

การจำแนกชนิดของแมลงวันหัวเขียวที่สำคัญทางนิติภุวิทยาในประเทศไทยจากบริเวณ second internal transcribed spacer ของ ribosomal DNA และยีน NADH dehydrogenase subunit 5



นางสาว รัชฎาภรณ์ จันทร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

IDENTIFICATION OF FORENSICALLY IMPORTANT BLOWFLIES IN THAILAND BASED
ON THE SECOND INTERNAL TRANSCRIBED SPACER REGION OF RIBOSOMAL DNA
AND THE NADH DEHYDROGENASE SUBUNIT 5 GENE



Miss Ratchadaporn Jantorn

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การจำแนกชนิดของแมลงวันหัวเขียวที่สำคัญทางนิติ
กีฏวิทยาในประเทศไทยจากบริเวณ second internal
transcribed spacer ของ ribosomal DNA และยีน
NADH dehydrogenase subunit 5

โดย

นางสาว รัชฎาภรณ์ จันทร

สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์การแพทย์


อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก


รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. เผด็จ สิริยะเสถียร


คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต



..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ อติศร ภัทรราชูลย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ดร. วิไล ชินธเนศ)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. เผด็จ สิริยะเสถียร)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. พูลลภ ชีพสุนทร)


..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร. อุษาวดี ดาวระ)

วิทยานิพนธ์ จันทร : การจำแนกชนิดของแมลงวันหัวเขียวที่สำคัญทางนิติวิทยาศาสตร์ใน ประเทศไทยจากบริเวณ second internal transcribed spacer ของ ribosomal DNA และยีน NADH dehydrogenase subunit 5. (Identification of forensically important blowflies in Thailand from the second internal transcribed spacer region of ribosomal DNA and the NADH dehydrogenase subunit 5 gene) อ. ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์หลัก: รศ.นพ.ดร. เผด็จ สิริยะเสถียร, 90 หน้า.

การระบุชนิดของหนอนแมลงวันได้อย่างถูกต้องสามารถนำมาใช้ในการประมาณเวลาตาย ได้ แต่การจำแนกชนิดโดยวิธีทางสัณฐานวิทยากระทำได้ยาก การจำแนกชนิดแมลงวันบนพื้นฐานของดีเอ็นเอจึงเป็นทางเลือกหนึ่ง งานวิจัยครั้งนี้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Second internal transcribed spacer (ITS2) ของ ribosomal DNA (rDNA) และบริเวณยีน NADH dehydrogenase subunit 5 (ND5) เพื่อจัดจำแนกสายพันธุ์แมลงวันหัวเขียวที่มีความสำคัญทางนิติเวช และพบได้บ่อยในประเทศไทย ได้แก่ *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya bezziana*, *Chrysomya rufifacies*, *Chrysomya albiceps*, *Lucilia cuprina* และ *Lucilia sericata* ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) โดยทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์บริเวณ ITS2 และ ยีน ND5 ซึ่งบริเวณ ITS2 จะถูกนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *DraI* ส่วนยีน ND5 จะตัดด้วย *VspI* ผลการวิเคราะห์ PCR-RFLP สามารถจำแนกความแตกต่างได้ 4 รูปแบบ โดยไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของสปีชีส์ที่มีความใกล้เคียงกัน คือ *Chrysomya rufifacies* กับ *Chrysomya albiceps* และ *Lucilia cuprina* กับ *Lucilia sericata* การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันหัวเขียวไม่พบความแตกต่างภายในสายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญ จากการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี neighbor-joining แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางสายวิวัฒนาการและผลการศึกษานี้สนับสนุนผลการจำแนกความหลากหลายด้วยเทคนิค PCR-RFLP ดังนั้นวิธีการดังกล่าวสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการจัดจำแนกเพื่อระบุสายพันธุ์แมลงวันหัวเขียวแต่ละชนิดในกรณีที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่สามารถระบุได้อย่างชัดเจน

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ปีการศึกษา 2552

ลายมือชื่อนิสิต..... วิทยานิพนธ์ จันทร.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

##5174814230: MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS: Blow flies / ITS2 / ND5 / PCR-RFLP

RATCHADAPORN JANTORN : IDENTIFICATION OF FORENSICALLY IMPORTANT BLOWFLIES IN THAILAND BASED ON THE SECOND INTERNAL TRANSCRIBED SPACER REGION OF RIBOSOMAL DNA AND THE NADH DEHYDROGENASE SUBUNIT 5 GENE. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. PADET SIRIYASATIEN, M.D.,Ph.D, 90 pp.

Identification of fly species can be used to estimate the PMI. However, morphological identification of insect made more difficult. Therefore, species identification based on genetic examination is an option. In this study, we demonstrate the application of second internal transcribed spacer (ITS2) sequences and NADH dehydrogenase subunit 5 (ND5) gene for differentiation of forensically important blowflies in Thailand; *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya bezziana*, *Chrysomya rufifacies*, *Chrysomya albiceps*, *Lucilia cuprina* and *Lucilia sericata* by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP). The second internal transcribed spacer region of ribosomal DNA and the NADH dehydrogenase subunit 5 gene were selected to amplified and digested with restriction endonucleases separately: *DraI* for ITS2 region, *VspI* for ND5 gene, respectively. Results from PCR-RFLP analysis could separate blowflies into 4 patterns. The closely related species pairs *Chrysomya rufifacies*+*Chrysomya albiceps* and *Lucilia cuprina*+*Lucilia sericata* were not able to be separated. Sequence analysis reveals no significant intraspecific divergence in blowfly specimens. Phylogenetic analysis by neighbor-joining (NJ) method indicates a close relationship among them. The results of phylogenetic lineages in the present study seem to support species identification based on PCR-RFLP analysis. These approaches serve as the promising tools for molecular identification of these common blowfly species in cases where morphological characters are unreliable.

Field of Study: Medical Science

Academic Year: 2009

Student's Signature..... 

Advisor's Signature..... 

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความสามารถจากอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ คือ รศ. นพ. ดร. เผด็จ สิริยะเสถียร ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำปรึกษา ในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยดี และช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในศูนย์วิจัยคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รวมทั้งคุณระพีพร แม้นนทรรัตน์ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ความรู้ ตลอดจนคำแนะนำในการใช้อุปกรณ์วิจัยภายในศูนย์วิจัย

ขอกราบขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และอำนวยความสะดวกในการทำการทดลองในห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณ นายแพทย์ กนก พฤตวิทย์ เป็นอย่างยิ่งที่ให้ความรู้และคำแนะนำตลอดการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ได้ให้โอกาสทางการศึกษาซึ่งประโยชน์และคุณค่าของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแต่ผู้ที่มีพระคุณทุกท่านตลอดจนผู้ที่สามารถนำไปใช้เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อไปได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฏ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	4
ขอบเขตของการวิจัย.....	4
ข้อตกลงเบื้องต้น.....	4
ข้อจำกัด.....	4
คำสำคัญ.....	4
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
กรอบแนวความคิดในกาวิจัย.....	6
ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย.....	6
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	7
ชีววิทยาของแมลงวันหัวเขียว	7
นิติกีฏวิทยา.....	11
- การประมาณระยะเวลาการตายจากแมลง.....	11
- การใช้แมลงเป็นหลักฐานแสดงถึงการเคลื่อนย้ายศพ.....	17
- การใช้แมลงเป็นหลักฐานเชื่อมโยงในที่เกิดเหตุ.....	17
- การใช้แมลงช่วยระบุตำแหน่งบาดแผลบนศพ.....	17
- การใช้แมลงในการหาหลักฐานทางพิษวิทยา.....	18

	หน้า
- การใช้แมลงในการหาสารพันธุกรรมของมนุษย์.....	18
- การใช้แมลงเป็นหลักฐานในการหาธุกรรม.....	19
ไมเอียซิส.....	19
การวิเคราะห์ทางดีเอ็นเอในงานนิติวิทยาศาสตร์.....	21
หน่วยทรานสคริปชันของไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ.....	22
จีโนมไมโทคอนเดรีย.....	24
- ลักษณะโดยทั่วไป.....	24
- ความหลากหลายของจีโนมไมโทคอนเดรีย.....	25
- คุณสมบัติของดีเอ็นเอไมโทคอนเดรียในการศึกษาวิวัฒนาการ.....	26
เทคนิคสำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม.....	27
- Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP).....	27
- การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์.....	27
ชีวสารสนเทศศาสตร์.....	28
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	28
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	30
ประชากร.....	30
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	30
วิธีดำเนินการวิจัย.....	34
- การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์.....	34
- การสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลและการทำให้บริสุทธิ์.....	36
- การเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เข้ากับพลาสมิดเวคเตอร์.....	37
- การเตรียมแบคทีเรียให้อยู่ในสภาพพร้อมรับดีเอ็นเอจากภายนอก.....	37
- การถ่ายโอนดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่แบคทีเรีย.....	38
- การติดตามโคลนดีเอ็นเอสายผสม.....	39
- การสกัดพลาสมิด.....	39
- การหาลำดับนิวคลีโอไทด์.....	40
- การวิเคราะห์ความหลากหลายด้วยเทคนิค PCR-RFLP.....	40
- การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ.....	44

บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	43
ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นยีนด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์.....	43
- การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS2 ของ rDNA	43
- การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณส่วนของยีน ND5.....	44
ผลการวิเคราะห์โคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมด้วยเทคนิค colony PCR.....	45
ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายด้วยเทคนิค PCR-RFLP.....	47
ผลวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์.....	50
ผลการหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ.....	57
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ.....	62
สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	62
ข้อเสนอแนะ.....	68
รายการอ้างอิง.....	69
ภาคผนวก.....	75
ภาคผนวก ก.....	76
ภาคผนวก ข.....	83
ภาคผนวก ค.....	89
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	90

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 จำนวนแมลงแต่ละชนิดที่พบบนศพทางตอนเหนือของประเทศไทยตั้งแต่ปี 2000-2006	11
2.2 แมลงตัวเต็มวัยที่พบบริเวณศพตามระยะต่างๆในรัฐเทนเนสซี.....	12
2.3 หนอนแมลงที่พบบริเวณศพตามระยะต่างๆในรัฐเทนเนสซี.....	13
3.1 ข้อมูลแมลงวันหัวเขียวที่ใช้ในงานวิจัย.....	31
3.2 รายละเอียดของไพรเมอร์.....	34
3.3 ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์.....	35
3.4 แสดง Thermal cycler condition.....	35
3.5 อัตราส่วนของสารในปฏิกิริยาการเชื่อมต่อ.....	37
3.6 อัตราส่วนของสารในเทคนิค PCR-RFLP.....	41
3.7 อัตราส่วนของสารใน 8 % native polyacrylamide gel electrophoresis.....	41
4.1 ขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	47
4.2 แสดง % identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2	51
4.3 แสดง % identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน ND5.....	52
4.4 ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างลำดับนิวคลีโอไทด์ (%) บริเวณ ITS2.....	60
4.5 ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างลำดับนิวคลีโอไทด์ (%) บริเวณส่วนของยีน ND5.....	61
5.1 ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์บริเวณ ITS2, ND5, COI-COII..	65
5.2 ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างสายพันธุ์บริเวณ ITS2 และ ND5.....	65

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
2.1	8
2.2	14
2.3	16
2.4	23
2.5	25
4.1	43
4.2	44
4.3	45
4.4	46
4.5	48
4.6	49
4.7	54
4.8	56
4.9	58
4.10	69

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ตัวย่อ	
%	percent (เปอร์เซ็นต์)
µg	microgram (ไมโครกรัม)
µl	microlitre, 10 ⁻⁶ liter (ไมโครลิตร)
µM	micromolar (ไมโครโมลาร์)
bp	base pair (คู่เบส)
cm	centimetre (เซนติเมตร)
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
ddH ₂ O	deionized distilled water (น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ)
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTPs	deoxynucleotide triphosphates (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
et al.	et. alii (latin), and others
g	grams (กรัม)
L	liter (ลิตร)
M	molar (โมลาร์)
mg	milligram (มิลลิกรัม)
ml	milliliter, 10 ⁻³ liter (มิลลิลิตร)
mM	millimolar (มิลลิโมลาร์)
mRNA	messenger RNA
mt DNA	mitochondrial DNA
ng	nanogram, 10 ⁻⁹ gram (นาโนกรัม)
° C	degree celsius (องศาเซลเซียส)
OD	optical density
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction (ปฏิกิริยาพีซีอาร์)
PCR-RFLP	Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism
pH	The negative logarithm of the concentration of hydrogen ions

rDNA	Ribosomal DNA
RNA	Ribonucleic acid
rpm	revolutions per minute (รอบต่อนาที)
rRNA	Ribosomal RNA
SDS	sodium dodecyl sulfate
TAE	Tris sodium acetate EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i> (polymerase)
UV	ultraviolet



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

วัตถุประสงค์ที่สำคัญประการหนึ่งของการชันสูตรพลิกศพที่กำหนดไว้ในกฎหมายก็คือ การระบุเวลาตาย ดังนั้นการหาหลักฐานมาสนับสนุนเพื่อประมาณระยะเวลาหลังการตาย (postmortem interval, PMI) มีความสำคัญมากสำหรับแพทย์และบุคลากรทางนิติเวช (Siryasatien and Sirisup, 2005) การประมาณเวลาหลังการตายเป็นการค้นหาระยะเวลาการตายว่าผู้ตายตายมานานเท่าใด มีความสำคัญทางกฎหมายมากทั้งทางอาญาและทางแพ่ง ในทางกฎหมายอาญาจะสามารถช่วยบอกถึงเวลาของการฆาตกรรมว่าเกิดขึ้นเมื่อใด มีส่วนช่วยเหลือในการตั้งข้อสงสัยใครหรือตัดผู้ต้องสงสัยคนใดออก นอกจากนี้อาจใช้ช่วยยืนยันหรือหักล้างข้อแก้ตัวของผู้ต้องสงสัย ส่วนในทางกฎหมายแพ่ง อาจจะช่วยบอกได้ว่าใครเป็นทายาทผู้รับมรดกหรืออื่นๆ เช่น กรณีที่เกี่ยวข้องกับการรับเงินประกันชีวิต ข้อมูลที่สำคัญในการระบุเวลาตายคือ ครึ่งสุดท้ายที่เห็นเมื่อยังมีชีวิตซึ่งจะสามารถบอกระยะเวลาหลังการตายที่มากที่สุดได้ (maximum PMI) (Henssge et al., 1995) แต่กระทำได้ยากดังนั้นการประมาณระยะเวลาการตายส่วนใหญ่จากการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับศพ เช่น การเกร็งตัวของกล้ามเนื้อบริเวณข้อต่างๆ การตกตะกอนของเม็ดเลือดในหลอดเลือดฝอย อุณหภูมิของศพ การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของน้ำในลูกนัยน์ตา เป็นต้น การเปลี่ยนแปลงภายในร่างกายหลังการตายมีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้อง (Micozzi, 1991) ทำให้การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและทางเคมีที่เป็นตัวบ่งชี้เวลาการตายที่ใกล้เคียงและน่าเชื่อถือในช่วงแรกให้ผลที่ถูกต้องน้อยกว่าข้อมูลจากนิติวิทยาศาสตร์เมื่อเวลาการตายเพิ่มขึ้น

นิติวิทยาศาสตร์ (Forensic Entomology) เป็นอีกสาขาที่ใช้ข้อมูลทางนิติวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับแมลงมาใช้ทางกฎหมายและมีบทบาทในการพิสูจน์หลักฐานทางอาชญากรรม คือ การระบุเวลาหลังการตาย ซึ่งในต่างประเทศนั้นมีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง ส่วนในประเทศไทยยังมีไม่มากนัก มีเพียงไม่กี่คดีเท่านั้นที่มีการบันทึกว่าใช้แมลงในการสืบสวน เป็นการศึกษาชนิดแมลงที่พบจากซากศพ ชนิดของแมลงเหล่านั้นเป็นข้อบ่งชี้ระยะเวลาการตายของศพได้ ในกระบวนการนำเปื่อยของศพจะมีการเปลี่ยนแปลงทั้งทางเคมี ชีวภาพ และกายภาพ (Henssge et al., 1995; Van den Oever, 1976) กระบวนการเหล่านี้จะดึงดูดพวกสัตว์ขาปล้อง (arthropod) และแมลงเป็นสิ่งมีชีวิตแรกที่เข้าถึงศพเร็วที่สุดภายในไม่กี่นาที (Anderson and VanLaerhoven, 1996; Erzinclioglu, 1983; Nuorteva, 1977; Smith, 1986) กลิ่นที่ปล่อยออกมาแต่ละระยะในกระบวนการ

เน่าเปื่อยจะดึงดูดสิ่งมีชีวิตบางสปีชีส์โดยเฉพาะแมลงวันหัวเขียวจะเข้าถึงศพในระยะเวลาอันสั้นจำนวนมาก แต่จะน้อยลงเมื่อศพเข้าสู่ระยะท้ายของการเน่าเปื่อยหรือศพกลายเป็นมัมมี่ (Nuorteva, 1977) ในประเทศอังกฤษมีรายงานว่าแมลงวันหัวเขียว *Calliphora vicina* และ *Lucilia caesar* พบในซากสัตว์พื้นทะเลภายในชั่วโมงหรือไม่กี่นาทีหลังการตาย แต่แมลงวันหัวเขียว *Lucilia illustris* จะพบบนศพหลังตาย 76 ชั่วโมง (Lane, 1975) นอกจากนี้การเข้าถึงศพมีความแตกต่างกันไปในแต่ละพื้นที่ ส่วนใหญ่จะเป็นแมลงวันหัวเขียว (family: Calliphoridae) แมลงวันหลังลาย (family Sarcophagidae) ในบริเวณเส้นศูนย์สูตร เช่น ฮาวาย แมลงชนิดแรกที่เข้าถึงเป็นอันดับแรกคือแมลงวันหัวเขียว *Lucilia cuprina* (Wiedemann), *Chrysomya megacephala* (F.) และ *Chrysomya rufifacies* (Macquart) แมลงวันหลังลาย *Sarcophaga haemorrhoidalis* (Fallen), *Parasarcophaga ruficornis* (F.), *Sarcophaga occidua* (F.) และ *Helicoba morionella* (Aldrich) (Early and Goff, 1986) ส่วนแมลงชนิดอื่น เช่น dermestid beetles (Coleoptea: Dermestidae) จะเข้าถึงศพค่อนข้างช้า บ่อยครั้งพบเมื่อศพเหลือแค่ผิวหนังกับกระดูกหรืออาจใช้เวลาเป็นเดือนหลังการตาย

