในแบคทีเรียชนิดนี้ (คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2546)

Restriction endonuclease แบ่งได้เป็น 3 ชนิด คือ type I restriction endonuclease, type II restriction endonuclease และ Type III restriction endonuclease ตามคุณสมบัติความต้องการ co-factor และวิธีการตัด DNA (คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2546) ดังนี้

-Type I restriction endonuclease จะไม่ตัด DNA ที่ตำแหน่งจำเพาะ ซึ่ง type I restriction endonuclease ส่วนใหญ่จะตัด DNA ห่างออกไปจาก recognition site ของเอนไซม์

-Type II restriction endonuclease จะตัด DNA ตรงตำแหน่ง recognition site เนื่องจากเอนไซม์ในกลุ่มนี้เป็นเอนไซม์ที่มี 2 subunit ที่เหมือนกัน (identical)

-Type III restriction endonuclease จะตัด DNA ที่ตำแหน่งห่างออกจาก recognition site ไป 25 คู่เบส เนื่องจากเอนไซม์ในกลุ่มนี้เป็นเอนไซม์ที่มี 2 subunit ที่ต่างกัน

ในปัจจุบันมี restriction endonuclease หลายชนิด เช่น AluI, BamHI, DdeI, EcoRI, Fnu4HI, PstI และ TaqI เป็นต้น โดย restriction endonuclease แต่ละชนิดจะมีความจำเพาะต่อลำดับเบสของ DNA ที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงตัวอย่างเอนไซม์ตัดจำเพาะ แหล่งที่มาของเอนไซม์และตำแหน่งตัดจำเพาะ

เอนไซม์	แหล่งที่มา	ตำแหน่งตัดจำเพาะ
AluI	*Arthrobacter luteus*	AG ↓ CT TC ↑ GA
BamHI	*Bacillus amyloliquefaciens H*	G ↓ GATC C C CTAG ↑ G
EcoRI	*Escherichia coli R factor*	G ↓ AATT C G TTAA ↑ G
PstI	*Providencia stuartii*	C TGCA ↓ G G ↑ ACGT C
TaqI	*Thermus aquaticus*	T ↓ CG A A GC ↑ T
Fnu4HI	*Fusobacterium nucleatum*	GC ↓ N GC CG N ↑ CG
DdeI	*Desulfovibrio desulfuricans*	C ↓ TNA G G ANT ↑ C

เทคนิค RFLP ได้ถูกนำไปประยุกต์ในงานวิเคราะห์ DNA หลายแบบ เช่น การจำแนก genotyping ของเชื้อไวรัสและแบคทีเรียบางชนิด การจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ นอกจากนั้น RFLP ยังสามารถใช้ตรวจหา point mutation ของยีนต่างๆ เช่น โรคมะเร็งหรือโรคความผิดปกติทางพันธุกรรม โดยอาศัยหลักการที่ว่าเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในตำแหน่งของยีน restriction endonuclease จะไม่สามารถตัด DNA ในตำแหน่งนั้นได้ จึงทำให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง DNA เหล่านั้น หลักการทำ RFLP ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้ การเตรียม DNA โดยการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA ที่สนใจ (DNA amplification) จากนั้นทำการตัด DNA ออกเป็นชิ้นย่อยด้วย restriction endonuclease และตรวจสอบความแตกต่างของชิ้นส่วน DNA โดยใช้เทคนิค electrophoresis (คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2546; สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2548)

2.6 การแยกชิ้นส่วน DNA ด้วยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis)

