โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การระบุรูปแบบและความแตกต่างดีเอ็นเอจากเลือดผสมของมนุษย์ในยุงเพื่อประยุกต์ในงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์

ชื่อนิสิต กานต์สินี จึงสถาปัตย์ชัย

เลขประจำตัวนิสิต 6032103023

ภาควิชา พฤกษศาสตร์

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การระบุรูปแบบและความแตกต่างดีเอ็นเอจากเลือดผสมของมนุษย์ในยุงเพื่อประยุกต์ในงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์

นางสาวกานต์สินี จึงสถาปัตย์ชัย

โครงงานวิทยาศาสตร์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2563

Identification of human DNA Profiles from mosquito blood meals mixture for forensic application

Miss Kansinee Jeungsathapatchai

A Senior Project in Partial Fulfillment of the Requirements

For the Degree of Bachelor of Science in Genetics

Department of Botany

Faculty of Science, Chulalongkorn University

Academic Year 2020

ชื่อโครงงาน การระบุรูปแบบและความแตกต่างดีเอ็นเอจากเลือดผสมของมนุษย์ในยุง เพื่อประยุกต์ในงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์

ชื่อนิสิต กานต์สินี จึงสถาปัตย์ชัย

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัทรา ยี่ทอง

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต

ภาควิชา พฤกษศาสตร์

สาขาวิชา พันธุศาสตร์

ปีการศึกษา 2563

ภาควิชาพฤกษศาสตร์อนุมัติให้โครงงานวิทยาศาสตร์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์

คณะกรรมการสอบโครงงานวิทยาศาสตร์

....อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัทรา ยี่ทอง)

....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต)

....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ต่อศักดิ์ สีลานันท์)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงงาน การระบุรูปแบบและความแตกต่างดีเอ็นเอจากเลือดผสมของมนุษย์ในยุง เพื่อประยุกต์ในงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์

ชื่อนิสิต กานต์สินี จึงสถาปัตย์ชัย

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัทรา ยี่ทอง

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต

ภาควิชา พฤกษศาสตร์

สาขาวิชา พันธุศาสตร์

ปีการศึกษา 2563

บทคัดย่อ

ยุงเป็นสิ่งมีชีวิตจำพวกแมลงสามารถพบได้ทั่วโลก มีแหล่งเพาะพันธุ์ในเขตพื้นที่อาศัยของมนุษย์ การใช้ดีเอ็นเอมนุษย์จากเลือดในท้องยุงมาประยุกต์ในการหาค้นหาผู้กระทำความผิดเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่น่าสนใจ แต่โดยทั่วไปในที่เกิดเหตุมักมีบุคคลตั้งแต่สองคนขึ้นไป จึงส่งผลให้ในการศึกษาที่ผ่านมาไม่ทราบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างเลือดมนุษย์ในท้องยุงได้หรือไม่ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงทำการศึกษาการระบุรูปแบบและความแตกต่างดีเอ็นเอผสมระหว่างบุคคล 2 คน จากตัวอย่างเลือดที่ได้จากยุงรำคาญซึ่งเป็นยุงที่พบได้มากในประเทศไทย โดยทำการศึกษาการตรวจสอบปริมาณและโพรไฟล์ของดีเอ็นเอดีเอ็นเอผสมระหว่างบุคคล 2 คน นำดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดของมนุษย์ในตัวอย่างยุงมาตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และตรวจสอบรูปแบบดีเอ็นเอของบุคคลโดยใช้ STRs ทั้งหมด 16 ตำแหน่ง ผลการศึกษาพบว่าสามารถแยกความแตกต่างของ 2 บุคคล ได้จากตัวอย่างเลือดในท้องยุงที่เก็บตั้งแต่เวลา 0 12 24 36 และ 48 ชั่วโมง โดยตัวอย่างที่เก็บที่เวลา 0 12 24 และ 36 ชั่วโมง เมื่อนำไปทำ capillary electrophoresis สามารถระบุ STR genotyping ของทั้งสองบุคคลได้ทั้ง 16 ตำแหน่ง ส่วนตัวอย่างที่เก็บที่เวลา 48 ชั่วโมง สามารถระบุ STR genotyping ได้เพียงบางตำแหน่ง ซึ่งผลการศึกษานี้จะเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับนำไปประยุกต์ในงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ต่อไปได้

คำสำคัญ ยุงรำคาญ; เอสทีอาร์; ดีเอ็นเอ; นิติวิทยาศาสตร์

Title	Identification of human DNA Profiles from mosquito blood meals mixture for forensic application
Student name	Kansinee Jeungsathapatchai
Advisor	Assist. Prof. Dr. Patra Yeetong
Co-advisor	Assoc. Prof. Dr. Pattamawadee Yanatatsaneejit
Program	Genetics
Department	Botany
Academic year	2020

Abstract

Mosquitoes are an insect that can be found worldwide. The mosquito habitat is close to humans. *Culex quiquefasciatus* is the most common mosquito in Thailand. The detection of human DNA in mosquito blood meals to track down the perpetrator is an alternative and interesting strategy, but most crimes involve many people. In this study, we aimed to identify human DNA profiles from mosquito (*Culex quiquefasciatus*) blood meal mixture between two volunteers. After written informed consent, blood sample collection and feeding experiment were performed. Genomic DNA was extracted from mosquito blood meal mixture at 0, 12, 24, 36, 48, 60 and 72 hours. We performed polymerase chain reaction (PCR) and genotyped 16 short tandem repeats (STRs) using DNA from mosquito blood meal mixture. We could detect the DNA profiles for all STRs of two volunteers which matched with our control DNA from one male and one female at 0, 12, 24, and 36 hours. While at 48 hours, some STRs could not be genotyped, this was consistent with previous studies. This study may be helpful for the identification of human DNA profiles from mosquito blood meal mixture for forensic application.

Keywords: *Culex quiquefasciatus*; STRs; DNA; Forensic Science

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัทรา ยี่ทอง อาจารย์ที่ปรึกษา และรองศาสตราจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำในการทำปฏิบัติการ คำปรึกษา แนวทางการแก้ไขโครงงานให้มีประสิทธิภาพดีด้วยความเอาใจใส่อย่างยิ่ง รวมทั้งให้กำลังใจในการทำโครงงานเสมอมา

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ต่อศักดิ์ สีลานันท์ กรรมการสอบโครงงานวิทยาศาสตร์ที่ช่วยตรวจสอบ และแนะนำการแก้ไขโครงงานฉบับนี้

ขอขอบพระคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนการวิจัย

ขอขอบพระคุณภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับการเอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการทำปฏิบัติการ

ขอขอบพระคุณนางสาวพิมพ์วิภา สุวรรณกาศ และนางสาวกาญจนา เอี่ยมสมบุญ นิสิตปริญญาโท ที่ให้คำแนะนำ สอนและช่วยเหลือในการทำปฏิบัติการเสมอมา

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ทุกคน สำหรับความช่วยเหลือ และกำลังใจในการทำโครงงานฉบับนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และทุกคนในครอบครัว ที่สนับสนุนด้านการศึกษา และให้กำลังใจในการทำโครงงานฉบับนี้ตลอดมา

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทนำ	1
การตรวจสอบเอกสารที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 ยุง	3
2.2 วัตถุพยาน	5
2.3 ยุงกับงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์	5
2.4 ยีน *CADM1*	6
2.5 short tandem repeats (STRs)	7
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินงาน	9
3.1 ตัวอย่างทางชีวภาพ	9
3.2 วัสดุ อุปกรณ์	9
3.3 สารเคมีที่ใช้	9
3.4 วิธีดำเนินงาน	10
3.4.1 ขอจริยธรรมมนุษย์และรับตัวอย่างยุงรำคาญ	10
3.4.2 การให้เลือดและเก็บตัวอย่างยุง	10
3.4.3 การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดผสมของมนุษย์ในตัวอย่างยุง	11
3.4.4 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ	11
3.4.5 multiplex PCR และการตรวจสอบรูปแบบดีเอ็นเอของบุคคล	12
3.4.6 การวิเคราะห์ข้อมูล	12
ผลการทดลอง	14
4.1 ศึกษาโครงสร้างของยุงด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ	14
4.2 ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้	15

4.3 ผลการตรวจสอบยีน *CADM1* 15

4.4 ผลการทำ STR genotyping 17

4.5 ผลการทำ capillary electrophoresis 44

อภิปรายผลการทดลอง และสรุปผล 54

เอกสารอ้างอิง 56

ภาคผนวก 59

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของยุง	3
ภาพที่ 2.2 ความแตกต่างระหว่างยุงรำคาญเพศผู้และเพศเมีย	4
ภาพที่ 4.1 โครงสร้างยุงรำคาญในช่วงเวลาต่าง ๆ ที่เก็บตัวอย่าง	14
ภาพที่ 4.2 ปริมาณดีเอ็นเอเฉลี่ย (ng/µl) ที่สกัดได้ในแต่ละช่วงเวลา	15
ภาพที่ 4.3 ผลที่ได้จากการทำ multiplex PCR ยีน *CADM1* ที่เวลา 0 ชั่วโมง	16
ภาพที่ 4.4 ผลที่ได้จากการทำ multiplex PCR ยีน *CADM1* ที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมง	16
ภาพที่ 4.5 ผลที่ได้จากการทำ multiplex PCR ยีน *CADM1* ที่เวลา 36 และ 48 ชั่วโมง	17
ภาพที่ 4.6 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 1 ที่เวลา 0 ชั่วโมง	18
ภาพที่ 4.7 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 2 ที่เวลา 0 ชั่วโมง	19
ภาพที่ 4.8 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 3 ที่เวลา 0 ชั่วโมง	20
ภาพที่ 4.9 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 4 ที่เวลา 0 ชั่วโมง	21
ภาพที่ 4.10 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 5 ที่เวลา 0 ชั่วโมง	22
ภาพที่ 4.11 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 1 ที่เวลา 12 ชั่วโมง	23
ภาพที่ 4.12 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 2 ที่เวลา 12 ชั่วโมง	24
ภาพที่ 4.13 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 3 ที่เวลา 12 ชั่วโมง	25
ภาพที่ 4.14 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 4 ที่เวลา 12 ชั่วโมง	26
ภาพที่ 4.15 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 5 ที่เวลา 12 ชั่วโมง	27
ภาพที่ 4.16 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 1 ที่เวลา 24 ชั่วโมง	28
ภาพที่ 4.17 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 2 ที่เวลา 24 ชั่วโมง	29
ภาพที่ 4.18 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 3 ที่เวลา 24 ชั่วโมง	30
ภาพที่ 4.19 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 4 ที่เวลา 24 ชั่วโมง	31
ภาพที่ 4.20 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 5 ที่เวลา 24 ชั่วโมง	32

ภาพที่ 4.21 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 1 ที่เวลา 36 ชั่วโมง 33
ภาพที่ 4.22 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 2 ที่เวลา 36 ชั่วโมง 34
ภาพที่ 4.23 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 3 ที่เวลา 36 ชั่วโมง 35
ภาพที่ 4.24 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 4 ที่เวลา 36 ชั่วโมง 36
ภาพที่ 4.25 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 5 ที่เวลา 36 ชั่วโมง 37
ภาพที่ 4.26 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 1 ที่เวลา 48 ชั่วโมง 38
ภาพที่ 4.27 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 2 ที่เวลา 48 ชั่วโมง 38
ภาพที่ 4.28 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 3 ที่เวลา 48 ชั่วโมง 39
ภาพที่ 4.29 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 4 ที่เวลา 48 ชั่วโมง 40
ภาพที่ 4.30 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 5 ที่เวลา 48 ชั่วโมง 41
ภาพที่ 4.31 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 3 ที่เวลา 60 ชั่วโมง 42
ภาพที่ 4.32 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 4 ที่เวลา 60 ชั่วโมง 42
ภาพที่ 4.33 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 3 ที่เวลา 72 ชั่วโมง 43
ภาพที่ 4.34 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 4 ที่เวลา 72 ชั่วโมง 44

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่ 2.1 STRs 16 ตำแหน่งบนโครโมโซมและจำนวนอัลลีล 7

ตารางที่ 4.1 ผลการทำ capillary electrophoresis ที่เวลา 0 ชั่วโมง 44

ตารางที่ 4.2 ผลการทำ capillary electrophoresis ที่เวลา 12 ชั่วโมง 46

ตารางที่ 4.3 ผลการทำ capillary electrophoresis ที่เวลา 24 ชั่วโมง 48

ตารางที่ 4.4 ผลการทำ capillary electrophoresis ที่เวลา 36 ชั่วโมง 50

ตารางที่ 4.5 ผลการทำ capillary electrophoresis ที่เวลา 48 ชั่วโมง 52

ตารางที่ 6.1 สารที่ใช้ในการทำ PCR ยีน *CADM1* 60

ตารางที่ 6.2 สารที่ใช้ในการทำ multiplex PCR ของ STRs 61

ตารางที่ 6.3 ปริมาณดีเอ็นเอที่วัดได้ 61

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ยุงเป็นสิ่งมีชีวิตจำพวกแมลง สามารถพบได้ทั่วโลกแต่พบมากในเขตร้อนและเขตอบอุ่น ปัจจุบันในโลกมียุงประมาณ 4,000 ชนิด และในประเทศไทยพบจำนวน 450 ชนิด สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ ยุงยักษ์ (Toxorhynchitinae), ยุงก้นปล่อง (Anophelinae) และยุงลายและยุงรำคาญ (Culicinae) ซึ่งยุงแต่ละชนิดจะมีพฤติกรรมที่แตกต่างกันไป ยุงมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง 4 ระยะ คือ ระยะไข่ ระยะลูกน้ำ ระยะตัวโม่ง และระยะตัวเต็มวัย (อุษาวดี ถาวระ และคณะ, 2559)

ยุงรำคาญ (*Culex quinquefasciatus*) เป็นยุงที่พบมากในประเทศไทย แหล่งเพาะพันธุ์อยู่ในเขตพื้นที่อาศัย ของมนุษย์ มีพฤติกรรมการหากินช่วงเวลากลางคืน ออกไข่ครั้งละประมาณ 200-250 ฟอง และฟักภายใน 30 ชั่วโมง ยุงรำคาญมีอายุประมาณ 20-30 วัน ยุงตัวเต็มวัยทั้งสองเพศจะกินน้ำหวานจากเกสรดอกไม้เป็นอาหาร แต่ยุงเพศเมียจำเป็นต้องกินเลือดมนุษย์หรือสัตว์ เพื่อช่วยในการเจริญของไข่ (อุษาวดี ถาวระ, 2553)

วัตถุพยานทางชีววิทยา (biological evidence) คือ หลักฐานในการติดตามผู้กระทำความผิดที่ได้จากสิ่งมีชีวิต เช่น คราบเลือด เส้นผม และฟัน เป็นต้น ซึ่งเป็นหลักฐานที่มีความสำคัญและสามารถใช้ในการระบุตัวตนของผู้กระทำความผิด (ปาณิก เวียงชัย, 2556) ในอดีตมีการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการค้นหาตัวผู้กระทำความผิดจากการตรวจสอบระบุรูปแบบดีเอ็นเอจากเลือดของมนุษย์ในยุง ในปี 2008 มีเหตุการณ์ขโมยรถที่เมือง Lapua ประเทศฟินแลนด์ แต่ไม่พบหลักฐานในการค้นหาตัวผู้กระทำความผิด ตำรวจจึงได้มีการใช้ดีเอ็นเอมนุษย์จากเลือดในยุงเป็นหลักฐานในการตรวจหาผู้กระทำความผิด (The Telegraph, 2008) ในประเทศไทยสามารถนำมาปรับใช้ได้เมื่อเกิดอาชญากรรมในพื้นที่ปิดและไม่มีหลักฐานอื่น ๆ ประกอบ เช่น ภายในรถ อาคาร และเลือกศึกษาในยุงชนิดที่พบมากบริเวณพื้นที่อาศัยในประเทศไทย คือ ยุงรำคาญ แต่โดยทั่วไปในที่เกิดเหตุมักมีบุคคลตั้งแต่สองคนขึ้นไป จึงส่งผลให้การระบุรูปแบบดีเอ็นเอจากเลือดของมนุษย์ในยุงในการศึกษาที่ผ่านมาไม่ทราบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างเลือดมนุษย์ในท้องยุงได้หรือไม่ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงทำการศึกษาการระบุรูปแบบ