แมลงวันหัวเขียว (blowflies) เป็นแมลงที่มีบทบาทมากในการประมาณระยะเวลาการตาย เนื่องจากเป็นแมลงกลุ่มแรกที่เข้ามาเกี่ยวข้องกับศพและสามารถถูกดึงดูดได้แม้ระยะทางไกล ในแอฟริกาใต้แมลงวันหัวเขียวที่ทำเครื่องหมายถูกดึงดูดด้วยเหยื่อล่อได้ไกลถึง 63.5 กิโลเมตรจากจุดปล่อย (Braack, 1981) ด้วยนิสัยที่ชอบตอมสิ่งปฏิกูล ซากศพ และเป็นแมลงวันที่อาศัยใกล้ชิดกับคน (synanthropic flies) แมลงวันหัวเขียวสามารถใช้เป็นดัชนีบ่งบอกเวลาการตายได้ใกล้เคียงมาก เมื่อมีการตายเกิดขึ้น สารประกอบพวกแอมโมเนียปริมาณมากจากศพ อุณหภูมิที่พอเหมาะ ฟิโรโมน (Ashworth and Wall, 1994) จะดึงดูดแมลงวันตัวเมียไปวางไข่ โดยมันจะเลือกวางไข่บริเวณบาดแผลหรือบริเวณเยื่อตามช่องต่างๆของร่างกาย เช่น โพรงจมูก ปาก ลูกตา เป็นต้น เนื่องจากไข่และตัวหนอนที่ฟักจากไข่ต้องการความชื้น หนอนแมลงวันจะหลั่งน้ำลายซึ่งเป็นเอ็นไซม์ที่มีฤทธิ์ย่อยโปรตีน (proteolytic enzymes) ออกมาและแมลงวันจะวางไข่ครั้งละหลายๆจึงเกิดหนอนจำนวนมาก ซึ่งทำให้ได้น้ำลายออกมาได้ปริมาณมากน้ำลายที่หลั่งออกมาแบบนี้จะช่วยทำให้เนื้อเยื่อสลายตัวได้รวดเร็วยิ่งขึ้น นอกจากนี้หนอนจำนวนมากจะปล่อยความร้อนออกมาเพื่อป้องกันตัวมันเองจากอุณหภูมิที่ลดลงด้วย การประมาณระยะเวลาการตายอาศัยความยาวของหนอนแมลงวัน ซึ่งจะวัดจากตัวหนอนที่มีขนาดใหญ่และยาวที่สุด เพราะมันมีอายุมากที่สุดแต่ทั้งนี้ต้องทำก่อนที่หนอนจะเข้าสู่ peak feeding เพราะหลังจากระยะนี้แล้วหนอนจะไม่กินอาหารทำให้น้ำหนักและขนาดลำตัวไม่เพิ่มขึ้นแต่จะลดลงเพราะเป็นระยะที่เตรียมเข้าดักแด้ดังนั้นการประมาณค่า PMI จะต้องกระทำก่อนหนอนเข้าสู่ระยะ peak feeding เพราะอาจทำให้เกิดความผิดพลาดใน

การคะแนน PMI โดยใช้ความยาวของหนอนเป็นเกณฑ์ได้ การเจริญเติบโตของหนอนแมลงวันจะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น อุณหภูมิ ความชื้นและชนิดของแมลงวันเพราะแมลงวันแต่ละชนิดใช้เวลาในการเจริญที่ต่างกัน การประมาณระยะเวลาการตายโดยใช้แมลงวันจึงต้องใช้ข้อมูลที่ตรงกับแมลงวันชนิดนั้นๆ จึงจะได้ค่า PMI ที่ใกล้เคียงที่สุด (Siriyasatien and Sirisup, 2005)

การจำแนกชนิดของหนอนแมลงวันที่พบบนศพได้อย่างถูกต้องถือว่าเป็นขั้นตอนสำคัญของนักนิติวิทยาศาสตร์ในการประมาณเวลาการตาย แต่การจำแนกชนิดโดยวิธีทางสัตวศาสตร์วิทยากระทำได้ยากในแมลงวันที่เจริญเติบโตไม่เต็มที่เนื่องจากมีลักษณะรูปร่างที่เหมือนกันหรือแมลงตัวอ่อนอยู่ในสภาพไม่สามารถจำแนกได้นอกจากนี้ผู้เชี่ยวชาญไม่มากนักที่จะสามารถจำแนกตัวอ่อนว่าเป็นแมลงชนิดใด สำหรับแมลงบางกลุ่มเช่น Sarcophagidae การแยกความแตกต่างทางสัตวศาสตร์วิทยาในระยะตัวอ่อนยังไม่สามารถทำได้ อาจต้องใช้เวลาในการเลี้ยงตัวอ่อนให้กลายเป็นตัวเต็มวัยสำหรับการจำแนกซึ่งจะทำให้การสืบสวนล่าช้าหรือเกิดปัญหาที่สำคัญคือการเลี้ยงล้มเหลว ภายใต้อุปกรณ์เหล่านี้ประกอบกับความก้าวหน้าในงานวิจัยด้านชีววิทยาโมเลกุลทำให้การจำแนกชนิดแมลงที่พบบนศพได้โดยอาศัยข้อมูลของสารพันธุกรรมดีเอ็นเอ (Jens et al., 2004)

งานวิจัยครั้งนี้จำแนกความหลากหลายของแมลงวันหัวเขียวโดยศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Second internal transcribed spacer (ITS2) ของยีน ribosomal RNA (rRNA gene, rDNA) และบริเวณยีน NADH dehydrogenase subunit 5 (ND5) ใน mtDNA ร่วมกับเทคนิค Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) และประเมินประสิทธิภาพการจำแนกความหลากหลายของแมลงวันหัวเขียวด้วยรูปแบบแผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ ด้านปศุสัตว์และงานด้านอื่นๆ ต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อจำแนกชนิดของแมลงวันหัวเขียวโดยอาศัยเทคนิค PCR-RFLP ร่วมกับการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Second internal transcribed spacer (ITS2) ของ ribosomal DNA และยีน NADH dehydrogenase subunit 5 (ND5)
2. เพื่อศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันหัวเขียวจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Second internal transcribed spacer (ITS2) ของ ribosomal DNA และยีน NADH dehydrogenase subunit 5 (ND5)

ขอบเขตของการวิจัย

1. ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องกับ forensic entomology, blow fly
2. ศึกษาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 และ ND5 ของแมลงวันหัวเขียว
3. เลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) สำหรับเทคนิค PCR-RFLP
4. สร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)
5. สรุปผลและเขียนรายงานผลการวิจัย

ข้อตกลงเบื้องต้น

เครื่องมือต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง เป็นเครื่องมือที่ผ่านการทดสอบความเที่ยงตรงและความแม่นยำตามมาตรฐานของเครื่องมือชนิดนั้นๆ

ข้อจำกัดของการวิจัย

ดีเอ็นเอของแมลงวันหัวเขียวมีจำนวนจำกัด

คำสำคัญ

Blowflies

ITS2

ND5

PCR-RFLP

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

Blowflies คือ ชื่อสามัญของแมลงวันหัวเขียว เนื่องจากส่วนอกและท้องของมันมีสีแวววาวเหมือนผิวโลหะ ซึ่งอาจเป็นสีเขียว สีน้ำเงิน ตารวมของแมลงวันกลุ่มนี้มีสีแดงขนาดใหญ่ เห็นได้ชัดเจน arista ฟูแบบขนนก แมลงวันกลุ่มนี้มี 2 ชั้นแฟมิลีที่มีความสำคัญทางการแพทย์ และพบบ่อยในประเทศไทย คือ *Calliphorinae* และ *Chrysomyinae*

ITS2 คือ บริเวณ internal transcribed spacer (ITS) ของยีน ribosomal RNA โดยมีตำแหน่งอยู่ทั้งสองข้างบริเวณ 5' และ 3' ของยีน 5.8S rRNA คือ ITS1 และ ITS2

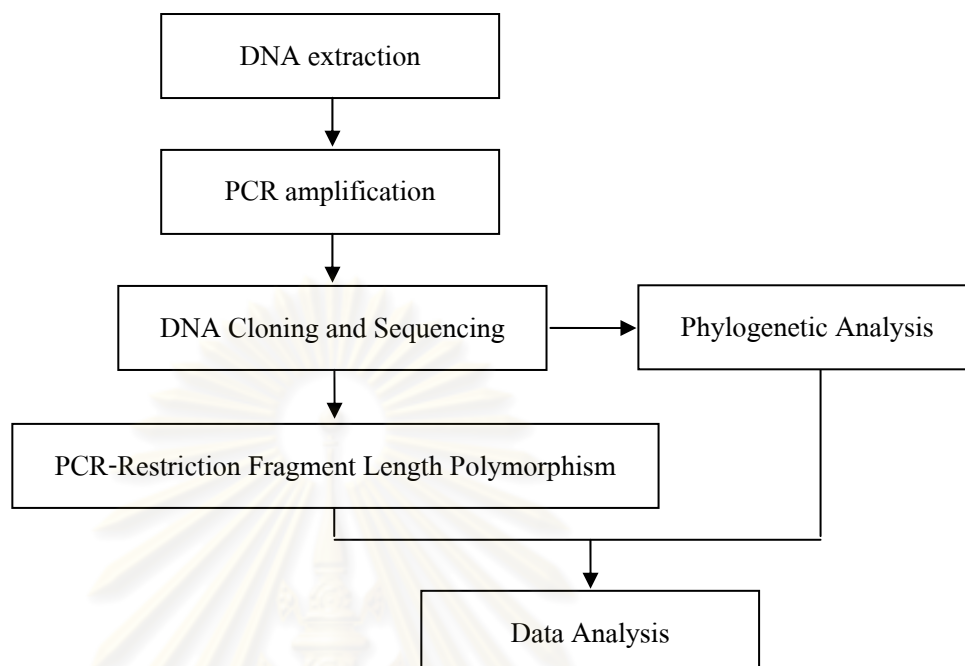
ND5 คือ ยีนไมโทคอนเดรีย (mtDNA) ย่อมาจาก NADH dehydrogenase subunit 5 เป็นยีนไมโทคอนเดรียที่ถอดรหัสเป็นโปรตีนหน่วยย่อยของเอนไซม์เชิงซ้อนตัวที่ 1 (NADH-ubiquinone oxidoreductase) ในกระบวนการ oxidative phosphorylation ร่วมกับอีกจำนวน 6 ยีน คือ ยีน ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L และ ND6

PCR-RFLP มาจากคำว่า Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism คือ เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมในการจำแนกความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอ เป้าหมายที่ผ่านการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ร่วมกับการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงชนิดของหนอนแมลงวันหัวเขียวจากการใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาในการจำแนกหรือระบุชนิดของหนอนแมลงวันอย่างถูกต้อง มีประสิทธิภาพได้ โดยไม่ต้องรอจนเจริญเป็นตัวเต็มวัย
2. ทราบถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันหัวเขียวที่พบในเขตพื้นที่ประเทศไทย
3. สามารถนำข้อมูลแมลงวันมาประยุกต์ใช้ประมาณเวลาการตายของศพได้อย่างมีประสิทธิภาพและเพื่อประโยชน์ในการศึกษาโรคไม่เฉียบพลัน
4. สามารถนำประยุกต์ใช้บริเวณ Second internal transcribed spacer (ITS2) ของ ribosomal DNA และยีน NADH dehydrogenase subunit 5 (ND5) ในการจำแนกชนิดของแมลงชนิดอื่นได้

กรอบแนวความคิดในการวิจัย



ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

1. ยื่นเสนอ proposal ต่อคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมในการวิจัย
2. ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 และยีน ND5 ของแมลงวันหัวเขียว
3. ศึกษาและวิเคราะห์ความหลากหลายด้วยเทคนิค PCR-RFLP
4. สร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)
5. สรุปผล เขียนรายงานผลวิจัยที่ได้ และส่งรายงานเพื่อตีพิมพ์เผยแพร่

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

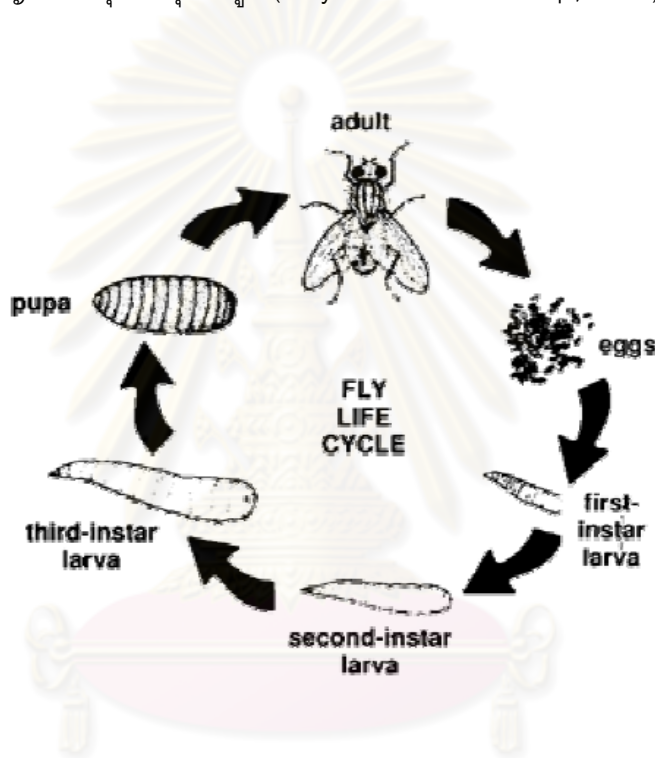
ชีววิทยาของแมลงวันหัวเขียว

แมลงวันหัวเขียว (Blow flies) เป็นแมลงวันขนาดใหญ่ที่มีลำตัวสีเขียวหรือน้ำเงิน จัดอยู่ใน

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Arthropoda
Class	: Insecta
Order	: Diptera
Suborder	: Brachycera
Infraorder	: Muscomorpha
Subsection	: Calyptratae
Superfamily	: Oestroidea
Family	: Calliphoridae
Common name:	Blowfly

แมลงวันหัวเขียวมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างแบบสมบูรณ์ (Complete metamorphosis) โดยมีการเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นระยะๆ จนครบสมบูรณ์ 4 ระยะ ดังนี้ ระยะไข่ (Egg stage), ระยะตัวอ่อน (Larval stage) แบ่งเป็น 3 ระยะย่อย คือ หนอนวัยที่ 1 (1st instar larval) หนอนวัยที่ 2 (2nd instar larval) หนอนวัยที่ 3 (3rd instar larval), ระยะดักแด้ (Puparial stage) และระยะตัวเต็มวัย (Adult stage) ลักษณะโดยทั่วไปของแมลงวันหัวเขียวคือ มีลำตัวค่อนข้างกลมความยาว 6-14 มิลลิเมตร ส่วนอกมีขนาดใหญ่ มีขนขนาดใหญ่ปกคลุมทั่วตัว ตาประกอบขนาดใหญ่ ตัวเต็มวัยมักอาศัยในบริเวณบ้านและตอมสิ่งปฏิกูลเป็นอาหาร ตัวเมียวางไข่เป็นกลุ่มประมาณ 50-100 ฟอง ประมาณ 12 ชั่วโมงไข่จึงฟักออกเป็นหนอนวัยที่ 1 (1st stage larva หรือ 1st instar larva) หนอนแมลงวันมักจะใช้คำเรียกเฉพาะว่า maggot ลักษณะของหนอนแมลงวันคือส่วนหัวมีขนาดเล็กมีอวัยวะที่ใช้กินอาหารเรียกว่า hook อยู่ 1 คู่ ส่วนท้ายของหนอนมีลักษณะป้านโดยมีท่อหายใจอยู่ 1 คู่เรียกว่า posterior spiracle รูปร่างลักษณะของ posterior spiracle นี้ใช้ช่วยในการจำแนกชนิดของหนอนแมลงวันได้ หนอนจะลอกคราบ 2 ครั้งเป็นหนอนวัยที่ 2 และ 3 ตามลำดับ หนอนวัยที่ 1 ใช้เวลาประมาณ 12 ชั่วโมงเพื่อเจริญเป็นหนอนวัยที่ 2 และหนอนวัยที่ 2

ใช้เวลาประมาณ 12-24 ชั่วโมง เพื่อเจริญเป็นหนอนวัยที่ 3 เมื่อหนอนวัยที่ 3 โตเต็มที่ (peak feeding) มีความยาวประมาณ 8-23 มิลลิเมตร มันจะหยุดกินอาหารและหาที่มืดและแห้งเพื่อเข้าสู่ระยะดักแด้ต่อไป หนอนวัยที่ 3 ใช้เวลาจนกระทั่งเป็นดักแด้ (pupa) ประมาณ 4-5 วัน ภายในดักแด้ตัวหนอนจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเพื่อเป็นแมลงวันตัวเต็มวัยโดยใช้เวลาในดักแด้ประมาณ 5-7 วัน (รูปที่ 2.1) ทั้งนี้ระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญเติบโตของหนอนแต่ละระยะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น อุณหภูมิ ความชื้น ปริมาณอาหาร ความหนาแน่นของหนอนแมลงวัน แต่ปัจจัยที่มีความสำคัญมากที่สุดคืออุณหภูมิ (Siriysatien and Sirisup, 2005)



รูปที่ 2.1 วงจรชีวิตของแมลงวันหัวเขียว (Blowflies)

(ที่มา: <http://www.umext.maine.edu/onlinepubs/htmlpubs/5002.htm>)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แมลงวันหัวเขียวมีความสำคัญทางการแพทย์และปศุสัตว์มีอยู่ 2 ชั้นแฟมีลีที่ ได้แก่ ชั้นแฟมีลี Chrysomyinae จี้นัสที่พบมากได้แก่ *Chrysomya* เป็นแมลงวันที่มีสีเขียวจนถึงสีน้ำเงินปนดำ พบมากแถบเอเชียและออสเตรเลียและจี้นัส *Cochliomyia* เป็นแมลงวันที่มีสีเขียวจนถึงเขียวอมม่วง พบมากแถบอเมริกา ชั้นแฟมีลี Calliphorinae จี้นัสที่พบมากได้แก่ *Lucilia*, *Phaenicia* และ *Calliphora* สำหรับในประเทศไทยแมลงวันหัวเขียวที่ชอบตอมศพและพบได้บ่อย คือ

Chrysomya megacephala (Oriental latrine fly) จัดอยู่ในชั้นแฟมีลี Chrysomyinae พบว่ามีการแพร่กระจายทั่วไปในแถบตะวันออกเฉียงใต้และออสเตรเลีย สำหรับประเทศไทยจะพบแมลงวันหัวเขียวชนิดนี้มากที่สุด โดยพบได้ตั้งแต่พื้นราบระดับน้ำทะเลจนถึงเทือกเขาสูง 1,700 เมตรจากระดับน้ำทะเล

Chrysomya rufifacies (Hairy maggot fly, Hairy sheep maggot) จัดอยู่ในชั้นแฟมีลี Chrysomyinae พบได้ทั่วไปแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และออสเตรเลียเขตร้อน นอกจากนี้มีรายงานการแพร่กระจายเข้าไปในอเมริกากลาง พบได้ตั้งแต่ระดับน้ำทะเลจนถึง 2,100 เมตรจากระดับน้ำทะเล ขึ้นอยู่กับภูมิภาคและสภาพแวดล้อม

