

การเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจอัตลักษณ์และ อณูนิติวิทยาศาสตร์ทางสัตว์

ISBN 978-974-682-377-7



นายสัตวแพทย์ณชัย ศราธพันธุ์

กลุ่มวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพการปศุสัตว์

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

คู่มือการเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจอัตลักษณ์และ อนุนิติวิทยาศาสตร์ทางสัตว์

นายสัตวแพทย์ณชัย ศราธพันธุ์

กลุ่มวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพการปศุสัตว์

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

คู่มือการเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจอัตลักษณ์และ อนุนิติวิทยาศาสตร์ทางสัตว์

รหัสมาตรฐานสากลประจำหนังสือ : ISBN 978-974-682-377-7

จัดทำโดย : ณชัย ศราวุฒินันท์

กลุ่มวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพการปศุสัตว์

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

เลขทะเบียนผลงานวิชาการ 57(2)-0208-012

พิมพ์ครั้งที่ 1 พ.ศ. 2556

สงวนลิขสิทธิ์ตาม พ.ร.บ. ลิขสิทธิ์ พ.ศ. 2527

พิมพ์ที่ บริษัท นิเวศน์มดาการพิมพ์ (ประเทศไทย) จำกัด

คำนำ

การเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจอัตลักษณ์และอนุนิติวิทยาศาสตร์ทางสัตว์เป็นส่วนสำคัญของเจ้าหน้าที่ปฏิบัติงานในการเก็บตัวอย่างและตรวจตัวอย่างเนื่องจากตามประมวลกฎหมายวิธีพิจารณาความอาญามาตรา ๑๓๑ ได้บัญญัติเกี่ยวกับอำนาจของพนักงานสอบสวนว่า ให้พนักงานสอบสวนมีอำนาจในการรวบรวมพยานหลักฐานทุกชนิดเท่าที่สามารถทำได้ เพื่อประสงค์จะทราบข้อเท็จจริงและพฤติการณ์ต่างๆ อันเกี่ยวกับความผิดที่ถูกกล่าวหาประกอบกับมาตรา ๑๓๑/๑ กำหนดให้ ในกรณีจำเป็นต้องใช้พยานหลักฐานทางวิทยาศาสตร์เพื่อพิสูจน์ข้อเท็จจริงตามมาตรา ๑๓๑ พนักงานสอบสวนมีอำนาจในการตรวจพิสูจน์ บุคคล วัตถุ หรือ เอกสารใดๆ โดยวิธีวิทยาศาสตร์ก็สามารถทำได้ โดยอาจขอความร่วมมือจากหน่วยงานที่มีความเชี่ยวชาญในการนั้นๆ ในคู่มือเล่มนี้จะประกอบด้วยชนิดของตัวอย่าง การเก็บตัวอย่าง การส่งตัวอย่าง การรับตัวอย่าง การสกัดดีเอ็นเอ การตรวจตัวอย่างดีเอ็นเอ การวิเคราะห์ผล ตลอดจนการรายงานผลเพื่อให้ผู้มีหน้าที่เกี่ยวข้องในการตรวจอัตลักษณ์และอนุนิติวิทยาศาสตร์ทางสัตว์ใช้เป็นคู่มือในการปฏิบัติงานได้อย่างถูกต้องและมีคุณภาพ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพการปศุสัตว์ ที่มีส่วนช่วยเหลือทำให้หนังสือเล่มนี้สำเร็จด้วยดี

ณชัย ศรารักษ์

กันยายน 2556

สารบัญ

		หน้า
บทที่ 1	ชนิดตัวอย่าง	1
บทที่ 2	การเก็บตัวอย่าง	3
บทที่ 3	การส่งตัวอย่าง	7
บทที่ 4	การรับตัวอย่าง	9
บทที่ 5	การสกัดดีเอ็นเอ	10
บทที่ 6	การตรวจตัวอย่างดีเอ็นเอ	20
	-การตรวจหาชนิดสัตว์ของตัวอย่าง	22
	-การตรวจอัตลักษณ์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ	23
บทที่ 7	การวิเคราะห์ผลการตรวจความเป็นพ่อ แม่ ลูก	27
บทที่ 8	การรายงานผล	30
	บรรณานุกรม	31
	ภาคผนวก	32

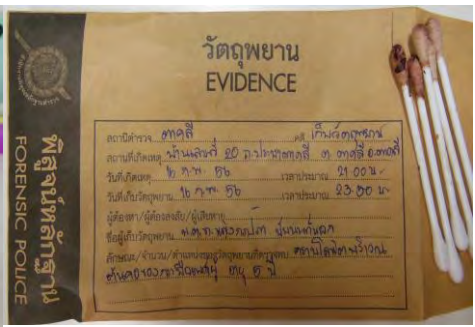
บทที่ 1

ชนิดตัวอย่าง

ในปัจจุบัน ดีเอ็นเอเทคโนโลยีสามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่างบุคคลได้จากตัวอย่างที่มีชีวิตและตายแล้ว ยกเว้น บุคคลที่เป็นแฝดแบบ identical twin ดีเอ็นเอสามารถสกัดได้จากตัวอย่างหลายชนิด เช่น เลือด ในเลือดสดมีดีเอ็นเอ 30,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร คราบเลือดมีดีเอ็นเอ 200 นาโนกรัมต่อตารางเซนติเมตร หรือ 2 นาโนกรัมต่อตารางมิลลิเมตร น้ำกาม ในน้ำกามหนึ่งมิลลิลิตรมีดีเอ็นเอ 25,000 นาโนกรัม หรือ 0-3,000 นาโนกรัมในสำลีที่ swab จากช่องคลอด หลังร่วเพศ ในน้ำลายมีดีเอ็นเอ 5,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในรากขน (ที่ร่วงเอง) มีดีเอ็นเอ 1-12 นาโนกรัมต่อเส้น



