

การวัดปริมาณดีเอ็นเอจากเลือดของมนุษย์ที่ได้จากยุงด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์

Quantification of Human DNA from Mosquito Blood Meals

by Real-Time PCR Technique

ภัสรา ควรเนตร* ธิติ มหาเจริญ และปฐมวดี ญาณทศนียจิต
คณะนิติวิทยาศาสตร์ โรงเรียนนายร้อยตำรวจ

Phatsara Khuannet* Thiti Mahacharoen and Pattamawadee Yanatatsaneejit
Faculty of Forensic Science, Royal Police Cadet Academy, Department of Botany,
Faculty of Science, Chulalongkorn University

Received: April 24, 2022

Revised: June 23, 2022

Accepted: June 27, 2022

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ และคุณภาพดีเอ็นเอที่คงอยู่ที่ได้จากยุงด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์เมื่อเวลาผ่านไปในแต่ละช่วงเวลานับตั้งแต่เวลาที่ยุงกินเลือดโดยแบ่งเป็น 4 ช่วงเวลา คือ 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เป็นการวิจัยเชิงทดลองโดยใช้เครื่อง QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System ด้วยไพรเมอร์ CADM1 จำนวน 3 ขนาด ได้แก่ 123, 229 และ 397 คู่เบส กลุ่มตัวอย่างในการทดลอง คือ ยุงลายบ้าน (*Aedes Aegypti*) ยุงลายสวน (*Aedes Albopictus*) และยุงรำคาญ (*Culex Quinguefasciatus*) และใช้สถิติการทดสอบ General Linear Model ผลการวิจัย พบว่า 1) ช่วงเวลาที่แตกต่างกันจะทำให้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้จากยุงทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ ยุงลายบ้าน ยุงลายสวน และยุงรำคาญ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($F = 13.906$, $p \text{ value} = 0.000$) 2) ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้จากยุงทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ ยุงลายบ้าน ยุงลายสวน และยุงรำคาญ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($F = 4.623$, $p \text{ value} = 0.018$) และ 3) ผลการวิเคราะห์คุณภาพของดีเอ็นเอที่คงอยู่ พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนได้ทุกไพรเมอร์ในทุกช่วงเวลา สรุปได้ว่าเมื่อช่วงเวลาผ่านไปส่งผลให้ปริมาณดีเอ็นเอที่คงอยู่ลดลง และสายพันธุ์ของยุงส่งผลต่อปริมาณดีเอ็นเอที่คงอยู่ต่างกัน และดีเอ็นเอที่ได้มีคุณภาพสามารถนำไปตรวจในงานนิติวิทยาศาสตร์ต่อไปได้ ทำให้สามารถนำมาใช้เป็นหลักฐานเชื่อมโยงไปสู่ผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับสถานที่เกิดเหตุได้ เป็นการตรึงข้อสงสัยให้เคลิบเคลิ้ม ส่งผลให้กระบวนการยุติธรรมทั้งระบบดำเนินการไปด้วยความรวดเร็ว ถูกต้อง และน่าเชื่อถือ อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มขีดความสามารถในการตรวจพิสูจน์หลักฐานอีกด้วย

คำสำคัญ: ยุง ดีเอ็นเอ เรียลไทม์พีซีอาร์

Abstract

This research aimed to estimate the time; 0, 24, 48 and 72 hours that elapsed since feeding from the degree of human DNA digestion in mosquitoes blood meal by Real-Time PCR technique. The experimental research was performed using QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System to quantitate the blood's human DNA by primers CADM1 (123, 229 and 397 bp). Samples in the experiment were *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinguefasciatus*. The statistical analysis and hypotheses testing were conducted with General Linear Model. The results showed that 1) The DNA concentrations of three mosquito species at different time after feeding were significantly different at the statistical significance level of 0.05 ($F = 13.906$, $p \text{ value} = 0.000$) 2) The DNA concentrations of three mosquito species were also significantly different at the statistical significance level of 0.05 ($F = 4.623$, $p \text{ value} = 0.018$). 3) The analysis of the quality of remaining DNA revealed that it can increase in any period of time. In conclusion, the amounts of DNA decreased gradually over time and the mosquito species had different remaining DNA. The acquired DNA had quality enough for further forensic examination. It can track down persons who were related to crime scene and limit of the number of suspects resulting in judicial process rapidly, correctly and reliably. Besides, it can be effective evidence for analysis.

Keywords: Mosquito, DNA, Real-Time PCR

บทนำ

เมื่อมีการกระทำความผิดเกิดขึ้นไม่ว่าจะเป็นคดีเกี่ยวกับทรัพย์สิน ชีวิต และร่างกาย ความมั่นคง หรือคดีเกี่ยวกับเพศ เป็นต้น ย่อมมีวัตถุพยานที่จะสามารถเชื่อมโยงผู้กระทำความผิด หรือผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องในคดีจากสถานที่เกิดเหตุเสมอ (NFSTC, 2013) เช่น ในคดีข่มขืนกระทำชำเรา ผู้ต้องหาเพศชายอาจมีเซลล์เยื่อบุอวัยวะเพศของผู้เสียหายติดอยู่ หรือในช่องคลอดของผู้เสียหายอาจมีคราบอสุจิ หรือเซลล์เยื่อบุอวัยวะเพศของผู้กระทำความผิดหลงเหลืออยู่ ซึ่งสามารถตรวจหาสารพันธุกรรม หรือดีเอ็นเอ เพื่อระบุยืนยันตัวบุคคลได้ หรือในคดีฆาตกรรมที่เกิดขึ้นในพื้นที่จังหวัดพระนครศรีอยุธยา พบศพผู้หญิงลอยน้ำอยู่ในคลอง บริเวณสถานที่เกิดเหตุใกล้กับจุดที่พบศพ พบวัตถุพยานหลายชิ้น หนึ่งในนั้น คือ หน้ากากอนามัย โดยนำผลตรวจดีเอ็นเอของหน้ากากอนามัยตรวจเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอของผู้ต้องสงสัย พบว่า มีรูปแบบดีเอ็นเอตรงกัน ทำให้สามารถจับตัวผู้กระทำความผิดมาลงโทษตามกฎหมายได้ (Thairath, 2021) ซึ่งเป็นไปตามหลักการแลกเปลี่ยนของวัตถุพยานตามกฎหมายของโลคาร์ด (Locard's Principle) โดย ดร. เอ็ดมันด์ โลคาร์ด กล่าวไว้ว่า “ทุก ๆ การสัมผัสจะมีการทิ้งร่องรอย (Every Contact Leaves a Trace)” (Phohab, 2022) ดังนั้น จะเห็นได้ว่าวัตถุพยานทางนิติวิทยาศาสตร์มีความสำคัญมาก เพราะเป็นหลักฐานที่ได้มาจากการวิเคราะห์ตามหลักวิชาการทางวิทยาศาสตร์ทำให้เป็นหลักฐานที่มีน้ำหนัก มีความน่าเชื่อถือ ได้รับการยอมรับในวงกว้าง และยังสามารถนำ

มาใช้ประโยชน์อย่างมากในกระบวนการสืบสวนสอบสวน เพื่อยืนยันตัวบุคคลผู้กระทำผิดกฎหมาย เพื่อนำไปสู่การชี้ตัวผู้กระทำผิด (Benjakul, 2007)

