

การตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอเพื่อระบุชนิดของสัตว์ป่าในงานนิติวิทยาศาสตร์

จิตติกา กิจพิพิธ^{1*} และ ภาวตุล ธนะเกียรติไกร¹

บทคัดย่อ

นิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่าเป็นสาขาที่ได้รับความสนใจและมีการนำไปใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายในหลายประเทศทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย ลักษณะของงานนิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่าส่วนมากเป็นการระบุชนิดของสัตว์ (Species Identification) จากชิ้นส่วนวัตถุพยานสัตว์ป่าที่เก็บรวบรวมได้จากสถานที่เกิดเหตุหรือตรวจยึดได้จากผู้ต้องสงสัย เพื่อประโยชน์ในการบังคับใช้กฎหมายหรืออนุสัญญาคุ้มครองสัตว์ป่าทั้งในและระหว่างประเทศ เนื่องจากวัตถุพยานสัตว์ป่าส่วนมากพบในปริมาณน้อย เป็นเศษชิ้นส่วนอวัยวะสัตว์ป่า มีลักษณะเสื่อมสภาพหรือผ่านการแปรรูป จึงไม่สามารถระบุชนิดของสัตว์ป่านั้นๆ ได้โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ดังนั้นการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งและใช้เป็นเครื่องมือในการสืบสวนสอบสวนเพื่อวัตถุประสงค์ดังกล่าว บทความนี้จะรวบรวมข้อมูลสำคัญที่เกี่ยวข้องอันได้แก่ ความสำคัญของงานนิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่า ตัวอย่างวัตถุพยานสัตว์ป่า วัตถุประสงค์การนำไปใช้และการเก็บรวบรวมวัตถุพยานเหล่านี้เพื่อการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ เครื่องหมายพันธุกรรมที่นิยมในการระบุชนิดสัตว์ป่า หลักการและเทคนิคที่ทันสมัยและนิยมใช้ในการระบุชนิดของสัตว์ป่า รวมถึงทิศทางการวิจัยในอนาคต ทั้งนี้เพื่อประโยชน์ในสายงานหรืองานวิจัยทางนิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่าต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: ดีเอ็นเอ การระบุชนิด สัตว์ป่า นิติวิทยาศาสตร์

¹ อาจารย์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

* ผู้นิพนธ์ประสานงาน โทรศัพท์ 0-7428-8565 อีเมล: thitika.k@psu.ac.th



Wildlife Forensic DNA Analysis for Species Identification

Thitika Kitpipit^{1*} and Phuvadol Thanakiatkrai¹

Abstract

Wildlife forensics is a growing field of study. It has been used in forensic investigations worldwide, including Thailand. The main line of work in wildlife forensics is species identification from body parts collected from crime scenes and suspects. This information aids law enforcement, multinational regulations, and monitoring efforts. Processed body parts and trace samples encountered often limit the use of morphology for species identification; thus DNA-based identification methods play a central investigative role in such cases. This review

summarizes the current literature on wildlife forensics: its significance; commonly encountered sample types; factors leading to hunting and poaching; proper sample collection for DNA analysis; popular DNA markers for species identification; and current widely used techniques for species identification. The purpose of this review is to raise awareness of the current situation among practitioners and to serve as a platform for further research projects.

Keywords: DNA, Species Identification, Wildlife, Forensic Science

¹ Lecturer, Department of Applied Science, Faculty of Science, Prince of Songkla University.

* Corresponding Author, Tel 0-7428-8565, E-mail: thitika.k@psu.ac.th

1. บทนำ

การลักลอบล่าและค้าสัตว์ป่าหรือผลิตภัณฑ์จากชิ้นส่วนของสัตว์ป่าเป็นปัญหาที่พบทั่วโลก ซึ่งส่งผลกระทบต่อทั้งในด้านการสูญเสียทรัพยากรธรรมชาติ ความไม่สมดุลของระบบนิเวศน์ รวมถึงการสูญเสียงบประมาณมหาศาลในการแก้ปัญหาดังกล่าว [1] การลักลอบค้าสัตว์ป่ามักกระทำเป็นขบวนการในลักษณะของการค้าเชิงพาณิชย์ที่ผิดกฎหมายแต่ให้ผลตอบแทนต่อผู้กระทำผิดสูง ส่งผลให้มีการลักลอบล่าสัตว์ป่าหลายชนิดเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนสัตว์ป่าหลายชนิดอยู่ในภาวะใกล้สูญพันธุ์

เพื่อป้องกันการลดจำนวนทรัพยากรสัตว์ป่าหลายชนิด อันจะนำไปสู่การสูญพันธุ์ของสัตว์เหล่านั้นในที่สุด สัตว์ป่าดังกล่าวจึงได้รับการคุ้มครองภายใต้กฎหมายของแต่ละประเทศและความร่วมมือระหว่างนานาประเทศ โดยมีการจัดตั้งองค์กรหรือหน่วยงานเพื่อป้องกันการล่า ควบคุมการค้า การนำเข้าและส่งออกสัตว์ป่าเหล่านี้ระหว่างประเทศ องค์กรหรือเครือข่ายความร่วมมือดังที่กล่าวข้างต้น ได้แก่ อนุสัญญาไซเตส (CITES: Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) เครือข่ายทราฟฟิค (TRAFFIC: Wildlife Trade Monitoring Network) และเครือข่ายอาเซียนเวน (ASEAN-WEN: ASEAN-Wildlife Enforcement Network) เป็นต้น

นิติวิทยาศาสตร์มีบทบาทสำคัญในการบังคับใช้กฎหมายคุ้มครองสัตว์ป่า โดยนำหลักการทางวิทยาศาสตร์มาตรวจพิสูจน์เพื่อประโยชน์ในการตัดสินความผิดเรื่อง การครอบครองสัตว์ป่าหรือชิ้นส่วนของสัตว์ป่าอย่างผิดกฎหมาย ลักษณะของงานส่วนมากเป็นการระบุชนิดสัตว์ป่าจากวัตถุพยานที่ส่งมาตรวจพิสูจน์ อย่างไรก็ตามหลักฐานที่ตรวจพบในงานอาชญากรรมสัตว์ป่านี้นั้น มักมีปริมาณน้อย มีขนาดเล็ก (Trace Evidence) เป็นวัตถุพยานที่มีอายุมาก เสื่อมสภาพเนื่องจากได้รับอิทธิพลจากสภาพแวดล้อมรอบในที่เกิดเหตุ หรือผ่านการแปรรูปด้วยสารเคมีหรือวิธีการทางกายภาพต่างๆ เพื่อการค้า

การตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอจึงเป็นเครื่องมือสำคัญที่สามารถใช้เพื่อตอบสนองต่อวัตถุประสงค์ดังกล่าวได้เป็นอย่างดี ดังนั้น บทความนี้จึงรวบรวมเทคนิค กระบวนการ หลักการ และงานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการตรวจพิสูจน์ระบุชนิดของสัตว์ป่าในงานนิติวิทยาศาสตร์ด้วยวิธีการทางดีเอ็นเอ เพื่อเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจ นักนิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่า หรือนักวิจัย ในการนำไปใช้ปฏิบัติงานจริงหรือเพื่อพัฒนางานวิจัยที่เกี่ยวข้องในอนาคต