Electrophoresis เป็นวิธีการแยกสารที่ผสมกันอยู่ให้ออกจากกันโดยใช้กระแสไฟฟ้า หลักการของ electrophoresis คือ โมเลกุลที่มีประจุอยู่ในสนามไฟฟ้าที่เกิดจากขั้วไฟฟ้า 2 ขั้วในสารละลาย โมเลกุลของสารนั้นจะมีการเคลื่อนย้ายจากขั้วหนึ่งไปสู่ขั้วหนึ่ง โดยที่โมเลกุลที่มีประจุไฟฟ้ารวมเป็นบวกจะเคลื่อนที่ไปที่ขั้วลบ ในขณะที่โมเลกุลที่มีประจุไฟฟ้ารวมเป็นลบจะเคลื่อนที่ไปขั้วบวก ซึ่งการเคลื่อนที่ในลักษณะนี้เรียกว่า electrophoresis ความเร็วในการเคลื่อนที่ขึ้นอยู่กับปัจจัย 2 ประการคือ แรงผลักดันซึ่งเกิดโดยสนามไฟฟ้ากระทำต่อโมเลกุลและแรงต้านทานการเคลื่อนที่ซึ่งเกิดขึ้นในขณะที่โมเลกุลนั้นเคลื่อนย้ายเข้าไปในตัวกลาง และเนื่องจากโมเลกุลของสารต่างๆ จะมีความแตกต่างกันทั้งขนาด รูปร่าง และประจุไฟฟ้า ส่งผลให้ความสามารถในการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าต่างกันทำให้สามารถแยกโมเลกุลของสารหลายชนิดออกจากกันได้ (Buckingham. 2007) ในทางอณูชีววิทยานิยมนำเทคนิคนี้มาใช้ในการแยกขนาดชิ้นส่วนของ DNA และโปรตีน โดยตัวกลางที่นิยมใช้มี 2 ประเภท คือ

- Paper electrophoresis ซึ่งนิยมใช้ในการแยกสารที่เป็นส่วนผสมของโมเลกุลที่มีประจุและมีขนาดเล็กโดยใช้กระดาษกรอง นำมาทำให้เปียกด้วยสารละลายที่มีการควบคุม pH และนำมาวางไว้ระหว่างขั้วไฟฟ้า 2 ขั้ว จากนั้นนำสารที่ต้องการจะแยกโมเลกุลต่างๆ ออกจากกันไปหยดที่ตำแหน่งที่กำหนดบนกระดาษนั้น เมื่อเปิดสนามไฟฟ้า และปล่อยให้โมเลกุลเคลื่อนที่เป็นเวลาพอเหมาะแล้ว จึงนำเอากระดาษนั้นมาทำให้แห้ง ย้อมสี และเปรียบเทียบกับการเคลื่อนที่ของสารมาตรฐานที่ทราบ

- Gel electrophoresis คือ การใช้วุ้นเป็นตัวกลาง ซึ่งเป็นที่นิยมเป็นอย่างมากในการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนและกรดนิวคลีอิก วุ้นประกอบไปด้วยเนื้อวุ้นและสารละลายที่เหมาะสม ซึ่งเนื้อวุ้นที่นิยมใช้มี 2 ชนิด คือ polyacrylamide ซึ่งเป็น cross-linked polymer ที่สามารถละลายน้ำได้ และ agarose ซึ่งเป็น polysaccharide ในเนื้อวุ้นที่หล่อเป็นแบบมีคุณสมบัติเป็นรูพรุนอยู่ภายใน จากนั้นนำเนื้อวุ้นไปตั้งไว้ระหว่างขั้วไฟฟ้า 2 ขั้ว แล้วหยอดสารละลายที่ต้องการศึกษาลงไปในเนื้อวุ้น เมื่อเปิดกระแสไฟฟ้าโมเลกุลในสารละลายนั้นก็จะมีการเคลื่อนที่ ถ้าปัจจัยอื่นๆ เหมือนกัน โมเลกุลของสารที่ใหญ่กว่าก็จะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วน้อยกว่า เมื่อใช้เวลานานขึ้นก็จะสามารถแยกขนาดชิ้นส่วนของ DNA ได้ชัดเจนขึ้น

DNA ที่เกิดจากปฏิกิริยา PCR ในหลอดทดลองจะไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ ดังนั้น ในการตรวจหา PCR product จะต้องนำตัวอย่างที่ทำ PCR มาตรวจสอบโดยวิธี gel electrophoresis ซึ่งเป็นการแยก DNA ใน agarose gel ด้วยกระแสไฟฟ้า เปรียบเทียบกับ DNA marker ที่ทราบขนาดแน่นอน โดยระยะทางที่ DNA สามารถเคลื่อนที่ไปได้จะขึ้นอยู่กับขนาดชิ้นส่วนของ DNA และกระแสไฟฟ้าที่ใช้ เมื่อนำ agarose gel ไปย้อมด้วย ethidium bromide ซึ่งมีลักษณะเป็น polycyclic aromatic compound ที่มีประจุบวกสามารถจับกับ DNA ระหว่างคู่เบส โดยโมเลกุลของ ethidium bromide จะจับกับ DNA ที่มีประจุลบตรงตำแหน่งของเกลียวที่ทำมุม 26° ดังนั้นเมื่อนำ agarose gel ที่ผ่านการย้อมด้วย ethidium bromide ไปส่องบนเครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV-transilluminator) จะเห็นแถบ DNA เรืองแสงบน agarose gel จากนั้นบันทึกภาพด้วยเครื่องบันทึกภาพถ่ายอัตโนมัติ (คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2546)

