The Application of Mitochondrial DNA Variation Testing in Human

Prapatsorn Areesirisuk and Budsaba Rerkamnuaychoke*

Department of Pathology, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand

Abstract

Mitochondrial DNA (mtDNA) is a useful genetic marker that can be applied in various applications including the human evolution study, anthropology, maternal lineage identification in forensic genetics, as well as the mutation variations of mitochondrial genes to predict the medical diagnosis. The mtDNA mutation variations are collected from popular international databases including GenBank, EMPOP, and MITOMAP used as references and mtDNA data comparison to achieve the quality and standardized analysis.

Keywords: Mitochondrial genome, mtDNA mutation, Database

***Corresponding author E-mail address:** budsaba.rer@mahidol.ac.th

Received: 6 June 2023 Revised: 24 July 2023 Accepted: 13 September 2023

#52-3-66 .indd 8661 7/12/2566 BE 12:30

การประยุกต์การทดสอบไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในมนุษย์

ประภัสสร อารีสิริสุข และ บุษบา ฤกษ์อำนวยโชค*

ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร

บทคัดย่อ

ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA: mtDNA) เป็นเครื่องหมายพันธุกรรม (genetic marker) ที่มีประโยชน์และสามารถนำมาประยุกต์ได้หลายด้าน เช่น การศึกษาวิวัฒนาการของมนุษย์ การศึกษาด้านมานุษยวิทยาการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลในงานนิติพันธุศาสตร์ รวมไปทั้งความผันแปรของการกลายในไมโทคอนเดรียลยีนสำหรับทำนายการเกิดโรคในทางการแพทย์ ความผันแปรของตำแหน่งการกลายที่ได้มีการรวบรวมไว้ในฐานข้อมูลสากลที่ได้รับความนิยม เช่น GenBank, EMPOP และ MITOMAP สำหรับใช้ในการอ้างอิงและเปรียบเทียบข้อมูลไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอเพื่อให้การวิเคราะห์มีคุณภาพและได้มาตรฐาน

คำสำคัญ: จีโนมของไมโทคอนเดรีย ตำแหน่งการกลายในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ ฐานข้อมูล

***ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address:** budsaba.rer@mahidol.ac.th

รับบทความ: 6 มิถุนายน 2566 แก้ไขบทความ: 24 กรกฎาคม 2566 รับตีพิมพ์บทความ: 13 กันยายน 2566

#52-3-66 .indd 8662 7/12/2566 BE 12:30

1. บทนำ

ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) เป็นออร์แกเนลล์ของเซลล์ (cellular organelle) มีดีเอ็นเอเป็นสารพันธุกรรมของตัวเองโดยเฉพาะเรียกว่า ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA: mtDNA) ในเซลล์ของมนุษย์ ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ มีลักษณะเป็น double stranded DNA ที่มีลักษณะเป็นวงกลม สามารถจำลองโมเลกุลดีเอ็นเอและสังเคราะห์โปรตีนได้เอง ซึ่งมีการกระจายอยู่ในไซโทพลาสซึม ภายในเซลล์จะมีไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอประมาณ 1,000-10,000 ชุด[1,2] แตกต่างจากดีเอ็นเอในนิวเคลียส (nuclear DNA) ที่พบเพียง 2 ชุดต่อเซลล์ ด้วยคุณสมบัตินี้จึงนิยมตรวจไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในกรณีที่ไม่สามารถตรวจดีเอ็นเอในนิวเคลียสได้อย่างสมบูรณ์ เช่น การตรวจตัวอย่างส่งตรวจที่เสื่อมสภาพ หรือไม่มีดีเอ็นเอในนิวเคลียส เป็นต้น

จีโนมของไมโทคอนเดรีย (mitochondrial genome) มีความยาว 16,569 คู่เบส (base pair) และยีน 37 ยีน ประกอบด้วยยีนที่ถอดรหัสเป็นอาร์เอ็นเอถ่ายโอน (transfer RNA: tRNA) จำนวน 22 ยีน เป็นไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอ (ribosomal RNA: rRNA) จำนวน 2 ยีน และเป็นรหัสของการสังเคราะห์โปรตีนจำนวน 13 ยีน เพื่อทำหน้าที่ผลิตพลังงานในรูปของอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (adenosine triphosphate: ATP) ให้แก่เซลล์[1-3] ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอมีโครงสร้างดังแสดงใน Fig. 1 ทั้งนี้ลำดับสารพันธุกรรมในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเออาจมีการเปลี่ยนแปลงได้ เนื่องจากมีอัตราการกลายสูงมีรายงานว่าอัตราการกลายของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอสูงกว่าดีเอ็นเอนิวเคลียสประมาณ 10-20 เท่า จึงนิยมใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ซึ่งการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอมีรูปแบบการถ่ายทอดไม่เป็นไปตามกฎของเมนเดล (non-Mendelian inheritance) แต่เป็นการถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมผ่านแม่ (maternal inheritance) ผ่านทางไซโทพลาสซึม (cytoplasm) ของเซลล์ไข่ของแม่ และถ่ายทอดไปยังลูกรุ่นต่อไปทุกคนโดยไม่มีการรวมตัวหรือแลกเปลี่ยนพันธุกรรมกับดีเอ็นเอจากสายพ่อ ทำให้ความแตกต่างของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในรุ่นลูกหลานปัจจุบันที่สืบสายจากบรรพบุรุษหญิงเดียวกันในอดีตเกิดขึ้นจากผลของการกลายที่เกิดขึ้นใหม่ทั้งสิ้น[4,5] นอกจากนี้ในบางกรณีการกลายที่เกิดขึ้นในยีนของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเออาจทำให้เกิดโรคได้เช่นกัน จากหลักการถ่ายทอดทางพันธุกรรมผ่านแม่ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ อีกทั้งขนาดข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมในจีโนมของไมโทคอนเดรียมีขนาดไม่ใหญ่มากและยิ่งไปกว่านั้นด้วยเทคโนโลยีในการหาลำดับพันธุกรรมในปัจจุบัน ทำให้สามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ในเวลาอันรวดเร็ว ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอจึงเป็นอีกหนึ่งเครื่องหมายทางพันธุกรรม ที่นิยมนำมาประยุกต์ทั้งทางด้านการศึกษาทางวิวัฒนาการ (evolution) มานุษยวิทยา (anthropology) นิติพันธุศาสตร์ (forensic genetics) และการแพทย์เพื่อวินิจฉัยโรคที่เกิดจากการกลายของยีนในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอได้เป็นอย่างดี

