บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความหลากหลายของดีออกซิไรโบนิวคลีอิก (DNA polymorphism)

ความหลากหลายของดีออกซิไรโบนิวคลีอิก (DNA polymorphism) 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 polymorphism (กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ. 2549; คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2546; Buckingham. 2007) ได้แก่

- การเปลี่ยนของเบสตัวเดียว พบทั้งการแทนที่เบสปกติด้วยเบสอื่น และการเพิ่ม (insertion) หรือหายไป (deletion) ของเบสเพียง 1 ตัว สาเหตุสำคัญของการเปลี่ยนของเบสตัวเดียวกันเกิดจากความผิดพลาดระหว่างการจำลองตัวของ DNA หรือเกิดจากการกระตุ้นให้เปลี่ยนแปลงด้วยสิ่งก่อการกลายพันธุ์ (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 polymorphism 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 อาจมีการเลื่อนของเบสทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ของ DNA ได้ การเลื่อนของเบสทำให้เกิดการซ้ำกันของเบส และมีปลายยื่นออกมา

2.2 การแสดงออกของยีน (Gene expression)

จีโนม (genome) ของคนประกอบด้วยยีน (gene) ประมาณ 30,000 ชนิด แต่จะมีเพียงบางยีนเท่านั้นที่สามารถใช้งานได้ในแต่ละเซลล์ เพราะมีการควบคุมการแสดงออกของยีนให้เกิดขึ้นเฉพาะส่วนที่ต้องการเท่านั้น เรียกกระบวนการควบคุมให้มีการแสดงออกเฉพาะยีนที่ต้องการว่า การควบคุมการแสดงออกของยีน (regulation of gene expression) ส่วนการแสดงออกของยีน หมายถึง การถอดรหัสพันธุกรรมของยีนจาก DNA เป็น mRNA แล้วเกิดการแปลรหัสเป็นโปรตีน รหัสพันธุกรรมของยีนใน DNA เป็นตัวกำหนดชนิดของโปรตีนที่เซลล์สร้าง โดยเริ่มต้นในนิวเคลียสจากกระบวนการถอดรหัสพันธุกรรม (transcription) ซึ่งเป็นการถอดรหัสพันธุกรรมที่อยู่ใน DNA เป็น mRNA จากนั้น mRNA จะเข้าสู่กระบวนการแปลรหัสพันธุกรรม (translation) เพื่อแปลรหัสจาก mRNA เป็นโปรตีนในไซโตพลาสซึม การควบคุมการแสดงออกของยีนเป็นการถ่ายทอดข้อความทางชีวภาพหรือข้อความทางพันธุกรรมที่บรรจุอยู่ใน DNA ไปยัง mRNA แล้วจึงแปลรหัสไปเป็นโปรตีน (หัทยา กากีวงศ์. 2549) ในเซลล์ร่างกายของสิ่งมีชีวิตทุกเซลล์มีข้อมูลทางพันธุกรรมหรือยีนเหมือนกัน แต่ในระหว่างการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนสภาพ (differentiation) ของแต่ละเซลล์มีกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนเหล่านี้แตกต่างกันไปตามช่วงเวลา โดยการควบคุมการแสดงออกของยีนแบ่งเป็น 2 ช่วง คือ ช่วงระหว่างกระบวนการ transcription โดยเป็นการควบคุมการสังเคราะห์ mRNA ซึ่งลำดับเบสที่อยู่บนสาย mRNA ถูกกำหนดโดยลำดับของเบสใน DNA template อีกช่วงจะเกิดระหว่างกระบวนการ translation มาเป็นโพลีเปปไทด์ (polypeptide) หรือโปรตีน การควบคุมการแสดงออกของยีน มีผลต่อปริมาณของโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้น และมีขั้นตอนการควบคุม 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 polymorphism)

ความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic polymorphism หรือ DNA polymorphism) หมายถึง การเปลี่ยนแปลงรหัสพันธุกรรมที่ไม่ก่อให้เกิดโรค หรือเป็นความหลากหลายของ DNA ที่เป็นลักษณะปกติในประชากร หากพิจารณาที่ระดับยีน หมายถึง ความแตกต่างของเบสระหว่าง 2 chromosome ณ ตำแหน่งเดียวกัน คือมีมากกว่า 2 อัลลีล (allele) ที่ 1 โลคัส (locus) ซึ่ง DNA polymorphism นี้พบได้มากกว่าร้อยละ 1 ในประชากรปกติ โดยมนุษย์จะมีลำดับเบสส่วนใหญ่ใน DNA เหมือนกันทุกคน จะแตกต่างกันเพียงร้อยละ 0.1 ของลำดับเบสทั้งหมดในจีโนมเท่านั้น