คดีอาชญากรรมที่เกิดขึ้น สามารถตรวจพิสูจน์วัตถุพยานได้หลากหลายรูปแบบ แม้กระทั่งการตรวจจากสิ่งมีชีวิตที่ใกล้ชิดกับมนุษย์มาก และสามารถพบได้บ่อยครั้งในชีวิตประจำวัน นั่นคือ ยุง (Mosquitoes) ยุงเป็นแมลงที่อยู่ในอันดับ Diptera วงศ์ Culicidae ซึ่งมีประมาณ 3,600 สปีชีส์ ส่วนใหญ่จะพบมากในเขตร้อนหรือเขตอบอุ่น โดยทั่วไปยุงจะกินน้ำหวานจากเกสรดอกไม้เป็นอาหาร แต่มียุงเพศเมียบางสายพันธุ์กินเลือดสัตว์ รวมไปถึงเลือดมนุษย์ เพื่อนำเอาโปรตีน และแร่ธาตุไปใช้สำหรับการเจริญเติบโตของไข่ในรังไข่ (ChemIn, 2022) เลือดที่ได้จากยุงสามารถนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ในการพิสูจน์หลักฐานได้ โดยปัจจุบันมีการตรวจดีเอ็นเอของผู้ต้องสงสัยที่มาจากเลือดของมนุษย์ในยุง เพื่อพิสูจน์ว่าผู้ต้องสงสัยมีส่วนเกี่ยวข้องกับสถานที่เกิดเหตุหรือไม่ เช่น คดีที่เกิดขึ้นในเดือนมิถุนายน ค.ศ. 2008 เมืองเฮลซิงกิ ประเทศฟินแลนด์ มีคดีขโมยรถเกิดขึ้น คนร้ายไม่ทิ้งวัตถุพยานใด ๆ ไว้ มีแต่เพียงยุงที่อยู่ในรถที่ถูกขโมยมา ตำรวจจึงนำยุงนั้นส่งไปที่ห้องปฏิบัติการนิติวิทยาศาสตร์เพื่อตรวจหาดีเอ็นเอของมนุษย์จากเลือดที่อยู่ภายในตัวยุง ซึ่งให้ผลการตรวจดีเอ็นเอออกมาตรงกับรูปแบบดีเอ็นเอของผู้ต้องหา (BCC NEWS, 2008) และคดีฆาตกรรมชายข้ามเพศที่เสียชีวิตบริเวณชายหาด แคว้นปกครองตนเองซิลี ประเทศอิตาลี ซึ่งมีผู้ต้องสงสัยเป็นนักธุรกิจ ตำรวจได้เข้าไปหาวัตถุพยานในบ้านของผู้ต้องสงสัย เพื่อนำมาตรวจดีเอ็นเอ แต่ไม่พบหลักฐานทางชีววิทยาใด ๆ มีเพียงแต่รอยเลือดที่กำพวดซึ่งเกิดจากการตบยุงเอาไว้ ตำรวจจึงเก็บเลือดจากรอยตบยุงจากสถานที่เกิดเหตุมาเปรียบเทียบกับรูปแบบดีเอ็นเอของผู้ต้องสงสัย พบว่า มีรูปแบบดีเอ็นเอตรงกันทำให้สามารถจับกุมผู้ต้องหาได้ในที่สุด (Spitaleri et al., 2006)

จากที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ยุงจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่นักนิติวิทยาศาสตร์ หรือเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในกระบวนการยุติธรรมได้ ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาการคงอยู่ของปริมาณ และคุณภาพดีเอ็นเอ ของมนุษย์ที่ได้จากยุง 3 สายพันธุ์ที่พบมากในประเทศไทย คือ ยุงลายบ้าน (*Aedes Aegypti*) ยุงลายสวน (*Aedes Albopictus*) และยุงรำคาญ (*Culex Quinguefasciatus*) ด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์กับไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน CADM1 ซึ่งเป็นยีนที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเท่านั้น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาปริมาณ และคุณภาพของดีเอ็นเอจากเลือดมนุษย์ที่คงอยู่ที่ได้จากยุง 3 สายพันธุ์ คือ ยุงลายบ้าน (*A. Aegypti*) ยุงลายสวน (*A. Albopictus*) และยุงรำคาญ (*C. Quinguefasciatus*) ที่ช่วงเวลาต่างกันคือ 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง
2. เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณดีเอ็นเอจากเลือดมนุษย์ที่คงอยู่ที่ได้จากยุงทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ ยุงลายบ้าน (*A. Aegypti*) ยุงลายสวน (*A. Albopictus*) และยุงรำคาญ (*C. Quinguefasciatus*)

แนวคิดทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

1. แนวคิด และทฤษฎีเกี่ยวกับยุง (Mosquito) ในโลกมีมากกว่า 4,000 ชนิด จัดอยู่ในอันดับ Diptera วงศ์ Culicidac ยุงที่พบมากในประเทศไทย คือ ยุงลายบ้าน (*A. Aegypti*) ยุงลายสวน (*A. Albopictus*) และ

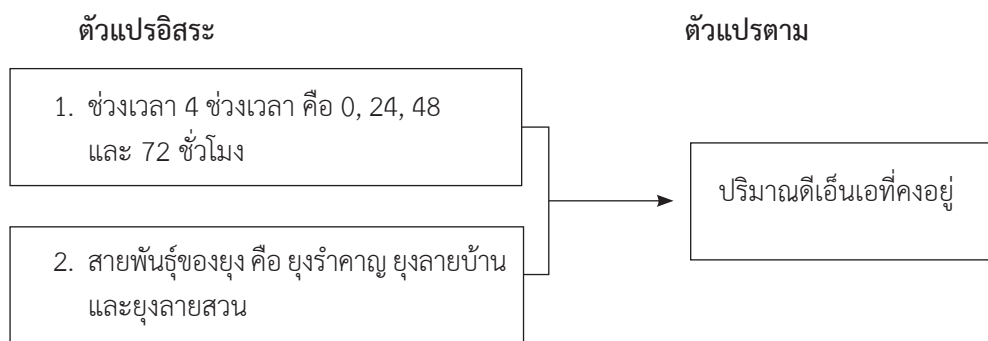
ยุงรำคาญ (*C. Quinguefasciatus*) ยุงตัวเต็มวัยทั้งตัวผู้ และตัวเมียกินน้ำหวานจากเกสรดอกไม้ก็สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ แต่ส่วนใหญ่ยุงตัวเมียยังต้องการโปรตีนจากเลือดมนุษย์หรือสัตว์ เพื่อช่วยในการเจริญเติบโตของไข่ อีกทั้งจะเกิดการย่อยเลือด เพื่อให้ได้พลังงานสำหรับการดำเนินชีวิต ซึ่งยุงแต่ละสายพันธุ์มีพฤติกรรมหลังจากกินเลือดที่แตกต่างกัน (Hiroshige et al., 2017) จึงอาจส่งผลให้เลือดที่คงเหลืออยู่ในยุงแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกัน ยุงแต่ละสายพันธุ์ชอบกินเลือดต่างกัน สายพันธุ์ที่กินเลือดสัตว์ เรียกว่า Zoophilic ส่วนสายพันธุ์ที่กินเลือดมนุษย์ เรียกว่า Anthropophilic เลือดจะเข้าไปช่วยในการเจริญเติบโตของไข่ การเจริญเติบโตของไข่แบบที่ต้องการโปรตีนจากเลือด เรียกว่า Anautogeny มียุงไม่กี่ชนิดที่ไข่สุกได้ โดยใช้อาหารที่สะสมไว้โดยไม่ต้องกินเลือด เรียก Autogeny เช่น ยุง *Aedes Togoi* และ *Culex Molestus* เป็นต้น ยุงมีการเจริญแบบสมบูรณ์ (Complete Metamorphosis หรือ Holometabola) หมายถึง การเจริญเติบโตที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างในแต่ละระยะแตกต่างกันมาก แบ่งเป็น 4 ระยะ คือระยะไข่ (Egg) ระยะลูกน้ำ (Larva) ระยะตัวโม่ง (Pupa) และระยะตัวเต็มวัย (Adult) ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 3 ส่วน ได้แก่ ส่วนหัว (Head) ส่วนอก (Thorax) และส่วนท้อง (Abdomen) (Chemlin, 2022) โดยยุงที่ใช้ในการศึกษารั้วนี้เป็นยุงเพศเมีย 3 สายพันธุ์ ที่พบได้มากในประเทศไทย ได้แก่ ยุงลายบ้าน (*A. Aegypti*), ยุงลายสวน (*A. Albopictusi*) และยุงรำคาญ (*C. Quinguefasciatus*) ซึ่งยุงแต่ละสายพันธุ์นี้มีพฤติกรรมดำรงชีวิตแตกต่างกัน เช่น พฤติกรรมการกินเลือดของยุงแต่ละสายพันธุ์ที่มีความแตกต่างกันไป (Charoensiri, 2014) เมื่อคำนวณปริมาณเลือดที่ยุงกินโดยใช้สารรังสีไอโซโทป Cerium ใส่ปนไปในอาหารของยุง พบว่า ยุงลายบ้าน (*A. Aegypti*) กินเลือดได้ค่าเฉลี่ย 4.2 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ซึ่งน้อยกว่ายุงรำคาญ (*Culex Quinguefasciatus*) ที่กินเลือดได้ 10.2 ลูกบาศก์มิลลิเมตร หรือความสามารถในการบินของยุงลายบ้าน (*A. Aegypti*) บินได้ 90 เมตร ส่วนยุงรำคาญ (*C. Quinguefasciatus*) บินได้ไกลกว่าเล็กน้อย เป็นต้น (Nurach, 2001) ส่วนรูปแบบการกินเลือดของยุงลายบ้านกับยุงลายสวน พบว่า ยุงลายสวนมีความถี่ในการกินเลือดมนุษย์มากกว่ายุงลายบ้าน (Ponlawat and Harrington, 2005) เป็นต้น