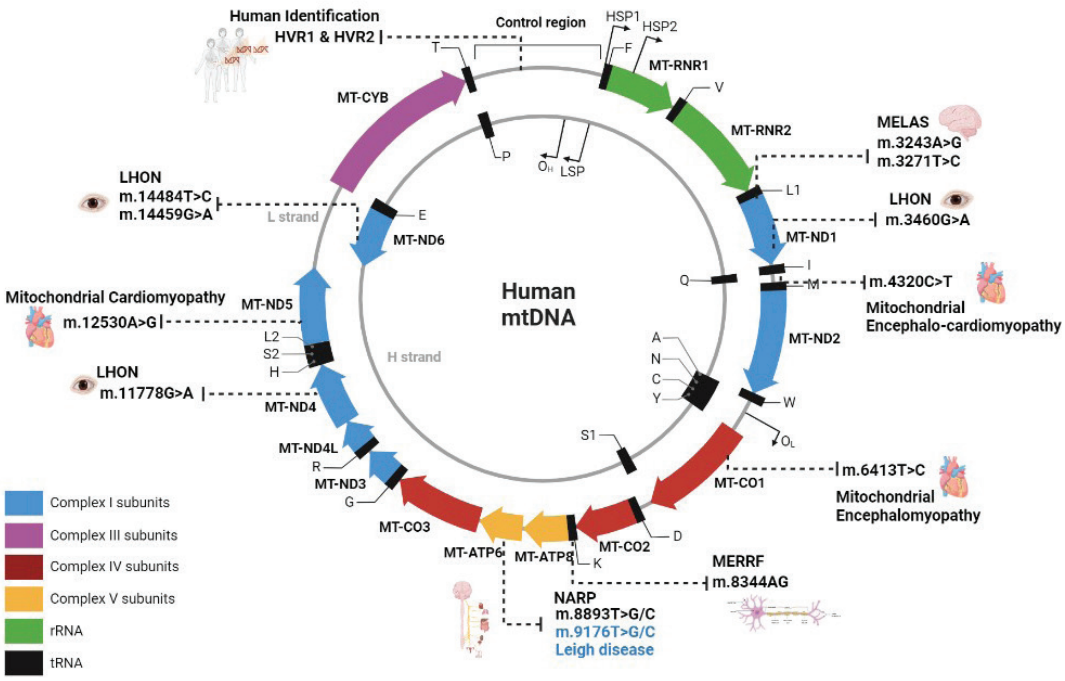


Fig. 1 Mitochondrial DNA structure and common mutant regions for several applications.

2. รูปแบบการรายงานข้อมูลการกลายของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอมีหลายเทคนิค ได้แก่ การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิคแซงเกอร์ (Sanger sequencing) และเทคโนโลยี next generation sequencing : (NGS) นอกจากนี้ยังมีเทคนิคใหม่ที่ใช้ตรวจหากลุ่มตำแหน่งการกลายที่สำคัญของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอและมีผลต่อการทำนายโรคที่จำเพาะได้ในคราวเดียว เรียกว่า เทคนิค multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) โดยทุกเทคนิคมีจุดมุ่งหมายเดียวกันคือ การศึกษาความหลากหลายของรูปแบบการกลายของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ รูปแบบการรายงานตำแหน่งการกลายจึงมีความสำคัญ โดยรายงานตำแหน่งการกลายของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ ซึ่งเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของตัวอย่างที่ต้องการตรวจพิสูจน์กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเออ้างอิง (revised Cambridge Reference Sequence: rCRS 1999; NC_012920.1) ที่รายงานโดย Andrews และคณะ[6] ซึ่งเป็นรูปแบบตำแหน่งที่แตกต่างไปจากลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง (rCRS 1999; NC_012920.1)[6] และชนิดของนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนไป ในที่นี้จะยกตัวอย่างการรายงานรูปแบบการกลายของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ 3 รูปแบบ ได้แก่

(1) การกลายแบบเฉพาะจุด (point mutation) คือ การเปลี่ยนชนิดของนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งนั้น เช่น นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 16093 ในบริเวณ HVR 1 (hyper variable region 1) มีการกลายพันธุ์จากเบส T เป็น C จะมีรูปแบบการเขียนได้ดังนี้ T16093C 16093C หรือ 16093T>C เป็นต้น

(2) การกลายแบบขาดหาย (deletion mutation) คือ การขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งนั้น อาจจะมีการหายไปเพียง 1 เบส หรือ หายไปมากกว่า 1 เบส เช่น นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 249 ในบริเวณ HVR 2 มีการกลายแบบขาดหายของเบส A จะมีรูปแบบการเขียนได้ ดังนี้ 249DEL, 249del หรือ 249- เป็นต้น

(3) การกลายแบบสอดแทรก (insertion mutation) คือ การเพิ่มนิวคลีโอไทด์เข้าไปในลำดับดีเอ็นเอตำแหน่งนั้น ซึ่งอาจจะเพิ่มขึ้นเพียงจำนวน 1 เบส หรือมากกว่า 1 เบส ที่เป็นชนิดเดียวกัน หรือเบสต่างชนิดกันก็ได้ เช่น นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 309 ในบริเวณ HVR 2 มีลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง คือ C แต่มีการเพิ่มจำนวน C มา 1 เบส จะมีรูปแบบการเขียนได้ดังนี้ 309.1C หากมีการเพิ่มจำนวน C มา 2 เบส จะมีรูปแบบการเขียนได้ดังนี้ 309.2C โดยตัวเลขหลังตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่เกิดการกลายจะแสดงจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่เพิ่มขึ้น[2, 7]