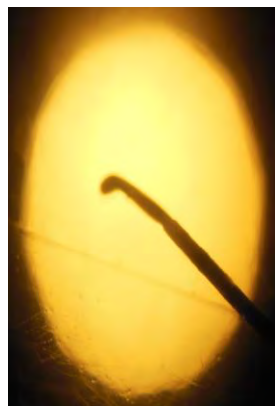
เลือดสดผสมสารป้องกันเลือดแข็ง



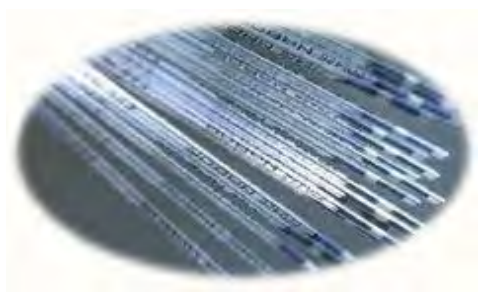
เลือดแห้ง



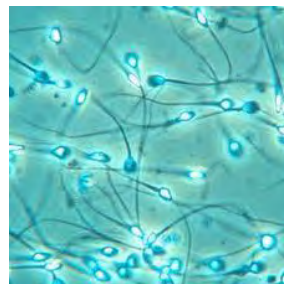
ขนหางสัตว์



รากขนหางสัตว์



น้ำเชื้อแช่แข็ง



น้ำเชื้อสัตว์



ชิ้นเนื้อแห้ง



กระดูก

บทที่ 2

การเก็บตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างสำหรับตรวจทางอนุนิติวิทยาศาสตร์ทางสัตว์ สามารถเก็บตัวอย่างหรือวัตถุพยานได้จากสัตว์ในขณะที่มีชีวิต สัตว์ที่ตายได้ดังต่อไปนี้

สัตว์ที่มีชีวิต

การเก็บตัวอย่างเลือด



- บังคับสัตว์ให้อยู่นิ่ง
- ใช้สาล์ชุบแอลกอฮอล์ 70% ทำความสะอาดที่บริเวณลำคอสัตว์
- ใช้เข็มเจาะเลือด เบอร์ 18G ขนาด 1.5 นิ้ว พร้อมกับไซริงค์ขนาด 10 หรือ

20 ซี.ซี. ที่ใหม่สะอาดปราศจากเชื้อ ดูดเลือดเลือด

- บรรจุเลือดทันทีหลังจากดูดจากสัตว์ลงในหลอดเก็บเลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดชนิด EDTA, Citrate หรือ Heparin ประมาณ 5 ซี.ซี.
- กลับหลอดเลือดขึ้น-ลง ผสมเลือดกับสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดให้เป็นเนื้อเดียวกัน
- เขียนหมายเลข/ชื่อสัตว์ บนหลอดเก็บเลือด รวบรวมหลอดเก็บเลือดในถุงซิปลาสติก ใส่ในกล่องโฟมที่มีน้ำแข็งส่งห้องปฏิบัติการ



ตัวอย่างเลือด เก็บรวบรวมในกล่องโฟม ที่มีน้ำแข็งแช่

การเก็บตัวอย่างขนสัตว์



บังคับสัตว์ให้อยู่นิ่งจับหางสัตว์ด้วยมือซ้าย มือขวาทำความสะอาดขนหาง

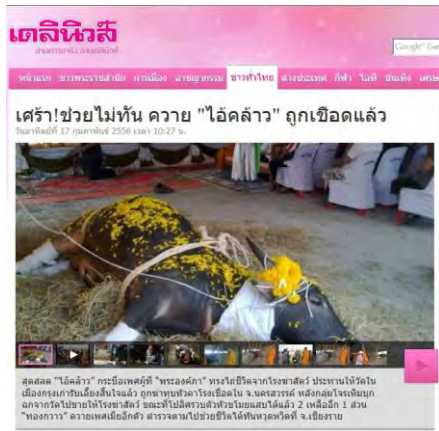


ดึงขนหางครั้งละประมาณ 10 เส้น จำนวน 5 ครั้ง รวม 50 เส้น



ตัดขนหางยาวประมาณ 3 นิ้ว เก็บในถุงซิปล็อก เขียนชื่อ/หมายเลขสัตว์ อายุ เพศ

สัตว์ที่ตาย



ใช้สำลีที่สะอาดซับเลือดบริเวณบาดแผลทิ้งไว้ให้แห้งในร่ม เก็บใส่ซองปิดผนึก



ชิ้นเนื้อสดขนาดประมาณ 10 กรัม กระตุกสด ให้เก็บใส่ถุงพลาสติก แช่น้ำแข็ง ส่วนชิ้นเนื้อแห้ง ให้เก็บใส่ถุงพลาสติก เขียนรายละเอียด ใส่ซองปิดผนึก ส่งห้องตรวจทางปฏิบัติการ

บทที่ 3

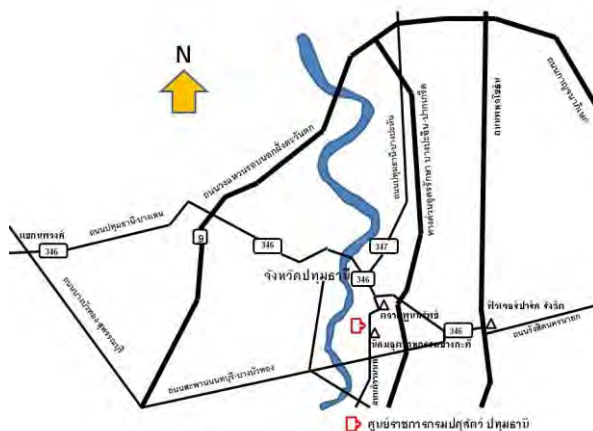
การส่งตัวอย่าง

การส่งตัวอย่างตรวจทางห้องปฏิบัติการอณูนิติวิทยาศาสตร์ทางสัตว์
สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ มีแผนผังดังนี้



- หลังจากตำรวจพิสูจน์หลักฐานเก็บตัวอย่าง (วัตถุพยาน) แล้วให้นำส่งตัวอย่าง โดยเจ้าหน้าที่ตำรวจผู้รับผิดชอบทำหนังสือจากต้นสังกัด เรียน อธิบดีกรมปศุสัตว์เพื่อขอความอนุเคราะห์ตรวจตัวอย่าง

- อธิบัติกรมปศุสัตว์พิจารณา รับทราบและแจ้งสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ให้ดำเนินการตรวจวิเคราะห์
- เจ้าหน้าที่ตำรวจนำส่งตัวอย่าง มายังหน่วยอนุนิติวิทยาศาสตร์ทางสัตว สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ พร้อมหนังสือส่งตัวอย่างที่มีรายละเอียดตัวอย่างและลายเซ็นรับรองของผู้บังคับบัญชาหน่วยงานที่จัดส่ง (ตัวอย่างต้องนำส่งโดยเจ้าหน้าที่โดยตรง ไม่รับตัวอย่างทางไปรษณีย์)