2.7 การคำนวณหาความถี่การกระจายตัว (gene frequency)

การคำนวณ genotype frequencies และ allele frequencies สามารถทำโดยใช้หลักการ Hardy – Weinberg rules ซึ่งมีแนวคิดว่า ประชากรหนึ่งที่พันธุกรรมอยู่ในภาวะสมดุล (Hardy-Weinberg equilibrium) ไม่มีวิวัฒนาการ คือ เป็นประชากรขนาดใหญ่ ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน ประชากรมีการแยกออกจากประชากรอื่นๆ ในชนิดพันธุ์เดียวกัน ไม่มีการอพยพ (migration) มีการแต่งงานแบบสุ่ม (random) ไม่มีการเลือก (selection) และยีนไม่มีผลต่อการอยู่รอดหรือสืบพันธุ์ สัดส่วนของลักษณะที่แสดงออกทางพันธุกรรม (genotype) ที่ตำแหน่งของยีนหนึ่งซึ่งมี allele 2 ประเภทแสดงออกร่วมกัน (co-dominant) จะเป็นไปตามสมการ

$$P^2 + 2pq + q^2 = 1$$

เมื่อ p คือความถี่ของ allele A และ q คือความถี่ของ allele B โดยผลรวมของความถี่ของ allele A และ allele B ในประชากรทั้งหมดจะต้องเท่ากับ 1 และความถี่ของ genotype AA, AB และ BB ย่อมเท่ากับ p^2, 2pq และ q^2 ตามลำดับคงที่ไปตลอดทุกรุ่นถัดไป โดยไม่มีแรงกดดันที่ทำให้เกิดการวิวัฒนาการ (กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ. 2549)

2.8 พาราออกโซเนส (paraoxonase)

กลุ่มของยีน paraoxonase (PON) ประกอบด้วย ยีน 3 ตัวคือ *PON1, PON2* และ *PON3* อยู่บน chromosome คู่ที่ 7 ในส่วนของ long arm ตำแหน่งระหว่าง q21.3 และ q22.1 (Hong-Liang. 2003 : 766-779) (ภาพที่ 1) ยีน paraoxonase ทำการควบคุมการแสดงออกทางโครงสร้างของเอนไซม์ ส่งผลให้ลักษณะโครงสร้างของเอนไซม์ในกลุ่มนี้มีความคล้ายคลึงกันทั้งในระดับ nucleotide และระดับกรดอะมิโน (Mackness. 2002 : 357-362; Draganov. 2000 : 33435–33442) โดยโครงสร้างของเอนไซม์ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 354 ตัว มีขนาดประมาณ 40-45 kDa มีลักษณะโครงสร้างเป็นวงคล้าย aromatic ring ซึ่งเกิดจากการเชื่อมโยงกันของกรดอะมิโน cysteine (Cys) ที่ตำแหน่ง 42 และ 353 และมีสายคาร์โบไฮเดรตหลายสายมาจับอยู่บนโครงสร้าง นอกจากนี้ยังมี Cys อิสระที่ตำแหน่ง 283 ซึ่งมี sulhydryl group (-SH) ทำให้เอนไซม์ในกลุ่ม paraoxonase เป็นกลุ่ม glycoprotein esterase enzyme ที่มีคุณสมบัติในการสลาย (hydrolyze) สาร lipid hydroperoxide และ hydrogen peroxide อันเป็นผลจากกระบวนการ lipid oxidation ภายในร่างกาย จึงเชื่อว่าเอนไซม์กลุ่มนี้มีคุณสมบัติในการป้องกันการเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็งตัว (Draganov. 2004 : 78-88)

ภาพที่ 1 แสดงกลุ่มยีน *PON* บนโครโมโซมคู่ที่ 7 ตำแหน่งระหว่าง q21.3 และ q22.1 (Hong-Liang. 2003 : 766-779)