3. การประยุกต์ข้อมูลการกลายในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

จากการรายงานพบว่ามีการนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอมาประยุกต์อย่างแพร่หลายในงานวิจัยหลายด้าน ซึ่งในงานวิจัยแต่ละด้านจะใช้รูปแบบการรายงานที่เป็นมาตรฐานเดียวกัน โดยอาจจะมีความจำเพาะเจาะจงมากขึ้นในบางรายงานแต่ไม่ได้เปลี่ยนแปลงจากเดิมมากนัก โดยมีข้อจำกัดหรือจุดเด่นในการรายงานในแต่ละรูปแบบของการประยุกต์ ซึ่งรูปแบบการรายงานหลักจะเป็นการรายงานรูปแบบตำแหน่งการกลายของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง โดยมีการประยุกต์ข้อมูลความหลากหลายของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเออย่างแพร่หลายดังนี้

3.1 นิติพันธุศาสตร์ (forensic genetics)

จากการที่รูปแบบการกลายของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอมีความหลากหลาย (mtDNA polymorphism pattern) มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมผ่านแม่ไปสู่ลูกหลาน โดยเฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณควบคุม (control region) ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอที่มีอัตราการกลายสูงกว่าบริเวณอื่น เรียกว่า hypervariable region (HVR) มี 3 บริเวณ ได้แก่ HVR1, HVR2 และ HVR3 หรือ เรียกว่า D-loop (displacement loop) นอกจากนี้การที่แต่ละเซลล์มีจำนวน copy ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอภายในเซลล์เป็นจำนวนมาก ทำให้มีโอกาสที่จะสกัดเอาไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ ออกจากตัวอย่างที่เสื่อมสภาพ ตัวอย่างที่ไม่สมบูรณ์และไม่มีนิวเคลียสมาวิเคราะห์ได้ การตรวจพิสูจน์ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ จึงเป็นอีกหนึ่งการทดสอบทางนิติพันธุศาสตร์ที่นำมาใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล โดยสามารถวิเคราะห์ได้จากความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณ HVR 1 และ HVR 2 เป็นอย่างน้อย[2, 8] หลักการแปลผลของการตรวจพิสูจน์ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ อาศัยหลักการที่บุคคลซึ่งสืบเชื้อสายมาจากสายมารดาเดียวกันจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ ที่สองบริเวณดังกล่าวไม่แตกต่างกัน[2, 7]

รูปแบบการรายงานผลของการตรวจวิเคราะห์ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในงานนิติวิทยาศาสตร์มีความสำคัญเป็นอย่างมาก รูปแบบการรายงานต้องได้มาตรฐานและสามารถเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการได้ โดยแต่ละห้องปฏิบัติการต้องมีหลักการรายงานผลตาม

แนวทาง (guideline) ของ Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWADM)[7] เพื่อให้มีการรายงานตำแหน่งและรูปแบบการรายงานผลที่ตรงกัน ได้มาตรฐานและสามารถเปรียบเทียบผลการตรวจพิสูจน์ได้ทั่วโลก นอกจากนี้ยังมีรายงานว่านอกจากบริเวณ HVR1, HVR2 และ HVR3 แล้ว ยังมียีนที่อยู่บริเวณ coding region ที่นำมาใช้ตรวจเพิ่มเติมได้ เช่น *ND4* และ *ND5* ที่ให้ค่า power of discrimination ใกล้เคียงกับ HVR1 และ HVR2[9] ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมทางเลือกเพื่อเพิ่มความสามารถในการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลได้

ในปัจจุบันเทคโนโลยีการหาลำดับสารพันธุกรรมได้รับการพัฒนาอย่างรวดเร็วทำให้ราคาถูกลง ทำให้มีการนำเทคโนโลยีนี้มาประยุกต์ในงานต่าง ๆ มากขึ้น รวมทั้งการใช้ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในการพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายมารดาเป็นที่นิยมมากขึ้น[10, 11] นอกจากนี้ข้อมูลความหลากหลายของชุดลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mtDNA haplotypes diversity) ของแต่ละประเทศมีความสำคัญและมีเอกลักษณ์ในประชากรแต่ละกลุ่ม จึงมีการจัดกลุ่มรูปแบบ haplotype โดยจำแนกกลุ่มประชากรตามความผันแปรของนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งต่าง ๆ เพื่อศึกษาความจำเพาะของกลุ่มประชากรในแต่ละภูมิศาสตร์เรียกว่า haplogroup สำหรับอธิบายความจำเพาะของสารพันธุกรรมของกลุ่มประชากรอีกด้วย การศึกษาความจำเพาะของประชากรของแต่ละประเทศจึงมีความสำคัญและมีประโยชน์ในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล เช่น ในกรณีการตามหาบุคคลสูญหาย ซึ่งในประเทศไทยได้มีการศึกษาทั้ง haplotype และ haplogroup ในกลุ่มประชากรไทยปัจจุบัน (modern Thai population) ซึ่ง haplogroup ที่พบมากที่สุดคือ F1a และพบในลำดับถัดมา ได้แก่ B5a และ M7b ตามลำดับ[12] โดย haplogroup ดังกล่าว มีความผันแปรของนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่จำเพาะในกลุ่มประชากรเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งมีภูมิศาสตร์ที่อยู่ใกล้ประเทศไทยอีกด้วย นอกจากนี้ ประภัสสร และคณะ[12] ได้ศึกษา haplogroup ในกลุ่มประชากรไทยปัจจุบัน และได้นำข้อมูลไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอดังกล่าวไปเผยแพร่ในฐานข้อมูล EMPOP ซึ่งนำไปใช้ประโยชน์ในการอ้างอิงและเปรียบเทียบกับข้อมูลอื่นได้

3.2 มานุษยวิทยา (anthropology)