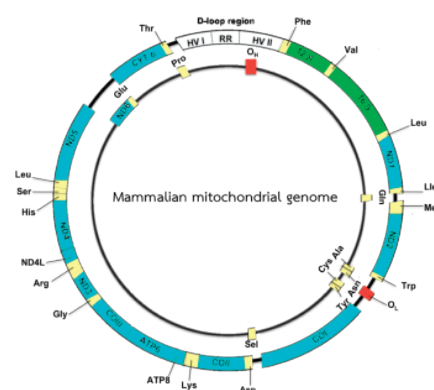
2. ชนิดของสัตว์ป่า ประเภทของวัตถุพยานและการเก็บรวบรวมเพื่อการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ

ประเภทของสัตว์ป่าที่นิยมลักลอบล่าและค้าขายมักเป็นสัตว์ป่าหายากหรือใกล้สูญพันธุ์ มีตั้งแต่สัตว์จำพวกนก สัตว์เลื้อยคลาน แมลง ปลาและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมขนาดใหญ่ [2] สัตว์เหล่านี้ถูกล่าและค้าเพื่อสนองต่อวัตถุประสงค์ที่หลากหลาย อันได้แก่ เพื่อใช้เป็นเครื่องประดับ เครื่องแต่งกาย เพื่อประกอบธุรกิจการบันเทิงหรือพักผ่อน เช่น ละครสัตว์ หรือปางช้าง เพื่อการสะสมหรือตกแต่งบ้าน เช่น ชิ้นส่วนกะโหลกเขาสัตว์ป่า หรือผิวหนังติดขนของสัตว์บางชนิด เช่น เสือ นอกจากนี้การล่าสัตว์ปายังอาจทำเพื่อการกีฬาเป็นสัตว์เลี้ยง ประกอบอาหารหรือเครื่องดื่มบางชนิด เช่น ไวน์จากกระดูกเสือ [3] และที่สำคัญมีการนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของเครื่องปรุงยาจีนและเวชภัณฑ์ต่างๆ โดยมีความเชื่อในเรื่องการรักษาโรค รวมทั้งการใช้เป็นยาชูกำลังหรือเพื่อเพิ่มสมรรถภาพทางเพศทั้งนี้ความเชื่อดังกล่าวไม่มีผลการวิจัยยืนยันประสิทธิภาพของยาหรือผ่านการรับรองทางวิทยาศาสตร์การแพทย์แต่อย่างใด ตัวอย่างสัตว์ป่าที่นิยมใช้เป็นส่วนประกอบในยาจีน ได้แก่ ชิ้นส่วนอวัยวะจากเสือโคร่ง (*Panthera tigris*) นอแรด (*Ceratotherium simum*) สัตว์เท้ากบ (*Cervus spp.*) สัตว์ตระกูลหมี (*Ursus spp.*) นกนางแอ่น (*Aerodramus spp.*) เป็นต้น [4]-[6]

เนื่องด้วยวัตถุประสงค์ในการล่าสัตว์ป่าดังที่กล่าวมาข้างต้น ทำให้ประเภทและลักษณะของวัตถุพยาน

สัตว์ป่าที่ส่งมาตรวจพิสูจน์มีหลากหลาย ตั้งแต่สัตว์ป่าที่ยังมีชีวิต ชี้นเนื้อ เนื้อเยื่อ อวัยวะส่วนใดส่วนหนึ่ง เส้นขน ชี้นหรือผงกระดูก นอแรด งาช้าง เครื่องดื่มหรือยาจีนที่คาดว่าจะมีส่วนผสมของสัตว์ป่า สารคัดหลั่งจากสัตว์ป่า เช่น เลือดหรือคราบเลือด อุจจาระ ปัสสาวะ เป็นต้น วัตถุพยานบางประเภทที่ตรวจพบอาจมีลักษณะเสื่อมสภาพเนื่องจากการแปรรูปด้วยสารเคมีหรือวิธีการทางกายภาพต่างๆ เช่น การดัดแปลงงาช้างเป็นเครื่องประดับหรือมีขนาดเล็กและพบในปริมาณน้อยมาก เช่น การตรวจพบเส้นขนสัตว์เพียงไม่กี่เส้นในกรงขัง ในขณะที่สัตว์ป่าถูกเคลื่อนย้ายออกจากพื้นที่แล้ว

ในการค้นหาและเก็บรวบรวมวัตถุพยานหลักฐานดังกล่าว นักนิติชีววิทยาต้องคำนึงถึงการป้องกันการปนเปื้อนของวัตถุพยานที่เกี่ยวข้องกับคดี กับสารคัดหลั่งของสิ่งมีชีวิตจากแหล่งอื่นๆ ที่ไม่เกี่ยวข้องทั้งจากบริเวณสถานที่เกิดเหตุ จากห้องปฏิบัติการ หรือจากเจ้าหน้าที่ [7] การจัดการหรือการเก็บรวบรวมวัตถุพยานทางชีวภาพที่ไม่เหมาะสม จะทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของตัวอย่างทางชีวภาพ ซึ่งจะส่งผลให้เกิดความสับสนหรือเกิดความผิดพลาดในการตีความผลการวิเคราะห์จากหลักฐานดังกล่าว วิธีการที่ใช้ในการเก็บรวบรวมวัตถุพยานทางชีวภาพแต่ละประเภทในงานนิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่ามีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิด สภาพของวัตถุพยานและขนาดของหลักฐานที่เป็นวัตถุพยานทางชีวภาพ [8]-[10] เช่น วัตถุพยานทางชีวภาพที่มีขนาดเล็กและสามารถเคลื่อนย้ายได้ เช่น ชี้นเนื้อ ชี้นกระดูก เส้นขน หรืออวัยวะส่วนใดส่วนหนึ่ง ควรแยกเก็บใส่ภาชนะที่สะอาดและมีความเหมาะสม เช่น ซองกระดาษ ส่วนสารคัดหลั่งที่มีสภาพแห้งซึ่งอยู่บนหลักฐานหรือวัตถุขนาดใหญ่ เช่น คราบเลือดติดกรงขัง สามารถเก็บรวบรวมได้โดยเขี่ยตรงบริเวณคราบต้องสงสัยด้วยไม้พันสำลีปลอดเชื้อที่ชุบด้วยน้ำกลั่น ด้วยวิธีดับเบิลสวอป (Double Swab) หรืออาจใช้วิธีการตัด/ขูด คราบต้องสงสัยนั้นๆ ออกจากวัสดุขนาดใหญ่ด้วยใบมีดปลอดเชื้อ ในขณะที่คราบต้องสงสัยที่มีสภาพเหลว อาจใช้เข็มฉีดยาดูดเก็บตัวอย่างเลือด



รูปที่ 1 โครงสร้างไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม [13]

ในปริมาณที่เหมาะสม จากนั้นโอนถ่ายไปเก็บในหลอดที่สะอาดผ่านการฆ่าเชื้อพร้อมทั้งใส่สารกันเลือดแข็ง เช่น EDTA (Ethylene-Diamine Tetraacetic Acid) หรือ Heparin เป็นต้น อีกวิธีหนึ่งคือสามารถเก็บรวบรวมได้โดยการซับด้วยไม้พันสำลีปลอดเชื้อและดีเอ็นเอเช่นเดียวกัน ทั้งนี้ควรทำให้ไม้พันสำลีเปื้อนคราบแห้งก่อนการเก็บในซองกระดาษเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดกิจกรรมของจุลินทรีย์ (Microbial Activity) อันจะก่อให้เกิดการเสียหายของวัตถุพยานนั้นๆ และส่งผลเสียต่อการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอต่อไป