และความแตกต่างดีเอ็นเอผสมระหว่างบุคคล 2 คน จากตัวอย่างเลือดที่ได้จากยุงรำคาญ ซึ่งเป็นยุงที่พบได้มากในประเทศไทย และได้มีการเก็บตัวอย่าง เลือดมนุษย์ในท้องของยุงที่ระยะเวลาต่าง ๆ เพื่อตรวจสอบและระบุรูปแบบดีเอ็นเอของมนุษย์

การตรวจสอบระบุรูปแบบดีเอ็นเอของมนุษย์ ในประเทศไทยได้ใช้เทคนิค STR genotyping จำนวน 16 ตำแหน่ง โดยเป็นการตรวจสอบจำนวนซ้ำของลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งแต่ละบุคคลจะมีจำนวนซ้ำที่แตกต่างกัน เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้ ได้แก่ D3S1358, D21S11, *CSF1PO*, *TPOX*, D19S433, *TH01*, *FGA*, D5S818, D2S1338, D7S820, D18S51, *Amelogenin*, *vWA*, D8S1179, D16S539 และ D13S317 (Krenke et al., 2002) ในการศึกษานี้มุ่งเน้นระบุรูปแบบและความแตกต่างดีเอ็นเอจากเลือดของมนุษย์สองคนที่เก็บได้จากยุงรำคาญ (*C. quiquefasciatus*) โดยการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลด้วย STR genotyping ทั้ง 16 ตำแหน่ง เพื่อนำมาประยุกต์ในงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอผสมจากบุคคล 2 คน ในตัวอย่างเลือดที่ได้จากยุงรำคาญ (*C. quiquefasciatus*)

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

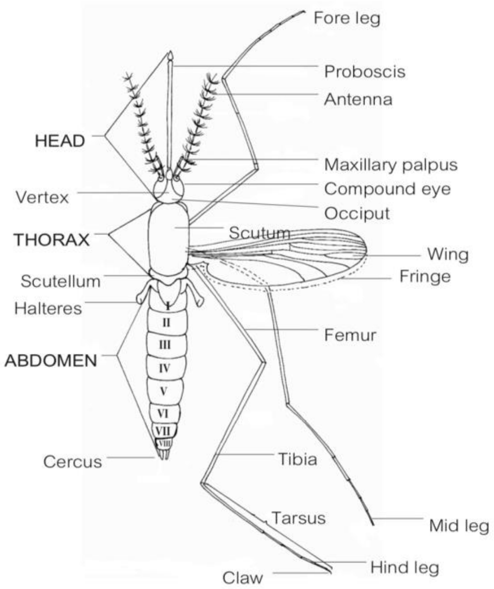
สามารถระบุ STR genotyping 16 ตำแหน่งจากบุคคล 2 คน ในตัวอย่างเลือดที่ได้จากยุงรำคาญ (*C. quiquefasciatus*) รวมทั้งทราบช่วงเวลาที่สามารถแยกความแตกต่างดีเอ็นเอของ 2 บุคคลได้ (ตั้งแต่เวลา 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง) โดยเปรียบเทียบกับตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครเพศหญิงและเพศชายที่ไม่ผ่านการกินของยุง ซึ่งสามารถนำผลการศึกษาดังกล่าวใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการนำไปประยุกต์กับงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์

บทที่ 2

การตรวจสอบเอกสารที่เกี่ยวข้อง

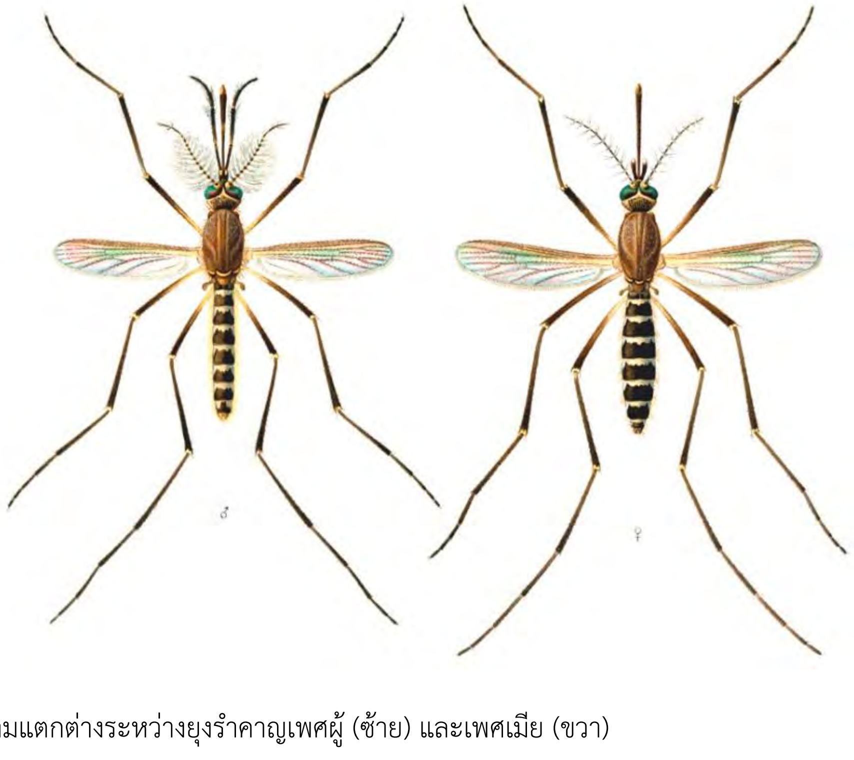
2.1 ยุง

ยุงเป็นสิ่งมีชีวิตจำพวกแมลง สามารถพบได้ทั่วโลกแต่พบมากในเขตร้อนและเขตอบอุ่น ปัจจุบันในโลกมียุงประมาณ 4,000 ชนิด และในประเทศไทยพบจำนวน 450 ชนิด สามารถแบ่งกลุ่มหลักได้ 3 กลุ่ม คือ ยุงยักษ์ (Toxorhynchitinae), ยุงก้นปล่อง (Anophelinae) และยุงลายและยุงรำคาญ (Culicinae) ซึ่งยุงแต่ละชนิดจะมีพฤติกรรมที่แตกต่างกันไป ยุงมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง 4 ระยะ คือ ระยะไข่ (egg) ใช้เวลา 1-3 วัน ระยะลูกน้ำ (larva) ใช้เวลาประมาณ 7-10 วัน ระยะตัวโม่ง (pupa) ใช้เวลา 1-3 วัน และระยะตัวเต็มวัย (adult) ลักษณะของยุงตัวเต็มวัยแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้อง โครงสร้างของยุงประกอบด้วยหนวด 1 คู่ ปีก 1 คู่ และขา 3 คู่ และในเพศเมียจะมีปากแบบเจาะดูด (อุษาวดี ถาวระ และคณะ, 2559) (ภาพที่ 2.1)



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของยุง

ยุงรำคาญ (*Culex quiquefasciatus*) มีลักษณะเฉพาะที่แตกต่างจากยุงชนิดอื่น ๆ คือ ลำตัวมีสีน้ำตาล ส่วนขาไม่พบปล้องขาวที่เห็นชัดเจน ปีกค่อนข้างใส ลักษณะของยุงรำคาญเพศเมียคือ ลำตัวมีสีดำหรือสีน้ำตาลอ่อน บริเวณ scutellum มีรอยหยัก 3 รอย ลักษณะของยุงรำคาญเพศผู้คือ ส่วนของ palpi จะมีขนาดยาว แต่ส่วนปลายไม่พองออกเหมือนยุงในกลุ่มยุงก้นปล่อง และในเพศเมียส่วนของ palpi จะยาวน้อยกว่า 1 ใน 4 ของความยาวปาก (ภาพที่ 2.2) ยุงรำคาญสามารถพบได้ในประเทศไทย แหล่งเพาะพันธุ์อยู่ในเขตพื้นที่อาศัยของมนุษย์ มีพฤติกรรมการหากินช่วงเวลากลางคืน ออกไข่ครั้งละประมาณ 200-250 ฟอง และฟักภายใน 30 ชั่วโมง ยุงรำคาญมีอายุประมาณ 20-30 วัน ยุงตัวเต็มวัยทั้งสองเพศจะกินน้ำหวานจากเกสรดอกไม้เป็นอาหาร แต่ยุงเพศเมียจำเป็นต้องกินเลือดมนุษย์หรือสัตว์เพื่อช่วยในการเจริญของไข่ (อุษาวดี ถาวระ, 2553)



ภาพที่ 2.2 ความแตกต่างระหว่างยุงรำคาญเพศผู้ (ซ้าย) และเพศเมีย (ขวา)

2.2 วัตถุพยาน

วัตถุพยาน คือ หลักฐานที่ใช้ในการติดตามผู้กระทำความผิดที่มีความน่าเชื่อถือนอกเหนือจากพยานบุคคล สามารถพบวัตถุพยานได้ในที่เกิดเหตุ ผู้เสียหาย และผู้กระทำความผิด วัตถุพยานแบ่งเป็น 2 ประเภทคือ วัตถุพยานทางกายภาพ (physical evidence) คือ หลักฐานในการติดตามผู้กระทำความผิดที่ได้จากสิ่งไม่มีชีวิต เช่น อาวุธ เขม่าดินปืน สี และวัตถุพยานทางชีววิทยา (biological evidence) คือ หลักฐานในการติดตามผู้กระทำความผิดที่ได้จากสิ่งมีชีวิต เช่น คราบเลือด เส้นผม และฟัน เป็นต้น ซึ่งเป็นหลักฐานที่มีความสำคัญและสามารถใช้ในการระบุตัวตนของผู้กระทำความผิดในการสืบสวนคดีอาญานับว่าวัตถุพยานทางชีววิทยาเป็นวัตถุพยานเพียงประเภทเดียวที่แสดงความสัมพันธ์โดยของเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นโดยตรงระหว่างผู้กระทำความผิดและผู้เสียหาย (ปาณิก เวียงชัย, 2556) สำหรับตัวอย่างเลือด จะต้องมีการตรวจสอบว่าเป็นเลือดของมนุษย์จากการตรวจสอบทางภูมิคุ้มกันวิทยา ซึ่งจะมีการทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี จากนั้นจะมีการตรวจสอบ หมู่เลือด และตรวจสอบดีเอ็นเอต่อไป ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพเลือด เช่น แสงยูวี (Hall et al., 2014), สารเคมี (Harris et al., 2006)

2.3 ยุงกับงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์

ยุงเป็นสิ่งมีชีวิตที่กินเลือดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเป็นอาหาร ซึ่งเลือดที่ยุงได้กินเข้าไปจะสามารถอยู่ภายในท้องยุงได้หลายวัน ในงานวิจัยการตรวจสอบดีเอ็นเอมนุษย์จากเลือดในยุง (Culicinae) พบว่าเลือดในท้องยุงมากกว่า 3 วันสามารถตรวจสอบการระบุรูปแบบดีเอ็นเอได้ (Curic et al., 2014) สำหรับเอนไซม์ที่พบในท้องยุงคือเอนไซม์ proteolytic มีบทบาทที่สำคัญในการย่อยเลือด สำหรับกรดอะมิโนที่ได้จากการย่อยเลือดจะถูกลำเลียงผ่านผนังลำไส้เข้าสู่ระบบ hemolymph และถูกใช้ในกระบวนการ vitellogenin ต่อไป หลังจากยุงเพศเมียกินเลือดเข้าไปจะมีการสังเคราะห์เยื่อบุช่องท้องที่ midgut สำหรับในยุงในกลุ่มยุงรำคาญ ต้องใช้เวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมงในการสังเคราะห์เยื่อบุช่องท้องได้อย่างสมบูรณ์ เยื่อบุช่องท้องที่สร้างขึ้นจะหุ้มเลือดที่ยุงได้กินเข้าไปและแยกกับ midgut (Barovsky, 1986)

ยุงได้เริ่มเข้ามามีบทบาทในงานนิติวิทยาศาสตร์ เช่น ในปี 2008 มีเหตุการณ์ขโมยรถที่เมือง Lapua ประเทศฟินแลนด์ แต่ไม่พบหลักฐานในการค้นหาตัวผู้กระทำความผิด ตำรวจจึงได้ใช้ดีเอ็นเอ

มนุษย์จากเลือดในท้องยุงที่พบในรถยนต์ในที่เกิดเหตุเป็นหลักฐานในการตรวจหาผู้กระทำความผิด (The Telegraph, 2008) หรือในการศึกษาเกี่ยวกับการตรวจสอบระบุรูปแบบดีเอ็นเอของมนุษย์ในท้องยุง ในปี 2017 จากการเก็บตัวอย่างเลือดด้วยวิธีการนำถ้วยพลาสติกที่ขึงด้วยตาข่ายบาง ๆ มาวางบริเวณผิวหนังเพื่อให้ยุงดูดเลือดโดยตรง และนำไปตรวจสอบ STR genotyping 15 ตำแหน่ง (Hiroshige et al., 2017)

การให้เลือดยุงในการทำงานทดลองสามารถทำได้กับอาสาสมัครโดยตรง โดยให้ยุงใช้ proboscis แทงเจาะลงบนผิวของอาสาสมัครและดูดเลือดจนเต็มส่วนช่องท้องของยุง (Hiroshige et al., 2017) แต่การให้เลือดยุงโดยตรงอาจเสี่ยงต่อทางร่างกายและจิตใจของอาสาสมัคร จึงมีการใช้วิธีการให้เลือดยุงที่เป็นการเลียนแบบพฤติกรรมการกินเลือดของยุง คือการให้ยุงเจาะแทงดูดเลือดลงบนผิวแผ่นฟิล์ม polytetrafluoroethylene (PTFE) ก่อนใส่เลือดเข้าไปจะต้องดึงแผ่นฟิล์มให้บางยืด (Siria et al., 2018) ซึ่งเป็นวิธีที่มีความเสี่ยงต่ออาสาสมัครน้อยกว่า

2.4 ยีน *CADM1*

ยีน *CADM1* (Cell Adhesion Molecule 1) พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ทำหน้าที่เป็น tumor suppressor ในเซลล์ non-small-cell lung cancer (NSCLC) โปรตีน CADM1 มีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน CRTAM (cytotoxic and regulatory T-cell molecule) และจะไปส่งเสริมการทำงานของเซลล์ natural killer (NK) และการหลั่ง interferon-gamma (IFN-gamma) ของเซลล์ CD8+ (GeneCards, 2020) ซึ่งยีนนี้จะไม่พบในยุง จึงทำให้สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบได้ว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้เป็นดีเอ็นเอของมนุษย์ นอกจากนี้ในการตรวจสอบว่าเป็นดีเอ็นเอของมนุษย์และแยกดีเอ็นเอของมนุษย์ออกจากยุงสามารถใช้ยีนต่าง ๆ ที่พบในมนุษย์หรือพบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมแต่ไม่พบในยุง

2.5 Short tendem repeats (STRs)

STRs คือ ส่วนของดีเอ็นเอที่มีการซ้ำกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ 1-6 คู่เบส ที่กระจายอยู่บริเวณต่าง ๆ ของจีโนม ซึ่งในแต่ละบุคคลจะมีความแตกต่างของจำนวนซ้ำ จึงสามารถนำมาใช้พิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลได้ (Chakraborty et al., 1999) ในแต่ละประเทศจะมีการตรวจสอบตำแหน่ง STRs ที่แตกต่างกัน ซึ่งในประเทศไทยมีการใช้ STRs 16 ตำแหน่ง ได้แก่ D3S1358, D21S11, *CSF1PO*, *TPOX*, D19S433, *TH01*, *FGA*, D5S818, D2S1338, D7S820, D18S51, *Amelogenin*, *vWA*, D8S1179, D16S539, D13S317 (Krenke et al., 2002) กระจายอยู่หลายโครโมโซมและแต่ละตำแหน่งมีจำนวนอัลลีลที่แตกต่างกันดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 STRs 16 ตำแหน่งบนโครโมโซมและจำนวนอัลลีล (ที่มา : AmpFlSTR Identifiler PCR Amplification Kit)