มานุษยวิทยา (anthropology) เป็นการศึกษาเกี่ยวกับข้อมูลมนุษย์และศึกษาวิวัฒนาการของมนุษย์ ซึ่งเริ่มมีการใช้ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในการศึกษาทางมานุษยวิทยาตั้งแต่ปีคริสต์ศักราช 1987[13] ต่อมาการศึกษาเกี่ยวกับพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลและพันธุศาสตร์ประชากร (population genetics) ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอมนุษย์ในภูมิภาคต่าง ๆ ทั่วโลกได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว[14] ทำให้มีการประยุกต์ในการสืบค้นความสัมพันธ์ในแง่ของวิวัฒนาการและในแง่โครงสร้างทางภูมิศาสตร์ภายในกลุ่มประชากรได้เป็นอย่างดี

จุดเด่นของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอที่เหมาะสมต่อการนำมาศึกษาด้านมานุษยวิทยา มีหลายประการ เช่น

- ไมโทคอนเดรียมีจำนวน copy มากภายในเซลล์ ทำให้มีโอกาสที่จะสกัดเอาไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่มีอายุเก่าแก่ซึ่งอาจอยู่ในสภาพที่ไม่ดีหรือเสื่อมสภาพ มาวิเคราะห์ได้
- ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอมีวิวัฒนาการค่อนข้างเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอในนิวเคลียสของสัตว์หลายชนิดรวมถึงมนุษย์

- ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ ไม่เกิด genetic recombination และมีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมผ่านสายแม่เท่านั้น ทำให้การแปลผลไม่ซับซ้อนเหมือนดีเอ็นเอในนิวเคลียส เนื่องจากนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอมีลำดับคงเดิมทุกประการเมื่อมีการถ่ายทอดจากแม่ไปสู่ลูก ดังนั้นความแตกต่างในระดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่างจะสะท้อนให้เห็นถึงความแตกต่างของวิวัฒนาการในแต่ละประชากรได้[15]

จากหลักการที่กล่าวมาข้างต้นพบว่า การศึกษาความหลากหลายของสารพันธุกรรมในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ ยังสามารถนำมาประยุกต์ในการสืบสวน การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของซากโครงกระดูกโบราณในแหล่งโบราณคดี และความสัมพันธ์ระหว่างประชากรในพื้นที่ระหว่างโครงกระดูกกับชนกลุ่มต่าง ๆ รวมทั้งระหว่างกระดูกโบราณกับพฤติกรรมการดำรงชีวิตของกลุ่มชาติพันธุ์ในแต่ละพื้นที่ได้ ทั้งนี้ในประเทศไทยก็มีการศึกษาข้อมูลของความหลากหลายของสารพันธุกรรมด้วยเช่นกัน โดยทำการศึกษายีนไมโทคอนเดรียในส่วน HVR รวมไปถึงระดับไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในจีโนมของประชากรกลุ่มต่าง ๆ ในปัจจุบันของประเทศไทย และมีงานวิจัยที่ศึกษากลุ่มประชากรโบราณ โดยมีทั้งแบบจำแนกโดยการที่ใช้ภาษา เช่น กลุ่มประชากรโบราณที่ใช้ภาษาตระกูลไต-กะได หรือการจำแนกโดยการที่ใช้กลุ่มประชากรโบราณตามภูมิภาคที่ค้นพบ เช่น บ้านเชียง รวมทั้งจากโครงกระดูกโบราณยุคสัมฤทธิ์และยุคเหล็กที่ขุดค้นในประเทศไทย ด้วยความร่วมมือกับกรมศิลปากร โดยข้อมูลไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอที่ได้จะนำมาศึกษาและเปรียบเทียบทั้งในแง่ของ haplotype diversity, phylogenetic tree และ genetic distance รวมทั้งการจัด haplogroup แล้วนำข้อมูลที่ได้มาบูรณาการกับข้อมูลด้านมานุษยวิทยา ประวัติศาสตร์ และโบราณคดี[11, 15-17]

3.3 การวินิจฉัยโรคไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mtDNA diagnosis)

ในทางการแพทย์ความผิดปกติของยีนในไมโทคอนเดรียทำให้เกิดโรคได้หลายโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งในโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทและระบบกล้ามเนื้อ (neuromuscular system) ซึ่งเป็นระบบที่ต้องใช้พลังงานสูงและหากเกิดความผิดปกติขึ้นจะส่งผลต่อระบบพลังงานในร่างกาย และส่งผลต่อการเกิดโรคร้ายแรงได้ โรคที่เกิดจากความผิดปกติของยีนไมโทคอนเดรียที่พบในปัจจุบันนั้นมีหลายโรค[18] มีการวิจัยและรายงานตำแหน่งการกลายในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอที่ใช้ในการวินิจฉัยโรคหลายตำแหน่ง แต่ละตำแหน่งจะจำเพาะต่อโรคนั้น ๆ และ/หรือเกี่ยวข้องกับหลายระบบในร่างกาย เช่น โรค Leigh syndrome เป็นภาวะผิดปกติของระบบประสาทที่หายาก ซึ่งเกิดจากการกลายของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *ATP6* โรค Mitochondrial Encephalopathy Lactic Acidosis and Stroke-like Episodes (MELAS) เป็นภาวะกรดแลกติกในเลือดสูงร่วมกับภาวะคล้ายสมองขาดเลือด จะพบการกลายของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอาร์เอ็นเอถ่ายโอน (tRNA) นอกจากนี้ยังพบว่า โรค Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fiber (MERRF) เป็นภาวะการเคลื่อนไหวผิดปกติแบบกระตุกหรือลมชักก็พบการกลายของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอาร์เอ็นเอถ่ายโอน (tRNA) เช่นกัน ในรายงานนี้ได้รวบรวมตำแหน่งการกลายที่สำคัญและทำให้เกิดโรคดังแสดงใน Table 1 และ Fig. 1 ซึ่งผู้เขียนได้จัดทำโครงสร้างไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอและแสดงตำแหน่งการกลาย ด้วยโปรแกรม biorender (https://app.biorender.com/) โดยใช้ข้อมูลที่รายงานเกี่ยวกับ

