

การตรวจสอบสารพันธุกรรมเพื่องานนิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่า

Forensic DNA Wildlife

นางเกียรติศิริ คันธวิวัฒน์, นางสาวอรุณญา กริธาชาติ, นางสาวประภาพร ไชประภา, นายธัญญพงศ์ อินทรสอน, นางสาวธนัสสรณ์ พงษ์สุวรรณ
กลุ่มตรวจพิสูจน์สารพันธุกรรมบุคคลสูญหายและโครงการเฉพาะ กองสารพันธุกรรม

บทนำ

เนื่องด้วยสถานการณ์การลักลอบล่า และค้าขายชิ้นส่วนของสัตว์ป่าในประเทศไทยมีความรุนแรงเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ประชากรสัตว์ป่าได้รับผลกระทบต่อการดำรงชีวิต การลักลอบล่าสัตว์ป่านั้นโดยส่วนมากจะลักลอบกระทำเป็นขบวนการเครือข่ายทั้งในระดับประเทศและระหว่างประเทศ ตามที่มีการนำเสนอข่าวในสื่อรูปแบบต่างๆหลากหลายช่องทาง โดยเนื้อหาที่ปรากฏในข่าวจะแสดงถึงการจับกุมเพื่อยึดของกลาง อาทิ สัตว์ป่าของกลาง ซากสัตว์ป่าของกลาง การลักลอบล่าและค้าขายชิ้นส่วนของสัตว์นั้นมาจากความเชื่อ ค่านิยมของกลุ่มคนบางกลุ่มที่นิยมบริโภคเนื้อ ผลิตภัณฑ์จากสัตว์ป่าเป็นอาหาร ยา เครื่องนุ่งห่ม เครื่องประดับ ของตกแต่งและรวมถึงการสะสมเพื่อเป็นสัตว์เลี้ยง โดยสัตว์ป่าที่เป็นที่นิยมทางการค้าเนื่องจากมีมูลค่าสูง ได้แก่ สัตว์ในกลุ่มเสือ ได้แก่ เสือด่า เสือจาวัว และสิงโต ส่งผลให้ประชากรของสัตว์ในกลุ่มเสือของประเทศไทยลดจำนวนลงอย่างต่อเนื่อง

เพื่อให้เกิดการร่วมกันตระหนักถึงการอนุรักษ์ การคุ้มครองสัตว์ป่า และบำรุงรักษาเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า และเขตห้ามล่าสัตว์ป่า จึงได้มีการออกกฎหมายและปรับปรุงพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2562 เพื่อให้สอดคล้องกับกระบวนการกระทำความผิดของอาชญากรรมสัตว์ป่า และการลักลอบค้าสัตว์ป่าที่ผิดกฎหมาย ภายหลังจากจับกุม ตรวจยึด สัตว์ป่าของกลางและซากสัตว์ป่าของกลาง การดำเนินการภายใต้กระบวนการยุติธรรมนั้น จะต้องอาศัยกระบวนการทางนิติวิทยาศาสตร์เพื่อระบุชนิดพันธุ์ และที่มาของสัตว์ป่า ที่จะเป็นประโยชน์ต่อการสืบสวนสอบสวนและพิจารณาคดีด้านการลักลอบค้าสัตว์ป่าและอาชญากรรมสัตว์ป่าที่ผิดกฎหมาย โดยใช้เทคโนโลยีการตรวจสอบสารพันธุกรรมเพื่อระบุชนิดพันธุ์ (Species Identification) การตรวจพิสูจน์สารพันธุกรรมเพื่อระบุตัว (Individual Identification) และการตรวจพิสูจน์สารพันธุกรรมเพื่อหาความสัมพันธ์ความเป็น พ่อ แม่ ลูก (Parental testing) ของสัตว์ในกลุ่มเสือ และสามารถนำรูปแบบสารพันธุกรรมของสัตว์ป่าจัดเก็บเป็นฐานข้อมูลเพื่อประโยชน์ในอนาคต ตัวอย่างซากสัตว์ที่เก็บได้จากสถานที่เกิดเหตุสามารถใช้เป็นหลักฐานในการตรวจพิสูจน์พ่อแม่เพื่อใช้ในการระบุตัวสัตว์ ในกรณีล่าสัตว์ผิดกฎหมายได้ แต่ในปัจจุบันกระบวนการตรวจพิสูจน์ยังคงขาดเครื่องหมายดีเอ็นเอในการตรวจสอบทางพันธุกรรมในวงศ์เสือ การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอของสัตว์ในตระกูลแมวจึงเป็นทางเลือกเพื่อค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ เพื่อตรวจเอกลักษณ์เฉพาะตัวในการตรวจพิสูจน์พ่อแม่ลูก สัตว์ป่าในวงศ์เสือและแมว (Felidae) ประกอบด้วยสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมประเภท เสือ สิงโต ลิงซ์ และแมวทั่วโลก 37 ชนิด (Nowak,1991) การลักลอบค้าสัตว์ป่าในตระกูลวงศ์เสือ มีวัตถุประสงค์เพื่อนำชิ้นส่วนของร่างกาย เช่น เนื้อเยื่อ กระดูก หนัง เลือด และอวัยวะเพศ ใช้เป็นส่วนประกอบทางยาที่พบทั้งใน