Locus	Chromosome location	Alleles included in identifiler Allelic Ladder
D3S1358	3p	12, 13, 14, 15 ,16 ,17 ,18, 19
D21S11	21q11.2-q21	24, 24.2, 25, 26, 27, 28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36, 37, 38
CSF1PO	5q33.3-34	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15
TPOX	2p23-2per	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13
D19S433	19q12-13.1	9, 10, 11, 12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 17.2
TH01	11p15.5	4, 5, 6, 7, 8, 9, 9.3, 10, 11, 13.3

Locus	Chromosome location	Alleles included in identifiler Allelic Ladder
FGA	4q28	17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26.2, 27, 28, 29, 30, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 47.2, 48.2, 50.2, 51.2
D5S818	5q21-31	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16
D2S1338	2q35-37.1	15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28,
D7S820	7q11.21-22	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15
D18S51	18q21.3	7, 9, 10, 10.2, 11, 12, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27
Amelogenin	X: p22.1-22.3 Y: p11.2	X, Y
vWA	12p12-pter	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24
D8S1179	8	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
D16S539	16q24-qter	5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15
D13S317	13q22-31	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินงาน

3.1 ตัวอย่างทางชีวภาพ

ยุงรำคาญ จำนวน 200 ตัว

ตัวอย่างเลือดของมนุษย์จำนวน 2 คน (ชาย 1 คน และหญิง 1 คน) คนละ 15 มิลลิลิตร

3.2 วัสดุ อุปกรณ์

เข็มสำหรับเจาะเลือด (Nipro, Japan)

หลอดเก็บเลือด Vacuette EDTA K3 Tube ขนาด 3 mL (Greiner Bio-One, Thailand)

กระบอกสำหรับดูดยุง (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ประเทศไทย)

แผ่นพาราฟิล์ม (Bemis, USA)

ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 ℃ (Sanden Intercool, Thailand)

เครื่องให้ความร้อนหลอดทดลอง (ALB64 Thermo Bath, Bio-Active, Thailand)

เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Mikro120 centrifuge, Hettich, Thailand)

เครื่องวัดการดูดกลืนแสงชนิดนาโน (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, USA)

เครื่อง PCR ($\mathrm{T100^{TM}}$ Thermal Cycle BIO-RAD, USA)

เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis) (BIO-RAD, USA)

เครื่องถ่ายภาพเจล (BluPAD, China)

3.3 สารเคมีที่ใช้

สารเคมีที่ใช้ในการสกัด DNA

ชุด QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany)

สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR และ STR genotyping

10X PCR buffer (Qiagen, Germany)

25 mM Magnesium chloride (Qiagen, Germany)

10 mM dNTP (Qiagen, Germany)

250 Units HotStarTaq DNA polymerase (Qiagen, Germany)

20 μM forward *CADM1* (Bioneer, USA)

20 μM reverse *CADM1* (Bioneer, USA)

10 μM forward 16 STRs primer (Geneplus, Thailand)

10 μM reverse 16 STRs primer (Geneplus, Thailand)

สารเคมีที่ใช้ในการทำ gel electrophoresis

Agarose gel (Vivantis, Malaysia)

Tris base (Vivantis, Malaysia)

Boric acid (Vivantis, Malaysia)

EDTA (Vivantis, Malaysia)

100 bp DNA ladder (Thermo Sciencetific, USA)

SafeView DNA Stain (ABM, Canada)

3.4 วิธีดำเนินงาน

3.4.1 ขอจริยธรรมมนุษย์และรับตัวอย่างยุงรำคาญ (*Culex quiquefasciatus*)

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ได้ศึกษาวิจัยในมนุษย์จึงมีการขอจริยธรรมโดยมีเอกสารอนุมัติเลขที่ 033/64 และตัวอย่างยุงรำคาญ (*C. quiquefasciatus*) ระยะตัวเต็มวัย ได้รับความอนุเคราะห์จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์จำนวน 200 ตัว ดูแลรักษายุงก่อนการให้เลือดโดยการให้วิตามินรวมชนิดน้ำ

3.4.2 การให้เลือดและเก็บตัวอย่างยุง

ตัวอย่างเลือดจากอาสามัครจำนวน 2 คน เป็นชาย 1 คน และหญิง 1 คน ปริมาตร 15 มิลลิลิตรต่อ 1 คน จัดเก็บในหลอดเก็บเลือด Vacuette EDTA K3 tube จากนั้นผสมเลือดของ 2 บุคคลเข้าด้วยกันและให้เลือดยุงด้วยก้นขวดรูปชมพู่ที่ห่อด้วยแผ่นฟิล์ม (ดัดแปลงจาก Siria et al., 2018) แล้วจึงเก็บตัวอย่างยุงด้วยการแช่ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 ℃ จากนั้นศึกษาโครงสร้างของยุงด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ และเก็บตัวอย่างเลือดในท้องยุงเวลาละ 10 ตัว ที่เวลา 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง โดยมีตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) คือ เลือดของ 2 บุคคลที่ไม่ผ่านการกินของยุง และตัวควบคุมเชิงลบ (negative control) คือ ยุงที่ผ่านการกินวิตามินรวมชนิดน้ำ

3.4.3 การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดผสมของมนุษย์ในตัวอย่างยุง

การสกัดดีเอ็นเอจากยุงที่ผ่านการกินเลือดเวลาละ 6 ตัว ทำการสกัดดีเอ็นเอทีละตัว ใช้ชุด QIAamp DNA Micro Kit

3.4.4 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ

วัดค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอตัวอย่างละ 1 ไมโครลิตร โดยใช้เครื่อง Nanodrop spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรและ 280 นาโนเมตร เทียบเป็นสัดส่วนค่าการดูดกลืนแสง OD260/OD280 โดยดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์ต้องมีค่า OD260/OD280 มากกว่า 1.8 และบันทึกค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอ เก็บดีเอ็นเอในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ในตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยการตรวจสอบยีน *CADM1* ซึ่งเป็นยีนที่พบเฉพาะในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสดังนี้

Forward Primer: 5’ ACTCCGCCTCCAGCGCATGT 3’

Reverse Primer 1: 5’ TCCGCTCGGCAGCACTACACT 3’

Reverse Primer 2: 5’ CCCACACCTACCTGTGGGGAT 3’

Reverse Primer 3: 5’GGCTCACAGATGCCCTCAGC 3’

จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *CADM1* ด้วยขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 Initiation denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ขั้นตอนที่ 2 Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

ขั้นตอนที่ 3 Annealing ที่อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

ขั้นตอนที่ 4 Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

ขั้นตอนที่ 5 ซ้ำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 35 รอบ

ขั้นตอนที่ 6 Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที

ผลผลิตที่ได้จะมีขนาด 121, 229 และ 397 bp

3.4.5 multiplex PCR และการตรวจสอบรูปแบบดีเอ็นเอของบุคคล

การทำ STR genotyping ได้มีการทำ multiplex PCR โดยจัดไพรเมอร์เป็นกลุ่มตาม T_m ขนาดของดีเอ็นเอที่ได้และสีฟลูออเรสเซนต์ที่ติดฉลาก เพื่อลดการใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีปริมาณจำกัด ซึ่งจัดเป็น 5 กลุ่มดังนี้ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย D3S1358, D19S433 และ D7S820 กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย D21S11, D16S539 และ D8S1179 กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย *CSF1PO*, *TPOX*, D13S317 และ *TH01* กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย *FGA*, D5S818 และ D2S1338 และกลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย *Amelogenin*, *vWA* และ D18S51

จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 Initiation denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ขั้นตอนที่ 2 Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

ขั้นตอนที่ 3 Annealing ที่อุณหภูมิตามกลุ่มของไพรเมอร์ที่จัดไว้ ได้แก่ กลุ่มที่ 1 อุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียส, กลุ่มที่ 2 อุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียส, กลุ่มที่ 3 อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส, กลุ่มที่ 4 อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส และกลุ่มที่ 5 อุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

ขั้นตอนที่ 4 Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

ขั้นตอนที่ 5 ซ้ำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 40 รอบ

ขั้นตอนที่ 6 Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที

และนำผลผลิตที่ได้ทำ capillary electrophoresis

3.4.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ผลการทดลอง ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากท้องยุงในแต่ละเวลา และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) เปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอที่เวลาต่าง ๆ ที่เก็บจากตัวอย่างเลือดในท้องยุง เพื่อศึกษาว่าปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากท้องยุงในแต่ละเวลาสามารถระบุโพรไฟล์ของมนุษย์ได้หรือไม่ โดยวิเคราะห์ผลที่ได้จากการทำ STRs genotyping 16 ตำแหน่ง ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้ระหว่างตัวอย่างเลือดที่เก็บจากท้องยุงที่เวลา 0 12 24 36 48 60 และ 72 ชั่วโมง กับตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครเพศหญิงและเพศชายที่ไม่ผ่านการกินของยุง โดยพิจารณาแถบและขนาดดีเอ็นเอที่ได้ ว่าตรงกับตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครเพศหญิงและเพศชายหรือไม่ จากนั้นนำตัวอย่างที่พบ

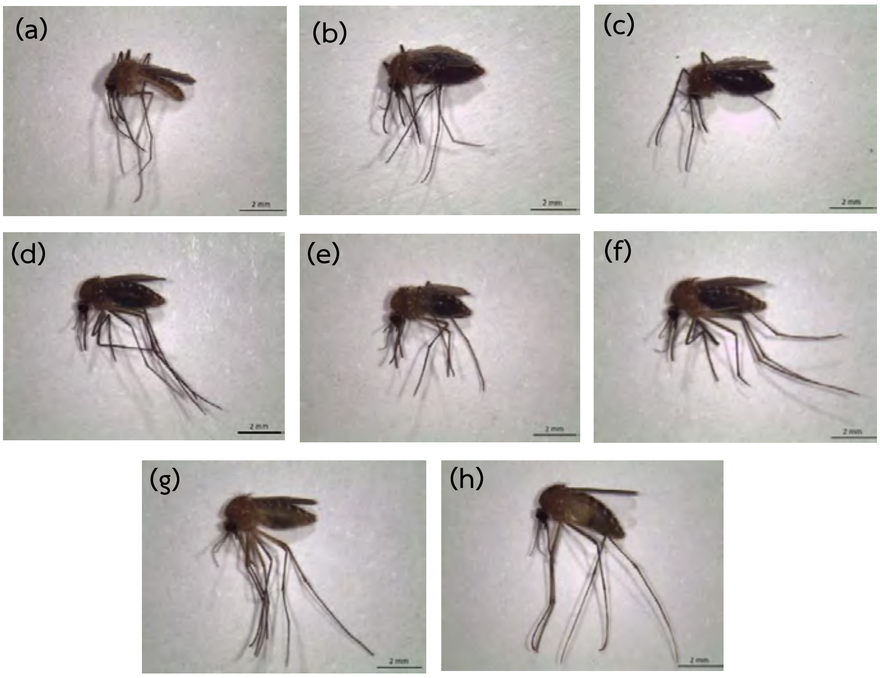
แถบดีเอ็นเอไปตรวจสอบด้วยเทคนิค capillary electrophoresis เปรียบเทียบกราฟที่ได้ โดยพิจารณาจากขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างเลือดที่เก็บจากท้องยุงที่เวลาดังกล่าวเปรียบเทียบกับตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครเพศหญิงและเพศชายที่ไม่ผ่านการกินของยุง

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ศึกษาโครงสร้างของยุงด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

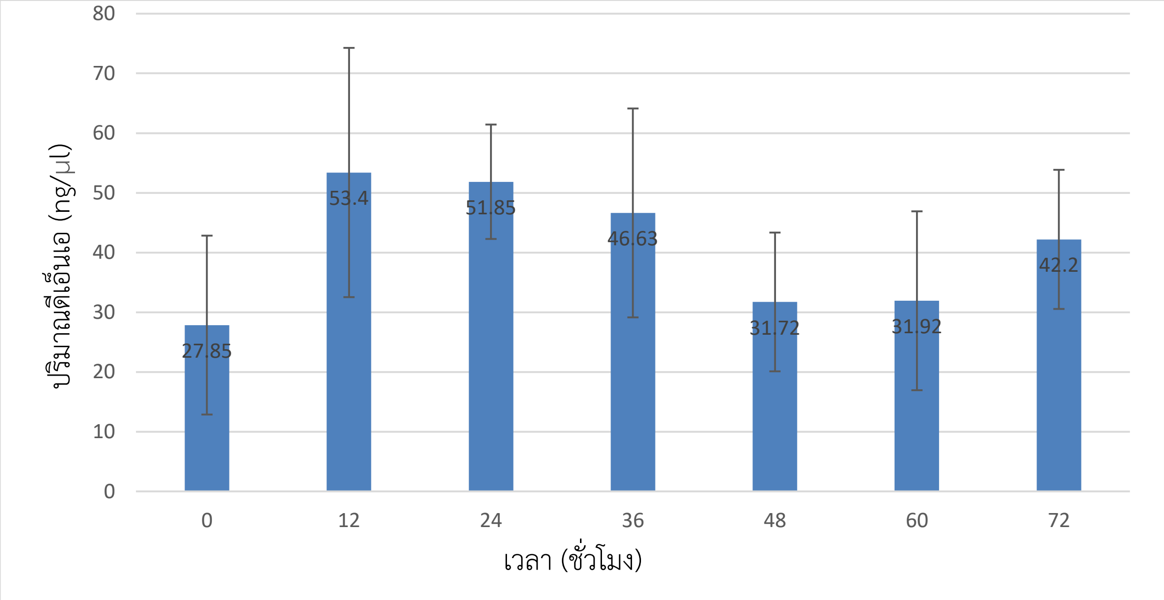
ถ่ายภาพยุงรำคาญด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอในช่วงเวลา 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมงที่เก็บตัวอย่าง



ภาพที่ 4.1 ยุงรำคาญที่เก็บในช่วงเวลาต่าง ๆ หลังจากทำการให้เลือด a. ตัวอย่างยุงรำคาญที่ไม่ผ่านการกินเลือด b. เก็บที่เวลา 0 ชั่วโมง c. เก็บที่เวลา 12 ชั่วโมง d. เก็บที่เวลา 24 ชั่วโมง e. เก็บที่เวลา 36 ชั่วโมง f. เก็บที่เวลา 48 ชั่วโมง g. เก็บที่เวลา 60 ชั่วโมง h. เก็บที่เวลา 72 ชั่วโมง

4.2 ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้

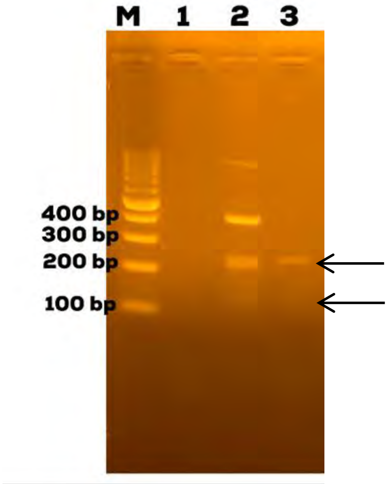
ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ (ng/µl) จากการใช้ยุงจำนวน 6 ตัวต่อเวลาในการสกัดดีเอ็นเอ พบว่าปริมาณดีเอ็นเอที่เวลา 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง มีค่าเฉลี่ย 27.85 ng/µl 53.4 ng/µl 51.85 ng/µl 46.63 ng/µl 31.72 ng/µl 31.92 ng/µl และ 42.2 ng/µl ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาค่า A_{260}/A_{280} พบว่าอยู่ในช่วง 1.98-2.37



ภาพที่ 4.2 ปริมาณดีเอ็นเอเฉลี่ย (ng/µl) ที่สกัดได้ในแต่ละช่วงเวลา (error bar = standard deviation)

4.3 ผลการตรวจสอบยีน *CADM1*

ยีน *CADM1* ประกอบด้วยไพรเมอร์ที่ให้ดีเอ็นเอ 3 ขนาด คือ 121 bp, 229 bp และ 397 bp ในการศึกษานี้นำมาเป็นยีนที่ใช้ยืนยันว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้เป็นของมนุษย์ จากการทำ multiplex PCR ของยีน *CADM1* พบว่าตัวอย่างที่เวลา 0 ชั่วโมง ได้ขนาดดีเอ็นเอ 2 ขนาด คือ 121 bp, 229 bp