เอนไซม์ PON2 มีขนาดโมเลกุลประมาณ 42-44 kDa พบได้เฉพาะในเนื้อเยื่อและในอวัยวะที่หลากหลายมากกว่าเอนไซม์ PON1 และ PON3 เช่น ปอด ตับ ไต เยื่อบุผนังหลอดเลือด และแม็คโครฟาจ (Ng. 2001 : 44444-44449) หน้าที่หลักและโครงสร้างของเอนไซม์นี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่จากงานวิจัยในปัจจุบันที่ศึกษาหน้าที่ของเอนไซม์ในกลุ่มนี้พบว่าเอนไซม์ PON2 สามารถป้องกันการเกิด lipid peroxidation ของ LDL ได้โดยการ hydrolyze ส่วน specific lipid peroxide ของ oxidized LDL (Ng. 2001 : 44444-44449) อันเป็นผลจากภาวะ oxidative stress ซึ่งเกิดจาก

ความไม่สมดุลกันระหว่างระดับอนุมูลอิสระ (free radical) และสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) นำไปสู่การเกิดปฏิกิริยา oxidation กับโมเลกุลของเซลล์ต่างๆ ซึ่งอาจทำให้เกิดความผิดปกติ และเป็นสาเหตุของโรคและภาวะต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง (cancer) โรคแก่ชรา (aging) โรคหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular disease) และภาวะหลอดเลือดแดงแข็งตัว (atherosclerosis) ซึ่งเป็นสาเหตุที่นำไปสู่การเกิดโรคหัวใจและภาวะสมองขาดเลือด

ลักษณะ polymorphisms ของยีน *PON2* ที่มีการศึกษากันจนถึงปัจจุบันพบว่ายีน *PON2* มี polymorphisms ที่สำคัญอยู่ 2 ตำแหน่ง ซึ่งถูกควบคุมด้วย allele 2 อัน ในลักษณะที่เป็นเด่นร่วม (co-dominant) คือ glycine หรือ alanine ที่ codon 148 และ cysteine หรือ serine ที่ codon 311 (Hangel. 1999 : 217–224) ซึ่งจากหลายๆ การศึกษาพบว่า polymorphisms เหล่านี้ไม่มีความเกี่ยวข้องกับระดับการทำงานของเอนไซม์หรือปริมาณของเอนไซม์ PON2 แต่มีความสัมพันธ์กับทางคลินิกหลายด้านและโรคร้ายแรงต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับภาวะ oxidative stress หลายอย่างได้แก่ ระดับความเข้มข้นของ total cholesterol, LDL cholesterol และ lipoprotein ชนิด apo B ในคนแคนนาดาที่มีการแสดงออกของยีน *PON2* ที่ตำแหน่ง 148 เป็นแบบ homozygous A allele (AA) มีระดับสูงกว่าแบบ AG และ homozygous G allele (GG) (Hegele. 1998 : 394–399) ซึ่งสอดคล้องกับ Hangel และคณะ ที่รายงานว่าระดับของ cholesterol และ lipoprotein ชนิด apo B ในพลาสมาของคนที่มีการแสดงออกของยีน *PON2* เป็น AA ที่ตำแหน่ง 148 และ homozygous S allele (SS) ที่ตำแหน่ง 311 สูงกว่าคนที่มีการแสดงออกของ *PON2* เป็นแบบ GG ที่ตำแหน่ง 148 และ homozygous C allele (CC) ที่ตำแหน่ง 311 (Hangel. 1999 : 217–224) ซึ่งไม่สอดคล้องกันกับ Mackness และคณะ ที่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มข้นของ total cholesterol และ lipoprotein ในพลาสมาทั้งในกลุ่มประชากรที่ปกติ กลุ่มประชากรที่เป็นเบาหวานชนิดที่ 1 และกลุ่มประชากรที่เป็นเบาหวานชนิดที่ 2 แต่พบว่าคนที่มีการแสดงออกของยีน *PON2* เป็นแบบ CC ที่ตำแหน่ง 311 มีระดับ HbA1C สูงกว่าการแสดงออกของยีน *PON2* เป็นแบบอื่นๆ (Mackness. 2005 : 363-368) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของ polymorphisms ของยีน *PON2* ที่ตำแหน่ง 148 กับระดับ fasting glucose ในพลาสมา โดย homozygous G allele ที่ตำแหน่ง 148 จะมีระดับ fasting glucose สูงกว่าแบบอื่นๆ (Robert. 1997 : 3373-3377) และพบว่า bone mineral density (BMD) ซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการมีมวลกระดูกลดลงมีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของยีน *PON2* ที่ตำแหน่ง 311 แบบ C allele ในผู้หญิงญี่ปุ่นวัยหมดประจำเดือน