3. การใช้ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอเพื่อระบุชนิดของสัตว์ป่า

3.1 ความสำคัญของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอในการตรวจพิสูจน์

โครงสร้างไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอของยูคาริโอตมีลักษณะเป็นวงกลมสายคู่ ประกอบด้วย Heavy Strand (H-strand) และ Light Strand (L-strand) มีขนาดประมาณ 16,000 เบส ที่ประกอบด้วยยีนทั้งหมด 37 ยีน โดยเป็นยีนที่ถอดรหัสเป็น Transfer RNA (tRNA) จำนวน 22 ยีน ถอดรหัสเป็น Ribosomal RNA (rRNA) จำนวน 2 ยีน และแสดงออกเป็นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบหลักภายในเซลล์อีกจำนวน 13 ยีน [11] ดังรูปที่ 1 จำนวนยีนใน

ไมโทคอนเดรียลจีโนมของสัตว์จะคงที่ แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอาจมีการเปลี่ยนแปลงขึ้นอยู่กับความห่างทางสายวิวัฒนาการ [12]

ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอนิยมใช้ในการออกแบบดีเอ็นเอเป้าหมายเพื่อใช้ในการระบุชนิดของสัตว์ป่าจากวัตถุพยานในงานนิติวิทยาศาสตร์ อันเนื่องมาจากเหตุผลหลายประการ ดังนี้

ลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอมีความผันแปรสูงและมากกว่านิวเคลียร์ดีเอ็นเอ [14], [15] จึงพบความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์เบสในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอสูงระหว่างสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน (High Inter-species Variation) ในขณะที่เดียวกันความผันแปรเหล่านี้เกิดขึ้นน้อยมากระหว่างสมาชิกของสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน (Low Intra-species Variation) เนื่องจากกลไกธรรมชาติในการควบคุมความผันแปรในลำดับเบสส่วนนี้ เพื่อรักษาสภาพและองค์ประกอบของโปรตีนให้คงที่และไม่ให้ส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิต [16] คุณสมบัติดังกล่าวนี้จึงมีความสำคัญในการระบุจำแนกสิ่งมีชีวิตต่างชนิดออกจากกันได้อย่างน่าเชื่อถือ

ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอมีจำนวนซ้ำ (Copy Number) ต่อเซลล์มาก ในขณะที่นิวเคลียร์ดีเอ็นเอมีเพียง 2 ซ้ำ (Diploid Cell) ทั้งนี้จำนวนซ้ำของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในแต่ละเซลล์มีความแตกต่างกันด้วยขึ้นอยู่กับประเภทของเซลล์นั้นๆ ในเซลล์ที่ต้องการพลังงานมากจะมีออร์แกเนลไมโทคอนเดรียมาก ส่งผลให้จำนวนไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอมากขึ้นด้วยเป็นสัดส่วน เช่น เซลล์สืบพันธุ์เพศเมียมีจำนวนไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอมากกว่า 100,000 ซ้ำ [17] เซลล์ร่างกายมีประมาณ 200-1,700 ซ้ำ [18] เป็นต้น แต่โดยเฉลี่ยแล้วในเซลล์หนึ่งๆ จะมีไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอจำนวนประมาณ 400-500 ซ้ำ [19] คุณสมบัติของจำนวนไมโทคอนเดรียดังกล่าว มีประโยชน์อย่างยิ่งในการตรวจพิสูจน์วัตถุพยานนิติวิทยาศาสตร์ เนื่องจากโดยมากวัตถุพยานที่ส่งมาตรวจพิสูจน์มักมีดีเอ็นเอที่เสื่อมสภาพและมีปริมาณน้อยมาก การตรวจพิสูจน์ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอจากวัตถุพยาน

ดังกล่าวจึงมีโอกาสได้รับผลการตรวจพิสูจน์มากขึ้นเป็นทวีคูณหรือแม้กระทั่งจากเซลล์เพียงแค่เซลล์เดียวก็ตาม

ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมรอบนอกมากกว่านิวเคลียร์ดีเอ็นเอ (High Stability) จึงถูกรักษาสภาพได้ดีกว่าและมีอัตราการเสื่อมสภาพน้อยกว่า ทั้งนี้เนื่องจากโครงสร้างของไมโทคอนเดรียที่เป็นเยื่อหุ้มสองชั้นช่วยในการป้องกันการเสื่อมสภาพของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอจากสภาพแวดล้อม อาทิเช่น แสงแดด ความร้อน หรือเอนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ เป็นต้น [14], [20]

3.2 เครื่องหมายพันธุกรรมในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอที่นิยมในการระบุชนิดสัตว์ป่า

ยีนจากไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการระบุชนิดของสัตว์ป่าดังที่อธิบายไว้ข้างต้นนั้นมีหลากหลาย และมีรายงานการออกแบบและทดสอบการใช้งานจริงของเครื่องหมายโมเลกุลจากยีนเหล่านี้เป็นจำนวนมาก ทั้งนี้การนำยีนจากไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอมาใช้ในการระบุชนิดของสัตว์ป่าในงานนิติวิทยาศาสตร์นั้น มีแนวคิดมาจากงานวิจัยของ Kocher และคณะ [21] กับ Irwin และคณะ [22] ที่ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต (Phylogenetics) และมีการนำยูนิเวอร์แซลไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีนไซโตโครมบีไปใช้เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตเป้าหมายหลายชนิด ไพรเมอร์รูปแบบดังกล่าวจึงถูกนำมาใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากวัตถุพยานทางชีวภาพสัตว์ป่าที่ไม่ทราบชนิดที่แน่นอนเพื่อการสืบสวนสอบสวน ด้วยเหตุที่ยีนไซโตโครมบีถูกนำมาใช้ออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลในหลายสาขาวิจัยตั้งแต่แรกเริ่ม ทำให้นักวิจัยทราบลำดับเบสอ้างอิงของยีนดังกล่าวในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ประกอบกับคุณสมบัติที่เหมาะสมของยีนชนิดนี้ในการระบุชนิดของสัตว์ป่า ทำให้ยีนไซโตโครมบีเป็นที่รู้จักกันดีและนิยมใช้เพื่อระบุชนิดของสัตว์ป่าในงานนิติวิทยาศาสตร์เป็นอย่างมาก [23]-[25] ต่อมาในปี พ.ศ. 2546 มีการนำยีนไซโตโครมออกซิเดสหน่วยย่อยที่ 1 มาประยุกต์ใช้ในงาน