นอกจากนี้ยังมีแมลงวันหัวเขียวชนิดอื่นๆ ได้แก่ *Chrysomya albiceps* ลำตัวมันวาวสีเขียว ขนาด 6-12 มิลลิเมตร คล้ายคลึงกับ *Chrysomya rufifacies* มาก แต่แตกต่างกันที่ *Chrysomya albiceps* ไม่มีขน stigmatic bristle มักพบแพร่กระจายแถบประเทศจีน อินเดีย รวมทั้งมีการแพร่กระจายเข้าไปในแถบอเมริกาใต้ แมลงวันชนิดนี้ชอบตอมอาหารที่เริ่มมีกลิ่นบูดเน่า จึงชอบวางไข่ตามกองขยะมูลสัตว์และสิ่งปฏิกูลทั่วไป สำหรับแมลงวันอีกชนิด คือ *Chrysomya bezziana* ลำตัวมันวาวสีน้ำเงินปนเขียวที่ส่วนอกมีสีดำพาดตามยาว ตัวเมียชอบวางไข่บนผิวหนังของสัตว์ เมื่อไข่ฟักเป็นตัวอ่อนตัวอ่อนก็จะไชเข้าไปที่แผลผิวหนังสัตว์ ทำให้เกิด Cutaneous myiasis ได้ เรียกตัวอ่อนนี้ว่า screw worm พบมากในแอฟริกาและเอเชียตอนใต้ ซึ่งเป็นปัญหาต่อการปศุสัตว์มากในพื้นที่ดังกล่าว สำหรับในประเทศไทยเคยมีรายงานน้อย

Lucilia cuprina (Australian sheep blowfly) จัดอยู่ในชั้นแฟมีลี Calliphorinae มีสีของลำตัวแตกต่างจากแมลงวันหัวเขียวชนิดอื่นมาก คือ ลำตัวมีสีคล้ายทองแดง ขนแข็งบนอกปล้องกลางเจริญดีและ stem vein จะไม่มีขนขึ้นเป็นแถวคล้ายคลึงกับ *Lucilia sericata* ลำตัวมีขนาด 5-10 มิลลิเมตร แต่ด้านหลังของ humerus มีขนขึ้น 2-4 เส้น notopleuron มีขนเล็กๆปกคลุมเพียงเล็กน้อย แผ่นแข็งด้านหลังของท้องตัวผู้จะมีขนยาวปกคลุม บริเวณตาเดี่ยวมี ocellar bristles 2 คู่ ตัวผู้ตารวมค่อนข้างห่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับแมลงวันบ้าน *Musca domestica* โดยตัวเมียจำเป็นต้องกินโปรตีนเพื่อให้ไข่มีพัฒนาการสมบูรณ์ โปรตีนจะได้จากซากสัตว์และมูลสัตว์ ตัวเมียจะวางไข่ในซากสัตว์โดยกลิ่นของซากสัตว์ที่เน่าเหม็นจะเป็นตัวชักนำให้แมลงวันมาวางไข่ การ

วางไข่จะวางเป็นกลุ่มๆละประมาณ 100-300 ฟอง ถ้าอุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียสและความชื้นสัมพัทธ์สูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ไข่จะฟักภายใน 8-12 ชั่วโมง *Lucilia cuprina* ออกหากินเวลากลางวัน วางไข่ในช่วงบ่าย และจะเจริญเต็มที่และฟักออกเป็นตัวหนอนเวลากลางคืนแต่หากความชื้นไม่เพียงพอไข่จะไม่ฟักตัว จากการสำรวจในเขตเมืองจะพบแมลงวัน *Lucilia cuprina* ตามกองขยะสดที่มีกลิ่นเน่าเหม็นและตามแหล่งกำจัดขยะมูลฝอยแบบฝังกลบที่พบแมลงวันหัวเขียว *Chrysomya megacephala* จะพบแมลงวัน *Lucilia cuprina* แต่ความหนาแน่นจะต่ำกว่าแหล่งเกาะพักของแมลงวัน *Lucilia cuprina* พบตามต้นหญ้าใกล้กับแหล่งหากินและแหล่งเพาะพันธุ์ แมลงวันชนิดนี้มักชอบเกาะพักในระดับต่ำใกล้ผิวดินมากกว่าระดับสูง (บุญเสริม อ่วมอ่อง, 2543)

แมลงวันหัวเขียวมีบทบาทในการพิสูจน์หลักฐานทางอาชญากรรม การรายงานของ Sukontason et al. (2007) แมลงวันหัวเขียวพบบนศพ 28 ราย คิดเป็น 93.3% โดยเป็นสปีชีส์ที่รู้จักกันโดยทั่วไป คือ *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya rufifacies*, *Chrysomya nigripes*, *Chrysomya chain*, *Chrysomya villeneuvi*, *Chrysomya bezziana*, *Lucilia cuprina* และ *Hemipyrellia ligurriens* นอกจากนี้ยังพบหนอนแมลงวันหัวเขียวที่ไม่สามารถจำแนกสปีชีส์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ 2 ตัวอย่าง ประกอบกับไม่สามารถเลี้ยงให้เป็นตัวเต็มวัยได้ และจากการรวบรวมข้อมูลพบว่า *Chrysomya megacephala* และ *Chrysomya rufifacies* เป็น 2 สปีชีส์ที่พบมากที่สุด ดังตารางที่ 2.1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Family	Species	Location			Total
		Forest	Outdoor urban/suburban	Indoor urban/suburban	
Diptera					
Calliphoridae (n=28)	<i>Chrysomya megacephala</i>	11	3	6	20
	<i>Chrysomya rufifacies</i>	8	4	5	17
	<i>Chrysomya bezziana</i>	1	0	0	1
	<i>Chrysomya chani</i>	1	0	0	1
	<i>Chrysomya nigripes</i>	3	0	0	3
	<i>Chrysomya villeneuvi</i>	6	0	1	7
	<i>Hemipyrellia ligurriens</i>	1	0	0	1
	<i>Lucilia cuprina</i>	2	1	0	3
	Two unidentified	7	1	1	9
	Muscidae (n=10)	<i>Hydrotaea spinigera</i>	7	0	0
<i>Synthesiomyia nudiseta</i>		0	0	3	3
Sarcophagidae (n=8)	<i>Parasarcophaga ruficornis</i>	0	0	2	2
	Three unidentified larvae ^a	3	1	3	7
Phoridae (n=2)	<i>Megaselia scalaris</i>	2	0	0	2
Piophilidae (n=3)	<i>Piophila casei</i>	3	0	0	3
Stratiomyiidae (n=2)	<i>Sargus</i> sp.	2	0	0	2
Coleoptera					
Dermestidae (n=5)	<i>Dermestes maculatus</i>	4	0	0	4
	One unidentified	3	0	0	3
Hymenoptera					
Formicidae (n=1)	One unidentified	1	0	0	1

ตารางที่ 2.1 จำนวนแมลงแต่ละชนิดที่พบบนศพทางตอนเหนือของประเทศไทย ตั้งแต่ปี 2000-2006

นิติกีฏวิทยา (Forensic Entomology)

การนำความรู้ทางด้านชีววิทยาของแมลงซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตใน Phylum Arthropoda มาประยุกต์ใช้อ้างอิงในกระบวนการทางกฎหมาย โดยสามารถแบ่งเป็นสาขาย่อยได้ดังนี้ Stored product entomology เป็นการนำความรู้เรื่องแมลงไปใช้ในกระบวนการพิจารณาทางกฎหมายในเรื่องเกี่ยวกับอาหารหรือผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่ใช้เพื่อการบริโภค เช่น หนอนแมลงในผัก และตัวมอดในข้าวสาร เป็นต้น Structural/urban entomology เป็นการนำความรู้เกี่ยวกับแมลงไปใช้ในกระบวนการพิจารณาทางกฎหมายในส่วนของสิ่งปลูกสร้าง หรืออาคารต่างๆ เช่น การพบปลวกในโครงสร้างอาคาร หรือการพบแมลงสาปภายในบ้าน เป็นต้น Medicolegal entomology เป็นการนำความรู้เกี่ยวกับการแพทย์ และชีววิทยาของแมลงมาประยุกต์ใช้ในทางกฎหมาย Stored product entomology และ Structural entomology เป็นการใช้เพื่อพิจารณาในคดีความทางแพ่ง เช่น การฟ้องร้องเรียกค่าเสียหาย เป็นต้น แต่ Medicolegal entomology ซึ่งเป็นการนำความรู้ทางกีฏวิทยามาใช้ร่วมกับความรู้ทางด้านนิติเวชศาสตร์ ปัจจุบันได้มีการนำความรู้ด้านกีฏวิทยามาใช้ในงานของนิติเวชหลายด้าน เช่น

INSECT FAMILY	STAGES OF DECOMPOSITION			
	FRESH	BLOATED	DECAY	DRY
CALLIPHORIDAE: (blow flies)	—	—	—	—
MUSCIDAE: (muscid flies)	—	—	—	—
SILPHIDAE: (carrion beetles)	—	—	—	—
SARCOPHAGIDAE: (flesh flies)	—	—	—	—
STAPHYLINIDAE: (rove beetles)	—	—	—	—
DERMESTIDAE: (dermestid beetles)	—	—	—	—
SCARABAEIDAE: (lamellicorn beetles)	—	—	—	—

*Each stage of decomposition is given the same amount of space in this table.

- Indicates a small number of individuals present.
- Indicates a moderate number of individuals present.
- Indicates a large number of individuals present.

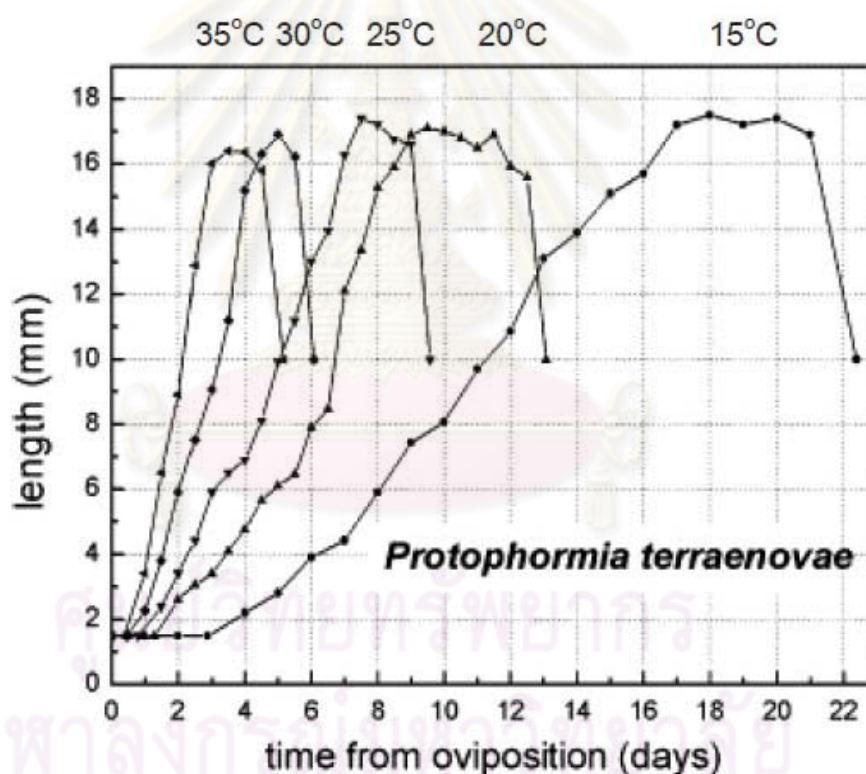
ตารางที่ 2.3 หนอนแมลงที่พบบริเวณศพตามระยะต่างๆ ในรัฐเทเนสซีช่วงฤดูใบไม้ผลิและฤดูร้อน (ดัดแปลงจาก Rodriguez and Bass, 1983)

วิธีนี้เหมาะสำหรับการประมาณระยะเวลาการตายที่นานกว่า 20 – 30 วัน หรืออาจเป็นเดือนมากกว่าที่จะใช้ประมาณระยะเวลาการตายในกรณีที่เสียชีวิตมาไม่กี่วัน เนื่องจากการประมาณในช่วงเวลากว้างๆ และการใช้วิธีนี้ในการประมาณระยะเวลาการตายจำเป็นที่จะต้องมีการรวบรวมข้อมูลของแมลงที่มากินศพแต่ละชนิดในแต่ละท้องถิ่น เนื่องจากชนิดของแมลงมักจะเปลี่ยนไปตามแต่ละภูมิภาคซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุที่ทำให้วิธีนี้ค่อนข้างที่จะไม่สะดวกในการใช้งาน

2) ประเมินจากการเปลี่ยนแปลงในระยะต่างๆ ตามวงจรชีวิตของแมลง (Estimating the PMI from degree of development) เป็นการประมาณระยะเวลาการตายโดยใช้ข้อมูลระยะเวลาการเปลี่ยนแปลงในแต่ละช่วงของวงจรชีวิตของแมลงที่พบบริเวณศพ ซึ่งวิธีนี้เหมาะสำหรับการประเมินระยะเวลาการตายในช่วงไม่กี่สัปดาห์หลังการเสียชีวิต หรือตามระยะเวลาทั้งหมดของวงจรชีวิตของแมลงที่พบในบริเวณศพนั้นๆ นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงของแมลงยังขึ้นอยู่กับปัจจัยภายนอกต่างๆ เช่น อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ และปริมาณอาหาร เป็นต้น แต่ปัจจัยที่สำคัญที่สุดก็คืออุณหภูมิ โดยแมลงจะมีการเจริญเติบโตได้ดีในอุณหภูมิที่สูงมากกว่าอุณหภูมิที่ต่ำ แต่อุณหภูมิดังกล่าวจะต้องอยู่ในช่วงที่แมลงชนิดนั้นๆ สามารถเติบโตได้ด้วย ซึ่งแมลงที่มีบทบาทในการประมาณระยะเวลาการตายด้วยวิธีนี้ก็คือ แมลงวันหัวเขียว (blowflies) เนื่องจากเป็นแมลงที่อยู่ใกล้ชิดกับมนุษย์ มีนิสัยชอบตอมสิ่งปฏิกูลรวมทั้งซากศพ และกระจายอยู่ทุกแห่ง นอกจากนี้ยังเป็นแมลงชนิดแรกๆ ที่เข้ามาตอมศพหลังจากเสียชีวิต ในสภาวะที่เหมาะสม เช่นอุณหภูมิที่พอเหมาะจะวางไข่ภายใน 1 ชั่วโมง การที่จะนำแมลงวันหัวเขียวมาใช้ในการประมาณระยะเวลาการตายนั้นจำเป็นต้องทราบข้อมูลวงจรชีวิตของแมลงวันหัวเขียวเสียก่อน หลังจากทราบข้อมูลวงจรชีวิตของแมลงวันหัวเขียวแล้วก็สามารถนำข้อมูลดังกล่าวมาใช้ในการ

ประมาณระยะเวลาการตายได้โดยอาศัยความยาวของหนอนแมลงวัน ซึ่งจะวัดจากตัวหนอนที่มีขนาดใหญ่ และยาวที่สุดที่พบในบริเวณศพเนื่องจากเป็นหนอนที่มีอายุมากที่สุด ตามที่ได้กล่าวมาข้างต้นแล้วว่ปัจจัยภายนอกก็มีผลต่อการเจริญเติบโตของหนอนแมลงวัน และปัจจัยที่สำคัญที่สุดก็คืออุณหภูมิ ดังนั้นการประมาณระยะเวลาการตายจะต้องมีข้อมูลของอุณหภูมิในบริเวณที่พบศพมาประกอบด้วย

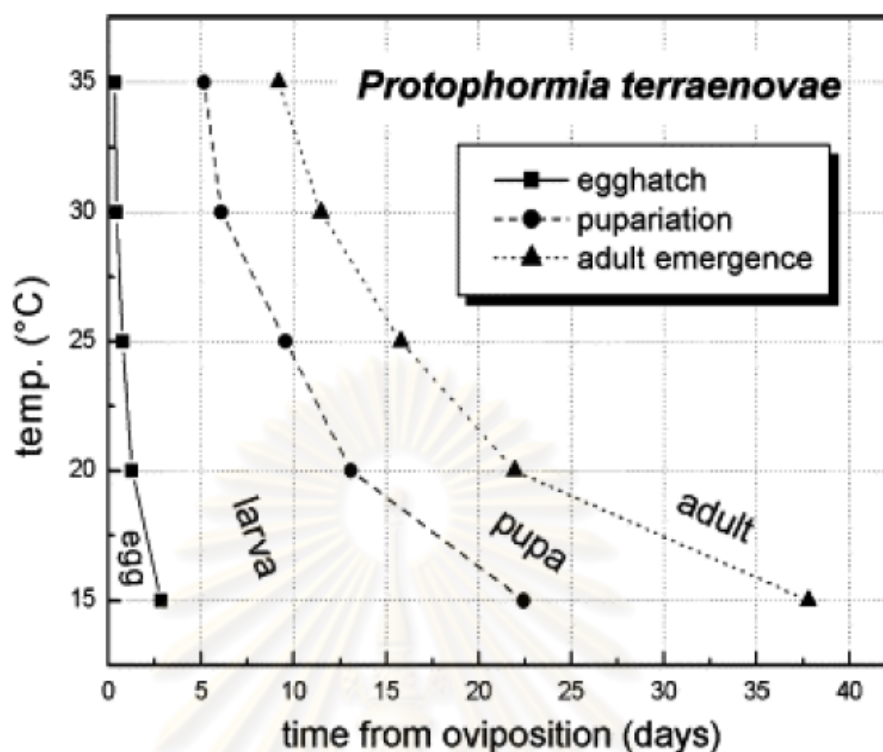
จากการศึกษาของ Grassberger และ Reiter ถึงผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของแมลงวัน หัวเขี้ยว *Protophormia terraenovae* ตั้งแต่เป็นไข่จนกระทั่งโตเต็มวัย พบว่าอุณหภูมามีผลต่อระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญเติบโตของแมลงทุกระยะ โดยศึกษาผลที่อุณหภูมิตั้งที่ 15, 20, 25, 30, และ 35 °C แล้วนำมาเขียนเป็นกราฟโดยแนวตั้งเป็นความยาวของตัวหนอน และแนวนอนเป็นระยะเวลาหลังจากฟักออกจากไข่ (รูปที่ 2.2)



รูปที่ 2.2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาและการเปลี่ยนแปลงของแมลง (ดัดแปลงจาก Grassberger and Reiter, 2002)

ตำแหน่งสูงสุดของกราฟ คือระยะ peak feeding และกราฟสิ้นสุดเมื่อแมลงวันเข้าสู่ระยะดักแด้ หลังระยะ peak feeding แล้วความยาวของหนอนแมลงวันลดลง ดังนั้นหากนำหนอนระยะที่ 3 มาประมาณค่า PMI ต้องสังเกตว่าหนอนเข้าสู่ระยะ peak feeding แล้วหรือไม่ ประโยชน์ของกราฟนี้คือเมื่อเก็บตัวอย่างหนอนแมลงวันจากศพมาวัดขนาดโดยมีข้อมูลของอุณหภูมิเฉลี่ยในที่เกิดเหตุมาประกอบแล้วลากเส้นลงมาถึงแกนเวลาเรา ก็จะสามารถประมาณวันที่เสียชีวิตได้อย่างไรก็ตามการใช้กราฟนี้ยังมีข้อจำกัดอยู่ หากศพอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิมากการใช้กราฟนี้ประมาณระยะเวลาการตายจะไม่แม่นยำเท่าที่ควร แต่หากศพอยู่ในที่ที่มีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิไม่มาก การใช้กราฟช่วยประมาณจะมีความแม่นยำมากขึ้น