ตำแหน่งการกลายจาก Habbane และคณะ[3] เพื่อให้เข้าใจได้ง่ายขึ้น

นอกจากนั้นแล้ว ยังพบว่าโรคที่พบได้บ่อยในประชากรทั่วไป ส่วนหนึ่งเกิดจากความผิดปกติของยีนไมโทคอนเดรียได้ เช่น โรคเบาหวาน โรคพาร์คินสัน และโรคอัลไซเมอร์[19-21] เป็นต้น ซึ่งโรคเหล่านี้เกิดจากการกลายที่อาจจะเป็นการขาดหายไปของยีนไมโทคอนเดรียหรือมีการแทนที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์บางตำแหน่งของยีนไมโทคอนเดรีย จากข้อมูลที่นักวิจัยกลุ่มอื่นรายงานว่า การจำแนกโรคไมโทคอนเดรีย ที่เกิดจากความผิดปกติของยีนไมโทคอนเดรียมีหลายโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งในโรค Leber hereditary optic neuropathy (LHON) ที่ผู้ป่วยมีอาการตามัวอย่างเฉียบพลัน LHON นับได้ว่าเป็นโรคไมโทคอนเดรียที่พบมากที่สุดในประเทศไทย[3, 22] ปัจจุบันการตรวจหาตำแหน่งการกลายของโรคนี้ยังใช้การหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธีแซงเกอร์ซึ่งถือว่าเป็นเทคนิคมาตรฐาน (gold standard) แต่ในกลุ่มโรคนี้มีตำแหน่งที่เกิดการกลายพบในหลายยีนของไมโทคอนเดรีย ดังนั้นการใช้วิธีแซงเกอร์อาจจะไม่คุ้มค่าหากต้องการทราบทุกตำแหน่งที่เกี่ยวข้อง ซึ่งในปัจจุบันมีการวิจัยและพัฒนาเทคนิคอื่น ๆ เพื่อช่วยเพิ่มความรวดเร็วและลดค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์ให้เหมาะสม เช่น วิธี multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)[23] และนอกจากนี้ยังมีการพัฒนารูปแบบการหาลำดับเบสให้ได้ปริมาณมากและรวดเร็วขึ้นโดยเทคโนโลยี NGS[3] เป็นต้น

Table 1 Mitochondrial genome mutation and disease.[3, 19-22]

Disease	Organelle	Symptoms	mtDNA mutation region	Gene
Leber's Hereditary Optic Neuropathy (LHON)	eye	- eyesight loss, starting with painless blurriness - vision loss occurs because the cells in the optical nerve die	m.3460G > A m.11778G > A m.14484T > C m.14459G > A	*ND1* *ND4* *ND6* *ND6*
Neurogenic Ataxia and Retinitis Pigmentosa (NARP)	nervous system	neuropathy	m.8993T > G/C	*ATP6*
Leigh syndrome	central nervous system	progressive neurological, seizures, poor sucking ability, loss of head control and motor skills	m.8993T > G/C m.9176T > G/C	*ATP6* *ATP6*

Table 1 Mitochondrial genome mutation and disease.[3, 19-22] (Cont.)

Disease	Organelle	Symptoms	mtDNA mutation region	Gene
Mitochondrial Encephalopathy Lactic Acidosis and Stroke-like Episodes (MELAS)	brain	lactic acidemia, epilepsy, and stroke	m.3243A > G m.3271T > C	tRNALeu (UUR) tRNALeu (UUR)
Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fiber (MERRF)	muscle and nervous system	generalized epilepsy, ataxia, weakness, and dementia	m.8344AG	tRNALys
Mitochondrial Encephalo-cardiomyopathy	heart muscle	heart muscle abnormalities	m.4320C > T	tRNAIle
Mitochondrial Cardiomyopathy			m.12530A > G	*ND5*
Mitochondrial Encephalomyopathy			m.6413T > C	*CO1*

4. วิธีการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

เทคโนโลยีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในปัจจุบันมีหลายวิธี โดยวิธีหลักที่ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอที่นิยมใช้ มี 2 วิธี ได้แก่

4.1 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้เทคนิคแซงเกอร์ (Sanger sequencing)

ในปัจจุบันยังถือว่าเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) ที่นิยมใช้ อาศัยหลักการ dideoxynucleotide chain termination ด้วยการนำนิวคลีโอไทด์ที่ดึงหมู่ hydroxyl บริเวณ carbon ตำแหน่งที่ 3 ออก ซึ่งทำให้หยุดการสร้างดีเอ็นเอ เรียกว่า dideoxynucleotide (ddNTP) ประกอบด้วย ddATP, ddTTP, ddCTP และ ddGTP และนำมาติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent dye) ซึ่งนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดจะมีการติดฉลากสีที่ต่างกัน จากนั้นใช้เอนไซม์ในการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ลำดับนิวคลีโอไทด์ใหม่จะประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์แต่ละตัวที่ติดฉลาก เมื่อเข้าไปต่อกับนิวคลีโอไทด์ก่อนหน้า จะทำให้ปฏิกิริยาหยุดเนื่องจากไม่มีหมู่ hydroxyl group ที่มาสร้างพันธะ phosphodi-

ester กับนิวคลีโอไทด์โมเลกุลใหม่ ทำให้ดีเอ็นเอมีขนาดที่แตกต่างกัน แล้วจึงนำมาแยกขนาดด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรม ได้ข้อมูลอิเล็กโทรฟีโรแกรม (electropherogram) มาวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอต่อไป[24]

4.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้เทคโนโลยี Next Generation Sequencing (NGS)

เป็นวิธีที่สามารถวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอจำนวนมากได้พร้อมกัน (massively parallel sequencing) การทำปฏิกิริยาแต่ละครั้งสามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ถึงประมาณ 6 แสนล้านเบส (600 Gb) ในขณะที่วิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์แบบแซงเกอร์จะหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้เพียง 1 พันเบส[25] โดยเทคโนโลยีนี้มีหลักการทั่วไป คือ การอ่านลำดับเบสในขณะเกิดปฏิกิริยาสังเคราะห์สารพันธุกรรม (sequence by synthesis) สามารถแบ่งประเภทตามความยาวของสารพันธุกรรมที่ถูกสังเคราะห์ได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่