จากความแตกต่างเพียงร้อยละ 0.1 นี้ส่งผลให้เกิดความแตกต่างทางพันธุกรรมที่ทำให้มนุษย์ทุกคนมีเอกลักษณ์ที่เป็นของตนเอง ยกเว้นจะเป็นฝาแฝดที่เป็นไข่ใบเดียวกัน กลไกที่ทำให้เกิดความแตกต่างทางพันธุกรรมดังกล่าว คือ การเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติในจีโนมมนุษย์ ทำให้แต่ละบุคคลมีลำดับเบสแตกต่างกัน ณ ตำแหน่งเดียวกันบน chromosome หนึ่ง ๆ ที่เรียกว่า มี allele ที่ต่างกัน (ตำแหน่งที่จำเพาะของลำดับเบสบน chromosome เรียกว่า locus) ซึ่งที่มาของความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมในมนุษย์มาจากการกลายพันธุ์ (mutation) แต่การ mutation ที่เป็นโทษมักจะถูกคัดออกโดยกระบวนการคัดเลือกตามธรรมชาติ (negative selection) ส่วน mutation ที่เป็นประโยชน์จะถูกเก็บและถ่ายทอดไปในรุ่นลูก จนมีความถี่ในประชากรมากกว่าร้อยละ 1 จึงกลายเป็นความหลากหลายทางพันธุกรรม (กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ. 2549; คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2546)

การเกิด polymorphism อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของชนิดของกรดอะมิโนในโครงสร้างของเอนไซม์ ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อปริมาณและการทำงานของเอนไซม์ ทำให้มีอัตราเสี่ยงต่อการเกิดโรคต่างๆ แตกต่างกันในแต่ละบุคคล การตรวจสอบความแตกต่างของ polymorphism นั้นสามารถทำได้หลายวิธี อาศัยหลักการแตกต่างกันออกไป วิธีที่เป็นที่นิยมได้แก่ วิธี restriction fragment length polymorphism (RFLP), single-stranded conformation polymorphism (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 ข้อดีของเทคนิค PCR คือ สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้อย่างจำเพาะเจาะจง โดยมีขั้นตอนการทำงานที่ใช้เวลาสั้น ปฏิกิริยา PCR คิดค้นและพัฒนาขึ้นโดย Kary Mullis และคณะ ซึ่งในปัจจุบันเทคนิค PCR ได้รับการปรับปรุงและพัฒนาเพื่องานวิจัยทางชีวโมเลกุลและพันธุวิศวกรรม 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 ที่ต้องการจะเพิ่มจำนวน เพื่อใช้ในการสร้าง primer ที่จำเพาะ

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

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

- แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) เป็น cofactor 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-ด่างของสารในหลอดทดลองมีความเหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา

- 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 ช่วยในการแยกสายและคลายเกลียว DNA ในทางปฏิบัติ เวลาที่ใช้อาจปรับเปลี่ยนตามความเหมาะสมกับลักษณะความซับซ้อน (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 แต่ถ้าใช้เวลาน้อยและอุณหภูมิต่ำเกินไป จะทำให้สาย dsDNA แยกออกจากกันไม่สมบูรณ์อาจทำให้ PCR product ลดลง นอกจากนี้การใช้อุณหภูมิที่สูงเกินไปและนานเกินไปเนื่องจากจะทำให้ระดับการทำงานของเอนไซม์ *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 ไม่สามารถที่จะเริ่มจากเบสตัวเริ่มต้นได้เนื่องจากเอ็นไซม์ DNA polymerase ต้องการปลาย -OH ทางด้าน 3' เพื่อนำ nucleotide มาต่อ ซึ่งในสิ่งมีชีวิตจะมีเอ็นไซม์ primase เป็นตัวสร้าง RNA primer ขึ้น โดยทั่วไปใช้อุณหภูมิ annealing temperature ที่ต่ำกว่าจุดหลอมเหลว (melting temperature ; Tm) ของ primer ประมาณ 5 องศาเซลเซียส การใช้อุณหภูมิที่สูงในขั้นตอนนี้จะช่วยในการเพิ่มความจำเพาะในการจับคู่ เวลาที่ใช้ในขั้นตอนนี้ประมาณ 30 วินาที ขั้นตอนนี้มีความสำคัญต่อประสิทธิภาพและความจำเพาะในการทำ PCR โดยทั่วไปสามารถทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสม

โดยการหาค่า Tm ของ primer จากการใช้สูตรคำนวณ ได้ดังนี้ Tm = 4 (จำนวนเบสของ G + จำนวนเบสของ C) + 2 (จำนวนเบสของ A + จำนวนเบสของ T) จากนั้นเปรียบเทียบการทำ PCR โดยใช้อุณหภูมิ annealing ที่ต่างกันประมาณ 2 องศาเซลเซียส หลายๆ อุณหภูมิ โดยใช้ค่า 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 ส่วนเวลาที่ใช้ในขั้นตอนนี้จะขึ้นกับความเข้มข้น และความยาวของลำดับเบส 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 มากขึ้น จะได้ dsDNA ที่สนใจจำนวนมาก เรียกการเพิ่มจำนวนแบบนี้ว่า “exponential amplification” ซึ่งคำนวณได้เท่ากับ 2n (n คือ จำนวนรอบในการทำ PCR cycle number) โดยจำนวนรอบที่ทำ PCR 20 รอบ สามารถเพิ่มปริมาณสาร dsDNA มากกว่า 100,000 เท่า จำนวนรอบในการทำ PCR ขึ้นกับปริมาณ DNA template ตั้งต้น แต่ถ้าใช้จำนวนรอบที่มากขึ้นโอกาสที่จะได้ผลผลิต PCR ที่ผิดพลาดมากขึ้นตามไปด้วย เนื่องจาก PCR product ที่ได้จะมีความจำเพาะเจาะจงที่ลดลง และมี background มากขึ้น แต่ถ้าใช้จำนวนรอบน้อยเกินไปผลผลิตที่ได้ก็น้อยลงด้วย (คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2546; หัทยา กากีวงศ์. 2549)

2.5 การศึกษาความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมโดยวิธี Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

เทคนิค restriction fragment length polymorphism (RFLP) คือ เทคนิคที่ใช้ในการศึกษาความยาวของท่อน DNA หลังการตัดโดย restriction endonuclease เพื่อใช้หาความสัมพันธ์ของลักษณะทางพันธุกรรมหรือโรคทางพันธุกรรมที่เกิดจากกลายพันธุ์ (mutation) ซึ่งการกลายพันธุ์สามารถทำ

ให้เกิด 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 ส่วนการเรียกชื่อ restriction endonuclease เรียกชื่อตามแบคทีเรียที่นำมาแยกเอนไซม์ โดยนำอักษรตัวแรกมาจากชื่อ genus อักษรสองตัวออกมาเป็นอักษรสองตัวแรกของ species อักษรตัวถัดมาจะเป็น strain และถัดมาจะเป็นตัวเลขโรมันที่ระบุถึงการค้นพบเอนไซม์ชนิดนั้น เช่น DdeI มาจากแบคทีเรีย genus *Desulfovibrio* species *desulfuricans* ซึ่งเอนไซม์นี้ถูกค้นพบเป็นตัวแรกในแบคทีเรียชนิดนี้ (คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2546)

Restriction endonuclease แบ่งได้เป็น 3 ชนิด คือ type I restriction endonuclease และ type II restriction endonuclease และ type III restriction endonuclease ตามคุณสมบัติ ความต้องการ 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, BsrBI, DdeI, EcoRI, Fnu4hI, HinfI, PstI และ TaqI เป็นต้น โดย restriction endonuclease แต่ละชนิดจะมีความจำเพาะต่อลำดับเบสของ DNA ที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างเอนไซม์ตัดจำเพาะ แหล่งที่มาของเอนไซม์และตำแหน่งตัดจำเพาะ

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

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 คือการเตรียม DNA โดยการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA ที่สนใจ (DNA amplification) จากนั้นทำการตัด DNA ออกเป็นชิ้นย่อยด้วย restriction endonuclease และตรวจสอบความแตกต่างของชิ้นส่วน DNA โดยใช้เทคนิค electrophoresis (คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2546; สุรินทร์ ปียะโชคณากุล. 2548)

2.6 การแยกชิ้น DNA ด้วยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis)

Electrophoresis เป็นวิธีการแยกสารที่ผสมกันอยู่ให้ออกจากกันโดยใช้กระแสไฟฟ้า หลักการของ electrophoresis คือ โมเลกุลที่มีประจุอยู่ในสนามไฟฟ้าที่เกิดจากขั้วไฟฟ้า 2 ขั้วในสารละลาย โมเลกุลของสารนั้นจะมีการเคลื่อนย้ายจากขั้วหนึ่งไปสู่ขั้วหนึ่ง โดยที่โมเลกุลที่มีประจุไฟฟ้ารวมเป็นบวกจะเคลื่อนที่ไปที่ขั้วลบ ในขณะที่โมเลกุลที่มีประจุไฟฟ้ารวมเป็นลบจะเคลื่อนที่ไปที่ขั้วบวก ซึ่งการเคลื่อนที่ในลักษณะนี้เรียกว่า electrophoresis ความเร็วในการเคลื่อนที่ขึ้นอยู่กับปัจจัย 2 ประการคือ แรงผลักดันซึ่งเกิดโดยสนามไฟฟ้ากระทำต่อโมเลกุลและแรงต้านทานการเคลื่อนที่ ซึ่งเกิดขึ้นในขณะที่โมเลกุลนั้นเคลื่อนย้ายเข้าไปในตัวกลางและเนื่องจากโมเลกุลของสารต่างๆ จะมีความแตกต่างกันทั้งขนาด รูปร่าง และประจุไฟฟ้า ทำให้ความสามารถในการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าต่างกัน จึงสามารถแยกโมเลกุลของสารหลายชนิดออกจากกันได้ (Buckingham. 2007) ในทางอณูชีววิทยานิยมนำเทคนิคนี้มาใช้ในการแยกขนาดของ DNA และโปรตีนโดยตัวกลาง ที่นิยมใช้มี 2 ประเภท คือ