แพทย์แผนไทยและแพทย์แผนจีน ที่เป็นผลมาจากความเชื่อเฉพาะกลุ่มคนที่ใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพของยา และการนำชิ้นส่วนของสัตว์เข้าสู่กระบวนการตรวจทางนิติวิทยาศาสตร์ มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจพิสูจน์หลักฐานในสถานที่เกิดเหตุ เพื่อเชื่อมโยงกับผู้กระทำความผิดในขั้นตอนของกระบวนการยุติธรรมเพื่อเป็นกลไกหนึ่งในการขับเคลื่อนยุทธศาสตร์กระทรวงยุติธรรม ระยะ 20 ปี พ.ศ. 2560 – 2579 และป้องกันปราบปรามอาชญากรรม

พื ๕ ศ ๒

ให้เกิดผลอย่างเป็นรูปธรรมสถาบันนิติวิทยาศาสตร์จึงเข้าร่วมลงนามบันทึกข้อตกลงความร่วมมือทางวิชาการด้านนิติวิทยาศาสตร์และการปฏิบัติงานเพื่อการสืบสวน การป้องกัน การปราบปรามการกระทำความผิดเกี่ยวกับคดีว่าด้วยการป่าไม้ระหว่างกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้จะต้องมีความจำเพาะเจาะจงต่อชนิดสัตว์ หรือสัตว์ที่อยู่ในตระกูลเดียวกัน เมื่อตำแหน่งของดีเอ็นเอที่ใช้ในการตรวจสอบมีจำนวนตำแหน่งเพิ่มขึ้น เป็นผลทำให้รูปแบบของดีเอ็นเอที่ใช้ในการตรวจมีความหลากหลายเพิ่มขึ้นเช่นกัน ทำให้สามารถนำมาตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์เฉพาะตัว และตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายโลหิตของสัตว์ในตระกูลวงศ์เสือได้ และเพื่อใช้เป็นประโยชน์ในการพิจารณาคดี และถือเป็นเครื่องมือที่ใช้แก้ปัญหาอาชญากรรมสัตว์ป่า และช่วยอนุรักษ์ทรัพยากรสัตว์ป่าในประเทศไทยอย่างยั่งยืนต่อไป

การตรวจพิสูจน์ทางนิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่าในประเทศไทย

การจัดเก็บตัวอย่างจากเลือด ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อหรือซาก เพื่อใช้เป็นหลักฐานในการตรวจพิสูจน์ จำเป็นต้องใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอจากสัตว์เลี้ยง เนื่องจากขาดเครื่องหมายในการระบุสารพันธุกรรมวงศ์ (Family) เสือ สัตว์ในวงศ์เสือและแมว (Felidae)

มาตรฐานการตรวจพิสูจน์ที่เกี่ยวข้อง

1. ANSI/ASB Standard 048, First Edition 2019: Wildlife Forensic DNA Standard Procedures (ANSI Approved May 2019)
2. Quality assurance standard for forensic DNA testing laboratories; Federal Bureau of Investigation. 2011.
3. SWGWILD Standards and Guidelines. Scientific Working Group on Wildlife. 2012

การตรวจพิสูจน์ในห้องปฏิบัติการ

การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ทำการจัดเก็บเพื่อส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการจัดเก็บในรูปแบบของเลือด ภายในหลอดเลือด มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด EDTA ที่เก็บจากเสือโคร่ง และมีประวัติเป็นกรณีตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ พ่อ แม่ และลูก