(1) การสังเคราะห์สารพันธุกรรมสายสั้น (short reading) บนเทคโนโลยี second generation sequencing เช่น

- เทคโนโลยีของ Illumina ที่ใช้การอ่านลำดับเบสด้วย fluorescence detection
- เทคโนโลยีของ Ion torrent ใช้หลักการอ่านลำดับเบสด้วย Ion detection
- เทคโนโลยีของ Applied Biosystems สามารถอ่านลำดับเบสจากสารเรืองแสงที่ติดฉลากบนชุดสารพันธุกรรม 10-20 เบส ซึ่งสุ่มปล่อยเข้าสู่ระบบเพื่อเข้าคู่สมกับสารพันธุกรรมต้นฉบับ (เรียกเทคโนโลยี sequence by ligation)

ข้อจำกัดของการสังเคราะห์สารพันธุกรรมสายสั้น ได้แก่ มีโอกาสที่ส่วนของสารพันธุกรรมจะถูกอ่านไม่เท่ากันจากขั้นตอนเตรียม library (enrichment bias) จึงอาจเกิดปัญหาการจัดวางเทียบกับลำดับเบสในกรณีเกิดการสอดแทรกและการขาดหายไปของเบส (insertion-deletion) และกรณีลำดับเบสซ้ำขนาดยาว

(2) การสังเคราะห์สารพันธุกรรมสายยาว (long reading) บนเทคโนโลยี third generation sequencing

- เทคโนโลยีจากบริษัท PacBio ที่อาศัย DNA polymeasase สังเคราะห์สารพันธุกรรมสายยาว พร้อมอ่านลำดับเบสจากสารเรืองแสงแต่ละลำดับ
- เทคโนโลยีจากบริษัท Oxford Nanopore ที่อาศัยการสังเคราะห์สารพันธุกรรมบนรูขนาดเล็กและทำการบันทึกลำดับเบสจากความต่างศักย์ที่เปลี่ยนแปลงทีละลำดับ เมื่อเสร็จกระบวนการจะได้ไฟล์รหัสพันธุกรรมพร้อมข้อมูลคุณภาพเช่นเดียวกัน

ข้อจำกัดของการสังเคราะห์สารพันธุกรรมสายยาว ได้แก่ โอกาสเกิดความผิดพลาดในปฏิกิริยา polymerization สูงขึ้นเมื่อสังเคราะห์สายพันธุกรรมที่ยาวขึ้นเนื่องจากเอนไซม์ที่ใช้ไม่ทำงานในการตรวจสอบความถูกต้อง (proof reading)[3,26]

การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี NGS จะใช้โปรแกรมที่จำเพาะในการวิเคราะห์เพื่อให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ ซึ่งนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงและรายงานตำแหน่งที่เกิดการกลายแล้วนำไปประยุกต์ในงานด้านต่าง ๆ ต่อไป

ในปัจจุบันงานทางนิติพันธุศาสตร์ยังนิยมใช้วิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์แบบแซงเกอร์ ซึ่งยังคงเป็นวิธีมาตรฐาน โดยจะเลือกใช้บริเวณที่มีความหลากหลายบนบริเวณควบคุม (control region) ซึ่งเรียก

ว่า hypervariable region (HVR 1 และ HVR 2) ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งมีขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์เพียง 300-400 คู่เบสเท่านั้น แต่ในงานด้านการวินิจฉัยโรค ที่ยังไม่ทราบโรคที่จำเพาะเจาะจง จะนิยมใช้การหาความผิดปกติของไมโทคอนเดรียลจีโนม โดย NGS เนื่องจากวิธีนี้สามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอทำได้ในปริมาณมาก ครอบคลุม รวดเร็วและราคาค่าใช้จ่ายถือว่ามีความคุ้มค่าเมื่อเทียบกับข้อมูลที่ได้[3, 10]

5. ฐานข้อมูลจำเพาะของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

ในปัจจุบันข้อมูลทางด้านไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของมนุษย์มีจำนวนมากขึ้น และมีการนำไปประยุกต์ใช้งานอย่างหลากหลาย ทั้งในด้านการศึกษาวิวัฒนาการ มานุษยวิทยา นิติวิทยาศาสตร์ และการวินิจฉัยโรค ดังนั้นการรวบรวมข้อมูลความหลากหลายของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของมนุษย์จึงมีความสำคัญ ฐานข้อมูลของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของมนุษย์ก็เป็นอีกช่องทางที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้โดยตัวอย่างฐานข้อมูลของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของมนุษย์ที่นิยมใช้และมีความน่าเชื่อถือมีดังนี้

5.1 GenBank

GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) เป็น DNA sequence database ที่เริ่มก่อตั้งเมื่อปี 1992 ซึ่งฐานข้อมูลนี้ประกอบด้วยข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ทั้งมนุษย์ สัตว์ พืช และจุลินทรีย์ และยังเป็นฐานข้อมูลที่สามารถนำผลการวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมมาเปรียบเทียบเพื่อการวิจัยทางด้านประชากร หรือโรคทางพันธุกรรมได้อีกด้วย ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอก็เป็นข้อมูลหนึ่งที่ถูกรวบรวมในฐานข้อมูลนี้ซึ่งถือว่าเป็นฐานข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมที่มีขนาดใหญ่ที่สุด[27, 28] แต่เนื่องจากฐานข้อมูล GenBank มีขนาดใหญ่อาจเกิดข้อจำกัดในบางงานวิจัยที่ต้องการข้อมูลที่จำเพาะจึงทำให้ต้องใช้เวลาในการคัดกรองข้อมูลมากขึ้น