นอกจากนี้ Grassberger และ Reiter ยังนำข้อมูลที่ได้มาเขียนเป็นกราฟที่เรียกว่า Isomorphen-diagram (รูปที่ 2.3) โดยแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ และระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญในแต่ละระยะของแมลงวันตั้งแต่ ไข่จนถึงเวลาฟักเป็นตัวหนอน (hatching) ระยะดักแด้ (pupariation) และระยะที่แมลงวันออกจากดักแด้ (adult emergence หรือ eclosion) ประโยชน์ของ Isomorphen-diagram คือ สามารถนำมาใช้ในการประมาณระยะเวลาการตายโดยใช้ระยะของแมลงวันที่พบมาคำนวณย้อนกลับไป โดยนำแมลงระยะที่แก่ที่สุดที่พบบริเวณศพมาเลี้ยงจนกระทั่งออกมาจากดักแด้ และนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณโดยลากเส้นจากอุณหภูมิที่วัดได้ขณะพบศพไปยังระยะของแมลงตัวเต็มวัย แล้วจึงลากเส้นลงมาจะได้อายุของแมลงทั้งหมดตั้งแต่ไข่จนกระทั่งเป็นตัวเต็มวัยที่อุณหภูมิดังกล่าว หลังจากนั้นนำอายุของแมลงที่ได้มาลบด้วยจำนวนวันที่เลี้ยงแมลงที่เก็บมาจะได้ระยะเวลาการตาย



รูปที่ 2.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาและอุณหภูมิต่อการเจริญของแมลง (Grassberger and Reiter, 2002)

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของแมลงและการกินซากศพ เช่น 1) **ชนิดของแมลง** การจำแนกชนิดของตัวอย่างแมลงได้อย่างถูกต้องเป็นข้อมูลที่สำคัญทางนิติวิทยาศาสตร์ในการประมาณเวลาหลังการตาย แมลงที่กินซากศพแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันในด้านการเจริญเติบโต ระยะเวลาที่เข้าถึงศพ และตำแหน่งการชอนไช เป็นต้น 2) **ภูมิอากาศและฤดูกาล** มีผลต่อระบบเมตาบอลิซึมและอัตราการเจริญเติบโตในแมลง (Adrewartha and Birch, 1954; Chapman, 1982) โดยทั่วไปในช่วงหนึ่งของอุณหภูมิ แมลงจะมีการเจริญเติบโตรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น แต่ไม่จริงในกรณีที่อุณหภูมิสูงเกินไปอาจทำให้ตายได้ 3) **แหล่งอาหาร** หนอนแมลงวันจะเจริญเติบโตในอาหารแต่ละประเภทแตกต่างกัน เช่น *Lucilia sericata* (Meigen) จะเจริญเติบโตในพวกซากพืชได้ช้ากว่าพวกเนื้อสัตว์ (Povolny and Rozsypal, 1968) 4) **ยาและสารพิษ** อาจพบอยู่ในหรือบนเหยื่อมีผลต่อแมลงที่กินซากศพ (Goff and Lord, 1994) เช่น โคเคน เฮโรอีน จะเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของหนอนแมลงวัน นอกจากนี้กระบวนการเน่าเปื่อยจะเพิ่มขึ้นหรือลดลงขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและชนิดของสารด้วย 5) **ภูมิภาค** พฤติกรรมของแมลงวันที่กินซากศพแตกต่างกันตามภูมิภาค เช่น *Chrysomya rufifacies* (Macquart) จะบุกรุกสัตว์ที่มีชีวิตหรือซากสัตว์เน่าเปื่อยเมื่อมีหนอนแมลงวันชนิดอื่นปรากฏอยู่ก่อน (Bohart and Gressitt, 1951;

Wells and Greenberg, 1994; Zumpt, 1965) แต่ในบางพื้นที่อาจพบวางไข่บนซากสัตว์สดๆ หรือ สัตว์แรกเกิด (O'Flynn and Moorehouse, 1979)

การใช้แมลงเป็นหลักฐานแสดงถึงการเคลื่อนย้ายศพ (Movement of the corpse)

แมลงเป็นสัตว์ที่มีกระจายอยู่ทั่วทุกมุมโลก แต่ก็มีแมลงหลายชนิดที่อาศัยอยู่เฉพาะบางพื้นที่ จากความรู้ดังกล่าวข้างต้นสามารถนำมาใช้ในการระบุว่าศพที่พบนั้นได้มีการเคลื่อนย้ายมาจากที่อื่นหรือไม่ โดยถ้าศพที่เราพบนั้นมีแมลงที่ไม่สามารถพบได้ในพื้นที่ที่พบศพ ให้ตั้งข้อสงสัยว่าศพดังกล่าวน่าจะถูกลูกเคลื่อนย้ายมาจากสถานที่อื่น และถ้าหากแมลงที่พบในศพเป็นแมลงที่สามารถพบได้เฉพาะบางพื้นที่ก็จะทำให้ทราบว่าศพดังกล่าวถูกลูกเคลื่อนย้ายมาจากสถานที่ใดบ้าง นอกจากนี้ระยะต่างๆ ในวงจรชีวิตของแมลงที่พบในศพสามารถนำมาใช้คำนวณว่าศพดังกล่าวได้อยู่ในสถานที่ที่มีแมลงเหล่านั้นเป็นระยะเวลาเท่าใดได้ด้วย ซึ่งการที่จะระบุสถานที่ที่ศพถูกเคลื่อนย้ายมา ให้มีความแม่นยำเท่าใดก็ขึ้นอยู่กับชนิดของแมลงที่พบในศพว่ามีที่อาศัยกระจาย เป็นพื้นที่กว้างแค่ไหน ยิ่งแมลงที่พบมีการอาศัยอยู่ในพื้นที่ที่จำกัดความแม่นยำในการระบุสถานที่ที่ศพถูกเคลื่อนย้ายมาก็ยิ่งสูงขึ้น (Jens, 2004)

การใช้แมลงเป็นหลักฐานเชื่อมโยงในที่เกิดเหตุ (Crime scene characterization)

เช่นเดียวกับการเคลื่อนย้ายศพ แมลงบางชนิดมีถิ่นที่อยู่อาศัยในเฉพาะบางพื้นที่เท่านั้น ดังนั้นจึงสามารถใช้แมลง หรือรอยกัดของแมลงมาเป็นหลักฐานในการเชื่อมโยงระหว่างที่เกิดเหตุเหยื่อ หรือผู้ต้องสงสัยได้ว่าเคยไปยังสถานที่ที่พบแมลงเหล่านั้นมาก่อนหรือไม่

การใช้แมลงช่วยระบุตำแหน่งบาดแผลบนศพ (Assessment of trauma)

โดยปกติมักจะพบแมลงตัวเต็มวัย ไข่ หรือหนอนแมลง โดยเฉพาะแมลงวันบริเวณรูเปิดบนร่างของศพ ได้แก่ บริเวณรูจมูก ปาก ทวารหนัก และอวัยวะเพศ เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีความชื้นสูงจากสารคัดหลั่งต่างๆ รวมทั้งเลือดทำให้เหมาะแก่การวางไข่ของแมลง แต่ถ้าหากศพมีบาดแผลที่เกิดก่อนเสียชีวิต หรือเกิดระหว่างที่กำลังจะเสียชีวิตในขณะที่ยังมีการไหลเวียนของโลหิตอยู่ จะทำให้มีเลือดออกบริเวณบาดแผลดังกล่าวซึ่งจะดึงดูดแมลงให้มาวางไข่ โดยจะต่างจากแผลที่เกิดหลังจากเสียชีวิตไปแล้วที่จะไม่พบเลือดออกทำให้ไม่มีแมลงมาวางไข่บริเวณแผลดังกล่าว จากข้อมูลนี้ทำให้สามารถแยกแยะระหว่างบาดแผลที่เกิดก่อน และหลังจากเสียชีวิตได้ นอกจากนี้ในกรณีที่

ศพเน่ามากทำให้ไม่แน่ใจว่ามีบาดแผลบนศพหรือไม่ แต่ถ้าหากพบหนองแมลงในบริเวณอื่นบนร่างกายที่ไม่ใช่รูเปิดตามปกติของร่างกายก็ให้ตั้งข้อสงสัยว่าบริเวณที่พบหนองแมลงดังกล่าวน่าจะเป็นบริเวณที่มีบาดแผลที่เกิดก่อนเสียชีวิต

การใช้แมลงในการหาหลักฐานทางพิษวิทยา (Entomotoxicology)

ในหลายกรณีศพที่พบนั้นเสียชีวิตมานานทำให้ศพเน่ามากหรือถูกย่อยสลายจนกระทั่งเป็นโครงกระดูกทำให้การเก็บสารต่างๆ หรือเนื้อเยื่อจากศพเพื่อนำไปใช้วิเคราะห์ทางพิษวิทยาไม่สามารถทำได้เนื่องจากขาดแหล่งที่เหมาะสม เช่น เนื้อเยื่อ เลือดหรือปัสสาวะ แต่ถ้าหากพบแมลงรวมทั้งคราบหรือซากของแมลงที่มากินศพ สามารถนำชิ้นส่วนของแมลงดังกล่าวมาทำการวิเคราะห์ทางพิษวิทยาได้ (Miller et al., 1994; Bourel et al., 2001) และโดยปกติสามารถใช้วิธีการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ทางพิษวิทยาตามปกติได้ เช่น radioimmunoassay (RIA), gas chromatography (GC), thin-layer chromatography (TLC), และ high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) เป็นต้น

นอกจากนี้ สารเคมีบางชนิดที่พบในศพยังส่งผลทำให้การประมาณระยะเวลาการตายจากวงจรชีวิตของแมลงที่พบบริเวณศพเกิดการคลาดเคลื่อนได้ เนื่องจากสารเคมีบางชนิดมีผลต่อการเจริญเติบโตของแมลงทำให้เร็วขึ้น หรือช้าลงกว่าปกติ (O'Brien and Turner, 2004) และในหลายงานวิจัยพบว่าศพที่เน่าในช่วง 2 - 4 สัปดาห์แรกสารเคมีบางชนิดที่พบในศพจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของหนอนแมลงวัน ซึ่งสารเคมีดังกล่าว ได้แก่ cocaine, heroin, phencyclidine, methylenedioxymethamphetamine (MDMA), methamphetamines และ amitriptyline

การใช้แมลงในการหาสารพันธุกรรมของมนุษย์ (Source of human DNA)

การเพิ่มจำนวน และวิเคราะห์สารพันธุกรรมได้ก้าวหน้าไปมาก สามารถใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ในการแยกดีเอ็นเอของมนุษย์ออกจากอาหารในกระเพาะหรืออุจจาระของแมลง เช่น ยุง แมลงวัน หรือ เหาได้ และการวิเคราะห์ดีเอ็นเอดังกล่าวใช้ในการยืนยันบุคคลจากหนอนแมลงวันที่เข้าไปกินซากศพนั้นได้ (Zehner et al., 2004) นอกจากนี้การสกัด mtDNA จากหนอนแมลงที่กินกระดูก เช่น แมลงปีกแข็งพวก *Nitidulidae* เป็นต้น เป็นการเพิ่มช่วงเวลาที่จะสามารถหาหลักฐานเพื่อยืนยันบุคคลจากการใช้ผลวิเคราะห์สารพันธุกรรมให้มากขึ้น

การใช้แมลงเป็นหลักฐานในการทารุณกรรม (Indicators of physical abuse)

จากที่พบว่ามี การทอดทิ้ง และทารุณกรรม ในเด็ก คนชรา และผู้ที่ไม่สามารถช่วยเหลือตนเองได้เพิ่มมากขึ้น ในบางกรณีการใช้หลักฐานทางกีฏวิทยาสามารถช่วยประมาณระยะเวลาที่ถูกทอดทิ้ง หรือถูกทารุณกรรมได้ เนื่องจากแมลงบางชนิดมีนิสัยในการตอม และวางไข่บนบาดแผลของมนุษย์ที่มีชีวิต เช่น แมลงวัน *Lucilia sericata* ซึ่งจะทำให้เกิดเป็นหนองมากัดกินบาดแผล (Myiasis) และจากการใช้ข้อมูลวงจรชีวิตของแมลงในการประมาณระยะเวลาของหนองตั้งแต่ออกจากไข่จนกระทั่งกลายเป็นหนองในระยะที่พบบนบาดแผล ทำให้สามารถนำไปใช้ประกอบในการประมาณระยะเวลาที่ถูกทอดทิ้งหรือทารุณกรรมได้

นอกจากนี้การที่มีแมลงมาวางไข่บนบาดแผลในขณะที่มนุษย์ยังมีชีวิตนั้น ในกรณีที่มีการเสียชีวิตอาจทำให้การประมาณระยะเวลาการตายจากหนองแมลงที่พบบนศพคลาดเคลื่อนไปได้ เนื่องจากได้รวมอายุของหนองแมลงที่มากินบาดแผลของศพตั้งแต่ก่อนที่จะเสียชีวิตเข้าไปด้วย ดังนั้นในการเก็บหนองแมลงจากศพจึงต้องมีการบันทึกข้อมูล ตำแหน่งที่เก็บหนองแมลงให้ละเอียดเพื่อช่วยในการประเมิน และป้องกันความผิดพลาดในการประมาณระยะเวลาการตายที่อาจเกิดขึ้นยังสามารถใช้ในการยืนยันบุคคลจากหนองแมลงวันได้ รวมทั้งใช้ในการจำแนกชนิดของแมลงวันได้เช่นเดียวกัน (Gennard, 2007)

ไมเอียซิส (Myiasis)

คือโรคที่เกิดจากหนองแมลงวันอาศัยอยู่ในคนหรือสัตว์ที่มีชีวิตในช่วงระยะเวลาหนึ่ง หนองแมลงวันจะดูดกินเนื้อเยื่อของโฮสต์หรืออาหารที่โฮสต์กินเข้าไปทำให้เกิดพยาธิสภาพขึ้น เป็นปัญหาร้ายแรงสำหรับอุตสาหกรรมปศุสัตว์และเกิดขึ้นบ่อยในประชากรที่อาศัยอยู่ตามชนบท เขตร้อนและภูมิภาคใกล้เคียงเขตร้อน ในแฟมิลี Calliphoridae (blowflies) หรือแมลงวันหัวเขียวอย่างน้อย 80 ชนิดพบว่าก่อให้เกิดโรคไมเอียซิส (Zumpt, 1965) หนองแมลงวันหัวเขียวปกติเป็นสาเหตุของ external myiasis และจัดเป็น ectoparasite ส่วน internal myiasis เกี่ยวข้องกับหนองแมลงวันในแฟมิลี Oestridae โดยจุดเริ่มต้นของโรคไมเอียซิสในแฟมิลี Calliphoridae เช่น *Chrysomya* spp., *Cochliomyia* spp., *Calliphora* spp. และ *Lucilia* spp. ยังไม่ชัดเจน (Erzinclioğlu, 1989; Zumpt, 1965) แมลงวันที่มีบทบาทมาก คือ *Lucilia sericata* สาเหตุของโรคไมเอียซิสที่พบบ่อยแถบออสเตรเลียและอังกฤษ ส่วนในแถบแอฟริกา คือ *Chrysomya megacephala* และ *Cochliomyia macellaria* แมลงวันหัวเขียวสามารถแบ่งเป็น 3 กลุ่มตามนิสัย

การกินอาหารของตัวอ่อน ได้แก่ 1) **saprophagy** คือ หนอนแมลงวันที่ปกติอาศัยอยู่ในซากพืช ซากสัตว์และอินทรีย์วัตถุที่เน่าเปื่อยเพื่อเป็นอาหาร ไม่ได้เป็นสาเหตุของไมเอียซิสโดยตรงแต่อาจมีการชอนไชเนื้อเยื่อเมื่อมีหนอนแมลงวันอื่นชอนไชอยู่ก่อน 2) **facultative ectoparasitism** คือ หนอนแมลงวันที่สามารถอาศัยแบบ Saprophage และสามารถปรับตัวเป็น ectoparasite เพื่ออาศัยกับสิ่งมีชีวิตในบางช่วงเป็นจุดเริ่มต้นของโรคไมเอียซิส และ 3) **obligate parasitism** คือ หนอนแมลงวันต้องอาศัยอยู่บนสัตว์มีกระดูกสันหลังตลอดเวลาเพื่อกินเนื้อเยื่อสัตว์เหล่านั้น ส่วนใหญ่เป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและนก (Hall and Wall, 1995) การจัดกลุ่มในบทบาทหน้าที่ดังกล่าว สะท้อนถึงวิวัฒนาการการดำรงชีวิตแบบปรสิต (parasitism) ในแฟมิลี Calliphoridae หรือแมลงวันหัวเขียว พบว่าบางโอกาสที่แมลงวันในกลุ่ม Saprophagy เช่น *Calliphora* spp. สามารถก่อให้เกิดโรคไมเอียซิสตามบาดแผล เนื้อเยื่อที่ใกล้ตายของโฮสต์ หรือกลุ่ม facultative ectoparasitism เช่น *Lucilia* spp. ก่อโรคไมเอียซิสตามบริเวณผิวหนังที่มีการปนเปื้อนอุจจาระ หรือบริเวณแผลที่มีการติดเชื้อแบคทีเรีย การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) ของแมลงวันที่เป็นสาเหตุของโรคไมเอียซิส (myiasis-causing flies) เช่น แมลงวันหัวเขียว (family : Calliphoridae) บนพื้นฐานของดีเอ็นเอจะเป็นข้อมูลเบื้องต้นบ่งชี้จุดเริ่มต้น obligate parasitism ของแมลงวันและการก่อโรคไมเอียซิสในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง (higher vertebrate) (Stevens, 2003) รวมทั้งการจำแนกชนิดแมลงวันก่อโรคมีความสำคัญในการกำจัดหรือรักษาที่มีประสิทธิภาพ มีการใช้เทคนิค PCR-RFLP, RAPD และ microsatellite ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic variability) โครงสร้างของกลุ่มประชากร (population structure) จำแนกชนิด (species identification) และมีประโยชน์ในการแสดงแผนภูมิทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ของแมลงวันที่ก่อโรคไมเอียซิส (Azeredo-Espin and Lessinger, 2006)

การวิเคราะห์ทางดีเอ็นเอในงานนิติกีฏวิทยา (DNA analysis in forensic entomology)