2. แนวคิด และทฤษฎีเกี่ยวกับเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ (Real-Time PCR) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาอย่างจำเพาะ และสามารถติดตามวัดปริมาณการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอเป้าหมายได้ในทุก ๆ รอบของการเพิ่มจำนวนในขณะที่ปฏิกิริยากำลังดำเนินอยู่ ตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งสิ้นสุดปฏิกิริยา เทคนิคนี้ทำได้โดยอาศัยการตรวจวัดสัญญาณแสงเรืองแสงที่ถูกปล่อยออกมา ปริมาณแสงที่วัดได้จะเป็นสัดส่วน โดยตรงกับปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นจากปฏิกิริยาในแต่ละรอบ โดยทั่วไปดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นจากการทำปฏิกิริยาถูกโซฟอลิเมอเรส หรือ PCR (Polymerase Chain Reaction) ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการ โดยงานวิจัยนี้จะใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน CADM1 จำนวน 3 คู่ จากขนาดเล็กไปใหญ่ และอยู่บริเวณเดียวกัน เพื่อคุณภาพ และการเสถียรภาพของดีเอ็นเอ ซึ่งยีนดังกล่าวเป็นยีนที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเท่านั้น จึงไม่มีการแสดงออกของยีนในยุงสายพันธุ์ใด ๆ โดยที่ยีน CADM1 ทำหน้าที่เหมือนเป็น Tumor Suppressor ในเซลล์ Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC) (Boles et al., 2005) ได้เป็นกราฟที่มีลักษณะเป็นรูปตัว S (Exponential Curve) โดยแกนตั้ง (Y) แสดงสัญญาณการเรืองแสง (Normalized Fluorescence) และแกนนอน (X) แสดงจำนวนรอบของการเพิ่มจำนวน (Cycle Number) กราฟปฏิกิริยาเรียลไทม์พีซีอาร์ ประกอบไปด้วย 3 ส่วน คือ 1) Exponential Phase เป็นช่วงที่มีการเพิ่ม

ปริมาณดีเอ็นเอแบบทวีคูณ การตรวจวัดผลผลิต PCR ในเวลาที่เกิดขึ้นจะทำเฉพาะในช่วงนี้เท่านั้น ซึ่งเป็นช่วงที่ระดับสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงเหนือระดับสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ใช้เป็นค่าต่ำสุดในการตรวจวัดสารฟลูออเรสเซนซ์ (Threshold) 2) Linear Phase เป็นช่วงที่ถัดมาจากช่วง Exponential Phase ในช่วงนี้จะเกิดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลดลง เนื่องจากมีส่วนประกอบสำหรับปฏิกิริยาลดลง เช่น ไพรมเมอร์ (Primers) และไดออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (Deoxynucleotide Triphosphate, dNTP) 3) Plateau Phase เป็นช่วงที่ระดับสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์คงที่ ไม่มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณดีเอ็นเอเนื่องจากสารต่าง ๆ ที่จำเป็นในปฏิกิริยาหมดไป เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์ในแต่ละรอบของปฏิกิริยาจะมีการสะสมสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ เกินระดับ Threshold ทำให้เกิดจุดตัดกันของเส้นกราฟของปฏิกิริยานั้นกับระดับ Threshold ได้เป็นค่า Ct ซึ่งจะมีความสัมพันธ์กับค่าความเข้มข้น โดยตัวอย่างที่มีปริมาณดีเอ็นเอน้อยจะมีค่า Ct มาก แต่ตัวอย่างที่มีปริมาณดีเอ็นเอมากจะมีค่า Ct น้อย (Applied Biosystems, 2008) ส่วนปฏิกิริยาที่ไม่มีปริมาณของดีเอ็นเอ เช่น ตัวควบคุมชนิดลบ (Negative Control) ก็จะไม่ปรากฏระดับสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ขึ้นมาเหนือระดับ Threshold (Butler, J.M. 2011) ค่า Ct ที่ได้จากปฏิกิริยาเรียลไทม์พีซีอาร์เป็นค่าที่ทำให้ทราบปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอได้ โดยนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่สร้างด้วยสารดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นอย่างน้อย 5 ความเข้มข้น แล้วนำค่า Ct ที่ได้นี้ไปสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่า Ct กับความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่เป็น Log Scale ได้เป็นกราฟเส้นตรงที่มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มปริมาณในช่วง Exponential Phase จากนั้นสามารถนำดีเอ็นเอที่ต้องการหาความเข้มข้นมาเทียบกับกราฟมาตรฐานดังกล่าว แล้วคำนวณด้วยสูตรสมการเส้นตรง $y = mx + b$ เมื่อ y คือ ค่า Ct, m คือ ค่าความชัน (Slope), x คือ Log [ปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)] และ b คือ ค่า y Intercept เมื่อย้ายข้างสมการจะได้เป็นปริมาณความเข้มข้นดีเอ็นเอ (ng/ μ l) เท่ากับ $10^{[y-b]/m}$ (Taneyhill and Adams, 2008)

กรอบแนวคิดในการวิจัย

ผู้วิจัยได้กำหนดกรอบแนวคิดในการวิจัยให้สอดคล้องกับสมมติฐานในการวิจัย โดยกำหนดตัวแปรอิสระและตัวแปรตาม แสดงดังภาพที่ 1 โดยสถิติที่ใช้ในการทดสอบ คือ สถิติการทดสอบ General Linear Model ทั้งนี้ ระยะเวลาตามตัวแปรที่ศึกษา จากการศึกษาก่อนหน้าของ Hiroshige et al., (2017) ได้ทำวิจัยเรื่อง การตรวจรูปแบบดีเอ็นเอของมนุษย์จากเลือดในถุง ตั้งแต่ช่วงเวลา 0-72 ชั่วโมง พบว่า ช่วงเวลาก่อน 48 ชั่วโมง รูปแบบดีเอ็นเอที่ได้มีความสมบูรณ์ สามารถนำมาตรวจเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอบุคคลอื่นได้ แต่หลังจากช่วงเวลา 48 ชั่วโมง รูปแบบดีเอ็นเอที่ตรวจได้มีจำนวนลดลง ทำให้ยากต่อการตรวจเปรียบเทียบดีเอ็นเอ ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ช่วงเวลาดำสุดที่ 0 ชั่วโมง และสูงสุดที่ 72 ชั่วโมง โดยแบ่งออกเป็น 4 ช่วงเวลา ได้แก่ 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง



ภาพที่ 1 กรอบแนวคิดในการวิจัย

สมมติฐานการวิจัย

1. ช่วงเวลาที่แตกต่างกันส่งผลให้ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากยุงทั้ง 3 สายพันธุ์ มีความแตกต่างกัน
2. ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากยุงแต่ละสายพันธุ์ มีความแตกต่างกัน