แผนที่ตั้งหน่วยอนุนิติวิทยาศาสตร์ทางสัตว ในศูนย์ราชการกรมปศุสัตว์ ปทุมธานี

บทที่ 4

การรับตัวอย่าง

การรับตัวอย่าง มีขั้นตอนดำเนินงานดังต่อไปนี้

- ห้องปฏิบัติการหน่วยอนุนิติวิทยาศาสตร์ทางสัตรว์ ตรวจรับตัวอย่าง (วัตถุพยาน) โดยตรวจสอบชนิด สภาพ จำนวนตัวอย่าง
- หลังจากนั้นผู้ส่งตัวอย่าง เช่น หนังสือส่งตัวอย่าง เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการหนังสือรับตัวอย่าง และถ่ายรูปวัตถุพยาน
- เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการจะสำเนาเอกสารตรวจรับ 1 ฉบับ และส่งคืนเจ้าหน้าที่นำส่งตัวอย่าง
- เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการบันทึกรายละเอียดตัวอย่าง ตามหลักเกณฑ์ห้องปฏิบัติการ และเก็บตัวอย่างไว้รอการตรวจวิเคราะห์



บทที่ 5

การสกัดดีเอ็นเอ

ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดสด (Whole Blood) ด้วย AxyPrep

Blood Genomic DNA Miniprep Kit

ดูด Whole Blood 200 μ l ใส่ 1.5 ml Micro. Tube



Add AP1 Buffer 500 μ l Mix by vortex



ดูดส่วนใสใส่ใน Miniprep Column ที่รองด้วย 2.0 ml Micro. Tube
ปั่นที่ความเร็ว 6000 rpm 1 นาที



ทิ้งส่วนใสด้านล่าง Add W1A Buffer 700 μ l ใน Miniprep Column
ที่รองด้วย 2.0 ml Micro.Tube



Incubate ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที ปั่นที่ความเร็ว 6000 rpm 1 นาที



ทิ้งส่วนใส Add W2 Buffer 800 μ l ใน Miniprep Column ที่รองด้วย 2.0 ml Micro.Tube
ปั่นที่ความเร็ว 12000 rpm 1 นาที



เติม TE buffer 100 μ l ใน Miniprep Column ที่รองด้วย

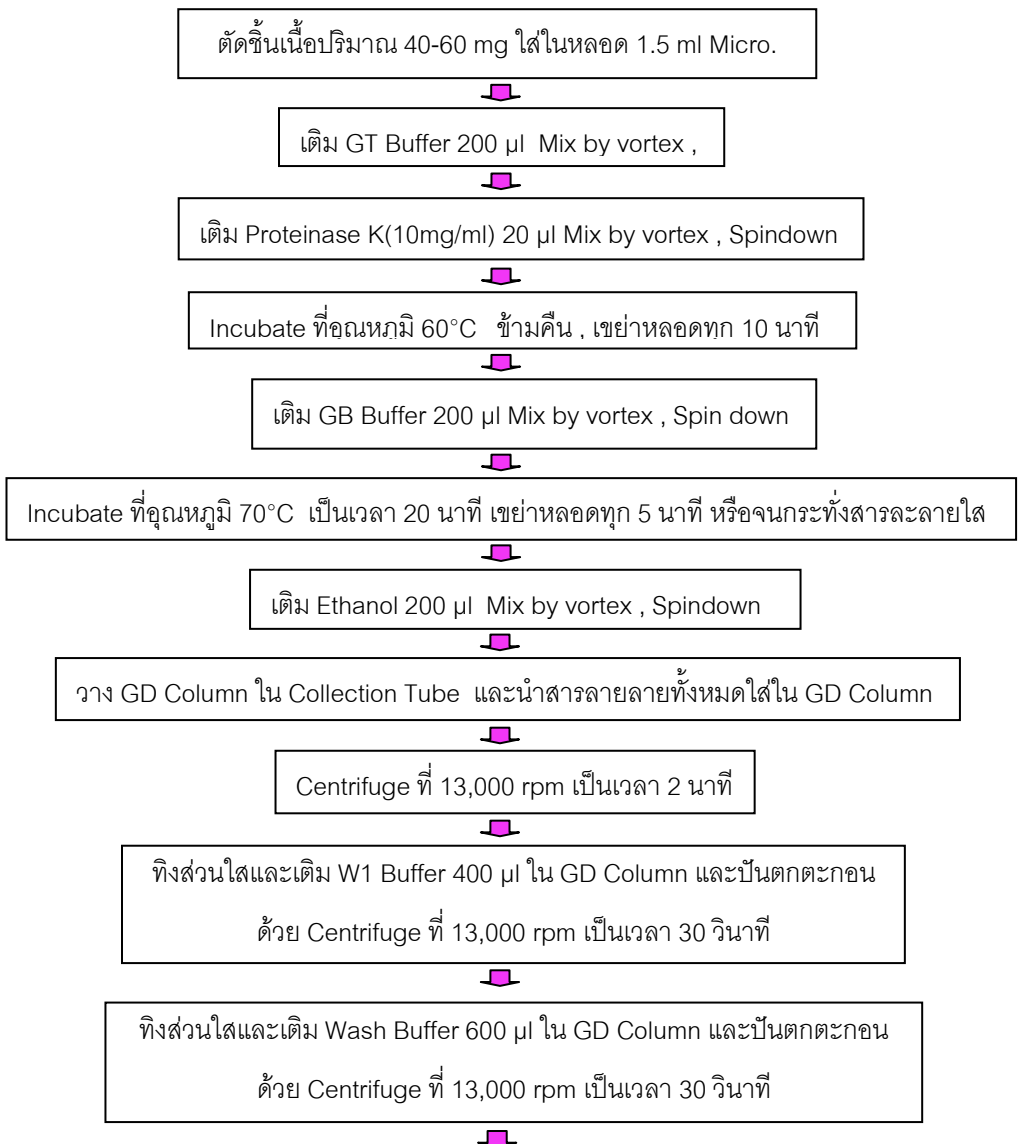


Incubate ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที ปั่นที่ความเร็ว 12000 rpm 1 นาที



Genomic DNA Store at -20°C

ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อ (Tissue) ด้วย Genomic DNA Extraction Kit (Tissue)



Centrifuge ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้ Column แห้ง



เติม Elution Buffer (Preheat) 100 μ l ใน GD Column ที่รองด้วยหลอด 1.5 ml Micro.