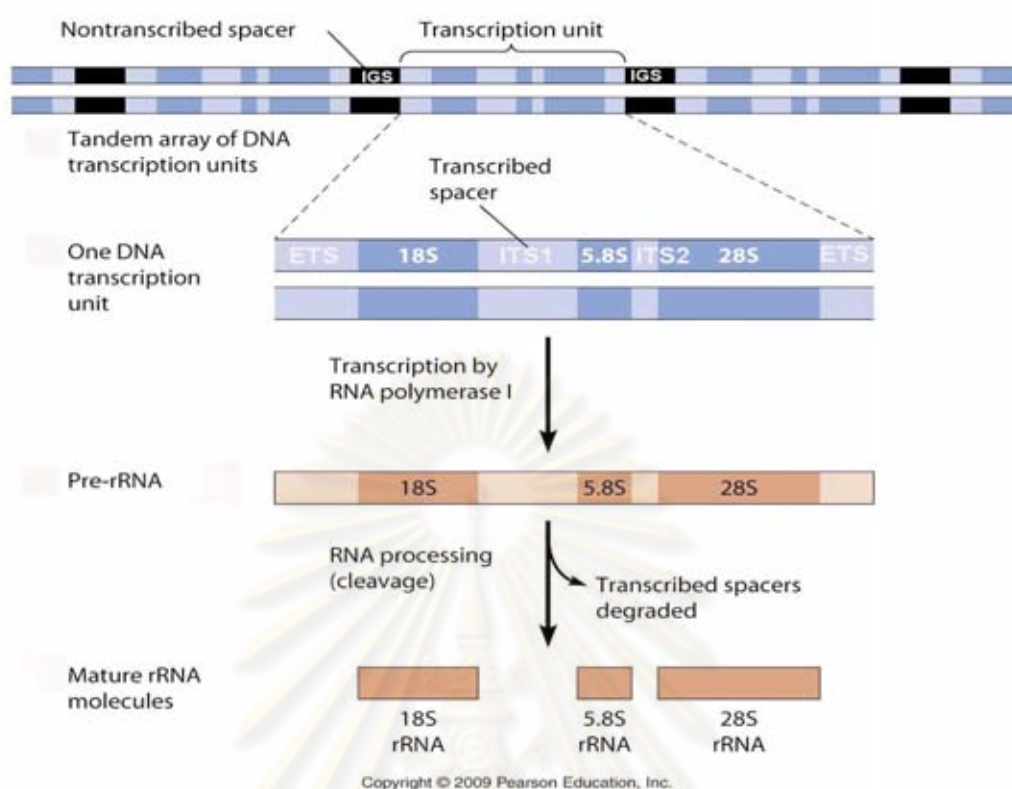
ข้อมูลการเจริญเติบโตแต่ละระยะของแมลงที่พบบนศพและการจำแนกชนิดถูกต้องมีความสำคัญทางนิติกีฏวิทยา การจำแนกชนิดของแมลงจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นวิธีที่ใช้โดยทั่วไป (Povolny and Verves, 1997; Smith, 1986) จำเป็นต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญทางด้านอนุกรมวิธาน รวมทั้งการจำแนกชนิดของแมลงจากตัวอย่างอ่อนกระทำได้ยากหรือไม่สามารถกระทำได้ บางครั้งตัวอย่างที่เก็บมาได้อยู่ในสภาพที่ไม่สมบูรณ์ ดังนั้นการจำแนกสปีชีส์จากสารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนที่เหมาะสม วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (alignment) กับฐานข้อมูลอ้างอิงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ได้รับการยอมรับ ในกระบวนการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) ต้องผ่านการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างโดยมีหลายวิธีด้วยกัน เช่น phenol/chloroform extraction, CTAB extraction, Chelex extraction หรือใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป เช่น QiAmpTissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany; Wells et al., 2001) หรือ DNAzol (Molecular Research Center, Cincinnati, Ohio, USA) ตามด้วยขั้นตอนพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนที่สนใจ โดยยีนที่นิยมใช้ในการศึกษา COI, COII, ND5, 12S rDNA, 16S rDNA (mitochondrial encoded) และ 28S rDNA, ITS1, ITS2 (nuclear encoded) เมื่อดำเนินการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างตรงกันกับฐานข้อมูลอ้างอิงสามารถสรุปว่าเป็นเหมือนกันหรือเป็นชนิดเดียวกันได้ การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) จากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์สามารถตรวจสอบความหลากหลายได้ทั้งหมดและยังคงเป็นทางเลือกหนึ่งในการจำแนกชนิด เทคนิคอื่นที่ประยุกต์ใช้ร่วมกัน เช่น PCR-RFLP (Sperling et al., 1994; Schroeder et al., 2003) เป็นเทคนิคให้ผลที่รวดเร็วแต่ข้อจำกัดในเรื่องขอบเขตของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกิดจากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เท่านั้น และอาจมีการแปลผลผิดพลาดในกรณีที่มีความหลากหลายภายในสายพันธุ์ (intraspecific variation) เกิดขึ้นบริเวณ restriction site (Jens et al., 2004)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หน่วยทรานสคริปชันของไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (Ribosomal RNA transcription unit)

โมเลกุลอาร์เอ็นเอ (RNA molecule) ของโปรคาริโอต และยูคาริโอต ที่ได้จากกระบวนการถอดรหัส (transcription) สามารถแบ่งได้เป็น 3 ชนิด คือ 1) messenger RNA (mRNA) ทำหน้าที่เป็นตัวกลางของยีนซึ่งจะถูกแปลรหัส (translation) ได้โปรตีนหรือสายโพลีเปปไทด์ 2) ribosomal RNA (rRNA) เป็นองค์ประกอบสำคัญของไรโบโซมซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนหรือการแปลรหัส และ 3) transfer RNA (tRNA) เป็นโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการนำกรดอะมิโนมาส่งให้ mRNA ทั้ง rRNA และ tRNA สามารถคงสภาพภายในเซลล์ได้ยาวนาน และสามารถทำงานได้ทันทีโดยไม่ต้องผ่านกระบวนการแปลรหัส โดยทั่วไปโมเลกุลของ rRNA ประกอบรวมอยู่กับโปรตีนแล้วเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนเรียกว่า ไรโบโซม ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการแปลรหัส ยูคาริโอตแบ่งโมเลกุลของ rRNA ได้เป็น 4 ชนิด คือ 28S rRNA, 18S rRNA, 5.8S rRNA และ 5S rRNA โดยโมเลกุล rRNA ของยูคาริโอตที่มี 4 ชนิด จะถูกผลิตออกมาในปริมาณเท่าๆกันและมีปริมาณมากเพียงพอ ดังนั้นยีน rRNA ที่ทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์โมเลกุล rRNA ทุกชนิดนั้นจะอยู่ในสภาพเป็นกลุ่มที่เรียกว่า rRNA transcription unit

rRNA transcription unit ของยูคาริโอตประกอบด้วยยีน 28S, 18S และ 5.8S rRNA เรียงต่อกันโดยแต่ละยีนถูกคั่นด้วย spacer ส่วนยีน 5S rRNA อยู่เป็นยีนเดี่ยวๆ ที่แยกไปอยู่ในตำแหน่งอื่นบนโครโมโซม บริเวณ spacer ดังกล่าว ได้แก่ internal transcribed spacer (ITS) 2 บริเวณ คือ ITS1 และ ITS2 ที่มีตำแหน่งอยู่ทั้งสองข้างของยีน 5.8S rRNA ซึ่งเรียงตัวอยู่บนโครโมโซมแท่งเดียวกันและ external transcribed spacer (ETS) 2 บริเวณ ทางตำแหน่งด้านนอกของยีน 28S และ 18S rRNA ในยูคาริโอตจะมี rRNA transcription unit ตั้งแต่ 50-500 ชุด แยกจากกันด้วย intergenic spacer (IGS) โดยพบว่าบริเวณ ITS และ ETS จะเป็นส่วนที่เริ่มต้นกระบวนการถอดรหัสเพื่อให้ได้ rRNA precursor molecule โดยกระบวนการที่เกิดจะค่อยๆ ตัดและแยกส่วน ITS และ ETS นำมาซึ่งการเกิดขึ้นของ ribosome โดยตรง (Singer et al., 1991) (รูปที่ 2.4)



รูปที่ 2.4 แสดงการจัดเรียงตัวของกลุ่มยีน rRNA ของสิ่งมีชีวิตชนิดยูคาริโอต

(ดัดแปลงจาก <http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-21/2115.jpg>)

ยีน ribosomal RNA (rRNA gene, rDNA) เป็น nuclear DNA ลักษณะเป็นยีนซ้ำๆ กัน (tandem repeat) แต่ละหน่วยที่ซ้ำกันนี้ประกอบด้วย บริเวณที่เป็นรหัส (coding region) สำหรับ rRNA ขนาด 18s, 5.8s และ 28s โดยมี spacer คั่นได้แก่ internal transcribed spacer (ITS) 2 บริเวณ คือ ITS1 และ ITS2, external transcribed spacer (ETS) และ intergenic spacer (IGS) บริเวณของยีน rRNA จะมีอัตราการกลายพันธุ์แตกต่างกัน คือ บริเวณที่เป็นรหัสของ rRNA จะค่อนข้างคงที่ไม่ค่อยเปลี่ยนแปลง และค่อนข้างจะเหมือนกันในสิ่งมีชีวิตต่างสปีชีส์และต่างจีเนัส ส่วนบริเวณ spacer จะมีอัตราการกลายพันธุ์ที่สูง ดังนั้นบริเวณ internal transcribed spacer ของยีน ribosomal RNA จึงเป็นบริเวณที่นิยมใช้ในการศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต รวมทั้งมีขนาดที่ค่อนข้างสั้นประมาณ 500-800 bp สามารถเพิ่มจำนวนได้ง่ายโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ (White et al., 1990)

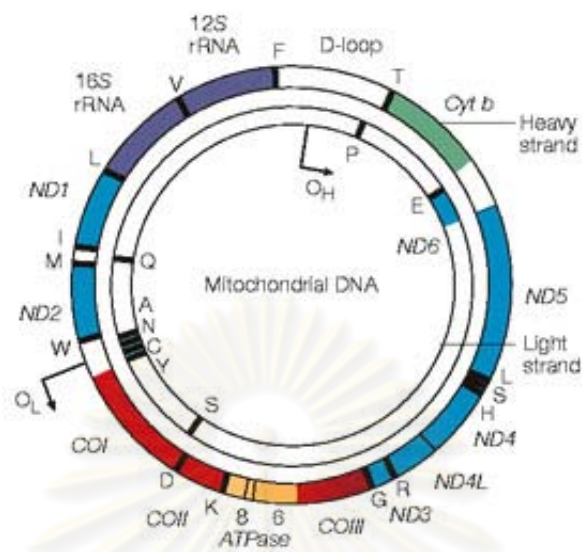
จีโนมไมโทคอนเดรีย (mitochondrial genome, mitochondrial DNA(mtDNA))

ลักษณะโดยทั่วไป

จีโนมไมโทคอนเดรียมีการถ่ายทอดทางมารดา จีโนมไมโทคอนเดรียจะอยู่ในไมโทคอนเดรียซึ่งเป็นส่วนที่อยู่ในไซโทพลาสซึมเท่านั้น จีโนมไมโทคอนเดรียของแมลงมีขนาด 16000 bp มีลักษณะเป็น double stranded ลอยอยู่ในส่วน matrix ของไมโทคอนเดรีย โดยที่ในหนึ่งไมโทคอนเดรียจะมีจีโนมไมโทคอนเดรียอยู่ประมาณ 5-10 copies สามารถถอดรหัสให้ยีนทั้งหมด 37 ยีน เป็นยีนที่ถอดรหัสให้ transfer RNA จำนวน 22 ยีน ถอดรหัสให้ ribosomal RNA จำนวน 2 ยีน และถอดรหัสให้โปรตีนจำนวน 13 ยีนโดยที่โปรตีนทั้ง 13 ชนิดนี้เป็นโปรตีนหน่วยย่อยของเอนไซม์เชิงซ้อนที่ใช้ในกระบวนการ oxidative phosphorylation ที่มีอยู่ 5 ตัว คือ NADH-ubiquinone oxidoreductase, Succinate-ubiquinone oxidoreductase, Ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase, Cytochrome oxidase และ ATP synthase

ยีนไมโทคอนเดรียที่ถอดรหัสเป็นโปรตีนหน่วยย่อยของเอนไซม์เชิงซ้อนตัวที่ 1 (NADH-ubiquinone oxidoreductase) จำนวน 7 ยีน คือ ยีน ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 และ ND6 ถอดรหัสเป็นโปรตีนหน่วยย่อยของเอนไซม์เชิงซ้อนตัวที่ 3 (Ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase) จำนวน 1 ยีน คือ ยีน *cytb* ถอดรหัสเป็นโปรตีนหน่วยย่อยของเอนไซม์เชิงซ้อนตัวที่ 4 (Cytochrome oxidase) จำนวน 3 ยีน คือ ยีน COI, COII และ COIII และเป็นโปรตีนหน่วยย่อยของเอนไซม์เชิงซ้อนตัวที่ 5 (ATP synthase) จำนวน 2 ยีน คือ ยีน ATP6 และ ATP8 (รูปที่ 2.5) (Anderson, 1981)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.5 ลักษณะของจีโนมไมโทคอนเดรีย

(ที่มา: http://www.nature.com/nrg/journal/v6/n5/fig_tab/nrg1606_F1.html)

ความหลากหลายของจีโนมไมโทคอนเดรีย

จีโนมไมโทคอนเดรียยังมีลักษณะที่แตกต่างจากจีโนมนิวเคลียสหลายประการ คือ 1) ตำแหน่งของจีโนมโดยที่จีโนมนิวเคลียสจะอยู่ในนิวเคลียสของเซลล์ ส่วนจีโนมไมโทคอนเดรียจะอยู่ในส่วนไซโทพลาซึมของเซลล์ 2) การถ่ายทอดสู่รุ่นลูกหลานของจีโนมนิวเคลียสจะเป็นไปตามทฤษฎีหรือตามกฎของเมนเดล ในขณะที่การถ่ายทอดของจีโนมไมโทคอนเดรียสู่รุ่นลูกหลานจะเป็นการถ่ายทอดทางสายแม่เท่านั้น 3) ลักษณะการจับรวมตัวกันของสารพันธุกรรมของจีโนมนิวเคลียสจะมีการรวมตัวกันชัดเจนและเกาะติดอยู่กับโปรตีนที่สำคัญคือ histone แต่จีโนมไมโทคอนเดรียจะไม่มี การรวมหรือเกาะติดกับโปรตีนใดๆ จีโนมไมโทคอนเดรียจะลอยอยู่ในส่วน matrix ของไมโทคอนเดรียอย่างนั้น และ 4) ขบวนการถ่ายแบบของจีโนมไมโทคอนเดรียที่เกิดขึ้นใน matrix นั้นไม่มี repairing system ทำให้เกิดความผิดพลาดในการถ่ายแบบสารพันธุกรรมของยีนไมโทคอนเดรียในอัตราที่สูงกว่าในยีนนิวเคลียสซึ่งมี repairing system ที่ดีมาก พบว่าอัตราการกลายพันธุ์ของจีโนมไมโทคอนเดรียสูงกว่ายีนนิวเคลียส 10-20 เท่า (Pesole et al., 1999) อัตราการกลายพันธุ์สูงกว่าจีโนมนิวเคลียสก็เนื่องจากลักษณะและสิ่งแวดล้อมรอบๆ จีโนมไมโทคอนเดรีย นั่นคือ การที่จีโนมไมโทคอนเดรียอยู่ในส่วน matrix ของไมโทคอนเดรียทำให้มีโอกาสสัมผัสกับอนุมูลเสรีที่เกิดจากขบวนการ oxidative phosphorylation สูงมากและตลอดเวลา นอกจากนั้นแล้วลักษณะของจีโนมไมโทคอนเดรียเองไม่มี repairing system ที่ดี ไม่มีโปรตีน histone ช่วย

ปกป้องล้อมรอบ ล้วนเป็นสิ่งที่ส่งเสริมให้จีโนมไมโทคอนเดรียมีอัตราการกลายพันธุ์ที่สูง อัตราการกลายพันธุ์ที่สูงดังกล่าวและการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของจีโนมไมโทคอนเดรียเป็นแบบทางสายมารดานี้มีประโยชน์ในการศึกษาวิวัฒนาการ

คุณสมบัติของดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียในการศึกษาวิวัฒนาการ

ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียมีอัตราการกลายพันธุ์สูงมากกว่าอัตราการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอในนิวเคลียสโดยภาพรวมประมาณ 10 เท่า ด้วยคุณสมบัติข้อนี้ทำให้เมื่อเวลาผ่านไปเท่าๆกัน จีโนมไมโทคอนเดรียจะสามารถสะสมการกลายพันธุ์ใหม่ๆได้มากกว่าในจีโนมนิวเคลียสประมาณ 10 เท่าตัวตามไปด้วย การสะสมการกลายพันธุ์ใหม่ในจีโนมไมโทคอนเดรียจะเป็นของนิวเคลียสหรือไมโทคอนเดรียย่อมเป็นสัดส่วนโดยตรงกับระยะเวลาที่ผ่านไป ในเมื่อจีโนมไมโทคอนเดรียสะสมการกลายพันธุ์ได้มากกว่าในระยะเวลาเท่าๆกันมันจึงเป็นเครื่องมือวัดการเปลี่ยนแปลงทางวิวัฒนาการที่มีทั้งความไวและละเอียดสูงกว่าดีเอ็นเอในนิวเคลียส

ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียพบได้ในเซลล์ที่มีชีวิตทุกๆเซลล์ของร่างกายโดยมีจำนวน copies ต่อเซลล์อยู่ในหลักพัน ขณะที่ดีเอ็นเอในนิวเคลียสมีเพียง 2 copies ต่อหนึ่ง somatic cell ด้วยคุณสมบัตินี้ทำให้สามารถตรวจพบและสกัดดีเอ็นเอจากจีโนมไมโทคอนเดรียได้ง่ายกว่าจากจีโนมนิวเคลียส โดยเฉพาะเมื่อเรามีตัวอย่างเซลล์หรือเนื้อเยื่อสำหรับการวิเคราะห์ในปริมาณน้อยมาก การที่ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียมีจำนวน copies มาก และค่อนข้างทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่เป็นกรดยังทำให้มีความเป็นไปได้มากที่ดีเอ็นเอซึ่งยังคงมีสภาพดีอยู่จะยังคงหลงเหลืออยู่ในตัวอย่างนานแล้วได้

การใช้ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียในการศึกษาวิวัฒนาการมีข้อจำกัดบางประการ คือ จีโนมไมโทคอนเดรียมีขนาดเล็กคิดเป็นเพียงร้อยละ 0.00006 ของจีโนมในนิวเคลียส ซึ่งเป็นตัวแทนได้ไม่ดีสำหรับวิวัฒนาการโดยภาพรวม ดังนั้นเราควรต้องใช้ในการศึกษาวิวัฒนาการจีโนมในนิวเคลียสมาช่วยตรวจสอบเทียบเคียงด้วยแม้ว่าวิวัฒนาการของดีเอ็นเอในนิวเคลียสจะสลับซับซ้อนและการวิเคราะห์ทางสถิติกระทำได้อย่างลำบากมากกว่า (พัชรีย์ เลิศฤทธิ, 2552)

เทคนิคสำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมปัจจุบันนิยมใช้เทคนิค 2 แบบหลัก ได้แก่ การตรวจความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์โดยอาศัยคุณสมบัติการตัดดีเอ็นเอของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (เทคนิค RFLP) และการตรวจสอบลำดับของนิวคลีโอไทด์ (เทคนิค DNA sequencing)

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

วิธีการนี้อาศัยการทำงานของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) เอนไซม์เหล่านี้แต่ละชนิดมีคุณสมบัติพิเศษตรงที่สามารถตัดดีเอ็นเอเฉพาะส่วนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เฉพาะเจาะจงกับตัวมัน ปัจจุบันนิยมนำดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบมาเพิ่มปริมาณให้มากขึ้นภายใต้ปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) ก่อน เรียกว่า PCR-RFLP เป็นวิธีที่บ่งบอกความหลากหลายทางชีวภาพที่สามารถจำแนกชนิดได้ โดยการตัดดีเอ็นเอจากผลิตภัณฑ์ของพีซีอาร์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดเป็นแบบแผนที่จำเพาะและมีความแตกต่างกันในระหว่างกลุ่มหรือสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ โดยแบบแผนของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเหล่านี้จะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี agarose หรือ polyacrylamide gel electrophoresis และพบว่าวิธี PCR-RFLP เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

เป็นเทคนิคอีกเทคนิคหนึ่งสำหรับการศึกษาทางอนุชีววิทยา เนื่องจากเป็นวิธีที่ทำให้ทราบลำดับของนิวคลีโอไทด์ถูกต้องของดีเอ็นเอ การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์นี้สามารถศึกษาได้ทั้งใน genomic DNA และ cDNA รวมทั้ง mitochondrial DNA นอกจากนี้การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะทำให้ทราบรายละเอียดของยีนทั้งส่วนที่ถอดรหัสได้ (coding region) และที่ไม่ถอดรหัส (non-coding region) อีกทั้งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาอนุกรมวิธาน (taxonomy) และการศึกษาทางพันธุกรรมประชากรศาสตร์ (population genetics) นับว่าเป็นวิธีที่ละเอียดที่สุดแต่จะต้องสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายมาก ข้อควรคำนึงในการทำ DNA sequencing คือ ควรมีการยืนยันลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอคู่สายทั้ง 2 สาย อีกทั้งในกรณีของการทำ DNA sequencing ที่ได้จากผลิตภัณฑ์ของพีซีอาร์ ควรมีการยืนยันผลโดยการทำปฏิกิริยามากกว่า 1 ครั้ง และผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ควรได้จากเอนไซม์ที่มีการตรวจสอบ (proof reading) อย่างไรก็ตามการทำ DNA

sequencing จากผลิตภัณฑ์ของพีซีอาร์ไม่สามารถทำได้ด้วยเหตุผลหลายประการ จำเป็นต้องมีการโคลนของดีเอ็นเอเข้าสู่เวกเตอร์ก่อนทำ sequencing (สุรงค์ นุชประยูช และคณะ, 2546)

ชีวสารสนเทศศาสตร์ (Bioinformatics)

คือ ศาสตร์เกี่ยวกับการนำเทคโนโลยีสารสนเทศมาจัดการข้อมูลทางชีววิทยาอย่างเป็นระบบ ระบบฐานข้อมูลทางชีววิทยาที่สำคัญในการจัดเก็บลำดับนิวคลีโอไทด์ของกรดนิวคลีอิก เช่น ฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>) ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ประเทศสหรัฐอเมริกา ชีวสารสนเทศศาสตร์ยังรวมไปถึงการใช้โปรแกรมซอฟต์แวร์มาช่วยวิเคราะห์ข้อมูลทางชีววิทยาด้านต่างๆ โดยมากเป็นโปรแกรมที่สามารถใช้ผ่านทางอินเทอร์เน็ตได้ การเปรียบเทียบระหว่างสายดีเอ็นเอหรือโปรตีนต่างๆ (Sequence Alignment) เช่น ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) ใช้เปรียบเทียบระหว่างสายดีเอ็นเอหรือโปรตีนหลายๆเส้นพร้อมกัน BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) เป็นการเปรียบเทียบเพื่อค้นหาสายดีเอ็นเอหรือโปรตีนในฐานข้อมูลที่มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สนใจ สำหรับการสร้าง phylogenetic tree เพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตเป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยหาความสัมพันธ์ทางลำดับวิวัฒนาการและจัดจำแนกสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต โดยอาศัยหลักการที่ว่าสิ่งมีชีวิตที่มีต้นกำเนิดร่วมกันจะมีข้อมูลในระดับดีเอ็นเอและโปรตีนที่คล้ายคลึงกัน

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ความรู้เกี่ยวกับพฤติกรรมของแมลงกินซากสัตว์และคน มีประโยชน์ในการพิสูจน์หลักฐานทางอาชญากรรม อย่างเช่น ระยะเวลาหลังการตาย (postmortem interval; PMI) โดยอาศัยการสังเกตวงจรชีวิตของแมลงว่าอยู่ในช่วงใด ซึ่งในต่างประเทศนั้นมีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง ส่วนในประเทศไทยยังมีไม่มากนัก มีเพียงไม่กี่คดีเท่านั้นที่มีการบันทึกว่าใช้แมลงในการสืบสวน โดยหลายประเทศที่ให้ความสนใจในการศึกษาด้านนิติกีฏวิทยา (forensic entomology) เช่น ประเทศสหรัฐอเมริกา รัฐนอร์ท คาโรไลนาก็มีรายงานเกี่ยวกับการศึกษาหนอนแมลงวัน *Chrysomya rufifacies* ระยะที่ 3 (third instar larvae) ในซากหมู ซึ่งเป็นข้อมูลที่มีประโยชน์ในการประกอบการสืบสวนทางนิติเวชศาสตร์ (Tomberlin et al., 2006) ส่วนในประเทศไทยมีการรายงานการพบหนอนแมลงวันพบศพลอยน้ำครั้งแรกเป็นชายไม่ทราบชื่อและอายุ จากการเก็บ

ตัวอย่างพบว่าเป็นหนอนวัยที่ 3 (third instar larvae) ของแมลงวันหัวเขียวสายพันธุ์ *Chrysomya megacephala* (F) และ *Chrysomya rufifacies* (Macquart) และเมื่อพิสูจน์วงศ์ชีวิตพบว่าตายมาประมาณ 7 วัน นี่จึงเป็นการรายงานถึงบทบาทของหนอนแมลงวันในทางนิติเวชศาสตร์ (Sukontason, 2005)

การวิเคราะห์ข้อมูลเชิงโมเลกุลเพื่อจำแนกสายพันธุ์แมลงวันเริ่มตั้งแต่ก่อนปี 2000 โดย Sperling กล่าวว่า ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ mtDNA สามารถใช้ในจำแนกสายพันธุ์แมลงวันและกระทำได้ในระยะตัวอ่อน (Sperling et al., 1994) และได้เริ่มศึกษากันอย่างเรื่อยมา เช่น ในประเทศออสเตรเลีย Harvey et al. (2003) จำแนกสายพันธุ์หนอนแมลงวันที่พบบนศพได้สำเร็จคือ *Calliphora dubia*, *Chrysomya rufifacies*, *Lucilia sericata*, *Chrysomya megacephala*, *Calliphora augar* จากตำแหน่งยีน cytochrome oxidase subunit I (COI) ส่วนในประเทศไทยอรัญญิกศึกษาทั้งยีน COI และ COII ของหนอนแมลงวันที่พบบนศพและชี้ให้เห็นว่าสามารถจำแนกสายพันธุ์ของหนอนแมลงวันได้อย่างรวดเร็วด้วยเทคนิค PCR-RFLP และเป็นประโยชน์ทางนิติเวชศาสตร์เป็นอย่างมาก (Schroeder et al., 2003) ในประเทศไต้หวัน สามารถระบุจำแนกสายพันธุ์อย่างสมบูรณ์จำนวน 8 สายพันธุ์ ได้แก่ *Chrysomya megacephala* (Fabricius), *Chrysomya pinguis* (Walker), *Chrysomya rufifacies* (Macquart), *Hemipyrellia ligurriensis* (Wiedemann), *Lucilia bazini Seguy*, *Lucilia cuprina* (Wiedemann), *Lucilia hainanensis Fan*, *Lucilia prophyrina* (Walker) จากตำแหน่งยีน COI (Chen et al., 2004) และยังมีการศึกษาอีกหลายยีนเพื่อประโยชน์ในงานด้านนิติเวชศาสตร์ เช่น ในประเทศออสเตรเลีย ศึกษาตำแหน่งยีน ITS2 ร่วมกับเทคนิค PCR-RFLP ในจำแนกแมลงวันหัวเขียวสำคัญจำนวน 9 สปีชีส์ได้อย่างสมบูรณ์ (Nelson et al., 2008) ในรัฐอิลลินอยส์ตอนกลางของสหรัฐอเมริกาพบว่า ยีนที่ครอบคลุมตั้งแต่ ITS1, 5.8s rRNA และ ITS2 ร่วมกับเทคนิค PCR-RFLP สามารถจำแนกสายพันธุ์แมลงวันได้กว้างขวางขึ้นโดยสามารถจำแนกได้ทั้งแฟมิลี Calliphoridae, Muscidae และ Sarcophagidae (Ratcliffe et al., 2003) และยังมีการศึกษาในแมลงวันชนิดอื่น เช่น การจำแนกสายพันธุ์ของแมลงวันผลไม้เมดิเตอร์เรเนียน *Ceratitis capitata* ด้วยเทคนิค PCR-RFLP จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ND5-tRNA-ND4 (Barr, 2009)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากร

กลุ่มประชากรเป้าหมาย

ในงานวิจัยนี้ได้ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอของแมลงวันหัวเขียวบริเวณต่างๆในประเทศไทย คือ กรุงเทพมหานคร พิษณุโลก เชียงใหม่ ตากและชุมพร ที่เก็บไว้ตั้งแต่ปี 2006 จากงานวิจัยของ Preativatanyou et al.

ขนาดของประชากรตัวอย่าง

แมลงวันหัวเขียวตัวเต็มวัย 6 สปีชีส์จำนวน 31 ตัวอย่าง ได้แก่ *Chrysomya megacephala* 16 ตัวอย่าง *Chrysomya rufifacies* 6 ตัวอย่าง *Chrysomya albiceps* 3 ตัวอย่าง *Chrysomya bezziana* 1 ตัวอย่าง *Lucilia cuprina* 4 ตัวอย่าง และ *Lucilia sericata* 1 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3.1)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Blowfly species	Code of specimen	Location
<i>Chrysomya megacephala</i>	A01	Chiang-Mai
	A02	Chiang-Mai
	A03	Chiang-Mai
	A04	Chiang-Mai
	A05	Chiang-Mai
	A06	Chiang-Mai
	A07	Tak
	A08	Tak
	A09	Tak
	A10	Chumphon
	A11	Chumphon
	A12	Chumphon
	A13	Phitsanulok
	A14	Phitsanulok
	A15	Phitsanulok
	A16	Bangkok
<i>Chrysomya rufifacies</i>	B01	Chiang-Mai
	B02	Chiang-Mai
	B03	Chiang-Mai
	B04	Chiang-Mai
	B05	Phitsanulok
	B06	Bangkok
<i>Chrysomya albiceps</i>	C01	Bangkok
	C02	Chiang-Mai
	C03	Chiang-Mai
<i>Chrysomya bezziana</i>	D01	Chumphon
<i>Lucilia cuprina</i>	E01	Chiang-Mai
	E02	Chiang-Mai
	E03	Chiang-Mai
	E04	Chiang-Mai
<i>Lucilia sericata</i>	F01	Chiang-Mai

ตารางที่ 3.1 ข้อมูลของแมลงวันหลังหัวเขียวในการวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องมือ

- 1.1 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Eppendorf Centrifuge 5804R; Eppendorf[®], USA)
- 1.2 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Eppendorf Centrifuge 5417R; Eppendorf[®], USA)
- 1.3 ไมโครเวฟ (Intellowave; LG[®], Thailand)
- 1.4 ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 ° C (Whirlpool; Sanyo[®], Thailand) และ -80 ° C (Thermo Scientific 995; Becthai[®], USA)
- 1.5 เครื่องเพิ่มปริมาณสาร DNA (GeneAmp PCR system 2400; Applied Biosystems[®], USA)
- 1.6 เครื่องอิเล็กทรอนิกส์ (Sub-Cell GT; Bio-Rad[®], USA)
- 1.7 เครื่องถ่ายภาพเจล (Gel Doc[™] XR; Bio-Rad[®], USA)
- 1.8 เครื่องกำเนิดไฟฟ้า (Power PAC 300; Bio-Rad[®], USA)
- 1.9 เครื่องรันเจล PAGE (MiniProtein 3 cell; Bio-Rad[®], USA)
- 1.10 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (autoclave; Becthai[®], USA)
- 1.11 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer; Bio-Rad[®], USA)
- 1.12 Cuvette 80-100 ไมโครลิตร
- 1.13 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (thermostat shaking)
- 1.14 เครื่องชั่งอิเล็กทรอนิกส์ (digital balance)
- 1.15 เครื่องปรับค่าความเป็นกรดต่าง (pH meter)
- 1.16 ไมโครปิเปตต์อัตโนมัติ (Automatic adjustable micropipette)
- 1.16 เครื่องผสมสาร (vortex)
- 1.17 gel chamber และกล่องพลาสติก เพื่อใช้สำหรับย้อมเจล
- 1.18 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (waterbath)

2. วัสดุอุปกรณ์

- 2.1 ปากคีบ (forceps)
- 2.2 หลอด flacon tube ขนาด 15 ml และ 50 ml
- 2.3 หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml
- 2.4 นาฬิกาจับเวลา (Digital Timer)
- 2.5 ถุงมือยาง (Disposable gloves)
- 2.6 Parafilm

3 สารเคมี

- 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Lueria-Bertani broth (LB), LB agar, SOB solution และ SOC medium
- 3.2 สารเคมีสำหรับการเตรียม Competent cell
- 3.3 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบโคลน
- 3.4 สารเคมีที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยวิธีแยกขนาดดีเอ็นเอในเจลอะกาโรสภายใต้กระแสไฟฟ้า (agarose gel electrophoresis)
- 3.5 สารเคมีที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยวิธีแยกขนาดดีเอ็นเอใน native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) ภายใต้กระแสไฟฟ้า
- 3.6 สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction) ของบริษัท Invitrogen[®] และ บริษัท Fermentas[®]
- 3.7 ชุดแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์จากเจลอะกาโรสโดยใช้ ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit ของบริษัท QIAGEN[®]
- 3.8 สารเคมีที่ใช้ในการเชื่อมดีเอ็นเอของ บริษัท Invitrogen[®]
- 3.9 ชุดสกัดพลาสมิด NucleoSpin[®] Plasmid Kits บริษัท MACHERY-NAGEL
- 3.10 ชุดสารเคมีที่ใช้ในการย่อยผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ (เอนไซม์ *DraI* ของบริษัท Roche[®], เอนไซม์ *VspI* ของบริษัท New England Biolabs, USA)

หมายเหตุ : รายละเอียดและการเตรียมอยู่ภาคผนวก ก.

วิธีดำเนินการวิจัย

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction ; PCR)

เป็นขั้นตอนการเพิ่มจำนวนปริมาณดีเอ็นเอที่สนใจโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอที่สนใจ ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ ใช้ไพรเมอร์ 2 ชุด (ตารางที่ 3.2)

โดยชุดที่ 1 มีความเฉพาะเจาะจงกับปลาย 3' ของ 5.8S rDNA และ 5' ของ 28S rDNA เพื่อครอบคลุมลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ second internal transcribed spacer (ITS2) ของ rDNA (Song et al., 2008b) เมื่อใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ rDNA ของ *Drosophila melanogaster* (accession no: M21017.1) เป็นตัวอย่างดีเอ็นเอต้นแบบพบว่า ITS2 F จับบริเวณตำแหน่งที่ 2814-2835 ส่วน ITS2 R จับที่ตำแหน่งที่ 3295-3317

ส่วนชุดที่ 2 ครอบคลุมลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน NADH dehydrogenase subunit 5 (ND5) ของ mtDNA (ดัดแปลงจาก Zehner et al., 2004) เมื่อใช้ mtDNA ของ *Drosophila yakuba* (accession no: X03240.1) เป็นตัวอย่างดีเอ็นเอต้นแบบพบว่า ND5 (a) จับบริเวณตำแหน่งที่ 6579 ส่วน ND5 (r) จับบริเวณตำแหน่งที่ 6964

No.	Name	Sequences (5' -3')	Product (bp)	Tm (° C)
1	ITS2 F	TGCTTGGACTACATATGGTTGA	400	58
	ITS2 R	GTAGTCCCATATGAGTTGAGGTT		61
2	ND5 (a)	CCAAAATATTCWGATCAHCCYTG	437	58
	ND5 (r)	GGATTAAGTGTGGTTATWCTTT		54

ตารางที่ 3.2 รายละเอียดของไพรเมอร์

กระบวนการในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ต้องอาศัยสารละลายที่มีส่วนประกอบ และสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสม (ตารางที่ 3.3) และทำการเพิ่มปริมาณสารดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง GeneAmp 2400 PCR Thermal Cycler (Applied Biosystems[®], USA) ตั้งโปรแกรม thermal cycler (ตารางที่ 3.4) เก็บผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ที่ 2–8°C หรือ –20°C จนกว่าจะนำมาใช้ การตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วย 1 % agarose gel ผ่านกระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 100 Volt เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วย้อม (stain) แถบดีเอ็นเอ

ในสารละลาย 0.1% ethidium bromide ประมาณ 10-15 นาที และล้าง (destain) ในน้ำสะอาด อีกประมาณ 10-15 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอที่ได้กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder, Invitrogen[®])

Substance	Volumn (μ l)
10X <i>Taq</i> buffer	2
2 mM dNTP	2
25mM MgCl ₂	2
10 μ M forward primer	1
10 μ M reverse primer	1
<i>Taq</i> DNA polymerase; Invitrogen [®] (5U/ μ l)	0.2
DNA template (200 ng/ μ l)	2
dH ₂ O	9.8
Total	20

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

Step	Time (min)	Temp ($^{\circ}$ C)
Initial PCR activation step:	5	95
3-step cycling		
Denaturation:	45	95
Annealing:	45	47
Extension:	45	72
Number of cycles: 30 cycles		
Final extension:	10	72