ระเบียบวิธีวิจัย

การวิจัยนี้ศึกษาเชิงทดลอง (Experimental Research) โดยใช้สถิติการทดสอบ General Linear Model มีขั้นตอนการดำเนินการวิจัย ดังนี้

1. เก็บตัวอย่างเลือดจากผู้วิจัย ซึ่งเป็นผู้ที่ไม่มีโรคภัยเรื้อรัง เช่น โรคหัวใจ โรคเบาหวาน หรือโรคเอดส์ เป็นต้น ปริมาณ 30 มิลลิลิตร โดยผู้มีใบประกอบวิชาชีพเทคนิคการแพทย์ ตามพระราชบัญญัติวิชาชีพเทคนิคการแพทย์ ณ ห้องปฏิบัติการ 306 อาคารพิษวิทยา ศณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลือดจะถูกเก็บในหลอดสำหรับเก็บเลือดที่เคลือบด้วยสาร EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid) เพื่อป้องกันเลือดแข็งตัว (Blood Collection Tube, With EDTA, VACUETTE, UK) จากนั้นนำสีกัดดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยา สกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป QIAamp DNA Micro Kit (QIAGEN, 2010) โดยในขั้นตอนสุดท้ายเติมสารละลาย บัฟเฟอร์ AE ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เพื่อชะตัวอย่างดีเอ็นเอออกจากเลือด เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และนำมาตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม แบบนาโน ในหน่วยนาโนกรัมต่อไมโครลิตร เพื่อนำมาใช้สำหรับทำกราฟมาตรฐาน

2. กลุ่มตัวอย่างในการทดลองคือ ยุงตัวเมีย 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ยุงลายบ้าน (*A. aegypti*) ยุงลายสวน (*A. albopictus*) และยุงรำคาญ (*C. quinquefasciatus*) ได้รับจากแหล่งเพาะพันธุ์ยุงของฝ่ายสนับสนุนงาน กิจการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี จำนวนสายพันธุ์ละ 100 ตัว โดยเป็นยุงตัวเต็มวัย (Adult) ที่ไม่มีโรค และไม่เคยดูดเลือด หรือเป็นระยะที่เพิ่งเปลี่ยนมาจากระยะตัวโม่ง (Pupa) มาประมาณ 7 วัน นำมาให้เลือด โดยเลียนแบบพฤติกรรมกรรมการกินเลือดของยุงด้วยการใช้แผ่นอะลูมิเนียมที่ห่อ ด้วยพาราฟิล์มที่ถูกตั้งให้บางที่สุดคล้ายกับผิวหนังมนุษย์ เพื่อให้ยุงสามารถเจาะท่อนอาหารลงบนผิวพาราฟิล์มได้ มีการควบคุมอุณหภูมิของแผ่นอะลูมิเนียมที่ 37 องศาเซลเซียส (Siria et al., 2018) โดยการวางปีกเกอร์ที่เติมน้ำอุ่นลงไปไว้ด้านบนแผ่นอะลูมิเนียม เพื่อให้ใกล้เคียงกับอุณหภูมิร่างกายที่ยุงจะตรวจจับได้ ยุงจะถูกเลี้ยงที่

อุณหภูมิห้องประมาณ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นที่ร้อยละ 60-90 ต่อไป ซึ่งจะใช้ผ้าชุบน้ำบิดหมาด ๆ วางบนกรงเหล็ก และนำกรงเหล็กวางในที่ร่ม (แสง: ความมืด, 12 ชั่วโมง: 12 ชั่วโมง) จากนั้นทำการเก็บตัวอย่าง ยุงแต่ละสายพันธุ์ที่ดูดเลือดแล้ว โดยสังเกตจากเลือดในส่วนท้อง จำนวน 6 ตัวต่อช่วงเวลา นำใส่หลอดเก็บยุง โดยช่วงเวลา 0 คือ เก็บทันทีหลังจากให้เลือด และช่วงเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง คือ เมื่อให้เลือดเสร็จปล่อยยุงไว้ตามเวลาดังกล่าว จะได้ยุงที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด 72 ตัว จากนั้นนำหลอดเก็บยุงไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อเป็นการทำให้ยุงสลบ หลังจากนั้นตัดส่วนท้อง (Abdomen) ของยุงมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยาสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป QIAamp DNA Micro Kit (QIAGEN, 2010) โดยในขั้นตอนสุดท้ายเติมสารละลายบัฟเฟอร์ AE ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เพื่อชะตัวอย่างดีเอ็นเอจากเลือด เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. การวัดปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอมนุษย์ที่คงอยู่ด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์

3.1 ออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) โดยไพรเมอร์จะต้องจำเพาะกับยีน CADM1 จำนวน 3 คู่ จากขนาดเล็กไปใหญ่ และอยู่บริเวณเดียวกัน เพื่อคุณภาพและการเสถียรภาพของดีเอ็นเอ และไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน GAPDH จำนวน 1 คู่ เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่เป็นตัวอย่างควบคุมในปฏิกิริยาเรียลไทม์พีซีอาร์

3.2 วัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ โดยใช้ชุดน้ำยาสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ PowerUp SYBR Green Master Mix ด้วยเครื่อง QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System โดยมีขั้นตอนดังนี้

3.2.1 เตรียมดีเอ็นเอสำหรับทำกราฟมาตรฐาน (Standard Curve) โดยใช้ดีเอ็นเอจากเลือดของผู้วิจัยที่สกัดได้ข้างต้น โดยทำการเจือจางแบบอนุกรม (Serial Dilution) ให้มีความเข้มข้น 5, 0.625, 0.078125, 0.0097, 0.0012 และ 0.0001 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ

3.2.2 นำดีเอ็นเอสำหรับทำกราฟมาตรฐานที่เจือจางเรียบร้อยแล้ว และดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเลือดที่อยู่ในท้องของยุงในแต่ละช่วงเวลามาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบของการเพิ่มปริมาณของยีน CADM1 จำนวน 3 คู่ คู่ละ 1 ตัวอย่าง โดยทำการทดลองเป็น 2 ซ้ำในแต่ละช่วงเวลาในสารละลายปริมาตรสุดท้าย 10 ไมโครลิตร โดยประกอบด้วยชุดน้ำยาสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ PowerUp SYBR Green Master Mix ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, ดีเอ็นเอต้นแบบ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ Forward และ Reverse ของยีน CADM1 จำนวน 3 คู่ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่อง QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System โดยใช้โปรแกรมปรับอุณหภูมิ ดังนี้ แยกสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ออกจากกัน (Denaturation) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ให้ไพรเมอร์มาจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ (Annealing) และสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ (Extension) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวนรอบในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอทั้งหมด 50 รอบ และทำเช่นเดียวกันนี้กับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเลือดของผู้วิจัย โดยเปลี่ยนเป็นไพรเมอร์ของยีน GAPDH จำนวน 1 คู่ เพื่อใช้เป็นตัวอย่างควบคุม

4. การอ่านผลการวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วย Real-Time PCR Software (QuantStudio™ Real-Time PCR Software) โดยประมาณค่าความเข้มข้นของตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้โดยวัดจากกราฟมาตรฐาน ซึ่งเมื่อสร้างกราฟมาตรฐาน จะได้ลักษณะกราฟเป็นเส้นตรง มีรูปแบบสมการเป็นสมการเส้นตรง คือ $y = mx + b$ โดย y คือ ค่า C_t , m คือ ค่าความชัน (Slope), x คือ Log [ปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)]

และ b คือ ค่า y Intercept เมื่อต้องการหาค่าความเข้มข้น ทำการย้ายข้างสมการจะได้เป็น ปริมาณความเข้มข้นดีเอ็นเอ (ng/ μ l) เท่ากับ $10 [(y-b)/m]$ จะได้ค่า Ct และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ในหน่วยนาโนกรัมต่อไมโครลิตร โดยค่า Ct จะมีความสัมพันธ์กับค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอ โดยตัวอย่างที่มีปริมาณดีเอ็นเอน้อยจะมีค่า Ct มาก แต่ตัวอย่างที่มีปริมาณดีเอ็นเอมากจะมีค่า Ct น้อย

5. การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้ในการวิจัย

5.1 วิเคราะห์ช่วงเวลาที่แตกต่างกัน คือ 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง กับความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากเลือดของมนุษย์ที่คงอยู่ที่ได้จากยุงทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยการวิเคราะห์สถิติโดยใช้ General Linear Model

5.2 วิเคราะห์ความแตกต่างความเข้มข้นของดีเอ็นเอมนุษย์ที่คงอยู่ที่ได้จากยุงในแต่ละสายพันธุ์ โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนโดยใช้ General Linear Model

5.3 วิเคราะห์คุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้ เปรียบเทียบจากความสามารถในการเพิ่มจำนวนของไพรเมอร์ยีน CADM1 แต่ละขนาด

ผลการศึกษา

1. ผลการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน CADM1 จำนวน 3 คู่ ได้ไพรเมอร์ที่มีขนาด 123 คู่เบส, 229 คู่เบส และ 397 คู่เบส ซึ่งเป็นบริเวณเดียวกันทั้ง 3 ขนาด และผลการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะกับยีน GAPDH จำนวน 1 คู่ ได้ไพรเมอร์ที่มีขนาด 163 คู่เบส (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ข้อมูลของไพรเมอร์ของยีน CADM1 และยีน GAPDH

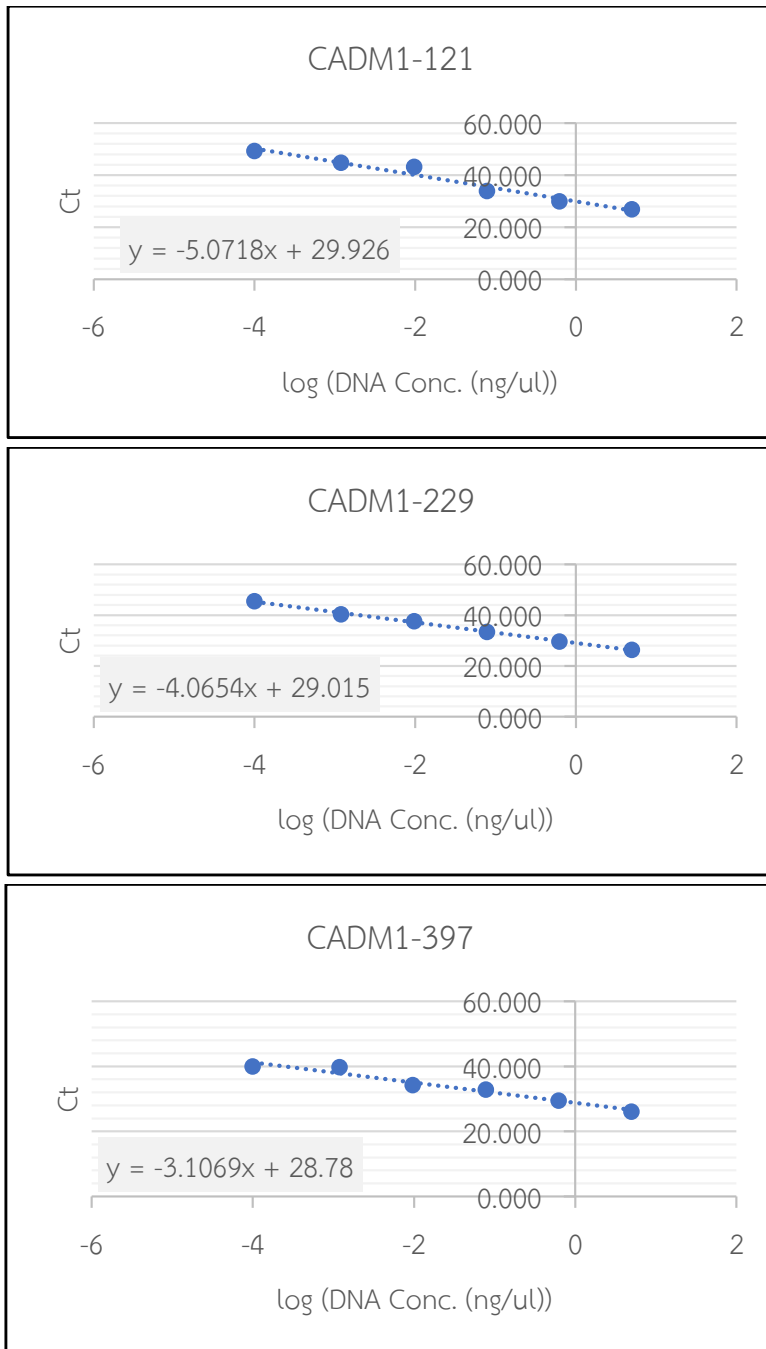
ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบสของไพรเมอร์	ขนาดผลิตภัณฑ์ (Base Pairs)
CADM1-121	Forward primer: 5'- ACTCCGCCTCCAGCGCATGT-3'	121
	Reverse primer: 5'- TCCGCTCGGCAGCACTACACT-3'	
CADM1-229	Forward primer: 5'- ACTCCGCCTCCAGCGCATGT-3'	229
	Reverse primer: 5'-CCCACACCTACCTGTGGGGAT-3'	
CADM1-397	Forward primer: 5'- ACTCCGCCTCCAGCGCATGT-3'	397
	Reverse primer: 5'- GGCTCACAGATGCCCTCAGC-3'	
GAPDH	Forward primer: 5'- CAGCCGCATCTTCTTTTG - 3'	163
	Reverse primer: 5'- GCCCAATACGACCAAATC -3'	

2. ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์จากตัวอย่างเลือดผู้วิจัย ที่มีความเข้มข้น 5, 0.625, 0.078125, 0.0097, 0.0012 และ 0.0001 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร โดยใช้ไพรเมอร์ CADM1-123, CADM1-229 และ CADM1-397 ได้ค่า Ct Mean ดังตาราง 2

ตารางที่ 2 ค่า Ct Mean ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมนุษย์ที่ใช้ทำเป็นกราฟมาตรฐาน

ลำดับ	ไพรเมอร์	ค่าความเข้มข้น (นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	ค่า Ct Mean
1	CADM1-121	5	26.892
2		0.625	29.963
3		0.078125	33.898
4		0.0097	43.241
5		0.0012	44.712
6		0.0001	49.265
7	CADM1-229	5	26.330
8		0.625	29.664
9		0.078125	33.395
10		0.0097	37.661
11		0.0012	40.321
12		0.0001	45.531
13	CADM1-397	5	26.098
14		0.625	29.461
15		0.078125	32.860
16		0.0097	34.208
17		0.0012	39.712
18		0.0001	39.998

จากนั้นนำค่า Ct ที่ได้นี้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน (Standard Curve) ระหว่างค่า Ct (แกนแนวดิ่ง) กับความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่เป็น Log Scale (แกนแนวนอน) ได้เป็นกราฟมาตรฐานที่ใช้ไพรเมอร์ CADM1-123, CADM1-229 และ CADM1-397 โดยมีสมการเส้นตรง คือ $y = -5.0718x + 29.926$, $y = -4.0654x + 29.015$ และ $y = -3.1069x + 28.78$ ตามลำดับ (ภาพที่ 2) ซึ่งจะนำไปใช้เป็นค่ามาตรฐานในการหาค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่คงอยู่ภายในยุงต่อไป



ภาพที่ 2 กราฟมาตรฐาน (Standard Curve) โดยใช้ไพรเมอร์ CADM1-123, CADM1-229 และ CADM1-397

3. ผลเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์จากตัวอย่างดีเอ็นเอของเลือดมนุษย์ที่ได้จาก ยุงลายบ้าน (A. Aegypti) ยุงลายสวน (A. Albopictus) และยุงรำคาญ (C. Quinguefasciatus) ในช่วงเวลาที่ 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ซึ่งเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ CDM1 ทั้ง 3 คู่ ที่มีขนาด 123 คู่เบส, 229 คู่เบส และ 397 คู่เบส ตามลำดับ ได้ค่า Ct Mean และค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของดีเอ็นเอมนุษย์ โดยเปรียบเทียบจาก กราฟมาตรฐาน (Standard Curve) ดังตารางที่ 3 โดยค่าความเข้มข้นดีเอ็นเอที่ได้นี้จะมีความเข้มข้นเฉพาะ ของมนุษย์ เนื่องจากไพรเมอร์ CDM1 มีความจำเพาะกับมนุษย์ จึงไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยุงได้