M = DNA Ladder

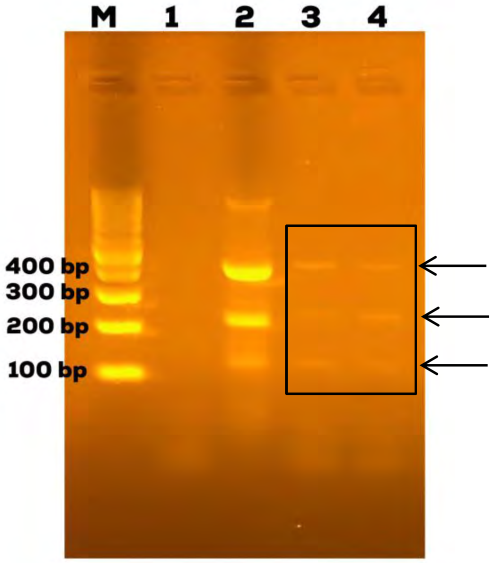
1 = Negative

2 = Positive

3 = ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 0 ชั่วโมง

ภาพที่ 4.3 ผลที่ได้จากการทำ multiplex PCR ยีน *CADM1* ของตัวอย่างดีเอ็นเอที่เวลา 0 ชั่วโมง

จากการทำ multiplex PCR ของยีน *CADM1* พบว่าตัวอย่างที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมง ได้ขนาดดีเอ็นเอ 3 ขนาด คือ 121 bp, 229 bp และ 397 bp



M = DNA Ladder

1 = Negative

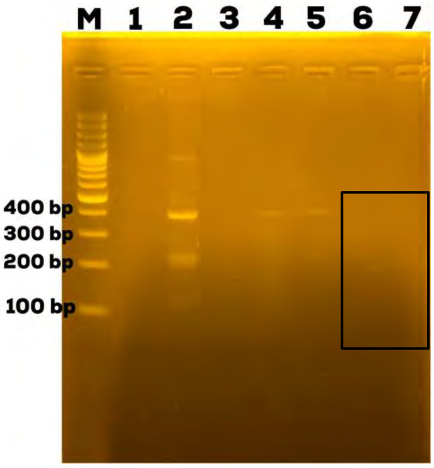
2 = Positive

3 = ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 12 ชั่วโมง

4 = ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 24 ชั่วโมง

ภาพที่ 4.4 ผลที่ได้จากการทำ multiplex PCR ยีน *CADM1* ของตัวอย่างดีเอ็นเอที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมง

จากการทำ multiplex PCR ของยีน *CADM1* พบว่าตัวอย่างที่เวลา 36 และ 48 ชั่วโมง ไม่พบขนาดดีเอ็นเอ



M = DNA Ladder

1 = Negative

2 = Positive

6 = ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 36 ชั่วโมง

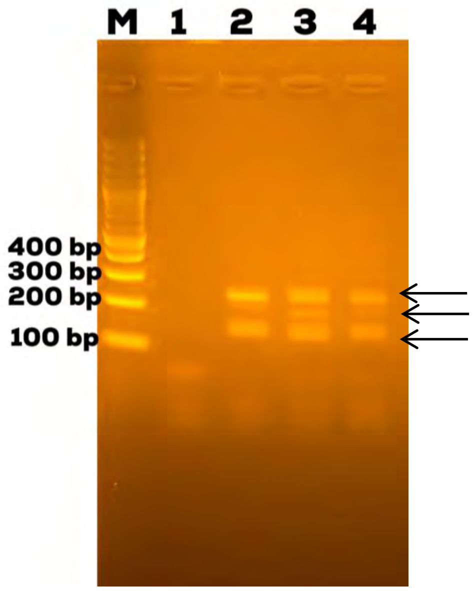
7 = ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 48 ชั่วโมง

ภาพที่ 4.5 ผลที่ได้จากการทำ multiplex PCR ยีน *CADM1* ของตัวอย่างดีเอ็นเอที่เวลา 36 และ 48 ชั่วโมง

4.4 ผลการทำ STR genotyping

ตัวอย่างที่เวลา 0 ชั่วโมง

จากการทำ multiplex PCR กลุ่มที่ 1 ของ D3S1358, D19S433 และ D7S820 ภาพที่ 4.6 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่ 0 ชั่วโมงพบดีเอ็นเอที่อยู่ในช่วง 120-250 bp ซึ่งตรงกับไพร์เมอร์ที่ให้ขนาดดีเอ็นเอ คือ D3S1358 ให้ดีเอ็นเอขนาด 99-147 bp, D19S433 ให้ดีเอ็นเอขนาด 119-221 bp และ D7S820 ให้ดีเอ็นเอขนาด 211-251 bp



M = DNA Ladder

1 = Negative

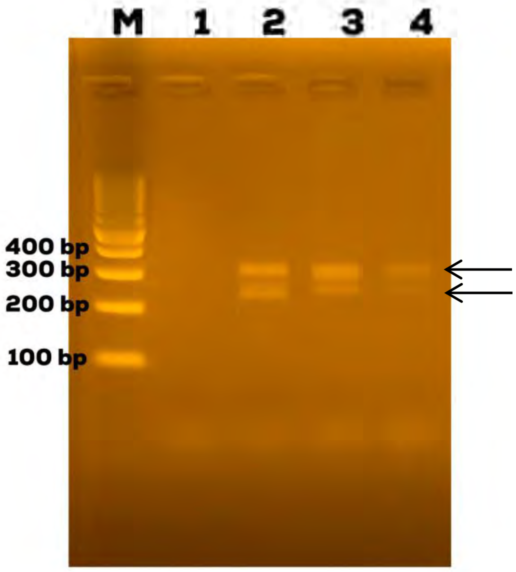
2 = Positive เลือดจากเพศหญิง

3 = Positive เลือดจากเพศชาย

4 = ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 0 ชั่วโมง

ภาพที่ 4.6 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย D3S1358, D19S433 และ D7S820 ของตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 0 ชั่วโมง

จากการทำ multiplex PCR กลุ่มที่ 2 ของ D21S11, D16S539 และ D8S1179 ภาพที่ 4.7 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่ 0 ชั่วโมงพบดีเอ็นเอที่อยู่ในช่วง 200-300 bp ซึ่งตรงกับไพร์เมอร์ที่ให้ขนาดดีเอ็นเอ คือ D21S11 ให้ดีเอ็นเอขนาด 154-272 bp, D16S539 ให้ดีเอ็นเอขนาด 260-308 bp และ D8S1179 ให้ดีเอ็นเอขนาด 203-255 bp



M = DNA Ladder

1 = Negative

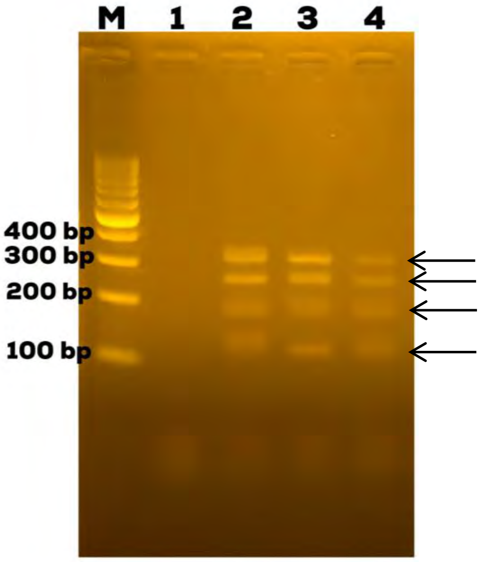
2 = Positive เลือดจากเพศหญิง

3 = Positive เลือดจากเพศชาย

4 = ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 0 ชั่วโมง

ภาพที่ 4.7 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย D21S11, D16S539 และ D8S1179 ของตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 0 ชั่วโมง

จากการทำ multiplex PCR กลุ่มที่ 3 ของ *CSF1PO*, *TPOX*, D13S317 และ *TH01* ภาพที่ 4.8 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่ 0 ชั่วโมงพบดีเอ็นเอ 4 ขนาดที่อยู่ในช่วง 100-330 bp ซึ่งตรงกับ ไพร์เมอร์ที่ให้ขนาดดีเอ็นเอ คือ *CSF1PO* ให้ดีเอ็นเอขนาด 287-331 bp, *TPOX* ให้ดีเอ็นเอขนาด 98-146 bp, D13S317 ให้ดีเอ็นเอขนาด 157-205 bp และ *TH01* ให้ดีเอ็นเอขนาด 230-274 bp



M = DNA Ladder

1 = Negative

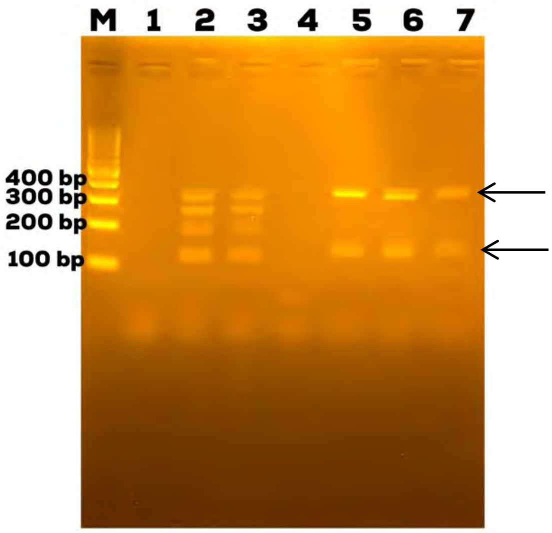
2 = Positive เลือดจากเพศหญิง

3 = Positive เลือดจากเพศชาย

4 = ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 0 ชั่วโมง

ภาพที่ 4.8 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย *CSF1PO*, *TPOX*, D13S317 และ *TH01* ของตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 0 ชั่วโมง

จากการทำ multiplex PCR กลุ่มที่ 4 ของ *FGA*, D5S818 และ D2S1338 ภาพที่ 4.9 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่ 0 ชั่วโมงพบดีเอ็นเอที่อยู่ในช่วง 120-350 bp ซึ่งตรงกับไพร์เมอร์ที่ให้ขนาดดีเอ็นเอ คือ *FGA* ให้ดีเอ็นเอขนาด 308-464 bp, D5S818 ให้ดีเอ็นเอขนาด 115-163 bp และ D2S1338 ให้ดีเอ็นเอขนาด 165-205 bp



M = DNA Ladder

4 = Negative

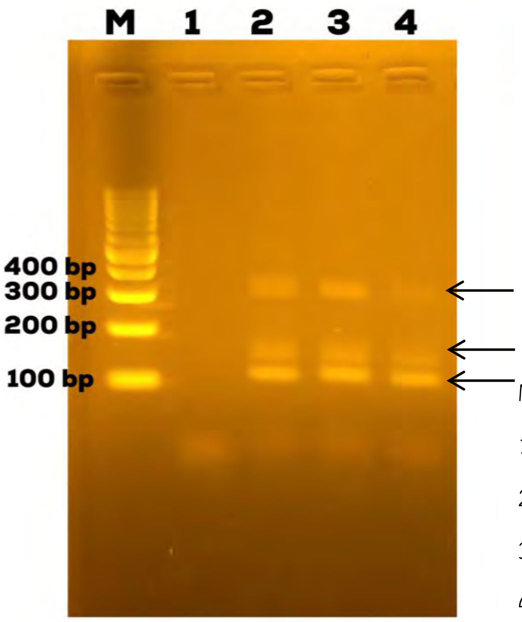
5 = Positive เลือดจากเพศหญิง

6 = Positive เลือดจากเพศชาย

7 = ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 0 ชั่วโมง

ภาพที่ 4.9 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย *FGA*, D5S818 และ D2S1338 ของตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 0 ชั่วโมง

จากการทำ multiplex PCR กลุ่มที่ 5 ของ *Amelogenin*, *vWA* และ D18S51 ภาพที่ 4.10 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่ 0 ชั่วโมงพบดีเอ็นเอที่อยู่ในช่วง 100-350 bp ซึ่งตรงกับไพร์เมอร์ที่ให้ขนาดดีเอ็นเอ คือ *Amelogenin* ให้ดีเอ็นเอขนาด 106-112 bp, *vWA* ให้ดีเอ็นเอขนาด 122-182 bp และ D18S51 ให้ดีเอ็นเอขนาด 262-349 bp



M = DNA Ladder

1 = Negative

2 = Positive เลือดจากเพศหญิง

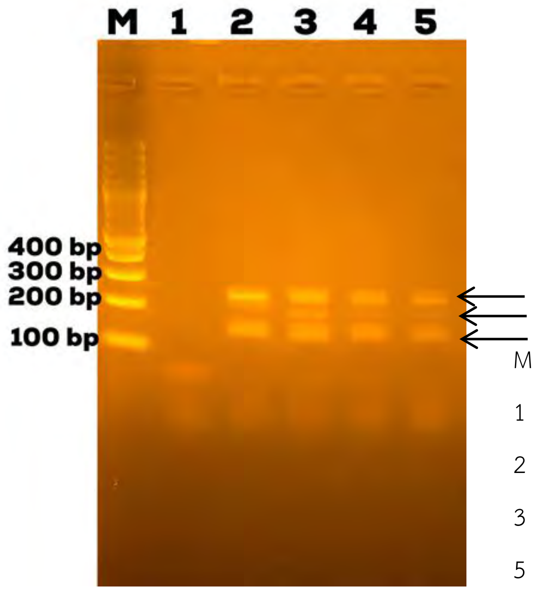
3 = Positive เลือดจากเพศชาย

4 = ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 0 ชั่วโมง

ภาพที่ 4.10 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย *Amelogenin*, *vWA* และ D18S51 ของตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 0 ชั่วโมง

ตัวอย่างที่เวลา 12 ชั่วโมง

จากการทำ multiplex PCR กลุ่มที่ 1 ของ D3S1358, D19S433 และ D7S820 ภาพที่ 4.11 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่ 12 ชั่วโมงพบดีเอ็นเอที่อยู่ในช่วง 120-250 bp ซึ่งตรงกับไพร์เมอร์ที่ให้ขนาดดีเอ็นเอ คือ D3S1358 ให้ดีเอ็นเอขนาด 99-147 bp, D19S433 ให้ดีเอ็นเอขนาด 119-221 bp และ D7S820 ให้ดีเอ็นเอขนาด 211-251 bp



M = DNA Ladder

1 = Negative

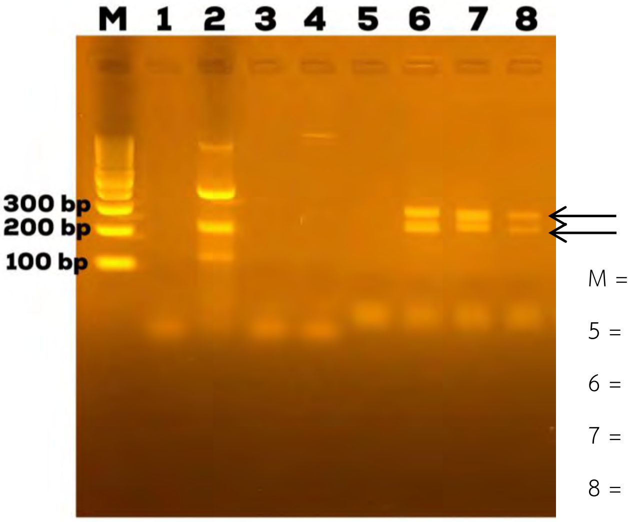
2 = Positive เลือดจากเพศหญิง

3 = Positive เลือดจากเพศชาย

5 = ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 12 ชั่วโมง

ภาพที่ 4.11 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย D3S1358, D19S433 และ D7S820 ของตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 12 ชั่วโมง