5.2 EMPOP

EMPOP database (www.empop.com)[29] เป็นฐานข้อมูลความหลากหลายของตำแหน่งการกลายในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอมนุษย์ ซึ่งรวบรวมข้อมูล haplotype diversity ของประชากรแต่ละประเทศโดยมีรูปแบบการรายงานตำแหน่งการกลายตามแนวทางของ Scientific Working Group on DNA Methods (SWGDAM) และมีการจัด haplogroup โดยใช้พื้นฐานจาก phylogenetic tree[30] ที่ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต โดยใช้องค์ความรู้พื้นฐานด้านพันธุกรรมเป็นตัวบ่งชี้ความสัมพันธ์ของแต่ละประชากร ซึ่งเป็นประโยชน์มากทั้งทางด้านนิติพันธุศาสตร์ที่ต้องการทราบความจำเพาะของประชากรแต่ละประเทศเพื่อใช้ในการตามหาบุคคลสูญหาย หรือใช้อธิบายการอพยพย้ายถิ่น (migration) ของแต่ละกลุ่มประชากรในงานทางด้านมานุษยวิทยาได้อีกด้วย อย่างไรก็ตามฐานข้อมูลของ EMPOP ค่อนข้างจำเพาะกับงานด้านการศึกษาประชากร จึงไม่เหมาะกับงานวิจัยด้านการแพทย์

5.3 MITOMAP

MITOMAP (A human mitochondrial genome database) (https://www.mitomap.org) เป็นฐานข้อมูลที่รวบรวมงานวิจัยที่รายงานความหลากหลายของการกลายในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของมนุษย์ โดยจะรายงานในรูปแบบความถี่ของตำแหน่งที่มีการกลายในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอพร้อมทั้งบอกแหล่งที่มาของข้อมูลอย่างชัดเจน ซึ่งมีประโยชน์ใน

ด้านการแพทย์ในการรายงานตำแหน่งที่ก่อให้เกิดโรค นอกจากนี้ยังรายงานความหลากหลายในแต่ละกลุ่มประชากรทำให้สามารถนำมาศึกษาความจำเพาะของแต่ละกลุ่มประชากรได้[31] จากการที่ข้อมูลมีความครอบคลุมมาก ผู้ใช้ข้อมูลต้องมีความรู้พื้นฐานทางด้านความหลากหลายของตำแหน่งการกลายในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอเพื่อที่จะเลือกใช้ข้อมูลได้อย่างเหมาะสมและรวดเร็วขึ้น

จากที่กล่าวมาทั้งหมด ฐานข้อมูลไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอแต่ละฐานข้อมูล มีข้อดีและข้อจำกัดที่แตกต่างกัน ดังแสดงใน Table 2 ดังนั้นการเลือกใช้ฐานข้อมูลได้อย่างจำเพาะเจาะจงจึงเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการศึกษาวิจัยต่าง ๆ ได้รวดเร็วขึ้น อีกทั้งยังเป็นตัวชี้วัดการค้นพบตำแหน่งการกลายชนิดใหม่ในแต่ละประชากร หรือในงานที่ศึกษาได้เนื่องจากในฐานข้อมูลได้รวบรวมงานวิจัยที่เคยพบตำแหน่งการกลายต่าง ๆ ไว้เป็นจำนวนมาก

หากมีเป้าหมายในการศึกษาข้อมูลการกลายพันธุ์ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอจีโนมที่เจาะจงแล้ว การเลือกใช้ข้อมูลที่จำเพาะในแต่ละงานจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพ และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างถูกต้อง และรวดเร็ว

Table 2 Comparison of human mitochondrial DNA database utilization (Data collecting date: March, 2023).

No.	Database	Number of uploaded sequences	Input data	Output data	Advantage	Limitation
1.	GenBank	Real-time updated data	- Fasta file - Bam file	- nucleotide sequence - annotation of mtDNA	- vast information on mitochondrial DNA sequences available - raw sequence data from 2 sequencing methods (Sanger sequencing and NGS) available	too huge amount of genomic DNA information including mitogenome resulted in difficulty to get specific data

Table 2 Comparison of human mitochondrial DNA database utilization (Data collecting date: March, 2023). (Cont.)

No.	Database	Number of uploaded sequences	Input data	Output data	Advantage	Limitation
2.	EMPOP database	**- 46,963** HVR 1 and HVR 2 region (16024-16365 and 73-340) **- 38,361** control region (16024-576) **- 4,289** full-length mitogenome	SNP haplotype e.g. 16093C	- haplogroup information - frequency of haplotype and haplogroup from each population was previously reported	- the database available for haplogroup construction haplogroup frequency data from worldwide population	- the entered data of the database is specific - specific information on population demographic diversity
3.	MITOMAP	**- 78,884** control region (16024-576) **- 59,389** full-length mitogenome	updated data of GenBank sequences every 4-6 months	- published data on human mitochondrial DNA variation - reference source data - frequency of mutation position data based on each population	- large amount of data collection - reference source of the information - point mutation data based on position - link to connect to the relevant database effectively - frequency of mitochondrial DNA mutation position of each population available	- hard to obtain data, prior basic sequence information required

บทสรุป

ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของมนุษย์เป็นข้อมูลทางด้านพันธุกรรมที่มีประโยชน์และนำไปประยุกต์ใช้ได้หลายด้าน การกลายของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในแต่ละตำแหน่ง สามารถนำไปใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล ทำนายการเกิดโรค รวมทั้งการศึกษาเกี่ยวกับต้นกำเนิดและการอพยพของกลุ่มประชากรที่สนใจ และในปัจจุบันเทคโนโลยีด้านอณูพันธุศาสตร์ได้พัฒนาไปอย่างรวดเร็ว การได้มาซึ่งข้อมูลพันธุกรรมของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอจึงทำได้ง่ายและราคาคุ้มค่ากับข้อมูลที่ได้รับ จึงเป็นผลดีและมีประโยชน์ในการประยุกต์ใช้ในงานทางด้านต่าง ๆ เพิ่มมากยิ่งขึ้น อีกทั้งปัจจุบันได้มีระบบฐานข้อมูลที่ได้รวบรวมข้อมูลสารพันธุกรรมของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของมนุษย์ในด้านต่าง ๆ ไว้อย่างหลากหลายและน่าเชื่อถือให้นำมาประยุกต์ใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นไมโทคอนเดรียลจีโนม จึงเป็นอีกหนึ่งเครื่องหมายพันธุกรรมที่น่าสนใจศึกษาและมีประโยชน์ต่อการปฏิบัติงานด้านนิติวิทยาศาสตร์เป็นอย่างมาก