- Paper electrophoresis ซึ่งนิยมใช้ในการแยกสารที่เป็นส่วนผสมของโมเลกุลที่มีประจุและมีขนาดเล็กโดยใช้กระดาษกรอง นำมาทำให้เปียกด้วยสารละลายที่มีการควบคุม pH และนำมาวางไว้ระหว่างขั้วไฟฟ้า 2 ขั้ว จากนั้นนำสารที่ต้องการจะแยกโมเลกุลต่างๆ ออกจากกันไปหยดที่ตำแหน่งที่กำหนดบนกระดาษนั้น เมื่อเปิดสนามไฟฟ้า และปล่อยให้โมเลกุลเคลื่อนที่เป็นเวลาพอเหมาะแล้วจึงนำเอากระดาษนั้นมาทำให้แห้ง 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 ซึ่งเมื่อเปิดกระแสไฟฟ้า โมเลกุลในสารละลายนั้นก็จะมีการเคลื่อนที่ ถ้าปัจจัยอื่นๆ เหมือนกัน โมเลกุลใหญ่กว่าก็จะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วน้อยกว่า ยิ่งใช้เวลานานขึ้นก็จะเคลื่อนที่แยกกันได้ชัดเจนขึ้น

DNA ที่เกิดจากปฏิกิริยา PCR ในหลอดทดลองจะไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ ดังนั้นในการตรวจหา PCR product จะต้องนำตัวอย่างที่ทำ PCR มาตรวจสอบโดยวิธี gel electrophoresis ซึ่งเป็นการแยก DNA ใน agarose gel ด้วยกระแสไฟฟ้า เปรียบเทียบกับ DNA marker ที่ทราบขนาดแน่นอน โดยระยะทางที่ DNA สามารถเคลื่อนที่ไปได้จะขึ้นอยู่กับขนาดของ DNA และกระแสไฟฟ้าที่ใช้ จากนั้นนำ agarose gel ไปย้อมด้วย ethidium bromide ซึ่งมีลักษณะเป็น polycyclic aromatic compound มีประจุบวกซึ่งจะไปจับกับ DNA ระหว่างคู่เบส โดยโมเลกุลของ

ethidium bromide จะจับกับ DNA ที่มีประจุลบตรงตำแหน่งของเกลียวที่ทำมุม 26° ดังนั้น เมื่อนำ agarose gel ที่ผ่านการย้อมด้วย ethidium bromide ไปส่องบนเครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV transilluminator) จะเห็นแบน 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 คือเป็นประชากรขนาดใหญ่ ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน (mutation) ประชากรมีการแยกออกจากประชากรอื่นๆ ในชนิดพันธุ์เดียวกันไม่มีการอพยพ (migration) มีการแต่งงานแบบสุ่ม (random) ไม่มีการเลือก (selection) และยีนไม่มีผลต่อการอยู่รอดหรือสืบพันธุ์ สัดส่วนของลักษณะที่แสดงออกทางพันธุกรรม (genotype) ที่ตำแหน่งของยีนหนึ่งซึ่งมี allele 2 ประเภทแสดงออกร่วมกัน (co-dominant) จะเป็นไปตามสมการ

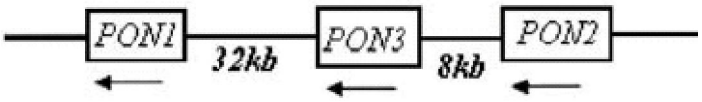
$$P^2 + 2pq + q^2 = 1$$

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 ตัว คือ *PON1, PON 2* และ *PON 3* อยู่บน chromosome คู่ที่ 7 ในส่วนของ long arm ตำแหน่งระหว่าง q21.3 และ q22.1 (Li. 2003 : 766-779) (ภาพที่1) ซึ่งยีน *PON* ทำการควบคุมการแสดงออกทางโครงสร้างของเอนไซม์ ทำให้ลักษณะโครงสร้างของเอนไซม์ในกลุ่มนี้มีความคล้ายคลึงกันทั้งในระดับ nucleotide และระดับกรดอะมิโน (Mackness. 2002 : 357-362; Draganov. 2004 : 78-88) โดยโครงสร้างของเอนไซม์ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 354 ตัว มีขนาดประมาณ 40 - 45 kDa มีลักษณะโครงสร้างเป็นวงคล้าย aromatic ring ซึ่งเกิดจากการเชื่อมโยงกันของกรดอะมิโน cysteine (Cys) ที่ตำแหน่ง 42 และ 353 และมีสายคาร์โบไฮเดรตหลายสายมาจับอยู่บนโครงสร้างนี้ นอกจากนี้ยังมี Cys อิสระที่ตำแหน่ง 284 ซึ่งมี sulhydryl group (-SH) ทำให้เอนไซม์ในกลุ่ม paraoxonase จัดอยู่ในกลุ่ม glycoprotein esterase enzyme ที่มีคุณสมบัติในการสลาย (hydrolyze) สาร lipid hydroperoxide และ hydrogen