จากการทำ multiplex PCR กลุ่มที่ 2 ของ D21S11, D16S539 และ D8S1179 ภาพที่ 4.12 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่ 12 ชั่วโมงพบดีเอ็นเอที่อยู่ในช่วง 200-300 bp ซึ่งตรงกับไพร์เมอร์ที่ให้ขนาดดีเอ็นเอ คือ D21S11 ให้ดีเอ็นเอขนาด 154-272 bp, D16S539 ให้ดีเอ็นเอขนาด 260-308 bp และ D8S1179 ให้ดีเอ็นเอขนาด 203-255 bp



M = DNA Ladder

5 = Negative

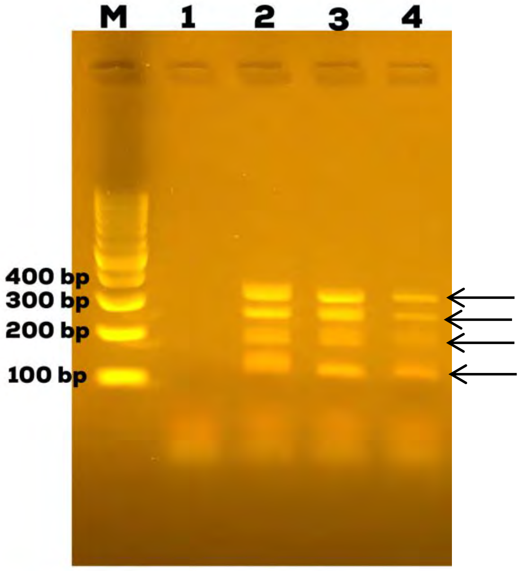
6 = Positive เลือดจากเพศหญิง

7 = Positive เลือดจากเพศชาย

8 = ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 12 ชั่วโมง

ภาพที่ 4.12 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย D21S11, D16S539 และ D8S1179 ของตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 12 ชั่วโมง

จากการทำ multiplex PCR กลุ่มที่ 3 ของ primer *CSF1PO*, *TPOX*, D13S317 และ *TH01* ภาพที่ 4.13 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่ 12 ชั่วโมงพบดีเอ็นเอ 4 ขนาดที่อยู่ในช่วง 100-330 bp ซึ่งตรงกับไพรเมอร์ที่ให้ขนาดดีเอ็นเอ คือ *CSF1PO* ให้ดีเอ็นเอขนาด 287-331 bp, *TPOX* ให้ดีเอ็นเอขนาด 98-146 bp, D13S317 ให้ดีเอ็นเอขนาด 157-205 bp และ *TH01* ให้ดีเอ็นเอขนาด 230-274 bp



M = DNA Ladder

1 = Negative

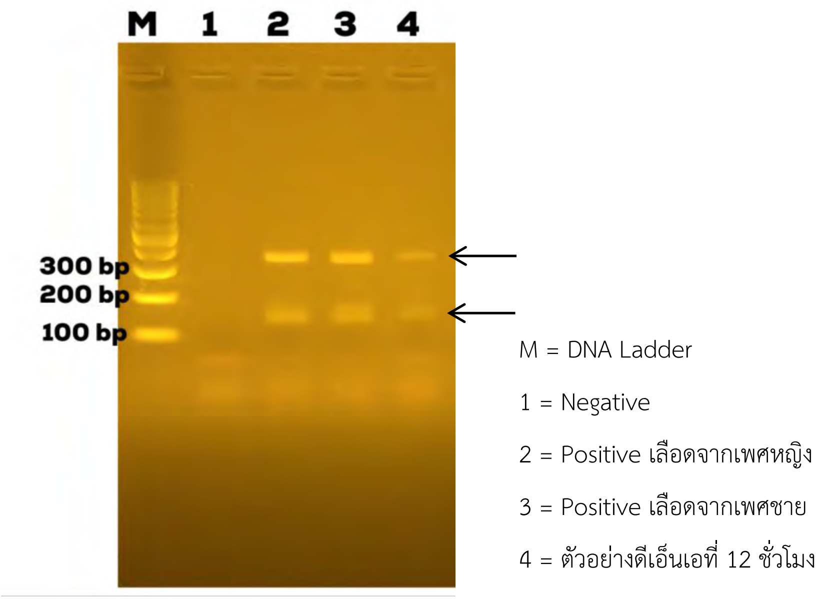
2 = Positive เลือดจากเพศหญิง

3 = Positive เลือดจากเพศชาย

4 = ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 12 ชั่วโมง

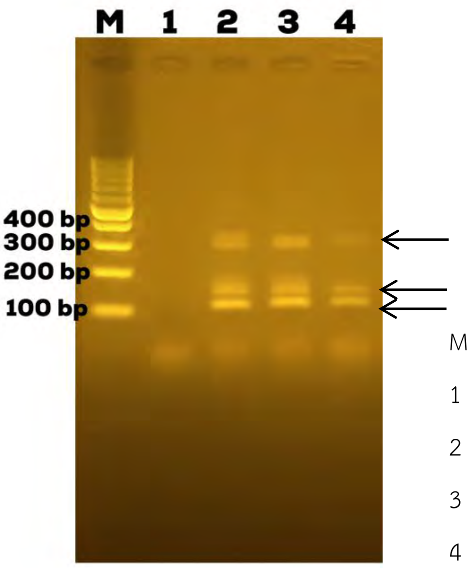
ภาพที่ 4.13 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย *CSF1PO*, *TPOX*, D13S317 และ *TH01* ของตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 12 ชั่วโมง

จากการทำ multiplex PCR กลุ่มที่ 4 ของ *FGA*, D5S818 และ D2S1338 ภาพที่ 4.14 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่ 12 ชั่วโมงพบดีเอ็นเอที่อยู่ในช่วง 120-350 bp ซึ่งตรงกับไพร์เมอร์ที่ให้ขนาดดีเอ็นเอ คือ *FGA* ให้ดีเอ็นเอขนาด 308-464 bp, D5S818 ให้ดีเอ็นเอขนาด 115-163 bp และ D2S1338 ให้ดีเอ็นเอขนาด 165-205 bp



ภาพที่ 4.14 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย *FGA*, D5S818 และ D2S1338 ของตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 12 ชั่วโมง

จากการทำ multiplex PCR กลุ่มที่ 5 ของ *Amelogenin*, *vWA* และ D18S51 ภาพที่ 4.15 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่ 12 ชั่วโมงพบดีเอ็นเอที่อยู่ในช่วง 100-350 bp ซึ่งตรงกับไพร์เมอร์ที่ให้ขนาดดีเอ็นเอ คือ *Amelogenin* ให้ดีเอ็นเอขนาด 106-112 bp, *vWA* ให้ดีเอ็นเอขนาด 122-182 bp และ D18S51 ให้ดีเอ็นเอขนาด 262-349 bp



M = DNA Ladder

1 = Negative

2 = Positive เลือดจากเพศหญิง

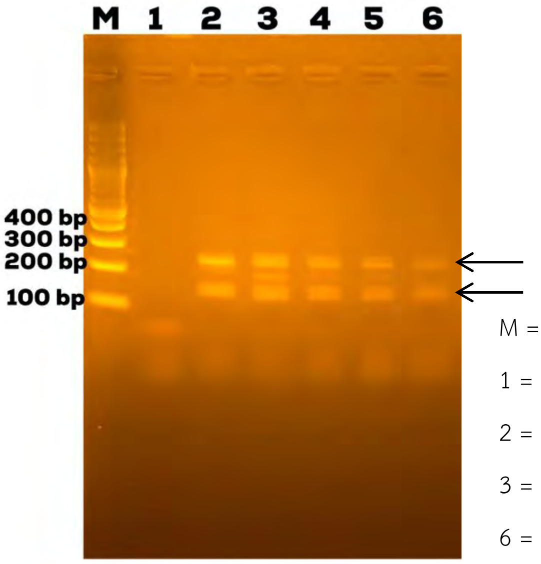
3 = Positive เลือดจากเพศชาย

4 = ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 12 ชั่วโมง

ภาพที่ 4.15 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย *Amelogenin*, *vWA* และ D18S51 ของตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 12 ชั่วโมง

ตัวอย่างที่เวลา 24 ชั่วโมง

จากการทำ multiplex PCR กลุ่มที่ 1 ของ D3S1358, D19S433 และ D7S820 ภาพที่ 4.16 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่ 24 ชั่วโมงพบดีเอ็นเอที่อยู่ในช่วง 120-250 bp ซึ่งตรงกับไพร์เมอร์ที่ให้ขนาดดีเอ็นเอ คือ D3S1358 ให้ดีเอ็นเอขนาด 99-147 bp, D19S433 ให้ดีเอ็นเอขนาด 119-221 bp และ D7S820 ให้ดีเอ็นเอขนาด 211-251 bp



M = DNA Ladder

1 = Negative

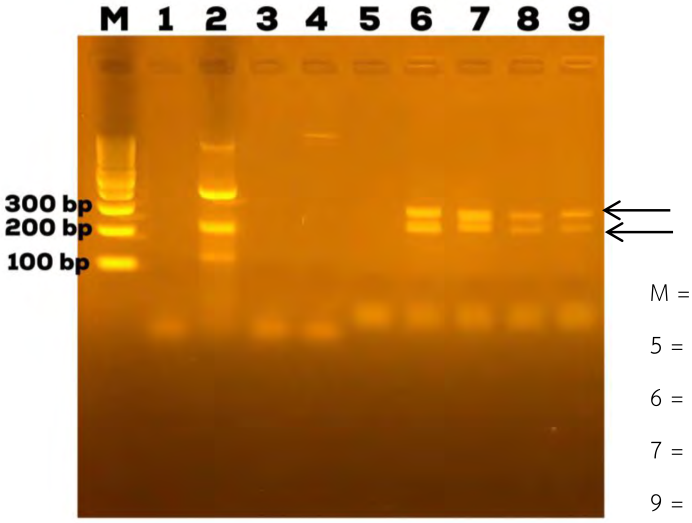
2 = Positive เลือดจากเพศหญิง

3 = Positive เลือดจากเพศชาย

6 = ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 24 ชั่วโมง

ภาพที่ 4.16 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย D3S1358, D19S433 และ D7S820 ของตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 24 ชั่วโมง

จากการทำ multiplex PCR กลุ่มที่ 2 ของ D21S11, D16S539 และ D8S1179 ภาพที่ 4.17 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่ 24 ชั่วโมงพบดีเอ็นเอที่อยู่ในช่วง 200-300 bp ซึ่งตรงกับไพร์เมอร์ที่ให้ขนาดดีเอ็นเอ คือ D21S11 ให้ดีเอ็นเอขนาด 154-272 bp, D16S539 ให้ดีเอ็นเอขนาด 260-308 bp และ D8S1179 ให้ดีเอ็นเอขนาด 203-255 bp



M = DNA Ladder

5 = Negative

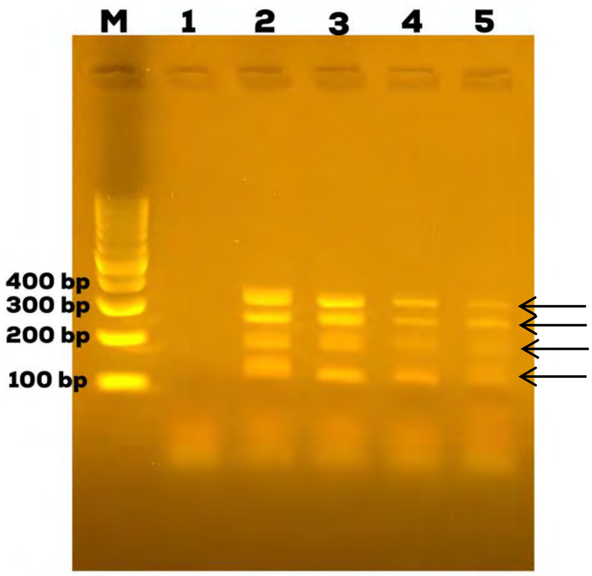
6 = Positive เลือดจากเพศหญิง

7 = Positive เลือดจากเพศชาย

9 = ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 24 ชั่วโมง

ภาพที่ 4.17 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย D21S11, D16S539 และ D8S1179 ของตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 24 ชั่วโมง

จากการทำ multiplex PCR กลุ่มที่ 3 ของ *CSF1PO*, *TPOX*, D13S317 และ *TH01* ภาพที่ 4.18 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่ 24 ชั่วโมงพบดีเอ็นเอ 4 ขนาดที่อยู่ในช่วง 100-330 bp ซึ่งตรงกับไพร์เมอร์ที่ให้ขนาดดีเอ็นเอ คือ *CSF1PO* ให้ดีเอ็นเอขนาด 287-331 bp, *TPOX* ให้ดีเอ็นเอขนาด 98-146 bp D13S317 ให้ดีเอ็นเอขนาด 157-205 bp และ *TH01* ให้ดีเอ็นเอขนาด 230-274 bp



M = DNA Ladder

1 = Negative

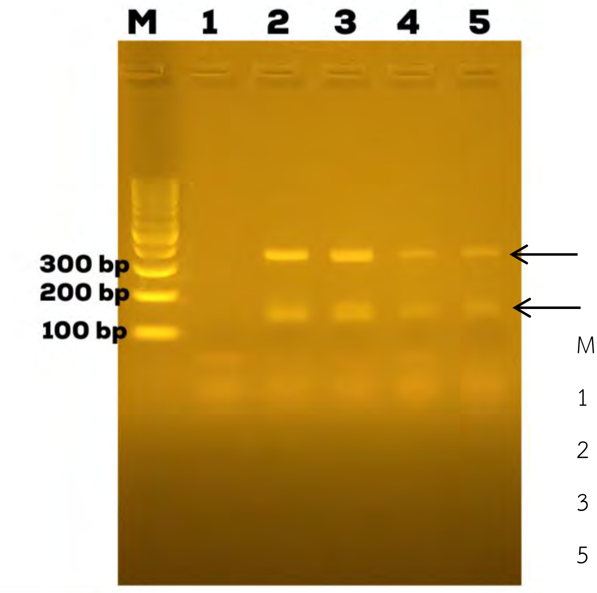
2 = Positive เลือดจากเพศหญิง

3 = Positive เลือดจากเพศชาย

5 = ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 24 ชั่วโมง

ภาพที่ 4.18 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย *CSF1PO*, *TPOX*, D13S317 และ *TH01* ของตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 24 ชั่วโมง

จากการทำ multiplex PCR กลุ่มที่ 4 ของ *FGA*, D5S818 และ D2S1338 ภาพที่ 4.19 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่ 24 ชั่วโมงพบดีเอ็นเอที่อยู่ในช่วง 120-350 bp ซึ่งตรงกับไพร์เมอร์ที่ให้ขนาดดีเอ็นเอ คือ *FGA* ให้ดีเอ็นเอขนาด 308-464 bp, D5S818 ให้ดีเอ็นเอขนาด 115-163 bp และ D2S1338 ให้ดีเอ็นเอขนาด 165-205 bp



M = DNA Ladder

1 = Negative

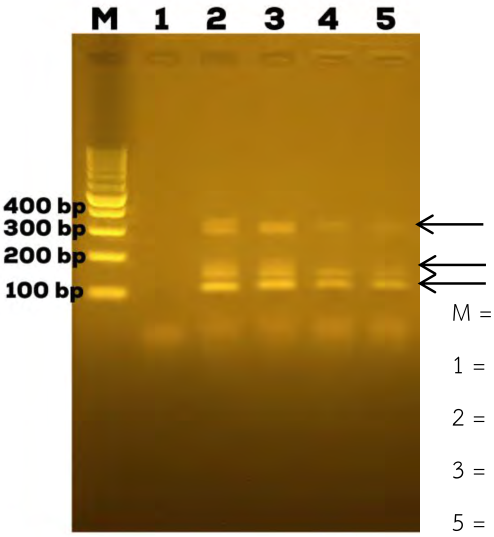
2 = Positive เลือดจากเพศหญิง

3 = Positive เลือดจากเพศชาย

5 = ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 24 ชั่วโมง

ภาพที่ 4.19 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย *FGA*, D5S818 และ D2S1338 ของตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 24 ชั่วโมง