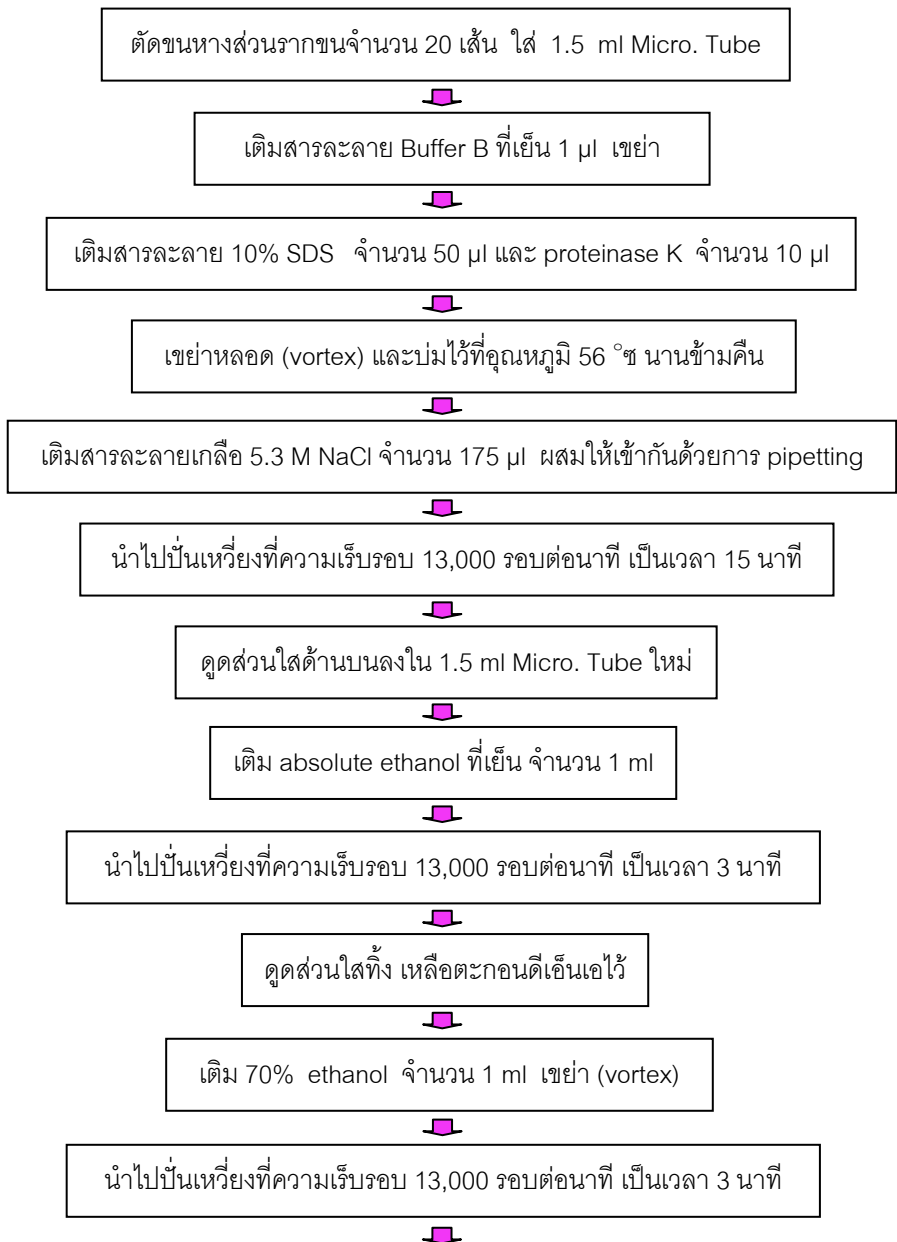


Incubate ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที ปั่นที่ความเร็ว 13,000 rpm 30 วินาที



Genomic DNA Store at -20°C

ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากรากขนด้วยวิธี Salt-Out



ดูดส่วนใสทิ้ง เหลือตะกอนดีเอ็นเอไว้



ทำการระเหย 70% ethanol ที่อุณหภูมิห้อง



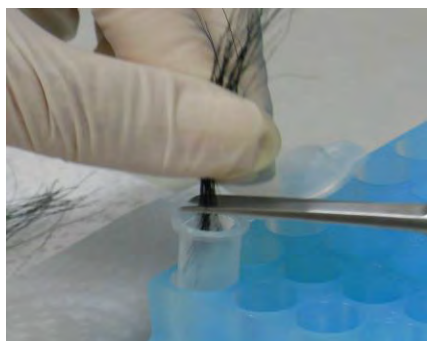
ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย TE buffer จำนวน 100 ul



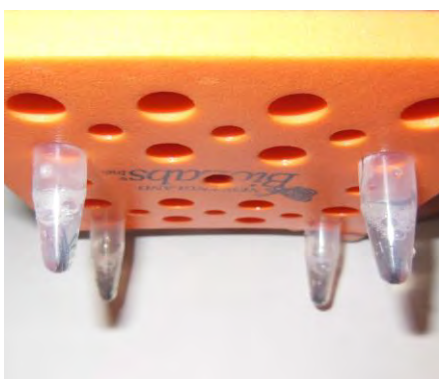
ทำความสะอาดขนด้วยแอลกอฮอล์ 70%



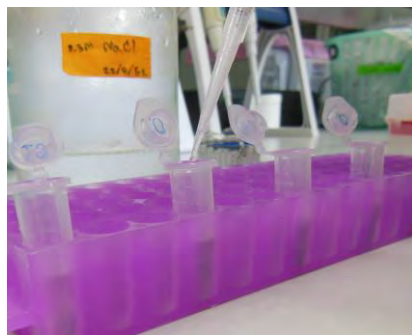
แสดงจำนวนเส้นของขนหาง



ใช้กรรไกรตัดขนหางด้านที่เป็นรากขน ใส่สารละลาย Buffer B, 10% SDS และ proteinase K



เขย่าและปั่นให้รากขนรวมกันที่ก้นหลอด ดังแสดงในภาพข้างบน

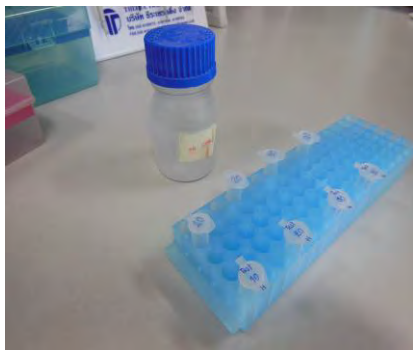
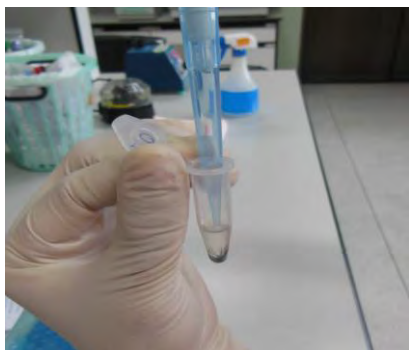


ย่อยตัวอย่างขนทางค้ำคั้นที่อุณหภูมิ 56°C .