กระบวนการดำเนินงาน

1. ตัวอย่างเลือดที่ได้นำมาสกัดดีเอ็นเอ ตามวิธีมาตรฐาน QIAamp® DNA Investigator kit และทำการตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยใช้ UV spectrophotometer, Nanodrop (Thermo Scientific, USA) และปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป็น 50 ng/μL ด้วยสารละลาย Tris-EDTA buffer เก็บตัวอย่างไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

2. คัดเลือกตัวอย่างเพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction จำนวน 35 เครื่องหมาย ได้แก่ FCA726, FCA733, FCA739, FCA747, FCA045, FCA077, FCA008, FCA096, FCA441, FCA124, F53, FCA391, FCA453, F146, F042, F27, F85, F115, F 98, F37, F164, F49, F41, FCA665, FCA126, FCA132, FCA031, FCA035, FCA105, F124, FCA723, Zn-finger, FCA075, FCA149, FCA678 ทำการคัดเลือกดีเอ็นเอ จะทำการเลือกชิ้นส่วนของขนาดของความยาวชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ในช่วง 120-300 bp

Master Mix ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

Reagents	Volume (1X)
MM 2X	6.25
Primer Mix (เส้นละ 0.25)	0.50
Q-sol	1.25
Water	4
DNA Template	1
Total	13

Condition PCR

Process Stage	Temperature	Time	Cycle
Initial Denaturation	95	5 min	1
Denaturation	95	30 sec	} 28
Annealing	47.5-59	1.30 sec	
Extension	72	30 sec	
Final Extension	60	30 min	1

Capillary Electrophoresis ***Dilute PCR Product 1:20

Hi-Di & Liz Gene Scan™ 600 LIZ Size Standard

Reagent	Volume (1X)
Hi-Di	9.2
Liz 600	0.4
Total	9.6

การวิเคราะห์และแปลผล

จากการตรวจพิสูจน์และวิเคราะห์รูปแบบสารพันธุกรรม จะทำการอ่านผลขนาดของอัลลีล (base pairs) ในตำแหน่งสารพันธุกรรม ดังนี้ F41, FCA052, FCA 126, FCA201, FCA220, FCA229, FCA279, FCA304, FCA391, FCA453, FCA672, Pati01 และ Pati15 ทำการเปรียบเทียบลักษณะเฉพาะตัวภายในครอบครัวของเชื้อที่มีประวัติความสัมพันธ์ทางสายโลหิตต่อไป

ผลรายงานที่ออก

ทางห้องปฏิบัติการกองสารพันธุกรรมได้รายงานผลการตรวจพิสูจน์สารพันธุกรรมเพื่อหาความสัมพันธ์ความเป็นพ่อแม่ลูก (Parental testing) ของสัตว์ในกลุ่มเสือโดยมีรายงานตั้งแต่ปี 2556-2565 ทั้งหมด 6 รายงาน 19 ตัวอย่าง โดยที่ ปี 2556 มี 1 รายงานตรวจหาความสัมพันธ์พ่อแม่ลูกเสือโคร่ง 3 ตัวอย่าง ปี 2563 มี 2 รายงาน ตรวจหาความสัมพันธ์พ่อแม่ลูกเสือโคร่ง 10 ตัวอย่าง ปี 2565 มี 2 รายงาน ตรวจหาความสัมพันธ์พ่อแม่ลูกเสือด้า 6 ตัวอย่าง

เอกสารอ้างอิง

Gaur, A. and P. A. Reddy. 2017. DNA Technique in Wildlife Forensic (Animals): Standard Operating Procedures (SOP). CSIR Centre for Cellular and Molecular Biology, Hyderabad, 37 p

กรรณชพรณ อุบลรัตน์, สุดธิชา เหล่าเปี่ยม. การประยุกต์ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ของแมวในทางนิติวิทยาศาสตร์เพื่อตรวจพิสูจน์พ่อแม่และเอกลักษณ์เฉพาะตัวในแมวบ้าน เสือโคร่ง และเสือด้า 2562; 2: 69-87

ฐิติกา กิจพิพิธ, ภูวดล ณะเกียรติไกร. การตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอเพื่อระบุชนิดของสัตว์ป่าในงาน
นิติวิทยาศาสตร์. วารสารวิชาการพระจอมเจ้าพระนครเหนือ 2556; 3:727-740.

ผู้จัดทำ

นางเกียรติศิริ คันธวิวิธน์, นางสาวอรัญญา กรีธาชาติ, นางสาวประภาพร ไช้ประภาย,
นายธัญญ์พงศ์ อินทรสอน, นางสาวธนัสสรณ์ พงษ์สุวรรณ