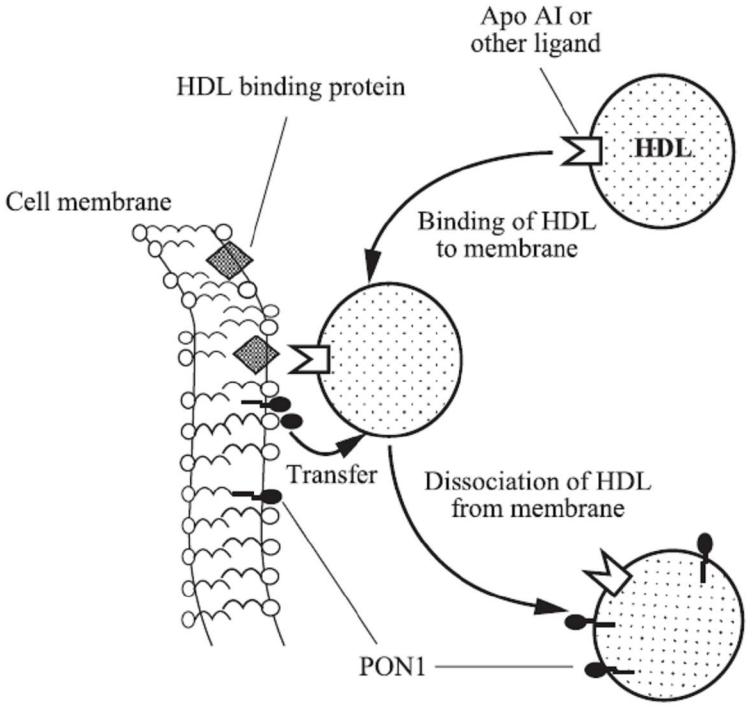
peroxide อันเป็นผลจากกระบวนการ lipid oxidation ภายในร่างกาย จึงเชื่อว่าเอนไซม์กลุ่มนี้มีคุณสมบัติในการป้องกันการเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็งตัว (Draganov. 2004 : 78-88)



ภาพที่ 1 กลุ่มยีน *PON* บนโครโมโซมคู่ที่ 7 ตำแหน่งระหว่าง q21.3 และ q22.1 (Li. 2003 : 766-779)

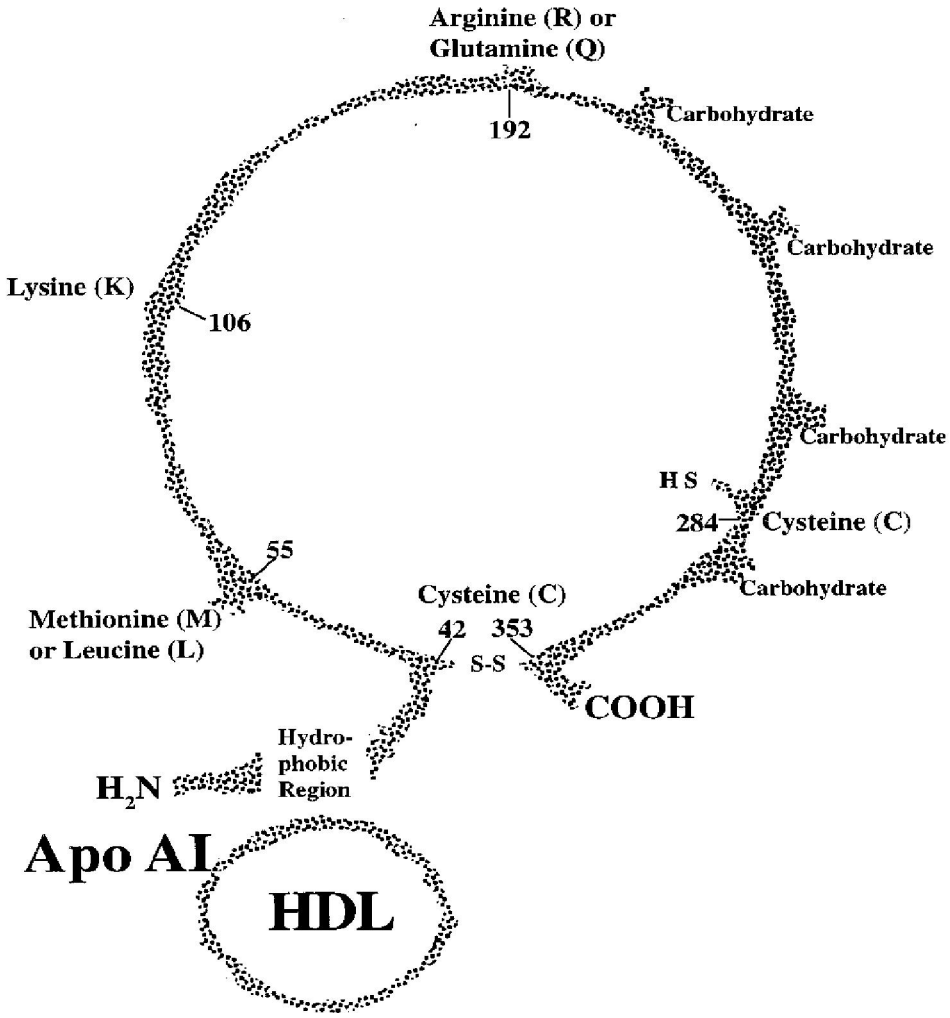
Paraoxonase 1 (PON1)