จากการทำ multiplex PCR กลุ่มที่ 5 ของ *Amelogenin*, *vWA* และ D18S51 ภาพที่ 4.20 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่ 24 ชั่วโมงพบดีเอ็นเอที่อยู่ในช่วง 100-350 bp ซึ่งตรงกับไพร์เมอร์ที่ให้ขนาดดีเอ็นเอ คือ *Amelogenin* ให้ดีเอ็นเอขนาด 106-112 bp, *vWA* ให้ดีเอ็นเอขนาด 122-182 bp และ D18S51 ให้ดีเอ็นเอขนาด 262-349 bp



M = DNA Ladder

1 = Negative

2 = Positive เลือดจากเพศหญิง

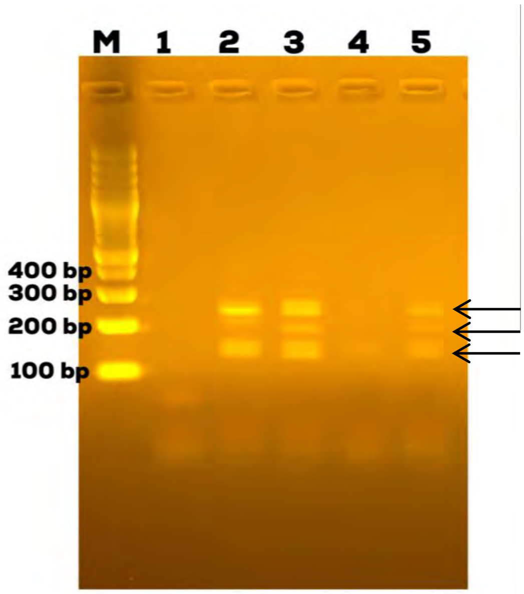
3 = Positive เลือดจากเพศชาย

5 = ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 24 ชั่วโมง

ภาพที่ 4.20 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย *Amelogenin*, *vWA* และ D18S51 ของตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 24 ชั่วโมง

ตัวอย่างที่เวลา 36 ชั่วโมง

จากการทำ multiplex PCR กลุ่มที่ 1 ของ D3S1358, D19S433 และ D7S820 ภาพที่ 4.21 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่ 36 ชั่วโมงพบดีเอ็นเอที่อยู่ในช่วง 120-250 bp ซึ่งตรงกับไพร์เมอร์ที่ให้ขนาดดีเอ็นเอ คือ D3S1358 ให้ดีเอ็นเอขนาด 99-147 bp, D19S433 ให้ดีเอ็นเอขนาด 119-221 bp และ D7S820 ให้ดีเอ็นเอขนาด 211-251 bp



M = DNA Ladder

1 = Negative

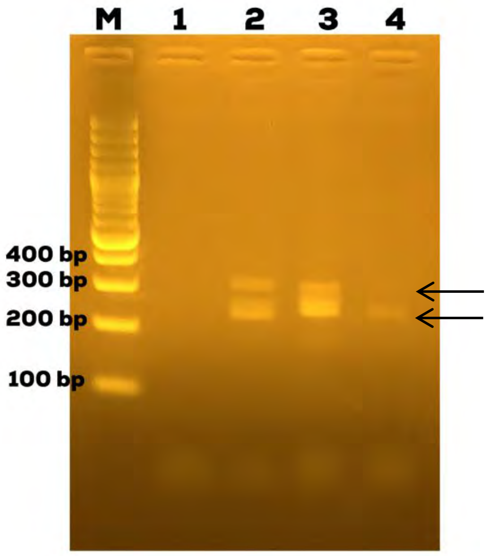
2 = Positive เลือดจากเพศหญิง

3 = Positive เลือดจากเพศชาย

5 = ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 36 ชั่วโมง

ภาพที่ 4.21 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย D3S1358, D19S433 และ D7S820 ของตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 36 ชั่วโมง

จากการทำ multiplex PCR กลุ่มที่ 2 ของ D21S11, D16S539 และ D8S1179 ภาพที่ 4.22 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่ 36 ชั่วโมงพบดีเอ็นเอที่อยู่ในช่วง 200-300 bp ซึ่งตรงกับไพร์เมอร์ที่ให้ขนาดดีเอ็นเอ คือ D21S11 ให้ดีเอ็นเอขนาด 154-272 bp, D16S539 ให้ดีเอ็นเอขนาด 260-308 bp และ D8S1179 ให้ดีเอ็นเอขนาด 203-255 bp



M = DNA Ladder

1 = Negative

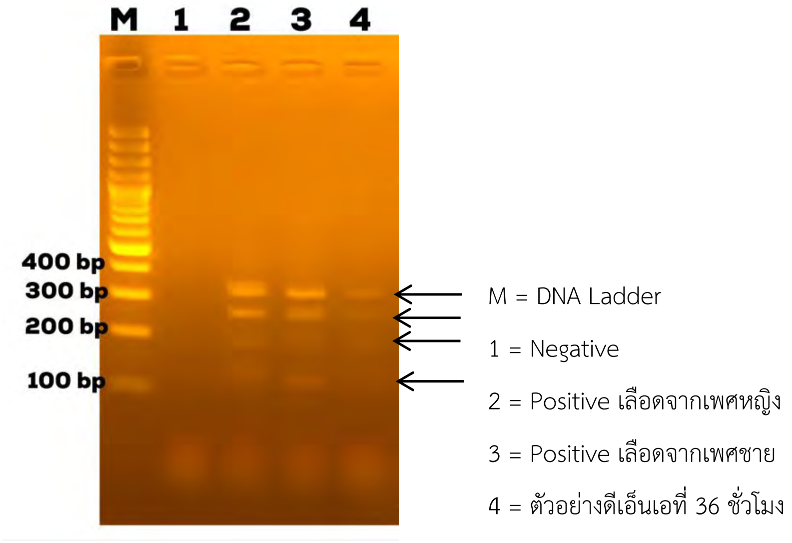
2 = Positive เลือดจากเพศหญิง

3 = Positive เลือดจากเพศชาย

4 = ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 36 ชั่วโมง

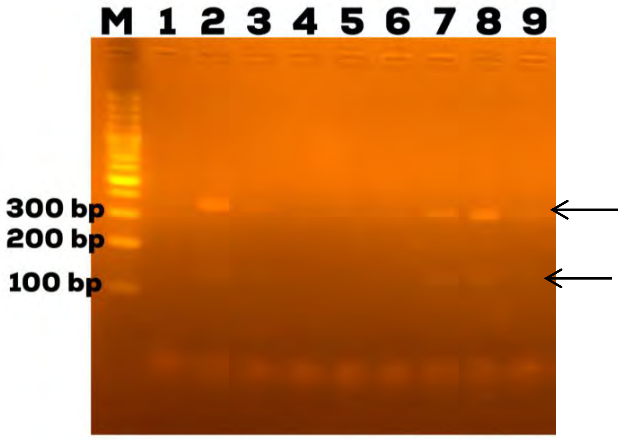
ภาพที่ 4.22 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย D21S11, D16S539 และ D8S1179 ของตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 36 ชั่วโมง

จากการทำ multiplex PCR กลุ่มที่ 3 ของ *CSF1PO*, *TPOX*, D13S317 และ *TH01* ภาพที่ 4.23 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่ 36 ชั่วโมงพบดีเอ็นเอ 4 ขนาดที่อยู่ในช่วง 100-330 bp ซึ่งตรงกับไพร์เมอร์ที่ให้ขนาดดีเอ็นเอ คือ *CSF1PO* ให้ดีเอ็นเอขนาด 287-331 bp, *TPOX* ให้ดีเอ็นเอขนาด 98-146 bp D13S317 ให้ดีเอ็นเอขนาด 157-205 bp และ *TH01* ให้ดีเอ็นเอขนาด 230-274 bp



ภาพที่ 4.23 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย primer *CSF1PO*, *TPOX*, D13S317 และ *TH01* ของตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 36 ชั่วโมง

จากการทำ multiplex PCR กลุ่มที่ 4 ของ *FGA*, D5S818 และ D2S1338 ภาพที่ 4.24 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่ 36 ชั่วโมงพบดีเอ็นเอที่อยู่ในช่วง 120-350 bp ซึ่งตรงกับไพร์เมอร์ที่ให้ขนาดดีเอ็นเอ คือ *FGA* ให้ดีเอ็นเอขนาด 308-464 bp, D5S818 ให้ดีเอ็นเอขนาด 115-163 bp และ D2S1338 ให้ดีเอ็นเอขนาด 165-205 bp



M = DNA Ladder

1 = Negative

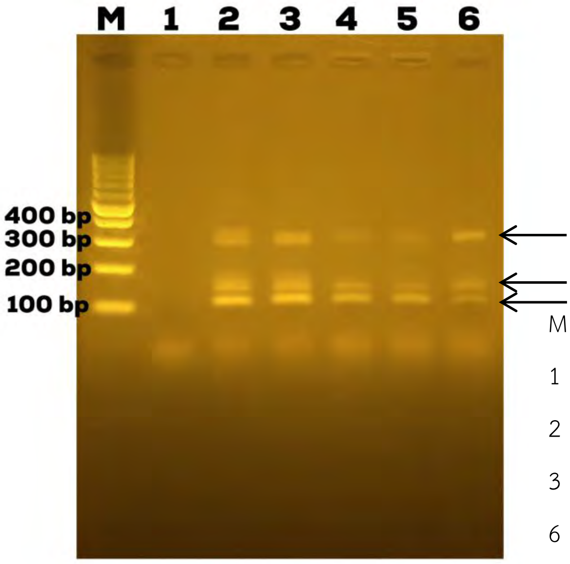
7 = Positive เลือดจากเพศหญิง

8 = Positive เลือดจากเพศชาย

9 = ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 36 ชั่วโมง

ภาพที่ 4.24 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย *FGA*, D5S818 และ D2S1338 ของตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 36 ชั่วโมง

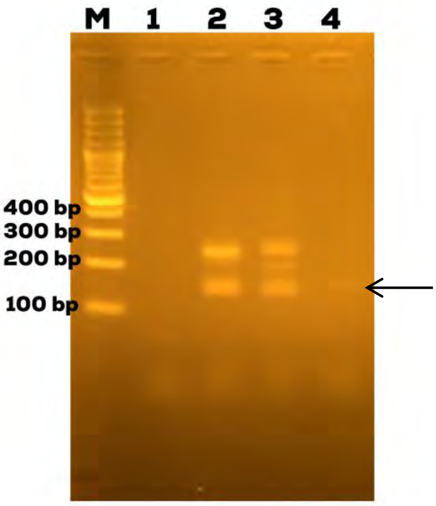
จากการทำ multiplex PCR กลุ่มที่ 5 ของ *Amelogenin*, *vWA* และ D18S51 ภาพที่ 4.25 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่ 36 ชั่วโมงพบดีเอ็นเอที่อยู่ในช่วง 100-350 bp ซึ่งตรงกับไพร์เมอร์ที่ให้ขนาดดีเอ็นเอ คือ *Amelogenin* ให้ดีเอ็นเอขนาด 106-112 bp, *vWA* ให้ดีเอ็นเอขนาด 122-182 bp และ D18S51 ให้ดีเอ็นเอขนาด 262-349 bp



ภาพที่ 4.25 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย *Amelogenin*, *vWA* และ D18S51 ของตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 36 ชั่วโมง

ตัวอย่างที่เวลา 48 ชั่วโมง

จากการทำ multiplex PCR กลุ่มที่ 1 ของ D3S1358, D19S433 และ D7S820 ภาพที่ 4.26 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่ 48 ชั่วโมงพบดีเอ็นเอเพียง 1 ขนาดประมาณ 150 bp ซึ่งอยู่ในช่วงเดียวกับไพร์เมอร์ที่ให้ขนาดดีเอ็นเอ คือ D3S1358 ให้ดีเอ็นเอขนาด 99-147 bp และ D19S433 ให้ดีเอ็นเอขนาด 119-221 bp



M = DNA Ladder

1 = Negative

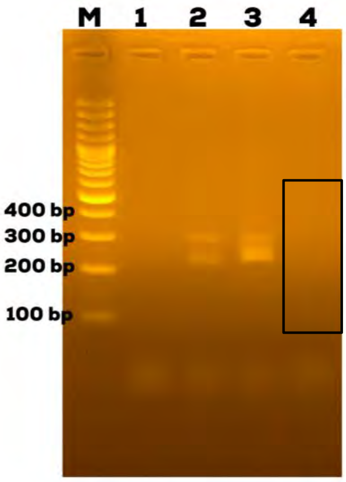
2 = Positive เลือดจากเพศหญิง

3 = Positive เลือดจากเพศชาย

4 = ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 48 ชั่วโมง

ภาพที่ 4.26 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย D3S1358, D19S433 และ D7S820 ของตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 48 ชั่วโมง

จากการทำ multiplex PCR กลุ่มที่ 2 ของ D21S11, D16S539 และ D8S1179 ภาพที่ 4.27 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่ 48 ชั่วโมง ไม่พบดีเอ็นเอที่อยู่ในช่วง 150-300 bp



M = DNA Ladder

1 = Negative

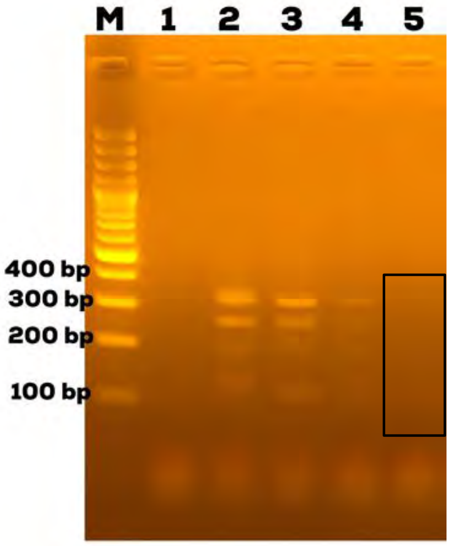
2 = Positive เลือดจากเพศหญิง

3 = Positive เลือดจากเพศชาย

4 = ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 48 ชั่วโมง

ภาพที่ 4.27 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย D21S11, D16S539 และ D8S1179 ของตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 48 ชั่วโมง

จากการทำ multiplex PCR กลุ่มที่ 3 ของ *CSF1PO*, *TPOX*, D13S317 และ *TH01* ภาพที่ 4.28 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่ 48 ชั่วโมง ไม่พบดีเอ็นเอที่อยู่ในช่วง 100-330 bp



M = DNA Ladder

1 = Negative

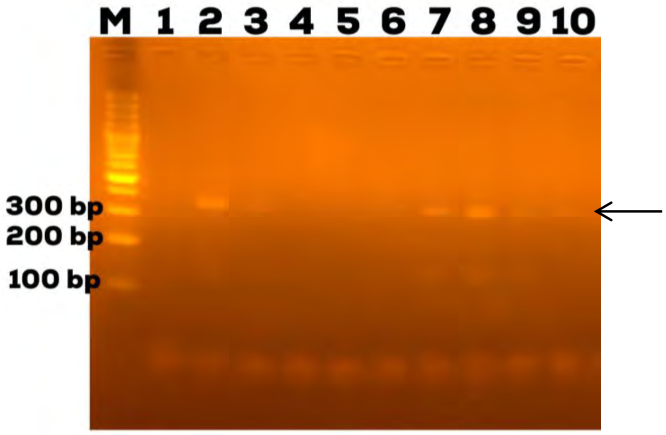
2 = Positive เลือดจากเพศหญิง

3 = Positive เลือดจากเพศชาย

5 =ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 48 ชั่วโมง

ภาพที่ 4.28 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย *CSF1PO*, *TPOX*, D13S317 และ *TH01* ของตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 48 ชั่วโมง

จากการทำ multiplex PCR กลุ่มที่ 4 ของ *FGA*, D5S818 และ D2S1338 ภาพที่ 4.29 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่ 48 ชั่วโมงพบดีเอ็นเอ 1 ขนาดประมาณ 300 bp ซึ่งตรงกับไพร์เมอร์ที่ให้ขนาดดีเอ็นเอ คือ *FGA* ให้ดีเอ็นเอขนาด 308-464 bp