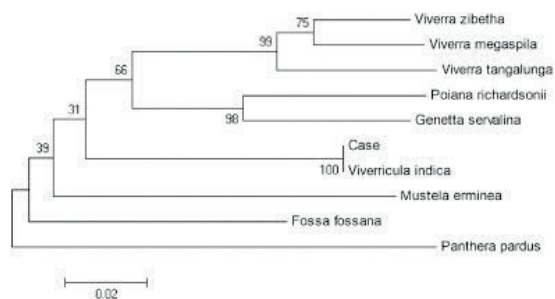
นิติวิทยาศาสตร์ในรูปแบบของบาร์โค้ด (Barcode) และจัดสร้างฐานข้อมูลลำดับเบสอ้างอิงของยีนดังกล่าว สำหรับสิ่งมีชีวิตที่ทราบแหล่งที่มาอย่างแน่ชัด หรือมีการระบุชนิดด้วยวิธีการทางสัณฐานวิทยาหรือวิธีอื่นๆ ที่น่าเชื่อถือ [26], [27] เพื่อการเปรียบเทียบกับตัวอย่างต้องสงสัยให้ได้ผลที่ถูกต้องและแม่นยำ อย่างไรก็ตามจากการเปรียบเทียบความแม่นยำในการระบุชนิดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมพบว่ายีนไซโตโครมบีให้ผลการระบุชนิดที่ถูกต้องมากกว่ายีนไซโตโครมออกซิเดส หน่วยย่อยที่ 1 เนื่องจากมีตำแหน่งเบสที่แตกต่างกันในสิ่งมีชีวิตต่างชนิด (Variable Sites) ที่สูงกว่า [28] นอกจากนี้ยีนอื่นๆ ที่มีรายงานการใช้ระบุชนิดของสัตว์ป่า ได้แก่ ยีน 16S rRNA [29]-[31] ยีน 12S rRNA [32],[33] หรือยีน NADH dehydrogenase subunit 1 (ND1) [34] เป็นต้น สำหรับเครื่องหมายพันธุกรรมจากลำดับเบสของไมโทคอนเดรียล ดีเอ็นเอที่ไม่มีการถอดรหัสเป็นโปรตีน (Control Region) นิยมนำมาใช้ในการระบุสายพันธุ์ของสัตว์ป่า (Subspecies Identification) มากกว่าการระบุชนิด [35],[36]

4. เทคโนโลยีดีเอ็นเอและรูปแบบการตรวจพิสูจน์ระบุชนิดสัตว์ป่า

ความสำเร็จในการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอเพื่อระบุชนิดของสัตว์ป่าในงานนิติวิทยาศาสตร์นั้น อาศัยหลักการใช้เทคโนโลยีทางดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพ และสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างเสื่อมสภาพหรือมีปริมาณน้อยได้ ร่วมกับการออกแบบไพรเมอร์ให้จับกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายบนยีนไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของสัตว์ต่างชนิด ที่มีความเหมือนหรือความแตกต่างกัน ณ ตำแหน่งหนึ่งๆ (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) ทั้งนี้สามารถแบ่งออกได้

4.1 การใช้ยูนิเวอร์แซลไพรเมอร์ (Universal Primer) ร่วมกับเทคนิคการหาลำดับเบส (DNA Sequencing)

ยูนิเวอร์แซลไพรเมอร์ คือไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากบริเวณของดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีลำดับเบสเหมือนกัน



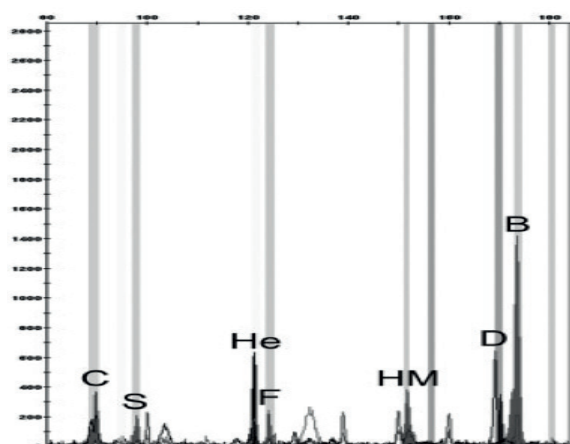
รูปที่ 2 ตัวอย่างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetics Tree) ที่ใช้ระบุชนิดของชะมดเช็ด (Viverricula Indica) จากวัตถุพยานทางนิติวิทยาศาสตร์ ด้วยวิธี Forensically Informative Nucleotide Sequencing (FINS) [38]

(Conserved Region) ในสัตว์ชนิดต่างๆ ทำให้ไพรเมอร์ชนิดนี้สามารถจับกับดีเอ็นเอต้นแบบและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้จากสัตว์หลากหลายชนิด จากนั้นใช้เทคนิคการหาลำดับเบส (DNA Sequencing) ของดีเอ็นเอเป้าหมายที่ถูกเพิ่มปริมาณ และนำลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสอ้างอิงที่ทราบชนิดของสิ่งมีชีวิต ซึ่งจะบรรจุอยู่ในฐานข้อมูลต่างๆ เช่น ฐานข้อมูล GenBank หรือ DNA Database of Japan (DDBJ) หรือ European Molecular Biology Laboratory (EMBL) ผลที่ได้รับจากการเปรียบเทียบตัวอย่างที่ตรวจพิสูจน์กับลำดับเบสอ้างอิงในฐานข้อมูลจะออกมาในรูปแบบของเปอร์เซ็นต์ Nucleotide Similarity ทำให้สามารถประเมินได้ว่าตัวอย่างที่ส่งมาตรวจพิสูจน์มาจากสิ่งมีชีวิตชนิดใดเป็นสัตว์ป่าสงวนหรือสัตว์ป่าคุ้มครองหรือไม่เพื่อกำหนดคดีทางกฎหมายต่อไป ในกรณีที่ทราบข้อมูลเบื้องต้นว่าวัตถุพยานต้องสงสัยมาจากสัตว์ป่าชนิดใด อาจระบุชนิดสัตว์ป่าเพื่อยืนยันผลการตรวจพิสูจน์จากสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetics Tree) ที่สร้างมาจากลำดับเบสที่ได้จากวัตถุพยานต้องสงสัยและจากสัตว์ที่มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกัน ซึ่งมีชื่อเรียกว่า Forensically Informative Nucleotide Sequencing (FINS) [37],[38] ดังรูปที่ 2

ในปัจจุบันมีการรายงานยูนิเวอร์แซลไพรเมอร์เพื่อการระบุชนิดของสัตว์ป่าจำนวนมาก ที่ได้ผ่านการทวนสอบการใช้งานได้จริง (Validation) สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากกลุ่มสัตว์ป่าหลากหลายประเภท เช่น สัตว์มีกระดูกสันหลัง [39] สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม [40] นก หรือสัตว์เลื้อยคลาน [41] รวมทั้งสัตว์ที่นิยมล่าในงานนิเวศวิทยา [42] เป็นต้น วัตถุประสงค์ในงานนิเวศวิทยาของสัตว์ป่าส่วนมากที่ส่งมาตรวจพิสูจน์นั้นไม่ทราบแหล่งที่มาจึงต้องอาศัยวิธีการนี้ในการตรวจพิสูจน์ นอกจากนี้มีรายงานการใช้เทคนิคเนสต์พีซีอาร์ (Nested PCR) [43] หรือไดเรกต์พีซีอาร์ (Direct PCR) ในการตรวจพิสูจน์สัตว์ป่าซึ่งพบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจพิสูจน์สัตว์ป่าปริมาณน้อยได้ อีกทั้งยังมีรายงานการใช้เทคนิค Pyrosequencing ในการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม [44] เพื่อวัตถุประสงค์นี้อีกด้วย อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวมีข้อจำกัดในการตรวจพิสูจน์ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอสัตว์ป่ามากกว่า 1 ชนิด เนื่องจากเทคนิคการหาลำดับเบส (DNA Sequencing) ไม่สามารถประยุกต์ใช้กับตัวอย่างดังกล่าวได้