PON1 เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม calcium-dependent esterase หรือ lactonase ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา hydrolysis สารจำพวก organophosphate (La Du. 1996 : 1186-1187) Mazur และคณะเป็นกลุ่มแรกที่มีการรายงานว่าพบเอนไซม์ PON1 ในเนื้อเยื่อของสัตว์ ซึ่งสามารถสลายยาฆ่าแมลงในกลุ่ม organophosphate (Mazur. 1946 : 271-289) โดย PON เป็นชื่อที่ได้มาจากคุณสมบัติในการสลาย metabolite product ของ paraoxon (paraoxonase activity, EC 3.1.8.1) ซึ่ง paraoxon เป็นยาฆ่าแมลงที่เป็น substrate ที่ใช้ในการศึกษามากที่สุด นอกจากนี้ PON1 ยังมีความสามารถสลาย metabolite ของยาฆ่าแมลงตัวอื่นๆ เช่น oxon และ diazoxon ที่มีความสามารถในการทำลายสาร สื่อประสาท เช่น sarin และ soman (Davies. 1996 : 334-336) และ PON1 ยังสามารถสลาย สารประกอบในกลุ่ม aromatic ester เช่น phenyl acetate (arylesterase activity, EC 3.1.1.2) นอกจากนี้ PON1 สามารถสลายสารประกอบในกลุ่ม aromatic และ aliphatic lactones ได้ (Biggadike. 2000 : 19-21; Billecke. 2000 : 1335-1342) PON1 ประกอบด้วย amino acid 354 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุล 45 kDa สามารถพบได้ในตับแต่พบได้น้อยในไต (Ng. 2005 : 153-163) PON1 จะถูกหลั่งออกมาใน plasma และจับกับ high-density lipoprotein (HDL) โดย apolipoprotein AI (apo AI) บน HDL เป็นตัวกระตุ้นให้ PON1 หลั่งออกมามาจากตับ (ภาพที่ 2) (Sorenson. 1999 : 2214-2225; James. 2004 : 1986-1994; Deakin. 2004 : 435-447) ซึ่ง calcium ions (Ca^{2+}) 2 ตัว ที่อยู่ตรงกลางโครงสร้างของ PON1 ทำหน้าที่ hydrolytic activity นอกจากนี้ PON1 มี cysteine 3 ตำแหน่งคือ cysteine (ภาพที่ 3) ที่ตำแหน่ง 42 และตำแหน่ง 353 เชื่อมติดกันโดย disulfide bond ในขณะที่ cysteine ที่ตำแหน่ง 284 เป็น free cysteine ที่จำเป็นสำหรับการทำงานของ arylesterase และทำหน้าที่เป็น antioxidant enzyme ในการยับยั้ง LDL oxidation (Aviram. 1998 : 1617-1624) โดย Avriam และคณะได้อธิบายว่า การดึง Ca^{2+} ออกส่งผลกระทบต่อเสถียรภาพของ PON1 และส่งผลกระทบต่อการทำงานในการ hydrolyze สารจำพวก organophosphate ให้มี activity น้อยลง แต่ไม่รบกวนความสามารถในการยับยั้ง LDL oxidation (Aviram. 1998 : 1617-1624)



ภาพที่ 2 การกระตุ้นการหลั่งเอนไซม์ PON1 จากเซลล์ตับ โดย apolipoprotein AI บน HDL (Deakin. 2004 : 435-447)