M = DNA Ladder

1 = Negative

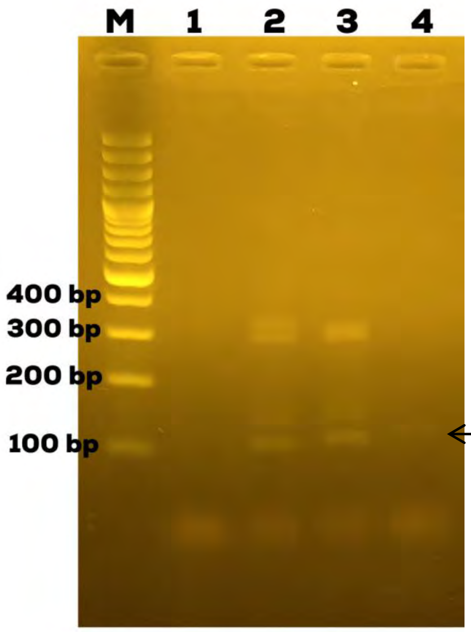
7 = Positive เลือดจากเพศหญิง

8 = Positive เลือดจากเพศชาย

10 =ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 48 ชั่วโมง

ภาพที่ 4.29 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย *FGA*, D5S818 และ D2S1338 ของตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 48 ชั่วโมง

จากการทำ multiplex PCR กลุ่มที่ 5 ของ *Amelogenin*, *vWA* และ D18S51 ภาพที่ 4.30 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่ 48 ชั่วโมงพบดีเอ็นเอที่อยู่ในช่วง 100-200 bp ซึ่งตรงกับไพร์เมอร์ที่ให้ขนาดดีเอ็นเอ คือ *Amelogenin* ให้ดีเอ็นเอขนาด 106-112 bp และ *vWA* ให้ดีเอ็นเอขนาด 122-182 bp



M = DNA Ladder

1 = Negative

2 = Positive เลือดจากเพศหญิง

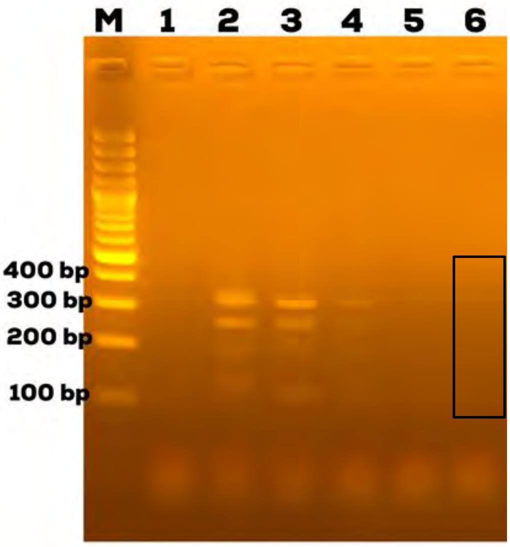
3 = Positive เลือดจากเพศชาย

4 = ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 48 ชั่วโมง

ภาพที่ 4.30 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย *Amelogenin*, *vWA* และ D18S51 ของตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 48 ชั่วโมง

ตัวอย่างที่เวลา 60 ชั่วโมง

จากการทำ multiplex PCR กลุ่มที่ 3 ของ *CSF1PO*, *TPOX*, D13S317 และ *TH01* ภาพที่ 4.31 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่ 60 ชั่วโมง ไม่พบดีเอ็นเอที่อยู่ในช่วง 100-330 bp



M = DNA Ladder

1 = Negative

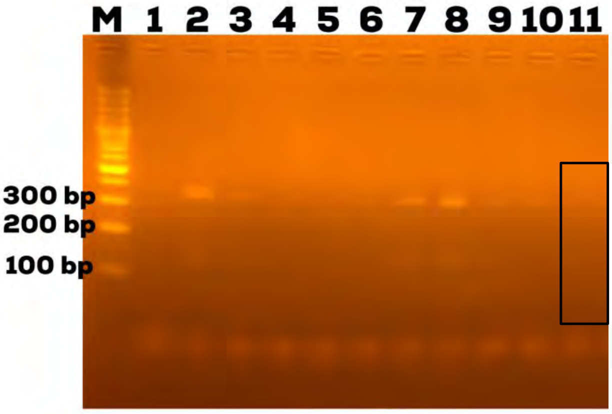
2 = Positive เลือดจากเพศหญิง

3 = Positive เลือดจากเพศชาย

6 =ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 60 ชั่วโมง

ภาพที่ 4.31 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย *CSF1PO*, *TPOX*, D13S317 และ *TH01* ของตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 60 ชั่วโมง

จากการทำ multiplex PCR กลุ่มที่ 4 ของ *FGA*, D5S818 และ D2S1338 ภาพที่ 4.32 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่ 60 ชั่วโมง ไม่พบดีเอ็นเอที่อยู่ในช่วง 110-470 bp



M = DNA Ladder

1 = Negative

7 = Positive เลือดจากเพศหญิง

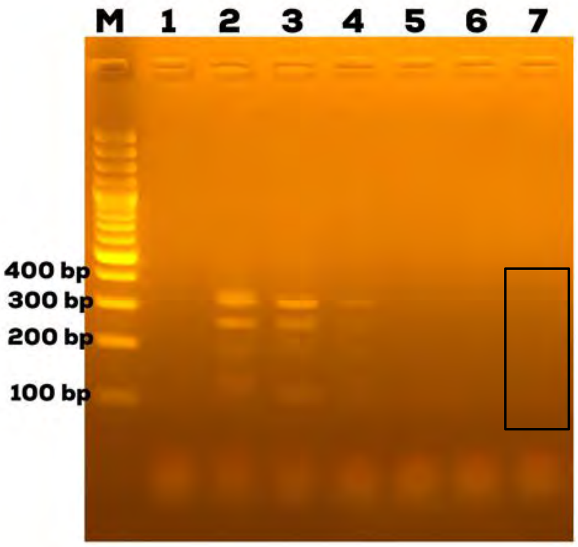
8 = Positive เลือดจากเพศชาย

11 = ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 60 ชั่วโมง

ภาพที่ 4.32 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย *FGA*, D5S818 และ D2S1338 ของตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 60 ชั่วโมง

ตัวอย่างที่เวลา 72 ชั่วโมง

จากการทำ multiplex PCR กลุ่มที่ 3 ของ *CSF1PO*, *TPOX*, D13S317 และ *TH01* ภาพที่ 4.33 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่ 72 ชั่วโมง ไม่พบดีเอ็นเอที่อยู่ในช่วง 100-330 bp



M = DNA Ladder

1 = Negative

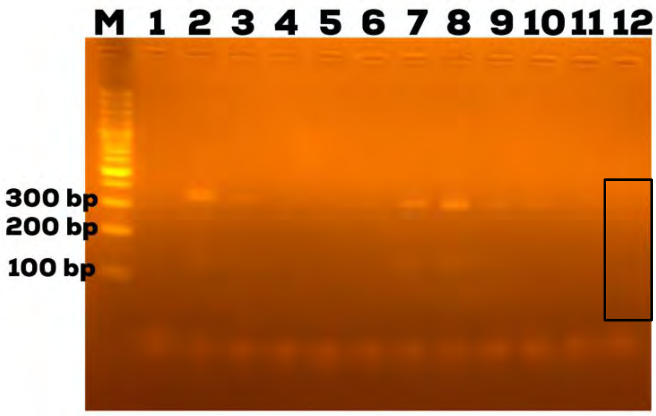
2 = Positive เลือดจากเพศหญิง

3 = Positive เลือดจากเพศชาย

7 =ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 72 ชั่วโมง

ภาพที่ 4.33 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย *CSF1PO*, *TPOX*, D13S317 และ *TH01* ของตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 72 ชั่วโมง

จากการทำ multiplex PCR กลุ่มที่ 4 ของ *FGA*, D5S818 และ D2S1338 ภาพที่ 4.34 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่ 72 ชั่วโมง ไม่พบดีเอ็นเอที่อยู่ในช่วง 110-470 bp



ภาพที่ 4.34 ผลที่ได้จากการทำ STR genotyping กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย *FGA*, D5S818 และ D2S1338 ของตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 72 ชั่วโมง

4.5 ผลการทำ capillary electrophoresis

ตัวอย่างที่เวลา 0 ชั่วโมง

จากการทำ capillary electrophoresis ของตัวอย่างที่เวลา 0 ชั่วโมง พบขนาดของดีเอ็นเอดังตารางที่ 4.1 ซึ่งตัวอย่างที่เวลา 0 ชั่วโมงมีขนาดดีเอ็นเอที่ได้ตรงกับตัวอย่างเลือดจากเพศหญิงและเพศชายที่ไม่ผ่านการกินของยุงในทุกตำแหน่ง

ตารางที่ 4.1 ผลการทำ capillary electrophoresis ของตัวอย่างที่เวลา 0 ชั่วโมง

PRIMER	ขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างเลือดจากเพศหญิง (bp)	ขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างเลือดจากเพศชาย (bp)	ขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างที่เวลา 0 ชั่วโมง (bp)
D3S1358	129, 133	125, 129	125, 129, 133
D19S433	152, 205	152, 186	152, 186, 205

PRIMER	ขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างเลือดจากเพศหญิง (bp)	ขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างเลือดจากเพศชาย (bp)	ขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างที่เวลา 0 ชั่วโมง (bp)
D7S820	231, 234	231, 234	231, 234
D21S11	224	238, 246	224, 238, 246
D16S539	289, 292	277, 289	277, 289, 292
D8S1179	230, 238	234, 238	230, 234, 238
CSF1PO	315, 319	315	315, 319
TPOX	115, 126	115	115, 126
D13S317	183, 187	183, 195	183, 187, 195
TH01	252	248, 252	248, 252
FGA	349	337, 341	337, 341, 349
D5S818	128, 141	128, 137	128, 137, 141
D2S1338	177, 196	164, 196	164, 177, 196
Amelogenin	106	106, 112	106, 112

PRIMER	ขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างเลือดจากเพศหญิง (bp)	ขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างเลือดจากเพศชาย (bp)	ขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างที่เวลา 0 ชั่วโมง (bp)
vWA	-	137, 155	137, 155
D18S51	314, 327	297, 314	297, 314, 327

ตัวอย่างที่เวลา 12 ชั่วโมง

จากการทำ capillary electrophoresis ของตัวอย่างที่เวลา 12 ชั่วโมง พบขนาดของดีเอ็นเอดังตารางที่ 4.2 ซึ่งตัวอย่างที่เวลา 12 ชั่วโมงมีขนาดดีเอ็นเอที่ได้ตรงกับตัวอย่างเลือดจากเพศหญิงและเพศชายที่ไม่ผ่านการกินของยุงในทุกตำแหน่ง

ตารางที่ 4.2 ผลการทำ capillary electrophoresis ของตัวอย่างที่เวลา 12 ชั่วโมง

PRIMER	ขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างเลือดจากเพศหญิง (bp)	ขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างเลือดจากเพศชาย (bp)	ขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างที่เวลา 12 ชั่วโมง (bp)
D3S1358	129, 133	125, 129	-
D19S433	152, 205	152, 186	152, 186, 205
D7S820	231, 234	231, 234	231, 234

PRIMER	ขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างเลือดจากเพศหญิง (bp)	ขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างเลือดจากเพศชาย (bp)	ขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างที่เวลา 12 ชั่วโมง (bp)
D21S11	224	238, 246	224, 238, 246
D16S539	289, 292	277, 289	277, 289, 292
D8S1179	230, 238	234, 238	230, 234, 238
CSF1PO	315, 319	315	315, 319
TPOX	115, 126	115	115, 126
D13S317	183, 187	183, 195	183, 187, 195
TH01	252	248, 252	248, 252
FGA	349	337, 341	337, 341, 349
D5S818	128, 141	128, 137	128, 137, 141
D2S1338	177, 196	164, 196	164, 177, 196
Amelogenin	106	106, 112	106, 112

PRIMER	ขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างเลือดจากเพศหญิง (bp)	ขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างเลือดจากเพศชาย (bp)	ขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างที่เวลา 12 ชั่วโมง (bp)
vWA	-	137, 155	137, 155
D18S51	314, 327	297, 314	297, 314, 327

ตัวอย่างที่เวลา 24 ชั่วโมง

จากการทำ capillary electrophoresis ของตัวอย่างที่เวลา 24 ชั่วโมง พบขนาดของดีเอ็นเอดังตารางที่ 4.3 ซึ่งตัวอย่างที่เวลา 24 ชั่วโมงมีขนาดดีเอ็นเอที่ได้ตรงกับตัวอย่างเลือดจากเพศหญิงและเพศชายที่ไม่ผ่านการกินของยุงในทุกตำแหน่ง

ตารางที่ 4.3 ผลการทำ capillary electrophoresis ของตัวอย่างที่เวลา 24 ชั่วโมง

PRIMER	ขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างเลือดจากเพศหญิง (bp)	ขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างเลือดจากเพศชาย (bp)	ขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างที่เวลา 24 ชั่วโมง (bp)
D3S1358	129, 133	125, 129	-
D19S433	152, 205	152, 186	152, 186, 205
D7S820	231, 234	231, 234	231, 234

PRIMER	ขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างเลือดจากเพศหญิง (bp)	ขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างเลือดจากเพศชาย (bp)	ขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างที่เวลา 24 ชั่วโมง (bp)
D21S11	224	238, 246	224, 238, 246
D16S539	289, 292	277, 289	277, 289, 292
D8S1179	230, 238	234, 238	230, 234, 238
CSF1PO	315, 319	315	315, 319
TPOX	115, 126	115	115, 126
D13S317	183, 187	183, 195	183, 187, 195
TH01	252	248, 252	248, 252
FGA	349	337, 341	337, 341, 349
D5S818	128, 141	128, 137	128, 137, 141
D2S1338	177, 196	164, 196	164, 177, 196
Amelogenin	106	106, 112	106, 112
vWA	-	137, 155	137, 155

PRIMER	ขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างเลือดจากเพศหญิง (bp)	ขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างเลือดจากเพศชาย (bp)	ขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างที่เวลา 24 ชั่วโมง (bp)
D18S51	314, 327	297, 314	297, 314, 327

ตัวอย่างที่เวลา 36 ชั่วโมง

จากการทำ capillary electrophoresis ของตัวอย่างที่เวลา 36 ชั่วโมง พบขนาดของดีเอ็นเอดังตารางที่ 4.4 ซึ่งตัวอย่างที่เวลา 36 ชั่วโมงมีขนาดดีเอ็นเอที่ได้ตรงกับตัวอย่างเลือดจากเพศหญิงและเพศชายที่ไม่ผ่านการกินของยุงในทุกตำแหน่ง

ตารางที่ 4.4 ผลการทำ capillary electrophoresis ของตัวอย่างที่เวลา 36 ชั่วโมง

PRIMER	ขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างเลือดจากเพศหญิง (bp)	ขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างเลือดจากเพศชาย (bp)	ขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างที่เวลา 36 ชั่วโมง (bp)
D3S1358	129, 133	125, 129	125, 129, 133
D19S433	152, 205	152, 186	152, 186, 205
D7S820	231, 234	231, 234	231, 234
D21S11	224	238, 246	224, 238

PRIMER	ขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างเลือดจากเพศหญิง (bp)	ขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างเลือดจากเพศชาย (bp)	ขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างที่เวลา 36 ชั่วโมง (bp)
D16S539	289, 292	277, 289	289
D8S1179	230, 238	234, 238	230, 234, 238
CSF1PO	315, 319	315	315, 319
TPOX	115, 126	115	115, 126
D13S317	183, 187	183, 195	183, 187, 195
TH01	252	248, 252	248, 252
FGA	349	337, 341	337, 341, 349
D5S818	128, 141	128, 137	128, 137, 141
D2S1338	177, 196	164, 196	164, 177, 196
Amelogenin	106	106, 112	106
vWA	-	137, 155	137, 155
D18S51	314, 327	297, 314	327

ตัวอย่างที่เวลา 48 ชั่วโมง

จากการทำ capillary electrophoresis ของตัวอย่างที่เวลา 48 ชั่วโมง พบขนาดของดีเอ็นเอดังตารางที่ 4.5 ซึ่งตัวอย่างที่เวลา 48 ชั่วโมงมีขนาดดีเอ็นเอที่ได้ตรงกับตัวอย่างเลือดจากเพศหญิงและเพศชายที่ไม่ผ่านการกินของยุงในทุกตำแหน่ง