4.2 ใช้การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับสัตว์แต่ละชนิด (Species-specific Primer) ร่วมกับเทคนิคพีซีอาร์

วิธีนี้เริ่มจากการตรวจหาตำแหน่งบนดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีความแตกต่างกันของเบส (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) ระหว่างสัตว์เป้าหมายและสัตว์ชนิดอื่นๆ ในขณะที่ยีนกลายพันธุ์ตำแหน่งดังกล่าวต้องเหมือนกันในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน จากนั้นออกแบบไพรเมอร์ให้จับกับบริเวณดังกล่าวโดยให้ลำดับเบสที่ต่างกันนี้อยู่ตรงส่วนปลาย 3 ของไพรเมอร์ ดังนั้นเฉพาะดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายเท่านั้นที่จะถูกเพิ่มปริมาณได้สำเร็จในขั้นตอนของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณขึ้นนี้อาจตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส หรือแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส ดังรูปที่ 3 ข้อดีของเทคนิคดังกล่าว คือมีความจำเพาะกับสัตว์เป้าหมายสูง



รูปที่ 3 ตัวอย่างอิเล็กโทรโฟรีแกรมที่ใช้ระบุชนิดสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจำนวน 7 ชนิด (C คือวัว S คือแกะ He คือเม่นแคระ F คือสุนัขจิ้งจอก HM คือหนูหริ่งบ้าน D คือสุนัข และ B คือแบดเจอร์) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับสัตว์แต่ละชนิด (Species-specific Primer) ร่วมกับเทคนิคพีซีอาร์ และการตรวจสอบดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส ทั้งนี้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับสัตว์แต่ละชนิด จะถูกออกแบบให้สร้าง PCR Product ที่มีขนาดต่างกันสำหรับสัตว์เป้าหมายต่างชนิด จึงทำให้ปรากฏฟีดของสัตว์ทั้ง 7 ชนิด ณ ตำแหน่งที่ต่างกันบนแกน x ของอิเล็กโทรโฟรีแกรม (ดัดแปลงจาก [45])

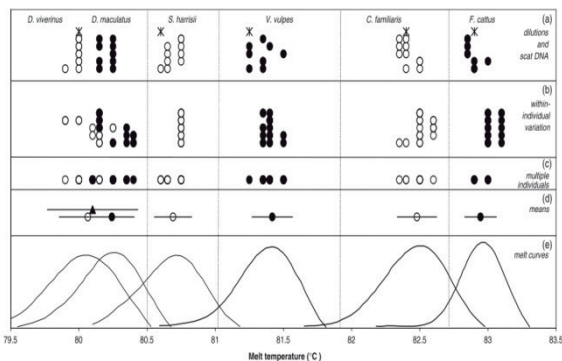
สามารถตรวจพิสูจน์ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอสัตว์เป้าหมายกับสัตว์ชนิดอื่นๆได้ เป็นวิธีที่ง่ายและค่าตรวจวิเคราะห์ไม่แพง [45] แต่ข้อจำกัด คือต้องทราบข้อมูลเบื้องต้นของตัวอย่างที่ส่งมาตรวจพิสูจน์เพื่อใช้ในการเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมกับตัวอย่างนั้นๆ

ในปัจจุบันมีงานวิจัยจำนวนมากที่ได้ทำการพัฒนาชุดทดสอบระบุชนิดของสัตว์ป่าหลากหลายชนิดด้วยเทคนิคดังกล่าว พร้อมทั้งทำการทวนสอบการใช้งานได้จริง (Validation) ทั้งในเรื่องความจำเพาะกับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมาย (Specificity Test) ความไวใน

การตรวจพิสูจน์ (Sensitivity Test) ความแม่นยำในการซ้ำ (Reproducibility) เป็นต้น เพื่อใช้ในการนิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่า ชุดทดสอบนี้มีการพัฒนาทั้งในรูปแบบของซิงเกิลเพลกซ์พีซีอาร์ (Singleplex PCR) เพื่อระบุชนิดของสัตว์เป้าหมายเพียงชนิดเดียว [24] หรืออาจพัฒนาในรูปแบบเนสต์พีซีอาร์ (Nested PCR) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการระบุชนิดของสัตว์เป้าหมายจากตัวอย่างที่มีปริมาณดีเอ็นเอน้อย เช่น ชุดทดสอบระบุชนิดของช้างจากงาช้าง [46], [47] เต่า [48] หรือเสือ [49] เป็นต้น หรืออาจพัฒนาในรูปแบบของมัลติเพลกซ์พีซีอาร์ (Multiplex PCR) เช่น ชุดทดสอบเพื่อระบุสายพันธุ์ของจระเข้ที่นิยมล่า (Meganathan) ชุดระบุชนิดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจำนวน 18 ชนิด [45] หรือชุดระบุชนิดของเสือ [50] เป็นต้น ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพที่ดีกว่าและลดความคลาดเคลื่อนในการระบุชนิดได้มากกว่าชุดทดสอบรูปแบบซิงเกิลเพลกซ์ [45], [50]

4.3 ใช้การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับสัตว์แต่ละชนิด (Species-specific Primer) ร่วมกับเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์

วิธีนี้ใช้ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับสัตว์แต่ละชนิด เช่นเดียวกับที่ได้อธิบายไว้ในหัวข้อ 4.2 แต่ทำการเพิ่มวัดปริมาณและตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์แบบสัมบูรณ์ (Absolute Quantification) ซึ่งให้ข้อมูลทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ โดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์แบบดั้งเดิม (Conventional PCR) แต่ทำการตรวจวัด PCR Product ที่เพิ่มขึ้นจากตัวอย่างในระหว่างที่ปฏิกิริยาพีซีอาร์กำลังดำเนินไป เปรียบเทียบกับการเพิ่มขึ้นของ PCR Product จากดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบปริมาณที่แน่นอน ทำให้สามารถคาดคะเนดีเอ็นเอตั้งต้นจากตัวอย่างได้ ทั้งนี้การระบุชนิดของสัตว์ป่าอาจใช้การติดตามผลที่ต่างกัน ในสัตว์แต่ละชนิด และตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นจากผลลานั้นๆ หรืออาศัยการออกแบบให้ PCR Product ของสัตว์แต่ละชนิดมีค่า Melting Temperature



รูปที่ 4 ตัวอย่าง Melting Curve ที่ใช้ระบุชนิดสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจำนวน 6 ชนิดโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับสัตว์แต่ละชนิด (Species-specific Primer) ร่วมกับเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ [54]

ที่ต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 4 ข้อดีของเทคนิคดังกล่าวคือมีความจำเพาะและความไวสูงมาก จึงสามารถตรวจวิเคราะห์วัตถุพยานที่พบดีเอ็นเอปริมาณน้อยมาก อันเนื่องมาจากการเสื่อมสภาพ มีอายุมากหรือผ่านการแปรรูป ซึ่งไม่สามารถตรวจวัดด้วยเทคนิคพีซีอาร์แบบดั้งเดิมได้