ตารางที่ 3.4 แสดง Thermal cycler condition

การสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลและการทำให้บริสุทธิ์

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วย 1 % agarose gel แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide และตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) โดยเปรียบเทียบดีเอ็นเอที่สกัดได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน และทำการสกัดแยกดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากเจล และทำให้บริสุทธิ์โดยทำตามวิธีในคู่มือของ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN[®]) ดังนี้ โดยเริ่มจากการตัดแถบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ ใส่หลอด microcentrifuge เต็มบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจลที่ตัดได้ จากนั้นปั่นที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกว่าเจลละลายหมด เติม isopropanol (1 เท่าของปริมาตรตัวอย่าง) ปิเปตสารละลายที่ได้ใส่ใน spin column ที่ประกอบกับหลอด collection tube ปริมาตร 2 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 500 μ l แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube ออก และเติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 μ l ใน spin column และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อทำให้ spin column แห้งที่ความเร็วสูงสุดหรือประมาณ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที และย้าย spin column ใส่หลอด microcentrifuge หลอดใหม่ เติมบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 30 μ l ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5-10 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที

การหาปริมาณดีเอ็นเอโดยวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) โดยใช้ spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร โดยดีเอ็นเอสามารถดูดกลืนแสงได้มากที่สุดที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร จากนั้นนำผลที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ(ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)} = A_{260} \times 50 \times \text{dilution factor}$$

ถ้าค่า A_{260} ที่วัดได้มีค่าเท่ากับ 1 แสดงว่ามีความเข้มข้นของดีเอ็นเอสายคู่ (double-stranded DNA; ds-DNA) เท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งค่า A_{260}/A_{280} ที่อยู่ในช่วง 1.65-1.85 แสดงว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้บริสุทธิ์หรือมีคุณภาพดี แต่ถ้าค่าต่ำกว่า 1.65 แสดงว่ามีโปรตีนและฟีนอลปะปนอยู่ในสารละลาย หรือถ้ามากกว่า 1.85 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปนอยู่ในสารละลาย

การเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ (ligation)

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่บริสุทธิ์ด้วยชุด QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN[®]) มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM[®]-T Easy (Promega[®]) จากหลักการที่ว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้านปลายมีการเติมเบส A (adenine) จากการทำงานของ *Taq* polymerase ซึ่งสามารถเชื่อมต่อกับปลาย T (thymine) ของพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM[®]-T Easy (Promega[®]) ด้วยเอนไซม์ T₄ DNA ligase ปฏิกริยาการเชื่อมต่อ (ligation reaction) 10 µl ประกอบด้วย 5X Ligation buffer (40 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0.5 mM ATP (pH 7.8 at 25°C) พลาสมิดเวกเตอร์ pGEM[®]-T Easy 50 ng/µl, T4 DNA Ligase (Invitrogen[®]) ความเข้มข้น 3U/µl, ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำสารละลายทั้งหมดผสมให้เข้ากันและบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ส่วนประกอบดังตารางที่ 3.5

Substance	Volumn/reaction (µl)
Insert DNA (50 ng/ µl)	5
Vector pGEM [®] -T Easy (50 ng/ µl)	1
5X Ligation buffer	2
T ₄ DNA Ligase (3U/µl)	1
ddH ₂ O	1
total	10

ตารางที่ 3.5 อัตราส่วนของสารในปฏิกริยาการเชื่อมต่อ (ligation reaction)

การเตรียมแบคทีเรียให้อยู่ในสภาพพร้อมรับดีเอ็นเอจากภายนอก (competent cell)

นำ frozen stock ของแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α มา streak บนอาหารแข็งสูตร LB (luria-bertani) ที่ไม่มียาปฏิชีวนะ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง เลือกลงโคโลนีเดี่ยวของเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร SOB ปริมาตร 15 ml เขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ปิเปิดเชื้อที่อยู่ในอาหารเหลวสูตร SOB 1 ml มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร SOB ใหม่อีกครั้งที่ปริมาตร 100 ml เพื่อให้เซลล์ของเชื้อมีความเป็น competent ที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600

nm ให้ได้ค่าประมาณ 0.4 จากนั้นทำการถ่ายเชื้อลงหลอด flacon tube ขนาด 50 ml ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนใสแล้วละลายตะกอนเบาๆ ด้วยสารละลาย TB ที่แช่เย็น ปริมาตร 16 ml จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 10 นาที ทิ้งส่วนใส ละลายตะกอนด้วยสารละลาย TB ที่แช่เย็น 4 ml แล้วค่อยๆ เติม DMSO 280 μ l แล้วตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 10 นาที แบ่ง competent cell ที่ได้ในหลอด microcentrifuge เก็บที่อุณหภูมิ -80 °C เพื่อรักษาความเป็น competent cell

การถ่ายโอนดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่แบคทีเรีย (competent cell) ด้วยวิธี Chemical transformation (Sambrook et al., 1989)

นำ competent cell ปริมาตร 100 μ l มาตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งนาน 15-30 นาที ปิเปตสารละลายที่ทำกรเชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ (ligation solution) ปริมาตร 5 μ l ใส่ใน competent cell ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วแช่ต่อน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที กระตุ้นด้วยความร้อน (heat shock) โดยการแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 42 °C เป็นเวลา 50 วินาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วโดยแช่ทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 3 นาที เติมหอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 900 μ l และนำไปปั่นแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 37 °C เป็นเวลา 120 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้ตกตะกอน ปิเปตส่วนใสที่ประมาณ 800 μ l นำสารละลายที่เหลือมาเกลี่ย (spread) บนจานเพาะเชื้ออาหารแข็ง LB ที่มี ampicillin 100 μ g/ml, Isopropyl-B-D thiogalactoside (IPTG) ความเข้มข้น 0.5 mM และ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside (X-gal) ความเข้มข้น 80 μ g/ml จากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การติดตามโคโลนีดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA)

คัดเลือกโคโลนีสีขาวโดยการใช้การแสดงผลของยีนที่มีในพลาสมิดเวคเตอร์ คือ ยีนที่ให้ลักษณะต่อต้านต่อยาแอมพิซิซิลิน โดยที่ *E. coli* ที่ได้รับการถ่ายทอดพลาสมิดเวคเตอร์จะสามารถเจริญได้บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin และเทคนิค blue/white screening จากหลักการที่ว่าพลาสมิด pGEM[®]-T Easy (Promega[®]) มีบริเวณ *lacZ* gene ที่ทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์ β -galactosidase โดยจะทำการย่อยสาร X-gal เกิดเป็นโคโลนีสีฟ้า แต่พลาสมิดเวคเตอร์ที่ได้รับชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (recombinant DNA) เข้าไปสอดแทรกจะถูกแยกออกจากกันจึงไม่สามารถผลิตเอนไซม์ β -galactosidase จะได้โคโลนีที่มีสีขาว ร่วมกับเทคนิค colony PCR โดยสุ่มเลือกโคโลนีสีขาวมาตรวจสอบโคลนว่ามีชิ้นยีนที่สนใจถูกแทรกสอดสู่พลาสมิดเวคเตอร์หรือไม่ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยตรงจากโคโลนี เริ่มจากทำเรพลิคา (replica) โคโลนีที่ได้เก็บไว้เป็นเพลทต้นแบบ (master plates) ให้หมายเลขประจำโคโลนี จากนั้นเตรียม colony suspension โดยเขี่ย (pick up) โคโลนีเหล่านี้เป็นต้นแบบ หลังจากปฏิกิริยาพีซีอาร์เสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์จะทำการตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้ (PCR product) ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วย 1 % agarose gel เทียบกับ 100 bp DNA ladder เป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน นำโคลนที่ผ่านการตรวจสอบแล้วว่ามีชิ้นส่วนยีนที่สนใจมาเลี้ยงในอาหาร LB ปริมาตร 5 ml ที่มี ampicillin 100 μ g/ml จากนั้นนำไปบ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 rpm ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 37 °C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง เพื่อนำมาสกัดพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจต่อไป

การสกัดพลาสมิด

ตกตะกอนเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที และทำการสกัดพลาสมิดตามวิธีในคู่มือของ NucleoSpin[®] Plasmid Kits โดยทำการเติมสารละลาย A1 เพื่อ resuspension ปริมาตร 250 μ l แล้วผสมให้เข้ากัน และเติมสารละลาย A2 เพื่อ lysis cell ปริมาตร 250 μ l จากนั้นกลับหลอดไปมา 4-6 ครั้ง เติมสารละลาย A3 เพื่อ neutralization ปริมาตร 350 μ l แล้วกลับหลอดไปมา 4-6 ครั้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm (หรือประมาณ 17,900 xg) เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดของเหลวทั้งหมดใส่ใน spin column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube ทิ้ง เติมสารละลาย A4 ปริมาตร 600 μ l แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube ทิ้ง ทำการปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว

13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีสารละลายตกค้าง ต่อมาย้าย spin column ไปใส่หลอด microcentrifuge หลอดใหม่ เติมสารละลาย AE ปริมาตร 50 μ l ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 2 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นตรวจสอบความเข้มข้นของพลาสมิดที่สกัดได้ด้วย วัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) โดยใช้ spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร การสกัดพลาสมิดที่มีขึ้นดีเอ็นเอที่สนใจเพื่อการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ในขั้นตอนต่อไป

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์

สำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ITS2 และส่วนของยีน ND5 โดยใช้ T7 promotor primer และ SP6 promotor primer เป็น primer ส่งไปที่ 1st BASE DNA sequencing services ประเทศมาเลเซีย โดยมีบริษัท Ward Medic Ltd. เป็นตัวกลางในการจัดส่ง เพื่อความแม่นยำลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์อย่างน้อย 3 โคลน

การวิเคราะห์ความหลากหลายด้วยเทคนิค PCR-RFLP

เป็นวิธีวิเคราะห์ความหลากหลาย (polymorphism) ของสิ่งมีชีวิตที่สนใจโดยดูจากความยาวที่แตกต่างกันของดีเอ็นเอเมื่อผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) โดยจากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณ ITS2 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *DraI* ส่วนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณยีน ND5 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *VspI* ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เลือกจากการใช้โปรแกรม NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>) โดยในปฏิกิริยามีปริมาตรรวม 10 μ l ประกอบด้วย ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product), สารละลาย (100 mM Tris-HCL, 500 mM NaCl, 100 mM MgCl₂, 10 mM Dithioerythritol, pH 7.5 ที่อุณหภูมิ 37°C), เอนไซม์ตัดจำเพาะ ความเข้มข้น 10 U/ μ l และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น (ตารางที่ 3.6) จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 10 ชั่วโมง และตรวจสอบขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดเอนไซม์ด้วย 8 % native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) ดังนี้ เทส่วนผสม 8 % native polyacrylamide gel (ตารางที่ 3.7) ลงในแผ่นกระจก ใส่หวี (comb) เพื่อทำหลุมแล้วทิ้งให้เจลเกิด polymerization ประมาณ 1 ชั่วโมงเมื่อเกิด polymerization นำหวีออก นำแผ่นเจลใส่ลงใน tank รันเจล เติม 0.5XTBE buffer ใน electrophoresis chamber ด้านในจนท่วม ด้านนอกประมาณ ½ หรือพอท่วมเส้นลวด หยอดสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 μ l ผสมกับ 6x loading dye 2 μ l และหยอด ดีเอ็นเอตัวอย่าง 5 μ l

ผสมกับ 6x loading dye 2 μ l ลงในแต่ละหลุม ปิดฝาครอบอุปกรณ์โดยต่อสายไฟจาก power supply สู้ขั้วไฟฟ้าให้ถูกต้อง ตั้ง power supply 100 volt เป็นเวลา 20 นาทีเพื่อไล่เศษตะกอนก่อนรันจริง จากนั้นทำการโหลดตัวอย่างดีเอ็นเอ แล้วตั้งเวลาไว้เป็นเวลา 75 นาที แล้วย้อมเจล ด้วย ethidium bromide และตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

Substance for ITS2 analysis	Substance for ND5 analysis	Volume/reaction (μ l)
Dral Buffer	Buffer O	1
Dral enzyme (10 U/ μ l)	Vspl enzyme (10 U/ μ l)	0.3
PCR product (400 ng/ μ l)	PCR product (400 ng/ μ l)	6
ddH ₂ O	ddH ₂ O	2.7
Total		10

ตารางที่ 3.6 อัตราส่วนของสารในเทคนิค PCR-RFLP

Substance	Volume (ml)
ddH ₂ O	2.635
30% acrylamide	1.33
5x TBE buffer	1
10% ammonium persulfate	0.035
TEMED	0.175
Total	5

ตารางที่ 3.7 อัตราส่วนของสารใน 8 % native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

วิเคราะห์โคลนที่ได้ว่ามีค่าความเหมือนหรือคล้ายคลึงกับดีเอ็นเอของแมลงวันชนิดใดในฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม BLASTN (Basic Local Alignment Search Tools) จากฐานข้อมูล NCBI ในอินเทอร์เน็ตที่ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) เพื่อใช้ในการหาค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงหรือความเหมือน (% Identity) จากนั้นจึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบ (alignment) ความแตกต่างและความเหมือนภายในสายพันธุ์และระหว่างสายพันธุ์ด้วยโปรแกรม ClustalX1.83, BioEdit และ GeneDoc version 2.7.000

สร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA 4.1 (beta3) โดยวิธี distance matrix ด้วย algorithm แบบ Neighbor-Joining method และกำหนดแบบจำลองของการแทนที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide substitution) แบบ Kimura-2-parameter modal เพื่อพิจารณาถึงความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งรวมอยู่ในโปรแกรม MEGA 4.1 (beta3) ทดสอบความน่าเชื่อถือทางสถิติของการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการด้วย bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ

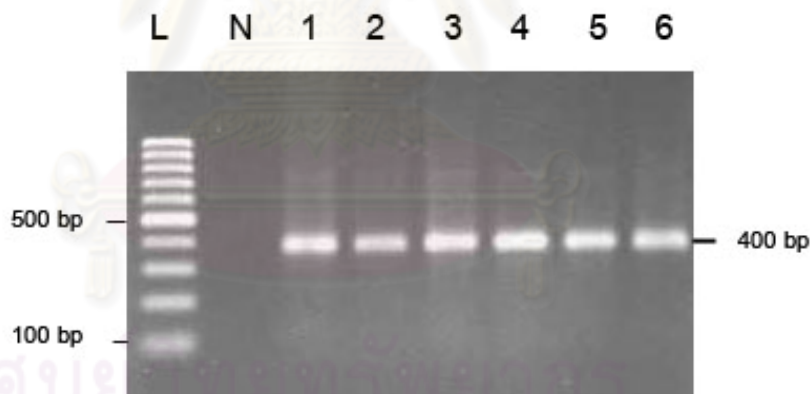
บทที่ 4

ผลการทดลอง

ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นยีนด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS2 ของ rDNA

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายบริเวณ ITS2 ของ rDNA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ดีเอ็นเอจากแมลงวันหัวเขียวเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ใช้ไพรเมอร์ ITS2 F (5' TGCTTGGACT ACATATGGTTGA 3') และ ITS2 R (5'GTAGTCCCATATGAGTTGAGGTT 3') จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย 1 % agarose gel ให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 100 volt เป็นเวลา 50 นาที แล้วนำเจลมาตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต เปรียบเทียบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder, Invitrogen[®]) พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 400 bp (รูปที่ 4.1)



รูปที่ 4.1 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณ ITS2

การตรวจสอบด้วย 1 % agarose gel

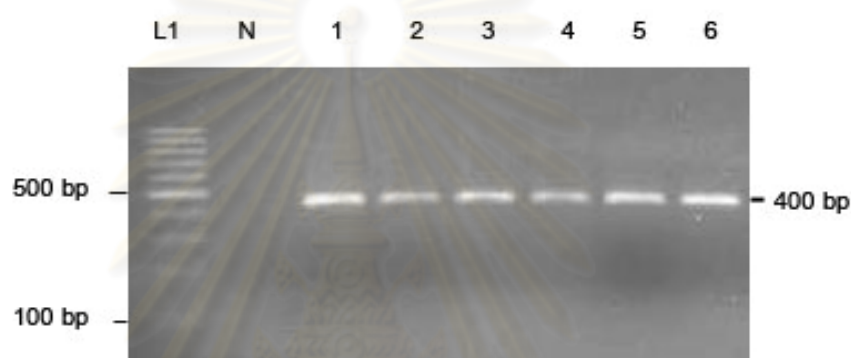
Lane L คือ DNA มาตรฐาน (100 bp DNA Ladder, Invitrogen[®])

Lane N คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์โดยใช้น้ำกลั่นเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

Lane 1-6 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของบริเวณ ITS2 ของแมลงวันหัวเขียวจำนวน 6 ตัวอย่าง

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณส่วนของยีน ND5

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายบริเวณส่วนของยีน ND5 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ดีเอ็นเอจากแมลงวันหัวเขียวเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ใช้ไพรเมอร์ ND5 (a) (5' CCAAAATATT CWGATCAHCCYTG 3') และ ND5 (r) (5' GGATTAAGTGGTTGTTATWCTTT 3') จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย 1 % agarose gel ปรากฏแถบดีเอ็นเอประมาณ 400 bp (รูปที่ 4.2)



รูปที่ 4.2 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณส่วนของยีน ND5

ตรวจสอบด้วย 1 % agarose gel

Lane L1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder, Invitrogen®)

Lane N คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์โดยใช้น้ำกลั่นเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

Lane 1-6 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของบริเวณยีน ND5 ของแมลงวันหัวเขียวจำนวน 6 ตัวอย่าง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการวิเคราะห์โคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมด้วยเทคนิค colony PCR

วิเคราะห์โคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมของดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยตรงจากโคโลนีสีขาว โดยเขี่ย (pick up) โคลนนี้เหล่านี้มาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ใช้ ITS2 F และ ITS2 R เป็นคู่ไพรเมอร์ในการตรวจสอบดีเอ็นเอสายผสมที่เชื่อมต่อด้วยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของบริเวณ ITS2 ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 400 bp เมื่อวิเคราะห์ด้วย 1 % agarose gel (รูปที่ 4.3) ใช้ ND5 (a) และ ND5 (r) เป็นคู่ไพรเมอร์ในการตรวจสอบดีเอ็นเอสายผสมที่เชื่อมต่อด้วยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ส่วนของยีน ND5 ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 400 bp เมื่อวิเคราะห์ด้วย 1 % agarose gel (รูปที่ 4.4)



รูปที่ 4.3 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการตรวจสอบโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมของบริเวณ ITS2

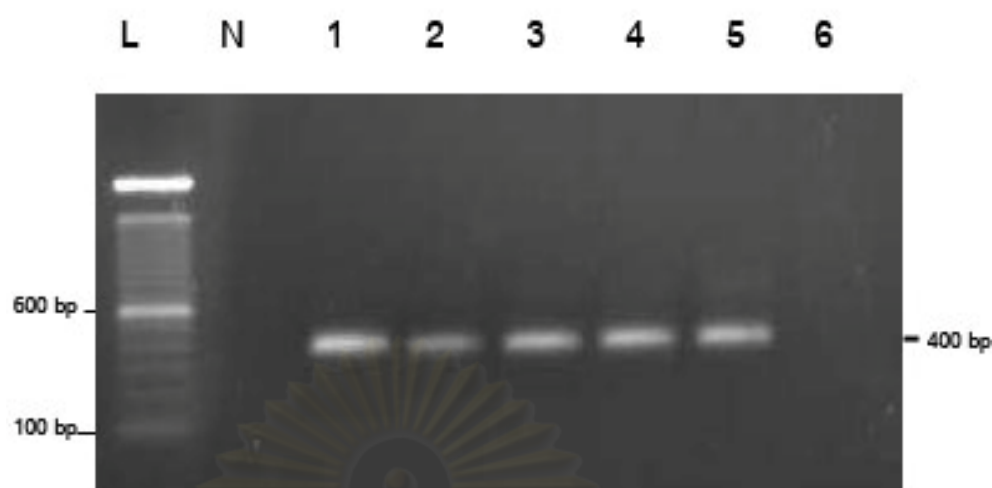
ตรวจสอบด้วย 1 % agarose gel

Lane L คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder, Fermentas[®])