Mackness และคณะสามารถอธิบายได้เป็นกลุ่มแรกว่า purified PON1 ของมนุษย์สามารถยับยั้ง LDL oxidation ในหลอดทดลอง (Mackness. 1991 : 193-199) จากการศึกษาคุณสมบัติการเป็น antioxidant ของ PON1 อธิบายได้ว่า PON1 สามารถป้องกันการเกิด oxidized-LDL (Ox-LDL) โดยกลไกการยับยั้ง Ox-LDL ของ PON1 ที่เป็นไปได้คือการ hydrolyze lipid peroxide และ hydrogen peroxide (Mackness. 1993 : 129-135) Watson และคณะอธิบายว่า PON1 ทำให้ผนังหลอดเลือด artery มีการตอบสนองต่อการอักเสบน้อยลงโดยทำลาย Ox-LDL (Watson. 1995 : 2882-2891) นอกจากนี้ free sulfhydryl group ของ cysteine ที่ตำแหน่ง 284 ยังสามารถป้องกันการเกิด oxidized phospholipids ของ HDL (Aviram. 1998 : 1617-1624) ซึ่งระดับการทำงานของ PON1 จะไม่แตกต่างกันระหว่างเพศแต่ขึ้นกับอายุ โดยพบว่าในเด็กแรกเกิดจนถึงก่อนอายุครบ 1 ปี จะมีระดับการทำงานของ PON1 ประมาณ 50% ของระดับที่พบในผู้ใหญ่ (Mackness. 1998 : 329-336; Cole . 2003 : 357-364) ในเด็กที่มีอายุมากกว่า 1 ปี จะมีระดับการทำงานของ PON1 เท่ากับผู้ใหญ่ อย่างไรก็ตาม Richter และ Furlong พบว่าความเข้มข้นและระดับ activity ของ PON1 ในแต่ละบุคคลมีความแตกต่างกันมากถึง 13 เท่า (Richter. 1999 : 745-753)



ภาพที่ 3 โครงสร้างของ PON1 (La Du. 1999 : 379-388)

ระดับการทำงานของ PON1 ในซีรั่มมีความหลากหลายเกี่ยวเนื่องมาจากหลายปัจจัย เช่น polymorphisms ของยีน *PON1* วิถีการดำรงชีวิตและการเกิดโรค โดย Nishio และ คณะ พบว่าการสูบบุหรี่มีผลยับยั้ง PON1 activity ในหลอดทดลอง (Nishio. 1997 : 289-293) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยจำนวนมากที่พบว่าคนที่สูบบุหรี่มีระดับการทำงานของ PON1 ต่ำกว่าคนที่ไม่สูบบุหรี่ (James. 2000 : 2252-2257; Jarvik. 2002 : 1329-1333; Ferre. 2003 : 1491-1497; Senti. 2003 : 5422-5426) อาจเนื่องจากสารประกอบในกลุ่ม aldehyde และ aromatic hydrocarbon ที่อยู่ในบุหรี่ แต่ระดับการทำงานของ PON1 ที่ลดลงจะกลับมาอยู่ที่ระดับเท่าเดิมหลังงดสูบบุหรี่ 3-24 เดือน (Nishio. 1997 : 289-293) นอกจากนี้ยังพบว่าการดื่ม alcohol มีผลต่อระดับการทำงานของ PON1 activity โดย ethanol alcohol และ aliphatic alcohol สามารถยับยั้ง PON1 ใน serum ของมนุษย์ (James. 2000 : 2252-2257; Ferre. 2003 : 1491-1497) แต่ไม่สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Debord และคณะ ที่พบว่าการดื่ม alcohol ของผู้ชายที่มีสุขภาพดีจะทำให้ระดับการทำงานของ PON1 สูงขึ้น (Debord. 1998 : 105-115) และจากการศึกษาอื่นๆ พบว่าการดื่ม alcohol ในปริมาณ

เล็กน้อยเป็นประจำจะทำให้มีระดับการทำงานของ PON1 สูงกว่าผู้ที่ไม่ได้ดื่ม alcohol ถึง 39% ในขณะที่มีการดื่ม alcohol อย่างหนักจะทำให้มีระดับการทำงานของ PON1 ต่ำกว่าผู้ที่ไม่ได้ดื่ม alcohol ถึง 45% (Vandergaag. 1999 : 405-410) แต่อย่างไรก็ตามบางรายงานการวิจัยพบว่าปริมาณการดื่ม alcohol ไม่มีผลกระทบต่อระดับการทำงานของ PON1 (Ferre. 2003 : 1491-1497; Sarandol. 2003 : 507-512)

มีรายงานการวิจัยพบว่าระดับการทำงานของ PON1 ลดลงเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค เช่น โรคเบาหวาน (Boemi. 2001 : 229-235; Mackness. 2001 : 1451-1457; Senti. 2003 : 5422-5426) vascular dementia, Alzheimer (Paragh. 2002 : 63-67) liver cirrhosis และ chronic hepatitis (Ferre. 2002 : 261-268) รวมทั้ง renal failure (Paragh. 1998 : 166-170) อย่างไรก็ตามระดับการทำงานของ PON1 จะกลับคืนมาอยู่ที่ระดับปกติภายหลังจากที่ผู้ป่วยได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนไต (Dantoine. 1998:) นอกจากนี้ยังพบว่าในผู้ชายที่เป็น coronary artery disease (CAD) ในระยะเริ่มต้นจะมีระดับการทำงานของ PON1 ต่ำกว่าในผู้ชายที่มีสุขภาพดี ถึง 30% (Mackness. 2003 : 2775-2779)