ในปัจจุบันมีงานวิจัยที่ได้พัฒนาชุดทดสอบระบุชนิดของสัตว์ป่าหลายชนิดด้วยเทคนิคดังกล่าวในรูปแบบของมัลติเพลกซ์พีซีอาร์ (Multiplex PCR) เช่น การระบุชนิดของช้างและสายพันธุ์ใกล้เคียงจากชิ้นส่วนงาช้างที่ผ่านการแปรรูป [51] การระบุชนิดของหมาไม่ตันทนและหมาจิ้งจอกแดงจากอุจจาระ [52] การระบุชนิดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหรือสัตว์จำพวกนกต้องห้าม [53] การระบุชนิดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่กินเนื้อและพบในเทสมาเนียประเทศออสเตรเลียจำนวน 6 ชนิด [54] เป็นต้น โดยชุดทดสอบดังกล่าวได้ผ่านการทดสอบการใช้งานได้จริง (Validation) ทั้งในเรื่องความจำเพาะกับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมาย (Specificity Test) ความไวในการตรวจพิสูจน์ (Sensitivity Test) ความแม่นยำในการซ้ำ (Reproducibility) เพื่อใช้ในการนิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่า

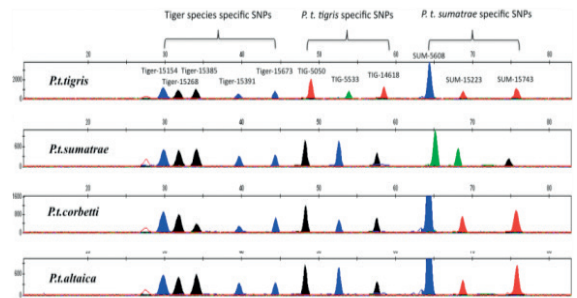
4.4 การจัดทำลายพิมพ์สปีส์ (SNP Typing)

วิธีนี้เริ่มจากการตรวจหาตำแหน่งบนดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันของเบส (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) ระหว่างสัตว์เป้าหมายและสัตว์ชนิดอื่นๆ เช่นเดียวกับที่ได้อธิบายไว้ในหัวข้อ 4.2 และอาศัยการจัดทำลายพิมพ์ SNP ตำแหน่งดังกล่าวเพื่อระบุชนิดของสัตว์เป้าหมาย ซึ่งเป็นเทคนิคที่เรียกว่า แสแนปช็อตมัลติเพลกซ์พีซีอาร์ (SNaPshot Multiplex PCR) โดยเริ่มจากการทำมัลติเพลกซ์พีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนที่ครอบคลุมตำแหน่ง SNP ทั้งหมด ดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณนี้จะใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำพีซีอาร์ครั้งถัดไปด้วยการใช้สแนปชอตไพรเมอร์ ซึ่งออกแบบให้มีขนาดต่างกันและจับดีเอ็นเอต้นแบบในตำแหน่งที่ปลาย 3 ของไพรเมอร์ติดกับ SNP เป้าหมาย ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ครั้งที่สองนี้ยังใช้ไดดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ (ddNTPs) ที่ติดฉลากสีต่างกันในแต่ละเบสแต่ละชนิด เพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอเส้นใหม่ ซึ่งทำให้เกิดการเข้าจับของไดดีออกซีนิวคลีโอไทด์เบสคู่สมยึดขยายออกจากสแนปชอตไพรเมอร์ได้เพียงตำแหน่งเดียวซึ่งก็คือตำแหน่ง SNP นั้นเอง ชิ้นส่วนลำดับเบสของสแนปชอตไพรเมอร์และ SNP ที่ถูกเพิ่มปริมาณขึ้นนี้สามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิคแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส

ในปัจจุบันมีรายงานการพัฒนาชุดทดสอบ แสแนปช็อตมัลติเพลกซ์พีซีอาร์ เพื่อระบุชนิดและสายพันธุ์ของเสือโคร่ง ซึ่งได้ผ่านการทดสอบการใช้งานได้จริง (Validation) เพื่อใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่า [55] รวมทั้งใช้ในการระบุชนิดของสัตว์ป่าที่นิยมบริโภคจากตัวอย่างชิ้นเนื้อ [56] หรือระบุชนิดและสายพันธุ์ของหมาป่าจากอุจจาระ [57] เป็นต้น

5. งานวิจัยในอนาคต

แม้ว่ามีรายงานการวิจัยที่ระบุชนิดสัตว์ป่าจำนวนมากด้วยเครื่องหมายพันธุกรรมดีเอ็นเอดังที่รวบรวมไว้ในบทความนี้ แต่การนำเครื่องหมายทางพันธุกรรมดีเอ็นเอดังกล่าวไปใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์ ต้องผ่าน



รูปที่ 5 ตัวอย่างลายพิมพ์สปีส์ (SNP Typing) ของเสือโคร่งจำนวน 4 สายพันธุ์ [55]

ทวนสอบการใช้งานได้จริงดังอธิบายใน Linacre et al. [58] จึงมีความจำเป็นต้องพัฒนางานวิจัยในสาขานิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่าให้มีคุณภาพสอดคล้องกับระดับมาตรฐานที่กำหนดไว้โดยองค์กรที่เกี่ยวข้อง นอกจากนี้ อาจพัฒนาการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอเพื่อการระบุชนิดของสัตว์ป่าจากวัตถุพยานที่มีปริมาณน้อยหรือปนเปื้อนดีเอ็นเอมากกว่า 1 ชนิดขึ้นไปให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ลดขั้นตอนความยุ่งยากหรือให้มีค่าใช้จ่ายที่น้อยลง เช่น ทวนสอบการใช้งานจริงสำหรับเทคนิค Direct PCR ในการตรวจพิสูจน์วัตถุพยานสัตว์ป่า หรืออาจประยุกต์ใช้เทคโนโลยีดีเอ็นเอที่ทันสมัย เช่น Next Generation Sequencing (NGS) เป็นต้น

ประเทศไทยนับเป็นตลาดมืดแหล่งใหญ่ในโลกที่ค้ากลุ่มสัตว์ป่าเป้าหมายจำนวนหนึ่ง การพัฒนาชุดทดสอบหลายตำแหน่งเพื่อระบุชนิดของกลุ่มสัตว์ป่าเหล่านี้ในการตรวจพิสูจน์ครั้งเดียวจากเป็นประโยชน์ในสายงานอย่างยิ่ง นอกจากนี้การพัฒนาเทคนิคหรือนำเทคโนโลยีใหม่ๆ ใช้เพื่อการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอจากวัตถุพยานที่ตรวจยึดได้บ่อยครั้งหรือคดีที่พบเฉพาะในประเทศไทย เช่น การตรวจสอบกรณีลักลอบนำงาช้างแอฟริกามาสวมเป็นงาช้างไทยและค้าในประเทศไทย รวมถึงการระบุแยกช้างป่าและช้างบ้าน จะเอื้อต่อสายงานและมีผลในการบังคับใช้กฎหมายในประเทศไทยได้ดียิ่ง