เติมสารละลาย 5.3 M NaCl

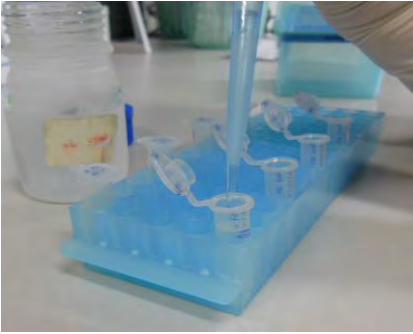


เขย่าหลอดตัวอย่าง 30 วินาที นำหลอดตัวอย่างไปปั่นที่ 13,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที

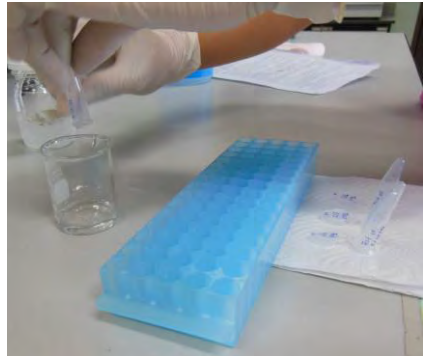


ดูดเก็บส่วนใสข้างบน นำไปใส่ในหลอดตัวอย่างใหม่ และเติม Abs. ethanol ที่เย็น

16 คู่มือการเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจอัตลักษณ์และอนุนิติวิทยาศาสตร์ทางสัตว์



เติม absolute ethanol เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ ปิดฝาหลอดแล้วเขย่าด้วยมือ

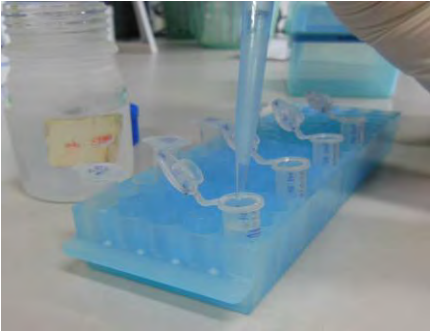


นำหลอดตัวอย่างไปปั่นที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที รินส่วนใสทิ้ง



ดูดเก็บส่วนใสข้างบน นำไปใสในหลอดตัวอย่างใหม่ และเติม Abs. ethanol ที่เย็น

คู่มือการเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจอัตลักษณ์และอนุนิติวิทยาศาสตร์ทางสัตว์ 17

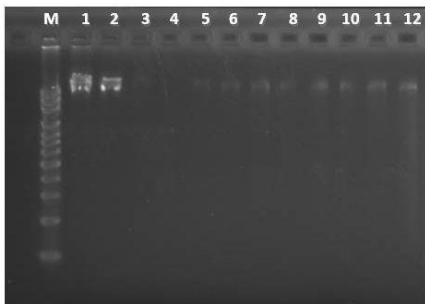


ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย สารละลาย TE buffer

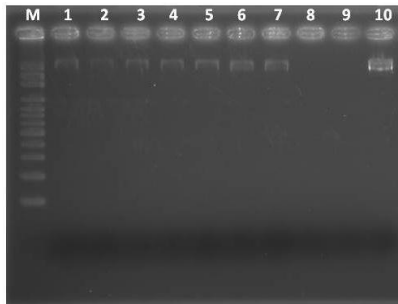
การตรวจสอบดีเอ็นเอ โดยวิธี Gel Electrophoresis ด้วย 1.5% Agarose gel และย้อมดีเอ็นเอด้วยอิเดียมโบรไมด์ ดูผลด้วยเครื่อง Gel Documentation (Alpha Imager3400)



ดูตัวอย่างดีเอ็นเอจำนวน 1 ไมโครลิตร ผสมกับสีที่มี ethidium bromide ใส่ลงไปหลอด 2% วุ้นอะกาโรส ปล่อยกระแสไฟฟ้า เพื่อให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอเคลื่อนที่ไป

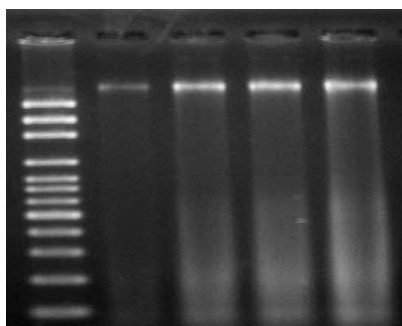


A



B

[A] แถบ Genomic DNA Lane M : 100 bp marker; Lane 1: DNA เลือดแกะ(PN82); Lane 2 : DNA เลือดป้อนองศ์ (PN83) ; Lane 3 - 12 : DNA คราบเลือดคิ้ว (PN84/1 – PN84/10) [B] แถบ Genomic DNA Lane M : 100 bp marker; Lane1-5 : DNA ชี้น้ำคิ้ว (PN85/1 – PN85/5) Lane 6 - 7 : DNA กระดุกสดคิ้ว; Lane 8 - 9 : DNA กระดุกแห้งคิ้ว; Lane 10 : เลือดทองคำ



จำนวนรากขนหางตั้งแต่ 10 ถึง 40 เส้น และชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างขนหาง

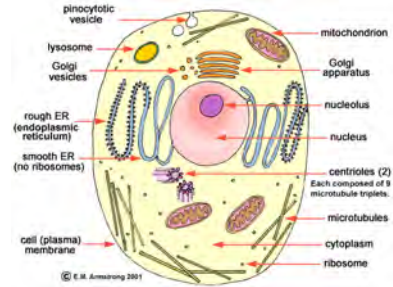
บทที่ 6

การตรวจตัวอย่างดีเอ็นเอ

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ได้รับขอความอนุเคราะห์ จากเจ้าหน้าที่ตำรวจให้ตรวจวัตถุพยานโดยใช้วิธีชีวโมเลกุลอย่างต่อเนื่อง ซึ่งถือได้ว่าผลการตรวจพิสูจน์ดังกล่าวเป็นความเห็นของพยานผู้เชี่ยวชาญ ตามประมวลวิธีพิจารณาความอาญา มาตรา ๒๕๓ และสามารถใช้เป็นพยานหลักฐานประกอบการพิจารณาในคดีได้