ตารางที่ 3 ค่า Ct และค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของตัวอย่างดีเอ็นเอมนุษย์ที่คงอยู่ในยุง 3 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ CDM1

ลำดับที่	สายพันธุ์	ไพรเมอร์	ช่วงเวลา (ชั่วโมง)	ค่า Ct Mean	ค่าความเข้มข้นเฉลี่ย (นาโนกรัม/ไมโครลิตร)
1	ยุงรำคาญ	CADM1-121	0	24.513	11.67297
2			24	26.433	4.88429
3			48	36.853	0.04307
4			72	41.929	0.00430
5		CADM1-229	0	26.947	3.22643
6			24	27.398	2.49938
7			48	27.398	2.49938
8			72	46.911	0.00004
9		CADM1-397	0	26.250	6.51977
10			24	28.455	1.27220
11			48	39.675	0.00031
12			72	42.095	0.00005
13	ยุงลายบ้าน	CADM1-121	0	28.468	1.93813
14			24	29.730	1.09309
15			48	41.028	0.00647
16			72	46.461	0.00055
17		CADM1-229	0	27.447	2.43008
18			24	28.677	1.21094
19			48	44.851	0.00013
20			72	48.620	0.00002

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ลำดับที่	สายพันธุ์	ไพรเมอร์	ช่วงเวลา (ชั่วโมง)	ค่า Ct Mean	ค่าความเข้มข้นเฉลี่ย (นาโนกรัม/ไมโครลิตร)
21	ยุงลายสวน	CADM1-397	0	27.732	2.17395
22			24	28.783	0.99777
23			48	36.357	0.00364
24			72	39.824	0.00028
25		CADM1-121	0	26.006	5.92681
26			24	44.227	0.00151
27			48	46.397	0.00057
28			72	48.679	0.00020
29		CADM1-229	0	26.766	3.57442
30			24	43.304	0.00031
31			48	46.954	0.00004
32			72	47.296	0.00003
33	ยุงลายสวน	CADM1-397	0	27.602	2.39418
34			24	27.779	2.09984
35			48	40.690	0.00015
36			72	41.144	0.00010

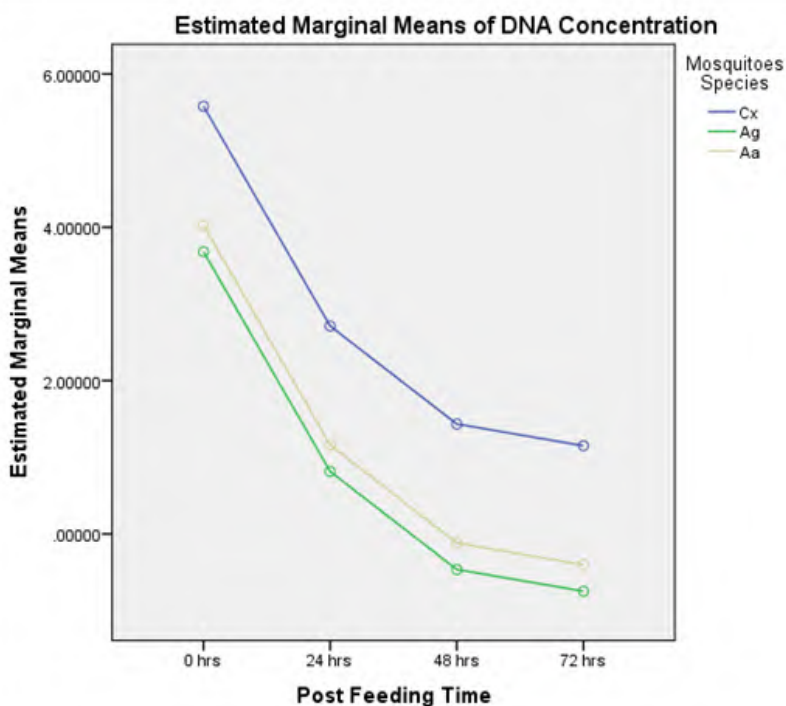
4. ผลการวิเคราะห์ข้อมูลสถิติ

4.1 วิเคราะห์ช่วงเวลาที่แตกต่างกัน คือ 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง กับความเข้มข้นของตัวอย่าง ดีเอ็นเอที่ได้จากยุงทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยการวิเคราะห์สถิติโดยใช้ General Linear Model ได้ผลการวิเคราะห์ คือ ช่วงเวลาที่แตกต่างกันจะทำให้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอมนุษย์ที่ได้จากยุงทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ ยุงลายบ้าน, ยุงลายสวน และยุงรำคาญมีความแตกต่างกันอย่างน้อย 2 ช่วงเวลา อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($F = 13.906$, $P \text{ Value} = 0.000$) โดยเรียงลำดับค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากยุงทั้ง 3 สายพันธุ์จากมากไปน้อย คือ ช่วงเวลาที่ 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ซึ่งได้ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของปริมาณ ดีเอ็นเอที่ได้จากยุงทั้ง 3 สายพันธุ์ เท่ากับ 4.429 ± 0.543 , 1.562 ± 0.543 , 0.284 ± 0.543 และ 0.001 ± 0.543 ตามลำดับ

4.2 วิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากยุงแต่ละสายพันธุ์ โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของ ความเข้มข้นดีเอ็นเอมนุษย์ที่เพิ่มจำนวนโดยใช้ General Linear Model ได้ผลการวิเคราะห์ คือ ความเข้มข้น ดีเอ็นเอมนุษย์ที่ได้จากยุงทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ ยุงลายบ้าน, ยุงลายสวน และยุงรำคาญ แตกต่างกันอย่างน้อย

2 ชนิด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($F = 4.623$, $P \text{ Value} = 0.018$) โดยเรียงลำดับค่าเฉลี่ยความเข้มข้นดีเอ็นเอมนุษย์ที่คงอยู่จากยุงทั้ง 3 สายพันธุ์จากมากไปน้อย คือ ยุงรำคาญ, ยุงลายสวน และ ยุงลายบ้าน ได้ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นดีเอ็นเอเท่ากับ 2.719 ± 0.470 , 1.167 ± 0.470 และ 0.821 ± 0.470 ตามลำดับ จากภาพที่ 3 จะเห็นได้ว่า ยุงรำคาญมีค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอมากที่สุด และยุงลายบ้านมีค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอน้อยที่สุด

4.3 ผลการวิเคราะห์คุณภาพของดีเอ็นเอที่คงอยู่ โดยดูจากความสามารถในการเพิ่มจำนวนของไพรเมอร์ CADM1 ขนาด 123 คู่เบส, 229 คู่เบส และ 397 คู่เบส ตามลำดับ จากตารางที่ 3 พบว่า ดีเอ็นเอจากเลือดของมนุษย์ในยุงสามารถเพิ่มจำนวนได้กับไพรเมอร์ทุกขนาด ในช่วงเวลาที่ 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ที่ได้จากความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ เช่น ยุงรำคาญ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ CADM1 ขนาด 123 คู่เบส, 229 คู่เบส และ 397 คู่เบส ในช่วงเวลาที่ 24 ชั่วโมง ได้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 4.88429, 2.49938 และ 1.27220 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับในยุงลายบ้าน ในช่วงเวลาที่ 48 ชั่วโมง ได้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 0.00647, 0.00013 และ 0.00364 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ และในยุงลายสวน ในช่วงเวลาที่ 72 ชั่วโมง ได้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 0.00020, 0.00003 และ 0.00010 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอจากเลือดของมนุษย์ในยุงมีคุณภาพที่ดี สามารถนำไปใช้สำหรับการวิเคราะห์ดีเอ็นเอต่อไปได้



ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่คงอยู่ในช่วงเวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง และสายพันธุ์ของยุง ที่ได้จาก General Linear Model เมื่อ Cx คือ ยุงรำคาญ, Ag คือยุงลายบ้าน และ Aa คือยุงลายสวน

อภิปรายผล

จากตัวแปรที่ศึกษาทั้งช่วงเวลาที่ยุงกินเลือดมนุษย์ 4 ช่วงเวลาคือ 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง และสายพันธุ์ของยุง 3 สายพันธุ์ คือ ยุงลายบ้าน (A. Aegypti), ยุงลายสวน (A. Albopictusi) และยุงรำคาญ (C. Auinguefasciatus) ซึ่งพบว่า มีผลต่อปริมาณดีเอ็นเอที่คงอยู่ในยุง อภิปรายผลได้ว่า

1. ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากยุงทั้ง 3 สายพันธุ์ จะมีค่าความเข้มข้นลดลง เมื่อช่วงเวลามากขึ้น กล่าวคือค่าความเข้มข้นจะมีค่าจากมากไปหาน้อย ซึ่งแปรผกผันกับค่า Ct ที่มีค่าน้อยไปหามาก ในช่วงเวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า ในช่วงเวลา 0 ชั่วโมง จะมีค่าความเข้มข้นสูงที่สุด แต่จะมีค่า Ct น้อยที่สุด และที่ช่วงเวลา 72 ชั่วโมง จะมีค่าความเข้มข้นน้อยที่สุด แต่จะมีค่า Ct สูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับหลักการที่ทาง Applied Biosystems (2008) ได้กล่าวไว้ว่าค่า Ct จะมีความสัมพันธ์กับค่าความเข้มข้น โดยตัวอย่างที่มีปริมาณดีเอ็นเอน้อยจะมีค่า Ct มาก แต่ตัวอย่างที่มีปริมาณดีเอ็นเอมากจะมีค่า Ct น้อย ดังนั้นเมื่อเวลาผ่านไปถึงชั่วโมงที่ 72 เป็นช่วงเวลาที่มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอน้อยลง แสดงว่าเมื่อเวลาผ่านไประยะหนึ่งยุงมีการย่อยสลาย ดีเอ็นเอ ทำให้มีปริมาณดีเอ็นเอที่ลดลงเมื่อช่วงเวลาเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องตามที่ Hiroshige et al. (2017) ได้กล่าว ไว้ว่ายุงตัวเมียจะทำการย่อยเลือดของมนุษย์ได้เป็นโปรตีน เพื่อนำช่วยในการเจริญเติบโตของไข่ และใช้เป็นพลังงานสำหรับการดำเนินชีวิต และเมื่อทดสอบทางสถิติหาความแตกต่างความเข้มข้นดีเอ็นเอที่คงอยู่ของช่วงเวลาแต่ละช่วง พบว่า แต่ละช่วงเวลามีความแตกต่างกันของความเข้มข้นดีเอ็นเอที่คงอยู่ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($F = 13.906$, $P \text{ Value} = 0.000$) ซึ่งเป็นไปตามสมมติฐานการวิจัย ที่กล่าวไว้ว่า ช่วงเวลาที่แตกต่างกันส่งผลให้ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากยุงทั้ง 3 สายพันธุ์มีความแตกต่างกัน ในส่วนคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้จากยุง วิเคราะห์ได้จากความสามารถในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ CADM1 ขนาด 123 คู่เบส, 229 คู่เบส และ 397 คู่เบส ตามลำดับ พบว่า ดีเอ็นเอจากเลือดของมนุษย์ในยุงสามารถเพิ่มจำนวนได้กับไพรเมอร์ทุกขนาด นั้นหมายความว่า ดีเอ็นเอถูกย่อยจนมีขนาดเล็กยังสามารถจับกับไพรเมอร์ขนาดเล็กเพียง 123 คู่เบสได้ แสดงว่าดีเอ็นเอมีคุณภาพมากพอที่จะสามารถนำไปตรวจรูปแบบดีเอ็นเอต่อไปได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hiroshige et al., (2017) ที่ทำการศึกษาการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลด้วยลำดับเบสที่ซ้ำกัน (Short Tandem Repeat, STR) จำนวน 15 ตำแหน่งจากเลือดมนุษย์ในยุง พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมงหลังยุงกัด สามารถตรวจพบรูปแบบดีเอ็นเอของมนุษย์ได้ แสดงให้เห็นว่าเลือดที่ได้จากยุงมีคุณภาพมากพอที่จะสามารถนำไปตรวจรูปแบบดีเอ็นเอของมนุษย์ได้

2. ยุงต่างสายพันธุ์ส่งผลต่อปริมาณดีเอ็นเอของมนุษย์ที่คงอยู่ในยุงที่ต่างกัน เป็นไปตามสมมติฐานการวิจัย กล่าวคือ ยุงรำคาญสามารถพบดีเอ็นเอมนุษย์ที่มีความเข้มข้นมากกว่า ยุงลายสวน และยุงลายบ้านตามลำดับ เนื่องจากค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้จากยุงรำคาญมากกว่ายุงอีกสองชนิด และพบว่า ยุงลายสวนพบปริมาณดีเอ็นเอมนุษย์ได้มากกว่ายุงลายบ้าน เนื่องจากค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้จากยุงลายสวนมากกว่ายุงลายบ้าน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ponlawat and Harrington (2015) ที่ทำการตรวจรูปแบบการกินเลือดของยุงลายบ้านกับยุงลายสวน พบว่า ยุงลายสวนมีความถี่ในการกินเลือดมนุษย์มากกว่ายุงลายบ้าน และสอดคล้องกับข้อมูลของ Nurach (2001) ที่กล่าวไว้ว่า ยุงลายบ้าน (A. Aegypti) กินเลือดได้น้อยกว่ายุงรำคาญ (C. Cuiquefasciatus) และเมื่อทดสอบทางสถิติหาความแตกต่างของความเข้มข้นดีเอ็นเอที่คงอยู่ของยุงแต่ละชนิด พบว่า ยุงแต่ละชนิดมีค่าความเข้มข้นดีเอ็นเอที่คงอยู่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทาง

สถิติที่ระดับ 0.05 ($F = 4.623$, $P \text{ Value} = 0.018$) การที่ยุงแต่ละชนิดมีความสามารถในการกินเลือดมนุษย์ และการย่อยเลือดมนุษย์ที่แตกต่างกัน อาจเกิดจากพฤติกรรมการกินเลือดของยุงแต่ละชนิดที่มีความแตกต่างกันไป ซึ่ง Charoensiri (2014) ได้กล่าวไว้ว่า การกินเลือดของยุงแต่ละสายพันธุ์มีลักษณะเฉพาะแตกต่างกันไป

ข้อเสนอแนะ

1. ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปประยุกต์ใช้

1.1 ข้อเสนอแนะต่อสังคม ควรมีการให้ความรู้แก่ประชาชนทั่วไปเกี่ยวกับยุงว่าเป็นทางเลือกหนึ่งในการจับตัวผู้กระทำความผิดได้ เนื่องจากสามารถวัดปริมาณดีเอ็นเอจากเลือดมนุษย์ที่ได้จากยุง ซึ่งชนิดของยุงกับระยะเวลาหลังจากกินเลือดจะส่งผลต่อปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอมนุษย์ที่ได้ โดยยุงรำคาญสามารถพบดีเอ็นเอมนุษย์ที่มีความเข้มข้นมากกว่า ยุงลายสวน และยุงลายบ้าน ตามลำดับ และระยะเวลาหลังการกินเลือดที่มากขึ้น จะส่งผลให้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอมนุษย์ลดลง