7. สรุป

การตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอเพื่อระบุชนิดของสัตว์ป่าในงานนิติวิทยาศาสตร์สัตว์ นับว่าเป็นเครื่องมือหลักที่มีประโยชน์อย่างยิ่งในการบังคับใช้กฎหมายหรือนำสัญญาคุ้มครองสัตว์ป่าทั้งในและระหว่างประเทศ ซึ่งสามารถใช้ตรวจพิสูจน์วัตถุพยานในงานนิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่าได้อย่างมีประสิทธิภาพและครอบคลุมถึงวัตถุพยานหลากหลายประเภทหากอยู่บนพื้นฐานของการเก็บรวบรวมวัตถุพยานที่ถูกต้องและปราศจากการปนเปื้อน ทั้งนี้ความสำเร็จของกระบวนการตรวจพิสูจน์ดังกล่าวอาศัยการพัฒนาเครื่องมือเลกซ์จากไมโครคอนดริยลดีเอ็นเอทั้งในรูปแบบของยูนิเวอร์แซลไพรเมอร์ หรือไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อสัตว์แต่ละชนิด และการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีทางดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพและทันสมัย เช่น การหาลำดับเบส เทคโนโลยีพีซีอาร์ทั้งในรูปแบบดั้งเดิมหรือเรียลไทม์ แคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสเพื่อการตรวจสอบและวิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอร่วมกับการติดตามกลาสีเรืองแสงในรูปแบบต่างๆ เป็นต้น ซึ่งนับว่ามีคุณสมบัติเหมาะสมและเอื้อต่อการตรวจวิเคราะห์วัตถุพยานทางชีวภาพในงานนิติวิทยาศาสตร์ซึ่งมีลักษณะเสื่อมสภาพหรือมีปริมาณน้อยมาก

เอกสารอ้างอิง

- [1] WWF International, *Fighting illicit wildlife trafficking: A consultation with governments*, World Wide Fund for Nature, Gland, Switzerland., 2012.
- [2] L. Wilson-Wilde, "Combating wildlife crime," *Forensic Science, Medicine and Pathology*, vol.6, pp.149-50, 2010.
- [3] S. Stoner and N. Pervushina, "Reduced to Skin and Bones Revisited-An Updated Analysis of Tiger Seizures From 12 Tiger Range Countries (2000-2012)," in *TRAFFIC International*, Kuala Lumpur, Malaysia, Mar. 2013.
- [4] S. A. Mainka and J. A. Mills, "Wildlife and Traditional Chinese Medicine: Supply and Demand for Wildlife Species," *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, vol.26, pp.193-200, 1995.
- [5] Operation Charm partnership, *Traditional Chinese Medicine and Endangered Species*, Greater London Authority, London, UK, Mar. 2006.
- [6] J. Still, "Use of animal products in traditional Chinese medicine: environmental impact and health hazards," *Complementary Therapies in Medicine*, vol.11, pp.118-22, 2003.
- [7] N. J. Port, V. L. Bowyer, E. A. M. Graham, M. S. Batuwangala, and G. N. Rutty, "How long does it take a static speaking individual to contaminate the immediate environment?," *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, vol.2, pp.157-63, Sept. 2006.
- [8] H. C. Lee and H. A. Harris, *Physical evidence in forensic science*, Lawyers & Judges Publishing Company, 2000.
- [9] D. Warrington, "Evidence Packaging," *Forensic Magazine*, vol.5, 2008.
- [10] Orchid Cellmark. (2013, Apr.). Forensic Evidence Handling Guidelines. [Online]. Available: <http://cm3.missiondata.com/uploads/43/File/Forensic%20Evidence%20Handling%20Guidelines.pdf>
- [11] A. Linacre, *Forensic Science in Wildlife Investigations*, 1st ed. USA: Taylor and Francis, 2009.
- [12] J. L. Boore, "Animal mitochondrial genomes," *Nucleic Acids Research*, vol.27, pp.1767-80, Apr 15, 1999.
- [13] T. Kitpipit and A. Linacre, "The complete mitochondrial genome analysis of the tiger (*Panthera tigris*)," *Molecular Biology Reports*,



- pp.1-10, 2011.
- [14] L. A. Tully and B. C. Levin, "Human mitochondrial genetics," *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, vol.17, pp.147-77, 2000.
- [15] B. Budowle, M. W. Allard, M. R. Wilson, and R. Chakraborty, "Forensics and mitochondrial DNA: applications, debates, and foundations," *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, vol.4, pp.119-41, 2003.
- [16] A. Linacre and S. S. Tobe, "An overview to the investigative approach to species testing in wildlife forensic science," *Investigative Genetics*, vol.2, p.2, 2011.
- [17] M. M. Holland and T. J. Parsons, "Mitochondrial DNA Sequence Analysis-Validation and Use for Forensic Casework," *Forensic Science Review*, vol.11, pp.21-50, 1999.
- [18] E. D. Robin and R. Wong, "Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells," *Journal of Cellular Physiology*, vol.136, pp.507-13, Sep. 1988.
- [19] M. Satoh and T. Kuroiwa, "Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell," *Experimental Cell Research*, vol.196, pp.137-40, Sep. 1991.
- [20] S. S. Tobe and A. M. T. Linacre, "A technique for the quantification of human and non-human mammalian mitochondrial DNA copy number in forensic and other mixtures," *Forensic Science International: Genetics*, vol.2, pp.249-56, 2008.
- [21] T. D. Kocher, W. K. Thomas, A. Meyer, S. V. Edwards, S. Paabo, F. X. Villablanca, et al., "Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers," in *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Aug. 1989, vol.86, pp.6196-200.
- [22] D. M. Irwin, T. D. Kocher, and A. C. Wilson, "Evolution of the cytochrome b gene of mammals," *Journal of Molecular Evolution*, vol.32, pp.128-44, Feb. 1991.
- [23] H. M. Hsieh, H. L. Chiang, L. C. Tsai, S. Y. Lai, N. E. Huang, A. Linacre, et al., "Cytochrome b gene for species identification of the conservation animals," *Forensic Science International*, vol.122, pp.7-18, Oct 15. 2001.
- [24] Q. H. Wan and S. G. Fang, "Application of species-specific polymerase chain reaction in the forensic identification of tiger species," *Forensic Science International*, vol.131, pp.75-8, Jan 9. 2003.
- [25] H.-M. Hsieh, L.-H. Huang, L.-C. Tsai, Y.-C. Kuo, H.-H. Meng, A. Linacre, et al., "Species identification of rhinoceros horns using the cytochrome b gene," *Forensic Science International*, vol.136, pp.1-11, 2003.
- [26] M. A. Smith, N. A. Poyarkov, Jr., and P. D. Hebert, "DNA BARCODING: CO1 DNA barcoding amphibians: take the chance, meet the challenge," *Molecular Ecology Resources*, vol.8, pp.235-46, Mar. 2008.
- [27] P. D. N. Hebert, M. Y. Stoeckle, T. S. Zemlak, and C. M. Francis, "Identification of Birds through DNA Barcodes," *PLoS Biology*, vol.2, p.e312, 2004.
- [28] S. S. Tobe, A. C. Kitchener and A. M. Linacre, "Reconstructing mammalian phylogenies: a detailed comparison of the cytochrome B and cytochrome oxidase subunit I mitochondrial