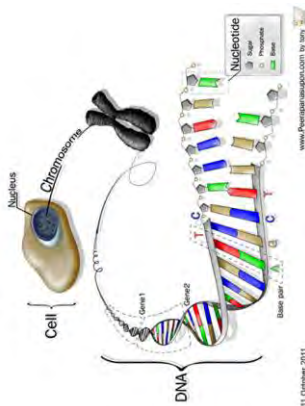
อณูนิติวิทยาศาสตร์ เป็นวิทยาการการนำเอาเทคโนโลยีดีเอ็นเอมาใช้ตรวจอัตลักษณ์ของบุคคล เพื่อประกอบกับทางนิติศาสตร์ เนื่องจากในบุคคลสองคนมีดีเอ็นเอจำนวน 99 เปอร์เซ็นต์ที่เหมือนกัน และอีกหนึ่งเปอร์เซ็นต์ที่แตกต่างกัน ซึ่งการตรวจดีเอ็นเอจำนวนหนึ่งเปอร์เซ็นต์นี้ จะเสียค่าใช้จ่าย และเวลามาก นักวิทยาศาสตร์จึงพัฒนาวิธีการตรวจดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างบุคคลโดยอาศัยคุณสมบัติของดีเอ็นเอชนิดแซทเทลไลต์ ตัวอย่างเช่น ถ้ามีการเรียงลำดับเบส 4 เบส ได้แก่ AATG ซ้ำๆ กัน เมื่อมีการเรียงตัวซ้ำกัน 2-5 ชุด เรียกว่าไมโครแซทเทลไลต์ ถ้าซ้ำกัน 9-80 ชุด เรียกว่า มินิแซทเทลไลต์ และที่สำคัญคือ ไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ ยังคงสภาพเดิมในขณะที่ดีเอ็นเอส่วนอื่นเสื่อมสภาพแล้ว ในตัวอย่างที่เก่าเช่น รากขน กระดูก ฟัน

นิวเคลียสที่อยู่ในเซลล์สลายตัวไป แต่ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียสามารถนำไปตรวจทางห้องปฏิบัติการได้ เนื่องจากในเซลล์หนึ่งมีไมโทคอนเดรียประมาณ 1,000 อัน ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย สามารถนำมาพิสูจน์ชนิดสัตว์ และสายสัมพันธ์ทางแม่ได้ เนื่องจากลูกได้รับไมโทคอนเดรียจากแม่เท่านั้น ในขณะที่เซลล์ไขปฏิสนธิกับตัวอสุจิ

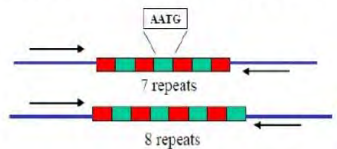


ตัวอสุจิขณะเข้าไปผสมกับเซลล์ไข่

ไดอะแกรมองค์ประกอบของเซลล์ของสัตว์



Short Tandem Repeats (STRs)



[A] ไดอะแกรมดีเอ็นเอนิวเคลียสและไมโทคอนเดรีย ประกอบด้วยเบส 4 เบสยึดเกาะกันเป็นดีเอ็นเอสายคู่ [B] การเรียงลำดับเบสของสายดีเอ็นเอที่มี 4 เบสซ้ำๆกัน ในสายดีเอ็นเอ

การตรวจหาชนิดสัตว์ของตัวอย่าง

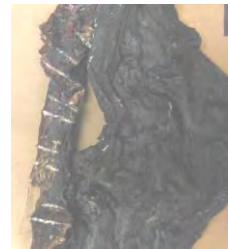
บางครั้งวัตถุพยานไม่สามารถจำแนกชนิดของสัตว์ได้จากสถานที่เกิดเหตุ จำเป็นต้องพิสูจน์ทราบชนิดของสัตว์จากวัตถุพยานเพื่อประกอบกับสำนวนคดี ชนิดตัวอย่าง ได้แก่ รากขน ชี้นเนื้อสด หรือแห้ง สามารถนำมาสกัดดีเอ็นเอ และตรวจหาชนิดของสัตว์ได้โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ เช่น Allelic specific PCR และ PCR-RFLP เป็นต้น



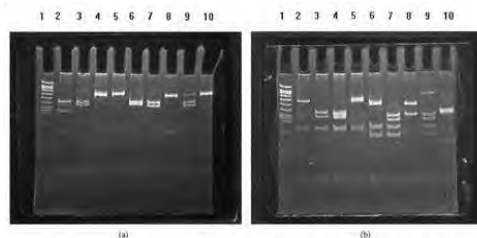
รากขน



เนื้อสด



เนื้อแห้ง



(a) *EcoRII* and (b) *BamHI* restriction profiles obtained from PCR-RFLP analysis of Centromeric Satellite DNA in cooked meat from nine animal species. Lane numbers 1=molecular marker of 1000 bp; 2= Taurine cattle; 3= Zebu cattle; 4= Banteng; 5=buffalo; 6= Bison; 7= Wsient; 8= Water buffalo; 9=African buffalo; 10=Indian cattle.

แสดงผลการตรวจหาชนิดสัตว์ด้วยเทคนิค PCR-RFLP

การตรวจอัตลักษณ์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA Fingerprint) ของกระป๋อง

ในการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA Fingerprint) ของกระป๋อง มีขั้นตอนและวิธีการดังนี้

1. นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Multiplex PCR ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ จำนวน 10 ตำแหน่ง คือ INRA006, CSSM47, RM004, BM1706, MAF65, CSSM38, CSSM42, CSSM19, INRA189 และ D5S2 ซึ่งได้แบ่งเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้
 - กลุ่มที่ 1 Multiplex 6 primers คือ INRA006, CSSM47, RM004, BM1706, MAF65, CSSM38
 - กลุ่มที่ 2 Multiplex 4 primers คือ CSSM42, CSSM19, INRA189 และ D5S2

PCR Mixture

	Concentration	Final Concentration	1 Reaction
PCR Buffer	10 X	1X	2 μ l
dNTP	2 mM	0.2 mM	2 μ l
MaCl ₂	50 mM	3 mM	1.2 μ l
Primer Mix	5 μ M	0.1 μ M	0.4 μ l
<i>Taq</i> Polymerase	5U/ μ l	0.1 U	0.4 μ l
DDW	-	-	13 μ l
Template	Genomic	Genomic	1 μ l
Total Volume	-	-	20 μ l