ความแตกต่างของความเข้มข้นและระดับการทำงานของ PON1 ในระหว่างบุคคลยังมีปัจจัยจาก polymorphisms ของยีน *PON1* จากการศึกษาจนถึงปัจจุบันพบว่ายีน *PON1* มี polymorphisms อยู่หลายตำแหน่งทั้ง coding region และ promoter ซึ่งยีน *PON1* ส่วน coding region มี polymorphisms ที่สำคัญอยู่ 2 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ 192 จะถูกควบคุมโดย allele ที่ควบคุมการสร้าง amino acid ชนิด glutamine และ arginine (Q192R) และที่ตำแหน่ง 55 จะถูกควบคุมโดย allele ที่ควบคุมการสร้าง amino acid ชนิด leucine และ methionine (L55M) (Adkins. 1993 : 598-608; Humbert. 1993 : 73-76) ซึ่ง L55M polymorphism มีผลกระทบต่อความเข้มข้นของ PON1 และ Q192R polymorphism มีผลกระทบต่อระดับการทำงานของ PON1 โดยเชื่อว่า L55M polymorphism ทำหน้าที่ในการจับกันระหว่าง PON1 กับ HDL เพราะ L55M มีตำแหน่งอยู่ทางด้าน N-terminal ของ PON1 (Furlong. 1991 : 1013 -1040) ส่วน Q192R polymorphism ทำหน้าที่ในการควบคุมระดับการทำงานของ PON1 โดยขึ้นอยู่กับชนิดของ substrate (Davies. 1996 : 334-336) ซึ่ง RR genotype มีประสิทธิภาพในการ hydrolyze paraoxon สูงกว่า QQ genotype (Humbert. 1993 : 73-76) ในทางตรงกันข้าม QQ genotype มีประสิทธิภาพในการ hydrolyze diazoxon, soman และ sarin สูงกว่า RR genotype (Davies. 1996: 334-336) ส่วนของ *PON1* gene promoter มี polymorphism ที่สำคัญ คือ ตำแหน่งที่ -108 โดยพบว่าการเปลี่ยนจาก cytosine (C) เป็น thymine (T) (T-108C) มีความสัมพันธ์กับระดับความเข้มข้นของ PON1 โดย CC genotype จะมีความเข้มข้นของ PON1 ในซีรั่มสูงกว่า TT genotype (Leviev. 2000 : 516-521; Suehiro. 2000 : 295-298)

ปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับลักษณะของ polymorphism และระดับการทำงานของ PON1 ในการป้องกันการเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็งตัว (atherosclerosis) เนื่องจาก PON1 มีคุณสมบัติเป็น

antioxidant ที่สามารถป้องกันการเกิด LDL และ HDL oxidation โดย Osei-Hyiaman และคณะ พบว่ากลุ่มประชากรที่มีการแสดงออกของ genotype ของยีน *PON1*-(Q192R) แบบ RR มีความสัมพันธ์กับการเกิด coronary artery disease (Osei-Hyiaman. 2001 : 639–644) แต่ในบางรายงานการวิจัยไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง *PON1*-(Q192R) ต่อความเสี่ยงในการเกิด coronary heart disease (CHD) (Hangel. 1999 : 217-224; Watzinger. 2002 : 116-122) แต่จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง polymorphisms ของ *PON1* กับ CHD โดยวิธี meta-analysis พบว่ากลุ่มประชากรที่มีการแสดงออกของ genotype ของยีน *PON1*-(Q192R) แบบ RR มีความสัมพันธ์กับ CHD (Wheeler. 2004 : 689-695) ในขณะที่ Mackness และคณะ พบว่าในกลุ่มประชากรที่มี L allele ของยีน *PON1*-(L55M) จะมีความสัมพันธ์กับภาวะ atherosclerosis (Mackness. 2004 : 1317-1323) จากรายงานการศึกษาจำนวนมากพบว่า *PON* polymorphisms เป็นปัจจัยเสี่ยงทางพันธุกรรมต่อการเกิด coronary heart disease (CHD) แต่ผลที่ได้ยังมีความขัดแย้งอยู่ ซึ่งปัจจัยหลักที่อาจทำให้เกิดความแตกต่างเหล่านี้ คือ การกระจายตัว *PON* polymorphisms ในแต่ละเชื้อชาติมีความแตกต่างกัน ดังนั้นการศึกษาการกระจายตัวของ *PON1* polymorphisms ที่ตำแหน่ง T-108C, L55M และ Q192R ในกลุ่มประชากรแต่ละประเทศ จึงมีความสำคัญในการประเมินความเสี่ยงของการเกิดโรคร้ายแรงต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับภาวะ oxidative stress เพื่อใช้เป็นแนวทางในการป้องกันและการรักษาโรค