ตารางที่ 4.5 ผลการทำ capillary electrophoresis ของตัวอย่างที่เวลา 48 ชั่วโมง

PRIMER	ขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างเลือดจากเพศหญิง (bp)	ขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างเลือดจากเพศชาย (bp)	ขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างที่เวลา 48 ชั่วโมง (bp)
D3S1358	129, 133	125, 129	129, 133
D19S433	152, 205	152, 186	152
D7S820	234	231, 234	231
FGA	349	337, 341	349
D5S818	128, 141	128, 137	-
D2S1338	176, 196	164	-
Amelogenin	106	106, 112	106, 112
vWA	-	137, 155	-

PRIMER	ขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างเลือดจากเพศหญิง (bp)	ขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างเลือดจากเพศชาย (bp)	ขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างที่เวลา 48 ชั่วโมง (bp)
D18S51	314, 327	297, 314	-

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง และสรุปผล

จากการศึกษาปริมาณเลือดภายในท้องยุงที่สามารถสังเกตผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอมีปริมาณลดลงเมื่อเวลาผ่านไปซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าที่กล่าวว่าปริมาณเลือดในท้องยุงที่สามารถสังเกตผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอจะลดลงเมื่อเวลาผ่านไป (Santos et al., 2019) โดยปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดโดยใช้ชุด QIAamp DNA micro kit ของแต่ละเวลาที่เก็บตัวอย่างเลือดในท้องยุงไม่ลดลงเมื่อเวลาผ่านไปและมีค่า A_{260}/A_{280} อยู่ในช่วง 1.98-2.37 ซึ่งไม่สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าที่ทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุด QIAamp DNA micro kit และพบว่าปริมาณดีเอ็นมีปริมาณลดลงเมื่อจำนวนชั่วโมงผ่านไป (Hiroshige et al., 2017) ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าในการศึกษานี้เป็นการสกัดดีเอ็นเอจากยุงทั้งตัวจึงอาจทำให้มีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอและโปรตีนที่พบในยุงในดีเอ็นเอที่สกัดได้

การตรวจสอบยีน *CADM1* เพื่อตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอเบื้องต้นและยืนยันว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้เป็นของมนุษย์ จากการใช้ไพร์เมอร์ที่ให้ขนาดดีเอ็นเอ 3 ขนาด คือ 121, 229 และ 397 พบว่าสามารถตรวจพบดีเอ็นเอมนุษย์จากตัวอย่างยุงที่เก็บตั้งแต่เวลา 0 ชั่วโมง โดยพบดีเอ็นเอขนาด 121 และ 229 bp ที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมงพบดีเอ็นเอขนาด 121, 229 และ 397 bp แต่ไม่พบขนาดดีเอ็นเอที่เวลา 36 และ 48 ชั่วโมง เนื่องจากการออกแบบไพร์เมอร์ที่อยู่บริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CADM1* ส่งผลให้การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวนมากในระยะเวลาที่สั้นสามารถทำได้ยาก

ในการศึกษานี้ออกแบบและจัดทำ multiplex PCR ของไพร์เมอร์ STRs โดยใช้ STRs มาตรฐานสำหรับประเทศไทยจำนวน 16 ตำแหน่ง ซึ่งแบ่งออกเป็นจำนวน 5 ชุด โดยจัดไพร์เมอร์ที่มี melting temperature ใกล้เคียงกันไว้ในกลุ่มเดียวกัน ขนาดของดีเอ็นเอและสีที่ติดฉลากที่แตกต่างกันไว้ในกลุ่มเดียวกัน เพื่อลดการใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีปริมาณจำกัด ลดการใช้เวลาและสารเคมี พบว่าสามารถตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอได้จากตัวอย่างเลือดในท้องยุงรำคาญที่เก็บเวลา 0 12 24 36 และ 48 ชั่วโมง แต่ที่เวลา 48 ชั่วโมงพบดีเอ็นเอบางขนาดเท่านั้น และเมื่อนำดีเอ็นเอที่ได้ไปทำ capillary electrophoresis พบว่า peak ที่พบมีขนาดตรงกับตัวอย่างเลือดจากเพศหญิงและเพศชายที่ไม่ผ่าน

การกินของยุง ซึ่งแสดงว่าสามารถตรวจสอบ STR genotyping และแยกความแตกต่างระหว่างบุคคล 2 คน จากตัวอย่างเลือดในท้องยุงรำคาญที่เก็บเวลา 0 12 24 36 และ 48 ชั่วโมง แต่ที่เวลา 48 ชั่วโมง สามารถตรวจสอบได้บางตำแหน่ง เนื่องจากเมื่อเวลาผ่านไปจะมีเอนไซม์ต่าง ๆ เช่น Trypsin aminopeptidase และ α-Glucosidase หลั่งออกมาบริเวณส่วนท้องยุงเพื่อทำการย่อยเลือด (Billingsley and Hecker, 1991) ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยที่กล่าวว่าสามารถตรวจสอบการระบุรูปแบบดีเอ็นเอจากเลือดที่อยู่ในท้องยุงเป็นเวลา 3 วัน (Curic et al., 2014)

การศึกษาในอนาคตควรเพิ่มการทดลองซ้ำในแต่ละเวลา เพื่อลดปัจจัยต่าง ๆ ที่เข้ามามีผลทำให้ยุงแต่ละตัวมีความแตกต่างกัน เช่น ปริมาณเลือดที่ยุงกิน เอนไซม์ในท้องยุง ที่ส่งผลให้ยุงแต่ละตัวแตกต่างกัน และควรเพิ่มการเก็บตัวอย่างยุงในแต่ละเวลาเพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอ เพื่อเพิ่มความน่าเชื่อถือของข้อมูล นอกจากนี้ควรเพิ่มช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่าง โดยเพิ่มการเก็บตัวอย่างระหว่างเวลา 36 ถึง 48 ชั่วโมง เพื่อให้ทราบข้อมูลเพิ่มเติมและนำมาวิเคราะห์ผลว่าเลือดภายในท้องยุงถึงเวลาเท่าใดที่สามารถระบุโพรไฟล์และแยกความแตกต่างระหว่างบุคคลได้

สรุปว่าจากการศึกษาการระบุรูปแบบและความแตกต่างดีเอ็นเอจากการตรวจสอบ STRs จำนวน 16 ตำแหน่ง สามารถระบุ STR genotyping ตรวจสอบรูปแบบดีเอ็นเอของบุคคลและแยกความแตกต่างของ 2 บุคคลได้จากตัวอย่างเลือดในท้องยุงที่เก็บตั้งแต่เวลา 0 12 24 36 และ 48 ชั่วโมง โดยตัวอย่างที่เก็บที่เวลา 0 12 24 และ 36 ชั่วโมง เมื่อนำไปทำ capillary electrophoresis สามารถระบุ STR genotyping ของทั้งสองบุคคลได้ทั้ง 16 ตำแหน่ง โดยพบว่าขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างที่เก็บที่เวลาดังกล่าวตรงกับตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครเพศหญิงและเพศชายที่ไม่ผ่านการกินของยุง ส่วนตัวอย่างที่เก็บที่เวลา 48 ชั่วโมง สามารถระบุ STR genotyping ได้เพียงบางตำแหน่ง

เอกสารอ้างอิง

ปาณิก เวียงชัย. 2556. วัตถุพยานทางชีววิทยา. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://biology.ipst.ac.th/ [10 เมษายน 2563]

อุษาวดี ถาวระ. 2553. ชีววิทยาและการควบคุมแมลงที่เป็นปัญหาสาธารณสุข. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.

อุษาวดี ถาวระ และคณะ. 2559. ยุงร้ายกว่าเสือ. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.

Applied Biosystems. 2012. AmpFlSTR Identifiler PCR Amplification Kit. California.

Billingsley, P. and Hecker, H. 1991. Blood Digestion in the Mosquito, *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae): Activity and Distribution of Trypsin, Aminopeptidase, and α-Glucosidase in the Midgut. Entomological Society of America. 28: 865-871

Borovsky, D. 1986. Proteolytic enzymes and blood digestion in the mosquito, *Culex nigripalpus*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology. 3: 147-160.

Butler, J. and Steffen, C. 2013. Biology and Genetics of new autosomal STR loci useful for forensic DNA analysis. Forensic DNA Analysis : Current Practices and Emerging Technologies. 1: 18.

Chakraborty et al., 1999. The utility of short tandem repeat loci beyond human identification:Implications for development of new DNA typing systems. Electrophoresis. 20:1682-1696.

Curic et al., 2014. Identification of person and quantification of human DNA recovered from mosquitoes (Culicidae). Forensic Science International: Genetics. 8: 109-112.

Ewing et al., 2016. Human DNA quantification and sample quality assessment: Developmental validation of the PowerQuant system. Forensic Science International: Genetics. 23: 166–177.

GeneCards, Human Gene. 2020. *CADM1* gene. [Online]. Available from https://www.genecards.org/. [2020, April 2]

Hall, A., Sim, L.M. and Ballantyne, J. 2014. Assessment of DNA damage induced by terrestrial UV irradiation of dried bloodstains. Forensic Science International: Genetics. 8: 24-32.

Harris et al., 2006. The effect of cleaning agents on the DNA analysis of blood stains deposited on different substrates. International Congress Series. 1288: 589-591.

Hiroshige et al., 2017. A human genotyping trial to estimate the post-feeding time from mosquito blood meals. Public Library of Science ONE. 12(6): 1-18.

Krenke et al., 2002. Validation of a 16-locus fluorescent multiplex system. Journal of Forensic Sciences. 47(4): 773-785.

Li et al., 1993. Three tetranucleotide polymorphisms for loci: D3S1352, D3S1358, D3S1359. Human Molecular Genetics. 2: 1327.

Mannucci et al., 1994. Forensic application of a rapid and quantitative DNA sex test by amplification of the X-Y homologous gene amelogenin. International Journal of Legal Medicine. 106: 190-193.

Oda et al., 1999. Effects of high temperature on the emergence and survival of adult *Culex pipiens molestus* and *Culex quinquefasciatus* in Japan. Journal of the American Mosquito Control Association. 15(2): 153-156.

Reeves et al., 2018. Barcoding blood meals: New vertebrate-specific primer sets for assigning taxonomic identities to host DNA from mosquito blood meals. Public Library of science Neglected Tropical Diseases. 12(8): 1-18.

Santos et al., 2019. Molecular identification of blood meals in mosquitoes (Diptera, Culicidae) in urban and forested habitats in southern Brazil. Public Library of Science ONE. 14(2): 1-18.

Siria et al., 2018. Evaluation of a simple polytetrafluoroethylene (PTFE)-based membrane for blood-feeding of malaria and dengue fever vectors in the laboratory. Parasit Vectors. 11(1): 236.

Urquhart et al., 1994. Variation in short tandem repeat sequences--a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers. International Journal of Legal Medicine. 107: 13-20.

ภาคผนวก

การให้เลือดยุงด้วยวิธีเลียนแบบธรรมชาติ

1. เตรียมขวดรูปชมพู่และหุ้มบริเวณก้นขวดรูปชมพู่ด้วยแผ่นพาราฟิล์ม
2. ใส่เลือดปริมาตร 4 มิลลิลิตรบริเวณก้นขวดรูปชมพู่ จากนั้นหุ้มทับด้วยแผ่นพาราฟิล์มอีกชั้นหนึ่ง
3. บรรจุน้ำอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสภายในขวดรูปชมพู่ เพื่อเลียนแบบอุณหภูมิร่างกายมนุษย์
4. นำขวดรูปชมพู่ไปวางบนกรงยุงเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ยุงดูดเลือด
5. ทำการเก็บตัวอย่างยุงโดยใช้กระบอกดูดยุง

การสกัดดีเอ็นเอด้วยชุด QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen, Germany)

1. ใส่ยุงทั้งตัวลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นใส่ Buffer ATL 100 ไมโครลิตร และใช้ปลาย pipette tip แทงบริเวณส่วนท้องยุง
2. เติม proteinase K 10 ไมโครลิตร และเติม Buffer AL 100 ไมโครลิตร จากนั้น vortex 15 วินาที
3. Incubate ที่ 56 องศาเซลเซียส 10 นาที
4. เติม 100% ethanol ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้น vortex 15 วินาที และตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที
5. ดูดสารละลายส่วนใสใส่ column จากนั้น centrifuge 8000 rpm 1 นาที เมื่อครบเวลาย้าย column ลงใน tube ใหม่ขนาด 2 มิลลิลิตร
6. เติม Buffer AW1 500 ไมโครลิตร และ centrifuge 8000 rpm 1 นาที เมื่อครบเวลาเทสารละสายใน tube ทิ้ง
7. เติม Buffer AW2 500 ไมโครลิตร และ centrifuge 8000 rpm 1 นาที เมื่อครบเวลาเทสารละสายใน tube ทิ้ง
8. centrifuge 14,000 rpm 3 นาที
9. ย้าย column ลงใน tube ใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Buffer AE 25 ไมโครลิตร และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที และ centrifuge 14,000 rpm 2 นาที
10. นำ column ทิ้ง และดีเอ็นเอที่สกัดได้จะอยู่ใน tube

ตารางที่ 6.1 สารที่ใช้ในการทำ PCR ยีน *CADM1*

สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (µL)
10x PCR buffer	1x	1
25 mM Magnesium chloride	2.5 mM	0.4
10 mM dNTP Mix	200 µM of each	0.2
250 U HotStarTaq	2.5 U/reaction	0.05
20 µM Forward primer	0.3 µM	0.15
20 µM Reverse primer 1	0.3 µM	0.15
20 µM Reverse primer 2	0.3 µM	0.15
20 µM Reverse primer 3	0.3 µM	0.15
DNA	<1 µg	1
Nuclease free water	-	ปรับปริมาตรให้ได้ 10
	ปริมาตรรวม	10

ตารางที่ 6.2 สารที่ใช้ในการทำ Multiplex PCR ของ STRs

สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (µL)
10x PCR buffer	1x	3
25 mM Magnesium chloride	2.5 mM	1.2
10 mM dNTP Mix	200 µM of each	0.6
250 U HotStarTaq	2.5 U/reaction	0.15
10 µM Forward primer 1	0.3 µM	0.9
10 µM Reverse primer 1	0.3 µM	0.9
10 µM Forward primer 2	0.3 µM	0.9
10 µM Reverse primer 2	0.3 µM	0.9
10 µM Forward primer 3	0.3 µM	0.9
10 µM Reverse primer 3	0.3 µM	0.9
DNA	<1 µg	1
Nuclease free water	-	ปรับปริมาตรให้ได้ 30
	ปริมาตรรวม	30

ตารางที่ 6.3 ปริมาณดีเอ็นเอที่วัดได้

ยุงตัวที่	เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณดีเอ็นเอ (ng/µL)	A_{260}/A_{280}
1	0	45.2	2.07
2	0	37.1	2.14
3	0	27	2.37
4	0	36.8	2.13
5	0	5.4	2.32
6	0	15.6	2.22
7	12	70.5	2.20
8	12	52.8	2.20
9	12	24.2	2.31
10	12	66.1	2.22

ยุงตัวที่	เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณดีเอ็นเอ (ng/μL)	A_{260}/A_{280}
11	24	58.6	2.11
12	24	37.1	2.09
13	24	51.8	2.10
14	24	50.6	2.11
15	24	47.8	2.13
16	24	65.2	2.09
17	36	36.4	2.11
18	36	41.5	2.13
19	36	48.5	2.06
20	36	30.2	2.15
21	36	43.2	2.12
22	36	80.0	2.14
23	48	49.4	2.17
24	48	33.6	2.18
25	48	36.7	2.13
26	48	24.6	2.24
27	48	14.9	2.26
28	48	31.1	2.22
29	60	32.7	2.10
30	60	34.5	2.09
31	60	31.2	2.05
32	60	37.0	2.01
33	60	31.5	2.02
34	60	24.6	2.10
35	72	44.3	2.15
36	72	49.6	1.98
37	72	51.9	2.03

ยุงตัวที่	เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณดีเอ็นเอ (ng/µL)	A_{260}/A_{280}
38	72	32.0	2.06
39	72	23.9	2.05
40	72	51.5	1.98