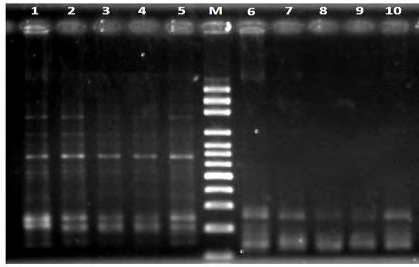
Thermal Condition

Step	Temp.	Time	Cycle
Initiation Denaturation	94°C	5 min.	1
Denature	94°C	30 sec.	30
Annealing	58°C	30 sec.	
Extention	72°C	1 min.	
Final Extention	72°C	60 min.	1
Hold	4°C	Hold	infinity

2. ตรวจสอบผล Multiplex PCR โดยวิธี Gel Electrophoresis ด้วย 2%

Agarose gel และย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ดูภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง

Gel Documentation (Alpha Imager3400)



แถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์อาร์

3. PCR Product ตรวจวิเคราะห์เปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอ จำนวน10 ตำแหน่ง ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์ 3130 Genetic Analyzer และ วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Gene Mapper



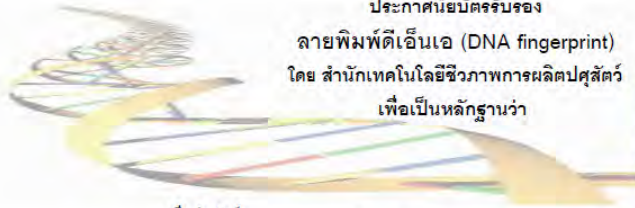
แสดงขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากเครื่องตรวจวิเคราะห์



หมายเลขอ้างอิง SW001
ให้ไว้ ณ วันที่ 4 พฤษภาคม 2555

กรมปศุสัตว์
ประกาศนียบัตรรับรอง

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint)
โดย สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์
เพื่อเป็นหลักฐานว่า



ชื่อพ่อพันธุ์
ชื่อเจ้าของฟาร์ม ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพันธุ์ผสมเทียมลาพญากลาง
ที่อยู่ หมู่ที่ 2 ต. หอนงรี อ. ลำสนธิ จ. ลพบุรี

มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอดังนี้

Markers	INRA006	CSSM47	CSSM42	MAP65	CSSM38	INRA189	RM004	BM1706	CSSM19	DSS2
Allele 1	111.5	131.6	129.6	109.9	166.6	245.1	135.8	236.8	130.9	198.8
Allele 2	119.1	150.0	199.1	122.3	166.6	245.1	137.8	254.0	1425.1	215.8

นางกัลยา เก่งวิทยกรรม
หัวหน้ากลุ่มวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

นายจิระศักดิ์ พิพัฒน์พงศ์โสภณ
ผู้อำนวยการสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

ใบประกาศนียบัตรรับรองลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ของกระบือพ่อพันธุ์

บทที่ 7

การวิเคราะห์ผล

การวิเคราะห์ข้อมูลขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ จำนวน 10 คู่ ในหนึ่งตัวอย่างที่ตรวจจะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (Allele) จำนวน 2 ชิ้น ถ้าชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากัน เรียกว่า Homozygote ถ้ามีขนาดไม่เท่ากันเรียกว่า Heterozygote ดังนั้นลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสัตว์แต่ละตัว จะมีขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของแต่ละเครื่องหมายไม่เหมือนกัน จึงเกิดเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสัตว์แต่ละตัว

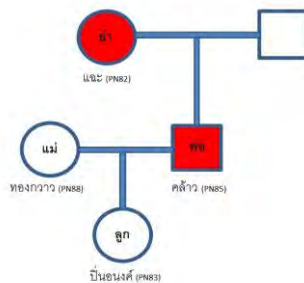
การตรวจความเป็นพ่อ แม่ ลูก

ในการตรวจความเป็นพ่อ-แม่-ลูกของสัตว์ โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ เช่น โค ม้า เป็นต้น ในต่างประเทศมีชุดน้ำยาสำเร็จรูปจำหน่าย ส่วนการตรวจในกระบือ ฦๅชัย และคณะ (2555) ได้พัฒนาชุดตรวจความเป็นพ่อ-แม่-ลูกในกระบือปลักไทยซึ่งมีความเชื่อมั่นสูงถึง 99.98 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ไมโครแซทเทลไลต์ จำนวน 10 เครื่องหมาย

EP in each locus										
Locus	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
INRA006	0.6471	0.6471	0.6471	0.6471	0.6471	0.6471	0.6471	0.6471	0.6471	0.6471
CSSM47	0.5254	0.5254	0.5254	0.5254	0.5254	0.5254	0.5254	0.5254	0.5254	
RM004	0.4629	0.4629	0.4629	0.4629	0.4629	0.4629	0.4629	0.4629		
BM1706	0.6119	0.6119	0.6119	0.6119	0.6119	0.6119	0.6119			
MAF65	0.4789	0.4789	0.4789	0.4789	0.4789	0.4789				
CSSM38	0.2921	0.2921	0.2921	0.2921	0.2921					
CSSM42	0.6232	0.6232	0.6232	0.6232						
CSSM19	0.6596	0.6596	0.6596							
DSS2	0.5325	0.5325								
INRA189	0.3479									
CEP	0.99949647	0.99922786	0.99834820	0.99514708	0.98712052	0.98180645	0.96508642	0.91004299	0.83252041	0.64714124

ตารางผลการตรวจวิเคราะห์ ความเป็นไปได้ (0-1) ระหว่างเครือญาติในกระบือปลักไทย

การวิเคราะห์ความเป็นพ่อ-แม่-ลูก นั้นอาศัยกฎเกณฑ์ว่า ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของลูกข้างหนึ่งของโครโมโซมได้มาจากพ่อ และอีกข้างหนึ่งมาจากแม่ โดยที่ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากการวัดขนาดต้องแตกต่างกันมากกว่า 1 เบส การวินิจฉัยความเป็นพ่อ-แม่-ลูกกันนั้น ลูกจะได้รับชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากพ่อและแม่ครบทั้ง 10 เครื่องหมาย ส่วนความสัมพันธ์ระหว่างพ่อกับลูก หรือ แม่กับลูก นั้น ลูกจะได้รับชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากพ่อ หรือแม่ตั้งแต่ 8-10 เครื่องหมาย