- genes,” *PLoS One*, vol.5, p.e14156, 2010.
- [29] S. Mukherjee, A. Cn, C. Home, and U. Ramakrishnan, “An evaluation of the PCR-RFLP technique to aid molecular-based monitoring of felids and canids in India,” *BMC Research Notes*, vol.3, pp.159, 2010.
- [30] M. Vences, M. Thomas, A. van der Meijden, Y. Chiari, and D. R. Vieites, “Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians,” *Frontiers in Zoology*, vol.2, pp.5, Mar 16. 2005.
- [31] T. Mitani, A. Akane, T. Tokiyasu, S. Yoshimura, Y. Okii, and M. Yoshida, “Identification of animal species using the partial sequences in the mitochondrial 16S rRNA gene,” *Legal medicine* (Tokyo, Japan), vol.11, pp.S449-S50, 2009.
- [32] B. Balitzki-Korte, K. Anslinger, C. Bartsch, and B. Rolf, “Species identification by means of pyrosequencing the mitochondrial 12S rRNA gene,” *International Journal of Legal Medicine*, vol.119, pp.291-4, Sep. 2005.
- [33] T. Melton and C. Holland, “Routine Forensic Use of the Mitochondrial 12S Ribosomal RNA Gene for Species Identification,” *Journal of Forensic Sciences*, vol.52, pp.1305-7, 2007.
- [34] F. Mayer, C. Dietz, and A. Kiefer, “Molecular species identification boosts bat diversity,” *Frontiers in Zoology*, vol.4, p.4, 2007.
- [35] W. Zhang, Z. Zhang, F. Shen, R. Hou, X. Lv, and B. Yue, “Highly conserved D-loop-like nuclear mitochondrial sequences (Numts) in tiger (*Panthera tigris*),” *Journal of Genetics*, vol.85, pp.107-16, Aug. 2006.
- [36] S. L. Clifford, N. M. Anthony, M. Bawe-Johnson, K. A. Abernethy, C. E. Tutin, L. J. White, et al., “Mitochondrial DNA phylogeography of western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*),” *Molecular Ecology*, vol.13, pp. 1551-65, 67, Jun. 2004.
- [37] S. E. Bartlett and W. S. Davidson, “FINS (forensically informative nucleotide sequencing): A procedure for identifying the animal origin of biological specimens,” *Biotechniques*, vol.13, pp.518, Oct. 1992.
- [38] V. Sahajpal and S. P. Goyal, “Identification of a forensic case using microscopy and forensically informative nucleotide sequencing (FINS): A case study of small Indian civet (*Viverricula indica*),” *Science and Justice*, vol.50, pp.94-7, Jun. 2010.
- [39] T. Kitano, K. Umetsu, W. Tian, and M. Osawa, “Two universal primer sets for species identification among vertebrates,” *International Journal of Legal Medicine*, vol.121, pp.423-7, 2007.
- [40] A. Naidu, R. R. Fitak, A. Munguia-Vega, and M. Culver, “Novel primers for complete mitochondrial cytochrome b gene sequencing in mammals,” *Molecular Ecology Resources*, vol.12, pp.191-6, 2012.
- [41] W. Branicki, T. Kupiec, and R. Pawlowski, “Validation of cytochrome b sequence analysis as a method of species identification,” *Journal of Forensic Sciences*, vol.48, pp.83-7, Jan. 2003.
- [42] S. K. Verma and L. Singh, “Novel universal primers establish identity of an enormous number of animal species for forensic application,” *Molecular Ecology Notes*, vol.3, pp.28-31, Mar. 2003.
- [43] L. Tsai, M. Huang, C. Hsiao, A. Lin, S. Chen,

- J. Lee, et al., "Species identification of animal specimens by cytochrome b gene," *Forensic Science Journal*, vol.6, pp.63-5, 2007.
- [44] A. O. Karlsson and G. Holmlund, "Identification of mammal species using species-specific DNA pyrosequencing," *Forensic Science International*, vol.173, pp.16-20, Nov 15. 2007.
- [45] S. S. Tobe and A. M. T. Linacre, "A multiplex assay to identify 18 European mammal species from mixtures using the mitochondrial cytochrome b gene," *Electrophoresis*, vol.29, pp.340-7, 2008.
- [46] J. Lee, H. M. Hsieh, L. H. Huang, Y. C. Kuo, J. H. Wu, S. C. Chin, et al., "Ivory identification by DNA profiling of cytochrome b gene," *International Journal of Legal Medicine*, vol.123, pp.117-21, Mar. 2009.
- [47] K. E. Comstock, E. A. Ostrander, and S. K. Wasser, "Amplifying nuclear and mitochondrial DNA from African elephant ivory: A tool for monitoring the ivory trade," *Conservation Biology*, vol.17, pp.1840-3, Dec. 2003.
- [48] J. C.-I. Lee, L.-C. Tsai, S.-P. Liao, A. Linacre, and H.-M. Hsieh, "Species identification using the cytochrome b gene of commercial turtle shells," *Forensic Science International: Genetics*, vol.3, pp.67-73, 2009.
- [49] Q. H. Wan and S. G. Fang, "Application of species-specific polymerase chain reaction in the forensic identification of tiger species," *Forensic Science International*, vol.131, pp.75-8, Jan 9. 2003.
- [50] N. Mukherjee, S. Mondol, A. Andheria, and U. Ramakrishnan, "Rapid multiplex PCR based species identification of wild tigers using non-invasive samples," *Conservation Genetics*, vol.8, pp.1465-70, 2007.
- [51] K. M. Wozney and P. J. Wilson, "Real-time PCR detection and quantification of elephantid DNA: Species identification for highly processed samples associated with the ivory trade," *Forensic Science International*, pp.6-12, 2012.
- [52] C. O'reilly, M. Statham, J. Mullins, P. D. Turner, and D. O'Mahony, "Efficient species identification of pine marten (*Martes martes*) and red fox (*Vulpes vulpes*) scats using a 5' nuclease real-time PCR assay," *Conservation Genetics*, vol.9, pp.735-8, Jun. 2008.
- [53] S. Cawthraw, G. C. Saunders, T. C. Martin, J. Sawyer, O. Windl, and S. D. Reaney, "Real-time PCR detection and identification of prohibited mammalian and avian material in animal feeds," *Journal of Food Protection*, vol.72, pp.1055-62, May. 2009.
- [54] O. Berry and S. D. Sarre, "Gel-free species identification using melt-curve analysis," *Molecular Ecology Notes*, vol.7, pp.1-4, Jan. 2007.
- [55] T. Kitpipit, S. S. Tobe, A. C. Kitchener, P. Gill, and A. Linacre, "The development and validation of a single SNaPshot multiplex for tiger species and subspecies identification-Implications for forensic purposes," *Forensic science international. Genetics*, vol.6, pp.250-7, 2012.
- [56] F. La Neve, T. Civera, N. Mucci, and M. T. Bottero, "Authentication of meat from game and domestic species by SNaPshot minisequencing analysis," *Meat Science*, vol.80, pp.216-24, 2008.
- [57] E. Fabbri, R. Caniglia, N. Mucci, H. P. Thomsen, K. Krag, C. Pertoldi, et al., "Comparison of



Single Nucleotide Polymorphisms and Microsatellites in Non-Invasive Genetic Monitoring of a Wolf Population,” *Archives of Biological Sciences*, vol.64, pp.321-35, 2012.

[58] A. Linacre, L. Gusmão, W. Hecht, A. P.

Hellmann, W. R. Mayr, W. Parson, et al., “ISFG: Recommendations regarding the use of non-human (animal) DNA in forensic genetic investigations,” *Forensic science international. Genetics*, vol.5, pp.501-5, 2011.