1.2 ข้อเสนอแนะต่อหน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ ควรดำเนินการจัดกิจกรรมให้ผู้เชี่ยวชาญด้านยุงมาให้ความรู้ และแนะนำแนวทางในการเก็บหลักฐานทางชีววิทยาจากสิ่งมีชีวิต เช่น ยุง ที่สามารถพบได้ตามบ้านเรือน และในชีวิตประจำวันของมนุษย์ เพื่อนำไปเป็นหลักฐานที่อาจสามารถเชื่อมโยงบุคคลที่เกี่ยวข้องเพื่อเป็นประโยชน์ต่อรูปคดี โดยควรเก็บพยานหลักฐานประเภทยุงทันทีหลังเกิดเหตุ เนื่องจากเมื่อเวลาผ่านไปจะทำให้ปริมาณความเข้มข้นของเลือดมนุษย์ในยุงลดลง ทำให้ส่งผลต่อประสิทธิภาพของการตรวจรูปแบบดีเอ็นเอได้

1.3 ข้อเสนอแนะต่อหน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ ควรมีการตรวจดีเอ็นเอประเภทยุงด้วย เนื่องจากดีเอ็นเอจากเลือดภายในยุง มีคุณภาพมากพอที่จะนำไปตรวจรูปแบบดีเอ็นเอต่อไป เป็นการเพิ่มขีดความสามารถในการตรวจพิสูจน์เมื่อการตรวจพิสูจน์ด้านอื่น ๆ มีขีดจำกัด

2. ข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยครั้งต่อไป

2.1 ควรศึกษาการตรวจปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากยุงสายพันธุ์อื่นที่พบได้ในประเทศไทย นอกจาก ยุงลายบ้าน ยุงลายสวน และยุงรำคาญที่พบได้ตามเขตเมือง เช่น ยุงก้นปล่อง ยุงเสือ ซึ่งเป็นยุงที่พบได้ในเขตป่าไม้ แม่น้ำ ลำคลอง เนื่องจากมีบ่อยครั้งที่คดีอาชญากรรมหรือคดีอื่น ๆ เกิดขึ้นในป่า เป็นต้น

2.2 ควรศึกษาในสภาวะแวดล้อมที่หลากหลาย เช่น อุณหภูมิที่ต่างกัน เพื่อให้ใกล้เคียงกับสถานการณ์จริง และสถานที่เกิดเหตุให้มากขึ้น

2.3 ควรศึกษาการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากยุง เพื่อนำไปวิเคราะห์หลักฐานทางชีววิทยาเพื่อสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้จริงในคดีที่เกิดขึ้นจริง

เอกสารอ้างอิง

เคมีอิน อินคอร์โปเรชั่น. (2565). ความรู้เกี่ยวกับเรื่องของยุง. [Online]. Available: <https://www.cheminpestcontrol.com/products/product-38>. [2565, มีนาคม 24].

จุฬารัตน์ นุราช. (2544). การศึกษาประสิทธิภาพของโลชั่นกันยุงจากน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากดอกดาวเรือง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

- ไทยรัฐ. (2564). **คุมมือฆ่าสาวโรงงานทำแผน ถูกรุมประชาทัณฑ์น่วม**. [Online]. Available: <https://www.youtube.com/watch?v=3RKTg3rIAfQ>. [2565, มีนาคม 23].
- วรฤทธิ เจริญศิริ. (2557). **ความรู้เกี่ยวกับยุง**. [Online]. Available: <http://61.7.231.171/epidem/knowledge/mosq.pdf>. [2565, มีนาคม 23].
- สรราช เบญจกุล. (2550). **หลักฐานทางนิติวิทยาศาสตร์กับกระบวนการยุติธรรม**. [Online]. Available: <https://mgronline.com/daily/detail/9500000087821>. [2565, มีนาคม 23].
- ไอรพต โพธิ์แหบ. (2565). **การปฏิบัติการฉกฉวยเงินในพื้นที่เกิดเหตุอาชญากรรม**. [Online]. Available: <https://www.emo1.org/single-post/การปฏิบัติการฉกฉวยเงินในพื้นที่เกิดเหตุอาชญากรรม>. [2565, มีนาคม 23].

References

- Applied Biosystems. (2008). **Real-Time PCR: Understanding Ct**. [Online]. Available: <https://www.gene-quantification.de/ab-application-note-understanding-ct.pdf>. [2022, April 18].
- BCC NEWS. (2008). **Mosquito Blood Identifies Thief**. [Online]. Available: <http://news.bbc.co.uk/2/hi/europe/7795725.stm>. [2019, February 7].
- Boles, K.S., et al. (2005). The Tumor Suppressor TSLC1/NECL-2 Triggers NK-cell and CD8+ T-cell Responses Through the Cell-surface Receptor CRTAM. **BLOOD**, **106** (3), 779-786.
- Butler, J.M. (2011). **Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology**. Maryland: Elsevier.
- Hiroshige, Y. et al. (2017). A Human Genotyping Trial to Estimate the Post-feeding Time from Mosquito Blood Meals. **PLOS ONE**. **12** (6), 1-18.
- NFSTC. (2013). **Principles of Trace Evidence**. [Online]. Available: <http://www.forensicsciencesimplified.org/trace/principles.html>. [2020, April 3].
- Ponlawat, A. and Harrington, C.L. (2005). Blood Feeding Patterns of Aedes Aegypti and Aedes Albopictus in Thailand. **Entomological Society of America**. **42** (5), 844-849.
- QIAGEN. (2010). **QIAamp® DNA Micro Handbook**. [Online]. Available: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/qiaamp-dna-kits/>. [2022, April 3].
- Siria, D., et al. (2018). Evaluation of a Simple Polytetrafluoroethylene (PTFE)-based Membrane for Blood-feeding of Malaria and Dengue Fever Vectors in the Laboratory. **Parasites & Vectors**. **11** (1), 1-10.

Spitaleri, S. et al. (2006). Genotyping of Human DNA Recovered from Mosquitoes Found on a Crime Scene. **International Congress Series. 1288** (6), 574–576.

Taneyhill, L.A. and Adams, M. S. (2008). **Chapter 19 Investigating Regulatory Factors and Their DNA Binding Affinities Through Real Time Quantitative PCR (RT-QPCR) and Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assays.** In Bronner-Fraser, M. (Ed.), *Avian Embryology* (2nd ed., 367-389). Cambridge: Academic Press.

Translated Thai References

Benjakul, S. (2007). **Forensic Science Evidence and Judicial Process.** [Online]. Available: <https://mgronline.com/daily/detail/9500000087821>. [2022, March 23]. (in Thai)

Charoensiri, W. (2014). **Knowledge of Mosquitoes.** [Online]. Available: <http://61.7.231.171/epidem/knowledge/mosq.pdf>. [2022, March 23]. (in Thai)

ChemIn. (2022). **Knowledge of Mosquitoes.** [Online]. Available: <https://www.cheminpestcontrol.com/products/product-38>. [2022, March 24]. (in Thai)

Nurach, J. (2001). **A Study on Efficiency of Mosquito Repellent Lotion with Volatile Oil Extrcted From Tagetes Erecta.** Master degree, Technology of Environmental Planning for Rural Delvelopment, Mahidol University. (in Thai)

Phohab, I. (2022). **Emergency Operations in Crime Scene Areas.** [Online]. Available: <https://www.emo1.org/single-post/การปฏิบัติการฉุกเฉินในพื้นที่เกิดเหตุอาชญากรรม>. [2022, March 23]. (in Thai)

Thairath. (2021). **Holding Hands Who Killed a Factory Girl Making a Plan Were Lynched.** [Online]. Available: <https://www.youtube.com/watch?v=3RKTg3rlAfQ>. [2022, March 23]. (in Thai)

คณะผู้เขียน

นางสาวภัสรา ควรเนตร

คณะนิติวิทยาศาสตร์ โรงเรียนนายร้อยตำรวจ

เลขที่ 90 หมู่ 7 อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม 73110

email: phattei@gmail.com

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พันตำรวจโท ดร.ธิตี มหาเจริญ

คณะนิติวิทยาศาสตร์ โรงเรียนนายร้อยตำรวจ

เลขที่ 90 หมู่ 7 อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม 73110

email: Thiti@rpca.ac.th

รศ.ดร.ปฐมวดี ญาณทศนียฺจิต

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

email: ypattama@hotmail.com