แสดงประวัติเครือญาติ (Pedigree) ของกระบือครอบครัวหนึ่ง

Family DNA Fingerprint Analysis (ฉบับ)																						
ชนิดเครือญาติ	ชื่อ	เพศ	Primer ที่ใช้ทดสอบ																		หมายเหตุ	
			PM8A06	CSM447	CSM442	CSM419	DS52	MAP5	CSM438	PM8A189	PM804	PM1706										
พ่อ (PM82)	PM82	♂	110.38	118	132.14	150.62	206.89	206.89	140.5	145.09	199.23	220.06	110.38	124.84	174.93	176.86	244.08	237.53	190.17	153.79	235.36	239.23
แม่ (PM88)	PM88	♀	110.82	112.10	126.41	132.02	198.24	206.67	145.08	158.02	195.36	199.12	112.19	124.86	197.19	174.96	244.09	237.57	190.18	137.94	235.39	239.23
ลูกชาย (PM85)	PM85	♂	110.29	112.12	126.51	131.39	198.23	206.6	145.05	158.03	195.23	199.12	112.23	124.91	196.99	174.91	244.13	237.44	190.19	137.82	234.92	239.81
ลูกสาว (PM83)	PM83	♀	110.26	112.18	125.51	131.97	198.53	206.8	145.04	158.94	195.33	199.11	112.18	124.79	166.61	174.94	244.48	237	190.12	137.84	235.27	238.79

- บวกรหัสดีเอ็นเอลูกได้มาจากพ่อ

- บวกรหัสดีเอ็นเอลูกได้มาจากแม่

- บวกรหัสดีเอ็นเอลูกได้มาจากพ่อและแม่

ตารางแสดงการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางเครือญาติของกระบือ ที่เป็นแม่-ลูกกันซึ่งลูกได้รับชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากแม่มาครบทั้ง 10 เครื่องหมาย

T1641U DNA Fingerprint Analysis

ชื่อผู้เลี้ยง/เจ้าของ	รหัส DNA	รหัส PCR	เพศ	DOB	Primer ที่ใช้ทดสอบ (Bovine KR)																หมายเหตุ					
					TGLA227	BM12113	TGLA53	ETH10	SP5115	TGLA126	TGLA122	INRA23	ETH3	ETH225	BM1824											
อุทัยดา	P11134	P275	ตัวผู้	81.93	81.93	122.56	122.56	158.52	158.52	209.33	216.87	244.12	246.04	116.93	116.93	135.47	143.13	206.96	211.99	112.23	112.2	155.65	155.65	179.75	181.82	เจนีออนแม่ทั้ง 11 ตัวบน
นาอัฐิ	P11135	P276	ตัวเมีย	77.07	81.96	122.6	122.6	158.6	158.6	216.73	216.73	243.9	245.83	116.94	123.29	143.16	143.16	206.17	211.93	112.31	112.3	155.65	155.65	179.78	181.85	

ชื่อเจ้าของ	รหัส DNA	รหัส PCR	เพศ	Primer ที่ใช้ทดสอบ (Bovine KR)														หมายเหตุ								
	TGLA227			TGLA53		SP5115		TGLA122		INRA23	ETH3		BM1824													
อุทัยดา	P11134	P275	ตัวผู้	81.93	81.93	122.56	122.56	158.52	158.52	209.33	216.87	244.12	246.04	116.93	116.93	135.47	143.13	206.96	211.99	112.23	112.22	155.65	155.65	179.75	181.82	เจนีออนแม่ 7 ตัวบน
นาอัฐิ	P11136	P277	ตัวเมีย	77.48	81.97	126.68	134.41	158.5	162.61	207.37	211.11	245.85	251.66	125.64	125.64	154.29	163.05	211.96	211.96	112.39	116.6	143.57	150.24	179.64	179.64	เจนีออนแม่ 4 ตัวบน

- ขนาดของเอ็นเอของลูกโคที่ได้นั้นมาจากแม่ตัวผู้

- ขนาดของเอ็นเอของลูกโคที่ได้นั้นมาจากแม่ตัวเมีย

ตารางแสดงการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางเครือญาติ (แม่-ลูก) ในกรณีพิพาทสิทธิ์โคหลงฝูง ผลการวิเคราะห์โคจำนวน 3 ตัว ซึ่งลูกโคได้รับชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากแม่ตัวหนึ่งมาครบทั้ง 11 เครื่องหมาย และจากแม่โคที่ส่งสัยอีกตัวหนึ่งมาไม่ครบทั้ง 11 เครื่องหมาย

บทที่ 8

การรายงานผล

เมื่อห้องปฏิบัติการตรวจและวิเคราะห์ผลเสร็จแล้ว จะพิมพ์รายงานผลให้หัวหน้าหน่วยฯ ตรวจสอบความถูกต้อง และเจ้าหน้าที่ของหน่วยฯ ร่างหนังสือส่งรายงานผลถึงหน่วยงานที่ส่งตัวอย่าง โดยอธิบดีกรมปศุสัตว์เป็นผู้ลงนาม



บรรณานุกรม

ณชัย ศรราชพันธุ์ กัลยา เก่งวิทย์กรรม สายใจ ชื่นสุข และ ณัฐนันท์ ศิริรัตนัญญะ
กุล 2555 การตรวจความเป็นพ่อ-แม่-ลูกในกระป๋องปลักไทยโดย
microsatellite markers บทคัดย่อ: การประชุมวิชาการแห่งชาติ
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 9, 362

ภาคผนวก

ส่วนประกอบสารละลายที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Salt-Out

Buffer A

NH_4Cl 1.875 g

Tris-HCl 0.25 g

Double distilled water 500 ml

Adjust pH 7.2, autoclave, and store at 4°C

Buffer B

Stock Solution

100 mM KCl 300 ml

100 mM Tris-HCl, pH 8.3 100 ml

10 mM MgCl_2 200 ml

TE buffer

10 mM Tris HCl, pH 7.5

1 mM EDTA

ประวัติผู้เขียน



- ชื่อ : ฌชัย ศรราชพันธุ์
- ชื่อเดิม : สุขชาติ ศรราชพันธุ์
- นพพร ศรราชพันธุ์
- วัน เดือน ปี เกิด : 22 ตุลาคม 2499
- จังหวัด : สุพรรณบุรี
- การศึกษา : วท.บ., สพ.บ. (มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์)
Ph.D. (Hokkaido University, Japan)
- สถานที่ทำงาน : 2524-2529 ศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์ภาคตะวันออก
เจียงเหินอ ต.ท่าพระ อ. เมือง จ. ขอนแก่น
- 2530-2549 สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ แขวงลาดยาว
เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร
- 2550-ปัจจุบัน สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์
ต.บางกะดี อ. เมือง จ. ปทุมธานี

คู่มือการเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจอัลกัมและอณูนิติวิทยาศาสตร์ทางสัตว์

ISBN 978-974-682-377-7