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการมนุษย์พันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล ที่สนับสนุนประสบการณ์และองค์ความรู้งานวิจัยเกี่ยวกับไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

เอกสารอ้างอิง

1. Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. Nat Rev Genet 2005; 389-402.
2. Amorim A, Fernandes T, Taveira N. Mitochondrial DNA in human identification: a review. PeerJ 2019; 7: e7314.
3. Habbane M, Montoya J, Rhouda T, Sbaoui Y, Radallah D, Emperador S. Human Mitochondrial DNA: Particularities and Diseases. Biomedicines. 2021; 9: 1364.
4. Sato M, Sato K. Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA. Biochim Biophys Acta 2013; 1833: 1979-84.
5. Basu S, Repository S. Mitochondrial Inheritance | Maternal Inheritance of Mitochondrial DNA. 2021 [cited 2023 Mar 31]; Available from: https://www.sciencerepository.org/mitochondrial-inheritance
6. Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge Reference Sequence for Human Mitochondrial DNA. Nat Genet 1999; 23: 147.
7. Budowle B, Polanskey D, Fisher CL, Den Hartog BK, Kepler RB, Elling JW. Automated alignment and nomenclature for consistent treatment of polymorphisms in the human mitochondrial DNA control region. J Forensic Sci 2010; 55: 1190-5.
8. Goodwin WH. The use of forensic DNA analysis in humanitarian forensic action: The development of a set of international standards. Forensic Sci Int 2017; 278: 221-7.
9. Sinha M, Rana M, Kushwaha P. Applications of Mitochondrial DNA in Forensic Science. In 2020. p. 329-43.

10. Parson W, Strobl C, Huber G, Zimmermann B, Gomes SM, Souto L, *et al*. Evaluation of next generation mtGenome sequencing using the Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM). Forensic Sci Int Genet 2013; 7: 543-9.
11. Kutanan W, Kampuansai J, Srikummool M, Kangwanpong D, Ghirotto S, Brunelli A, *et al*. Complete mitochondrial genomes of Thai and Lao populations indicate an ancient origin of Austroasiatic groups and demic diffusion in the spread of Tai-Kadai languages. Hum Genet 2017; 136: 85-98.
12. Areesirisuk P, Srikulnath K, Onsod P, Jaroensuk J, Rerkamnuaychoke B. Haplogroup Distribution of 309 Thais from Admixed Populations across the Country by HVI and HVII Sanger-Type Sequencing. Diversity 2021; 13: 496.
13. Wallace DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. Annu Rev Genet 2005; 39: 359-407.
14. Nesheva D. Aspects of Ancient Mitochondrial DNA Analysis in Different Populations for Understanding Human Evolution. Balkan J Med Genet 2014; 17: 5-14.
15. Samehsalari S, Reddy KR. Application control region of human mitochondrial DNA in forensic anthropology. Int J Anthropol 2018; 2: 233-48.
16. Kampuansai J, Bertorelle G, Castri L, Nakbunlung S, Kangwanpong D. Mitochondrial DNA Variation of Tai Speaking Peoples in Northern Thailand. Sci Asia 2007; 33: 443-8
17. Kampuansai J, Kutanan W, Phuphanitcharoenkul S, Kangwanpong D. A suggested Khmuic origin of the hunter-gatherer Mlabri in northern Thailand: evidence from maternal DNA lineages. Thai J Genet 2012; 5: 203-15.
18. Ng YS, Turnbull DM. Mitochondrial disease: genetics and management. J Neurol 2016; 263: 179-91.
19. Alharbi MA, Al-Kafaji G, Khalaf NB, Messaoudi SA, Taha S, Daif A, *et al*. Four novel mutations in the mitochondrial ND4 gene of complex I in patients with multiple sclerosis. Biomed Rep 2019; 11: 257-68.
20. Buneeva O, Fedchenko V, Kopylov A, Medvedev A. Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease: Focus on Mitochondrial DNA. Biomedicines 2020; 8: 591.
21. Al-Ghamdi BA, Al-Shamrani JM, El-Shehawi AM, Al-Johani I, Al-Otaibi BG. Role of mitochondrial DNA in diabetes Mellitus Type I and Type II. Saudi J Biol Sci 2022; 29: 103434.

22. Phasukkijwatana N, Chuenkongkaew WL, Suphavilai R, Luangtrakool K, Kunhapan B, Lertrit P. Transmission of heteroplasmic G11778A in extensive pedigrees of Thai Leber hereditary optic neuropathy. J Hum Genet 2006; 51: 1110-7.
23. Dokrungkoon T, Onsod P, Areesirisuk P, Rerkamnuaychoke B, Vanikieti K, Chareonsirisuthigul T. Performance of the MLPA technique for detecting common mutations in Leber hereditary optic neuropathy. Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal 2019; 30: 819-24.
24. Ballard D. Analysis of Mitochondrial Control Region Using Sanger Sequencing. Methods Mol Biol 2016; 1420: 143-55.
25. Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. Curr Protoc Mol Biol 2018; 122: e59.
26. Mardis ER. Next-generation DNA sequencing methods. Ann Rev Genomics Hum Genet 2008; 9: 387-402.
27. Benson DA, Boguski MS, Lipman DJ, Ostell J, Ouellette BFF. GenBank. Nucleic Acids Research 1998; 26: 1-7.
28. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, *et al*. GenBank. Nucleic Acids Res 2013; 41(Database issue): D36-42.
29. Parson W, Gusmão L, Hares DR, Irwin JA, Mayr WR, Morling N, *et al*. DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: revised and extended guidelines for mitochondrial DNA typing. Forensic Sci Int Genet 2014; 13: 134-42.
30. Röck AW, Dür A, van Oven M, Parson W. Concept for estimating mitochondrial DNA haplogroups using a maximum likelihood approach (EMMA). Forensic Sci Int Genet 2013; 7: 601-9.
31. Ruiz-Pesini E, Lott MT, Procaccio V, Poole JC, Brandon MC, Mishmar D, *et al*. An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny. Nucleic Acids Res 2007; 35(Database issue): D823-828.