(Yamada. 2003 : 469-475) อีกทั้งยังพบว่า *PON2* polymorphisms มีความสัมพันธ์กับโรคทางจิตประสาทตามรายงานการศึกษาของ Shi และคณะ ที่ทำการศึกษาในคนจีนที่เป็นโรค late onset Alzheimer's disease (LOAD) พบว่าที่มีการแสดงออกของยีน *PON2* ที่ตำแหน่ง 311 เป็นแบบ C allele มีความสัมพันธ์กับโรค LOAD (Shi. 2004 : 201-204) ในขณะที่คนยุโรปที่มีการแสดงออกของยีน *PON2* ที่ตำแหน่ง 311 เป็นแบบ S allele จะมีความสัมพันธ์กับโรค Alzheimer's disease (AD) and vascular dementia (VD) (Janka. 2002 : 110-112) นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยจำนวนมากเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของ *PON1* และ *PON2* polymorphisms กับโรคในกลุ่ม coronary heart disease (CHD), coronary artery disease (CAD) และ cardiovascular disease (CVD) โดยพบว่า S allele ที่ตำแหน่ง 311 ของยีน *PON2* มีความสัมพันธ์กับการเกิด CVD ในขณะที่ homozygous C allele อาจมีความสามารถในการป้องกันการเกิด CVD ในผู้ป่วย familial hypercholesterolemia (FH) (Leus. 2002 : 641-649) และพบว่าในคนที่สูบบุหรี่ที่มีการแสดงออกของยีน *PON2* เป็น homozygous C allele ที่ตำแหน่ง 311 มีความเสี่ยงต่อการเกิด myocardial infarction (MI) สูงกว่าคนที่มีการแสดงออกของยีนเป็น CS และ SS ตามลำดับ แต่ในคนที่ไม่สูบบุหรี่ความเสี่ยงต่อการเกิด MI จะไม่ขึ้นอยู่กับการแสดงออกของยีน *PON2* (Martinelli. 2004 : 14-20) การแสดงออกของยีน *PON2* ที่ตำแหน่ง 311 เป็น S allele มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการเกิด CAD ในคนอินเดีย (Sanghera. 1998 : 36-44) และคนไต้หวัน ซึ่งพบว่ามีความเสี่ยงต่อการเกิด CAD มากกว่า C allele ถึง 4.6 เท่า (Pan. 2002 : 415-421) นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยที่มี C allele หรือมีการแสดงออกเป็นแบบ CC และ CS มีระดับของ HDL-C ในพลาสมาสูงกว่าแบบ SS (Pan. 2002 : 415-421) ซึ่งแตกต่างกับการศึกษาของ Chen และคณะ ที่พบว่า C allele มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการเกิด CAD (Chen. 2003 : 13-22) ในขณะที่ไม่พบความแตกต่างของการกระจายตัวของ polymorphisms ที่ตำแหน่ง A148G ระหว่างผู้ป่วย CAD และคนปกติ (Pan. 2002 : 415-421) Sanghera และคณะ รายงานว่าการแสดงออกของ *PON2* แบบ 311S allele มีความสัมพันธ์กับ *PON1* 192R allele ในการเกิดโรค CHD (Sanghera. 1998 : 36-44) ซึ่งไม่สอดคล้องกันกับรายงานของ Leus และคณะ ที่พบว่าปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคในกลุ่ม CHD มีความสัมพันธ์กันกับ 311S allele ของยีน *PON2* และ *PON1* Q192 allele (Leus. 2002 : 641-649) อย่างไรก็ตาม Pinizzotto และคณะ ไม่พบความสัมพันธ์ของ polymorphisms ของยีน *PON2* กับการเกิดโรค CHD (Pinizzotto. 2001 : 104-107) ดังนั้นการศึกษาการกระจายตัวของ *PON2* polymorphisms ที่ตำแหน่ง A148G

และ C311S จึงมีความสำคัญในการประเมินความเสี่ยงของการเกิดโรคร้ายแรงต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับภาวะ oxidative stress เพื่อใช้เป็นแนวทางในการป้องกันและการรักษาโรคต่อไป