Lane N คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ใช้น้ำกลั่นเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

Lane 5 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากโคลนที่ไม่มีดีเอ็นเอสายผสมของบริเวณ ITS2

Lane 1-4 และ 6 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมของบริเวณ ITS2



รูปที่ 4.4 ผลิตรหัสพันธุกรรมที่ได้จากการตรวจสอบโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมส่วนของยีน ND5

ตรวจสอบด้วย 1 % agarose gel

Lane L คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder, Fermentas[®])

Lane N คือ ผลิตรหัสพันธุกรรมที่ใช้น้ำกลั่นเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

Lane 6 คือ ผลิตรหัสพันธุกรรมที่ได้จากโคลนที่ไม่มีดีเอ็นเอสายผสมส่วนของยีน ND5

Lane 1- 5 คือ ผลิตรหัสพันธุกรรมที่ได้จากโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมส่วนของยีน ND5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

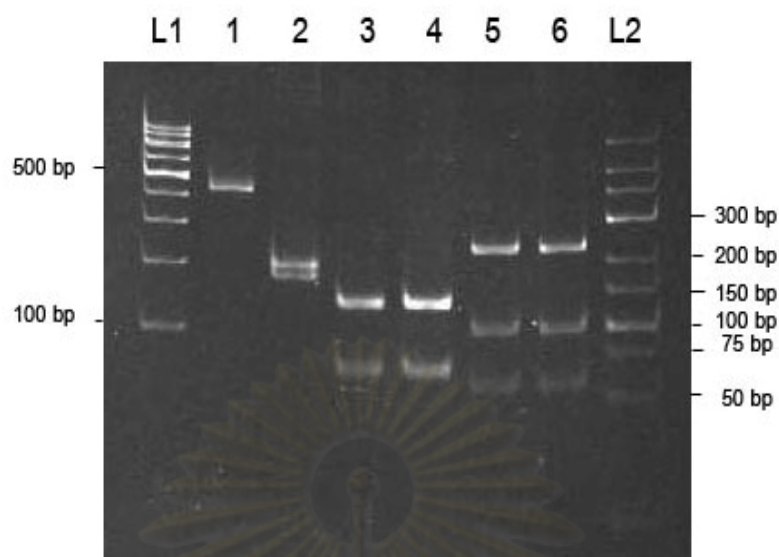
ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายด้วยเทคนิค PCR-RFLP

ใช้โปรแกรม NEB Cutter (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>) ทำนายชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ที่มีตำแหน่งตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณ ITS2 และส่วนของยีน ND5 และให้ขนาด จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในแต่ละสปีชีส์สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR-RFLP พบว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณ ITS2 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *DraI* และส่วนของยีน ND5 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *VspI* (ตารางที่ 4.1)

Blowfly species	ITS2 digested with <i>DraI</i>	ND5 digested with <i>VspI</i>
<i>Chrysomya megacephala</i>	Undigested	205, 126, 56, 39 และ 11 bp
<i>Chrysomya bezziana</i>	188 และ 165 bp	313 และ 124 bp
<i>Chrysomya rufifacies</i>	125, 122 และ 65, 63 bp	370 และ 67 bp
<i>Chrysomya albiceps</i>	125, 122 และ 65, 63 bp	370 และ 67 bp
<i>Lucilia cuprina</i>	217, 96, 56 และ 22 bp	244, 126 และ 67 bp
<i>Lucilia sericata</i>	217, 96, 56 และ 22 bp	244, 126 และ 67 bp

ตารางที่ 4.1 ขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

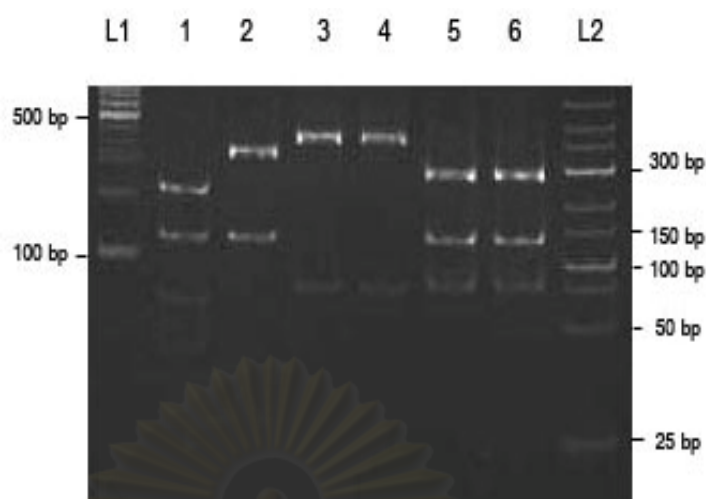
ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของบริเวณ ITS2 มาวิเคราะห์ความหลากหลายด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *DraI* (รูปที่ 4.5) และผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ส่วนของยีน ND5 มาวิเคราะห์ความหลากหลายด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *VspI* ตรวจสอบขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดเอนไซม์ด้วย 8 % native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) โดยให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 100 volt เป็นเวลา 75 นาที แล้วย้อมเจลดด้วย ethidium bromide และตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต โดยเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 bp DNA Ladder และ 100 bp DNA Ladder



รูปที่ 4.5 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณ ITS2 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *DraI*

ตรวจสอบด้วย 8 % native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

- Lane L1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder, Fermentas[®])
- Lane L2 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (25 bp DNA Ladder, Fermentas[®])
- Lane 1 คือ *Chrysomya megacephala* (จำนวน 1 ซีน ขนาดประมาณ 360 bp)
- Lane 2 คือ *Chrysomya bezziana* (จำนวน 2 ซีน ขนาด 188 และ 165 bp)
- Lane 3 คือ *Chrysomya rufifacies* (จำนวน 2 ซีน ขนาด 125, 122 และ 65, 63 bp
ขนาดที่ใกล้เคียงกันจะไม่สามารถแยกได้ด้วย 8 %PAGE)
- Lane 4 คือ *Chrysomya albiceps* (ให้รูปแบบเหมือนกับ *Chrysomya rufifacies*)
- Lane 5 คือ *Lucilia cuprina* (จำนวน 3 ซีน ขนาด 217, 96 และ 56 bp ส่วน 22 bp ไม่สามารถมองเห็นได้)
- Lane 6 คือ *Lucilia sericata* (ให้รูปแบบเหมือนกับ *Lucilia cuprina*)



รูปที่ 4.6 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณส่วนของยีน ND5 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *VspI*

ตรวจสอบด้วย 8 % native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

Lane L1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder, Fermentas[®])

Lane L2 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (25 bp DNA Ladder, Fermentas[®])

Lane 1 คือ *Chrysomya megacephala* (จำนวน 4 ซีน ขนาด 205, 126, 56 และ 39 bp ส่วน 11 bp ไม่สามารถมองเห็นได้)

Lane 2 คือ *Chrysomya bezziana* (จำนวน 2 ซีน ขนาด 313 และ 124 bp)

Lane 3 คือ *Chrysomya rufifacies* (จำนวน 2 ซีน 370 และ 67 bp)

Lane 4 คือ *Chrysomya albiceps* (ให้รูปแบบเหมือนกับ *Chrysomya rufifacies*)

Lane 5 คือ *Lucilia cuprina* (จำนวน 3 ซีน ขนาด 244, 126 และ 67 bp)

Lane 6 คือ *Lucilia sericata* (ให้รูปแบบเหมือนกับ *Lucilia cuprina*)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ทำการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 และส่วนของยีน ND5 ของแมลงวันหัวเขียวที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1st BASE DNA sequencing services ประเทศมาเลเซีย หลังจากนั้นทำการตัดเฉพาะบริเวณยีนที่ต้องการด้วยโปรแกรม BioEdit และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบความเหมือนกับฐานข้อมูลบนอินเทอร์เน็ตด้วยโปรแกรม BLAST (basic local alignment search tools; [Error! Hyperlink reference not valid.](#)) เป็นโปรแกรมสำหรับการค้นหาบริเวณเฉพาะที่เหมือนกันระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สนใจกับฐานข้อมูลทางพันธุศาสตร์บนระบบอินเทอร์เน็ต แสดงเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงหรือเหมือน (% Identity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 (ตารางที่ 4.2) และส่วนของยีน ND5 (ตารางที่ 4.3) ของแมลงวันหัวเขียวแต่ละสายพันธุ์



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Blow fly species	Number of specimen	GenBank record or previously published ITS2		
		Accession number	% Identity	Reference
<i>Chrysomya megacephala</i>	16	EF560175.1	99%	Marinho et al., 2007
<i>Chrysomya rufifacies</i>	6	EF560177.1	99%	Marinho et al., 2007
<i>Chrysomya albiceps</i>	3	EF560177.1	99% (<i>Chrysomya rufifacies</i>)	Marinho et al., 2007
		EF560172.1	97% (<i>Chrysomya albiceps</i>)	Marinho et al., 2007
<i>Chrysomya bezziana</i>	1	EF061804.1	96% (<i>Hemipyrellia ligurriens</i>)	Song et al., 2008
		EF560174.1	83% (<i>Chrysomya bezziana</i>)	Marinho et al., 2007
<i>Lucilia cuprina</i>	4	EF560185.1	99%	Marinho et al., 2007
<i>Lucilia sericata</i>	1	EF560185.1	99% (<i>Lucilia cuprina</i>)	Marinho et al., 2007
		EF560187.1	91% (<i>Lucilia sericata</i>)	Marinho et al., 2007

ตารางที่ 4.2 แสดง %Identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 เทียบกับฐานข้อมูล GenBank

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

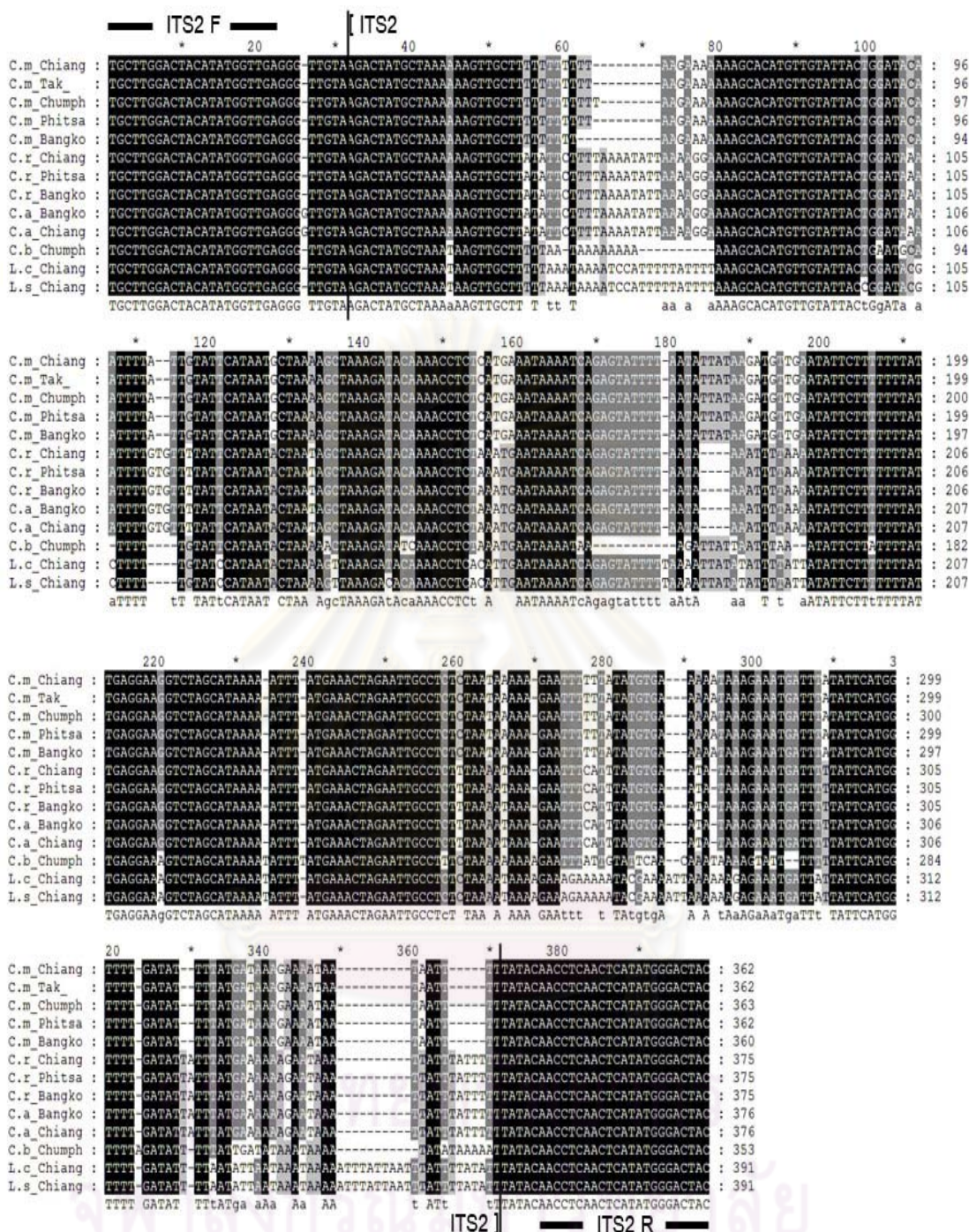
Blow fly species	Number of specimen	GenBank record or previously published ND5		
		Accession number	% Identity	Reference
<i>Chrysomya megacephala</i>	16	FJ614869.1	99%	Zaidi and Chen, 2009
<i>Chrysomya rufifacies</i>	6	EU661319.1	100%	Yang et al., 2008
<i>Chrysomya albiceps</i>	3	EU661319.1	99% (<i>Chrysomya rufifacies</i>)	Yang et al., 2008
<i>Chrysomya bezziana</i>	1	FJ614872.1	99% (<i>Hemipyrellia ligurriens</i>)	Zaidi and Chen, 2009
<i>Lucilia cuprina</i>	4	FJ614876.1	99% (<i>Lucilia sericata</i>)	Zaidi and Chen, 2009
<i>Lucilia sericata</i>	1	FJ614876.1	98%	Zaidi and Chen, 2009

ตารางที่ 4.3 แสดง % identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน ND5 เทียบกับฐานข้อมูล GenBank

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากนั้นจึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบ (alignment) ความแตกต่างและความเหมือนภายในสายพันธุ์และระหว่างสายพันธุ์ด้วยโปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ความเหมือนระหว่างกลุ่มยีนแบบเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (global alignment) โดยใช้โปรแกรมที่ติดตั้งเพื่อใช้งานบนคอมพิวเตอร์ระบบวินโดวส์โดยการโปรแกรม BioEdit จัดการลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยการปรับแก้และรวมสายดีเอ็นเอที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งในกรณีนี้คือการจัดการลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการโคลนนิ่งเข้าสู่เวกเตอร์ โดยใช้โปรแกรม BioEdit สำหรับการหาตำแหน่งของไพรเมอร์ หาตำแหน่งของยีนที่ต้องการและตัดส่วนที่ไม่ใช่ออก จากนั้นทำการปรับแก้ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ชัดเจนออก และปรับสายดีเอ็นเอที่ได้ให้เป็นสาย 5' ไป 3' จึงเก็บข้อมูลของสายดีเอ็นเอที่ได้ในรูปแบบ .tex และ .fasta และการใช้โปรแกรม ClustalX1.83 เพื่อเปรียบเทียบกลุ่มยีนที่ได้ โดยทำการเปรียบเทียบทีละคู่ยีน เพื่อดูความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์และทำการเก็บข้อมูลการเปรียบเทียบความเหมือนของยีนด้วยรูปแบบ .msf เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากแมลงวันหัวเขียวแต่ละสายพันธุ์ที่ได้ ว่ามีค่าความเหมือนหรือคล้ายคลึงกันของนิวคลีโอไทด์ภายในและระหว่างสายพันธุ์โดยใช้โปรแกรม GeneDoc version 2.7.000 และแสดงผล (รูปที่ 4.6 และ 4.7)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.7 ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของแมลงวันหัวเขียว ประกอบด้วย *Chrysomya megacephala* (C.m) จากเชียงใหม่ ตาก ชุมพร พิษณุโลก กรุงเทพมหานคร; *Chrysomya rufifacies* (C.r) จากเชียงใหม่ พิษณุโลก กรุงเทพมหานคร; *Chrysomya albiceps* (C.a) จากกรุงเทพมหานคร เชียงใหม่; *Chrysomya bezziana* (C.b) จากชุมพร; *Lucilia cuprina* (L.c) จากเชียงใหม่ และ *Lucilia sericata* (L.s) จากเชียงใหม่ โดยบริเวณส่วนต้น 5' และ ปลาย 3' คือลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ ITS 2 F และ ITS 2 R ตามลำดับ


```

C.m_Chiang : AAACAGTTAATCC : 437
C.m_Tak_   : AAACAGTTAATCC : 437
C.m_Chumph : AAACAGTTAATCC : 437
C.m_Phitsa : AAACAGTTAATCC : 437
C.m_Bangko : AAACAGTTAATCC : 437
C.r_Chiang : AAACAGTTAATCC : 437
C.r_Phitsa : AAACAGTTAATCC : 437
C.r_Bangko : AAACAGTTAATCC : 437
C.a_Bangko : AAACAGTTAATCC : 437
C.a_Chiang : AAACAGTTAATCC : 437
C.b_Chumph : AAACAGTTAATCC : 437
L.c_Chiang : AAACAGTTAATCC : 437
L.s_Chiang : AAACAGTTAATCC : 437
AAACAGTTAATCC
ND5 (r)

```

รูปที่ 4.8 ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณส่วนของยีน ND5 ของแมลงวันหัวเขียว ประกอบด้วย *Chrysomya megacephala* (C.m) จากเชียงใหม่ ตาก ชุมพร พิษณุโลก กรุงเทพมหานคร; *Chrysomya rufifacies* (C.r) จากเชียงใหม่ พิษณุโลก กรุงเทพมหานคร; *Chrysomya albiceps* (C.a) จากกรุงเทพมหานคร เชียงใหม่; *Chrysomya bezziana* (C.b) จากชุมพร; *Lucilia cuprina* (L.c) จากเชียงใหม่ และ *Lucilia sericata* (L.s) จากเชียงใหม่ โดยบริเวณส่วนต้น 5' และปลาย 3' คือลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ ND5(a) และ ND5(r) ตามลำดับ

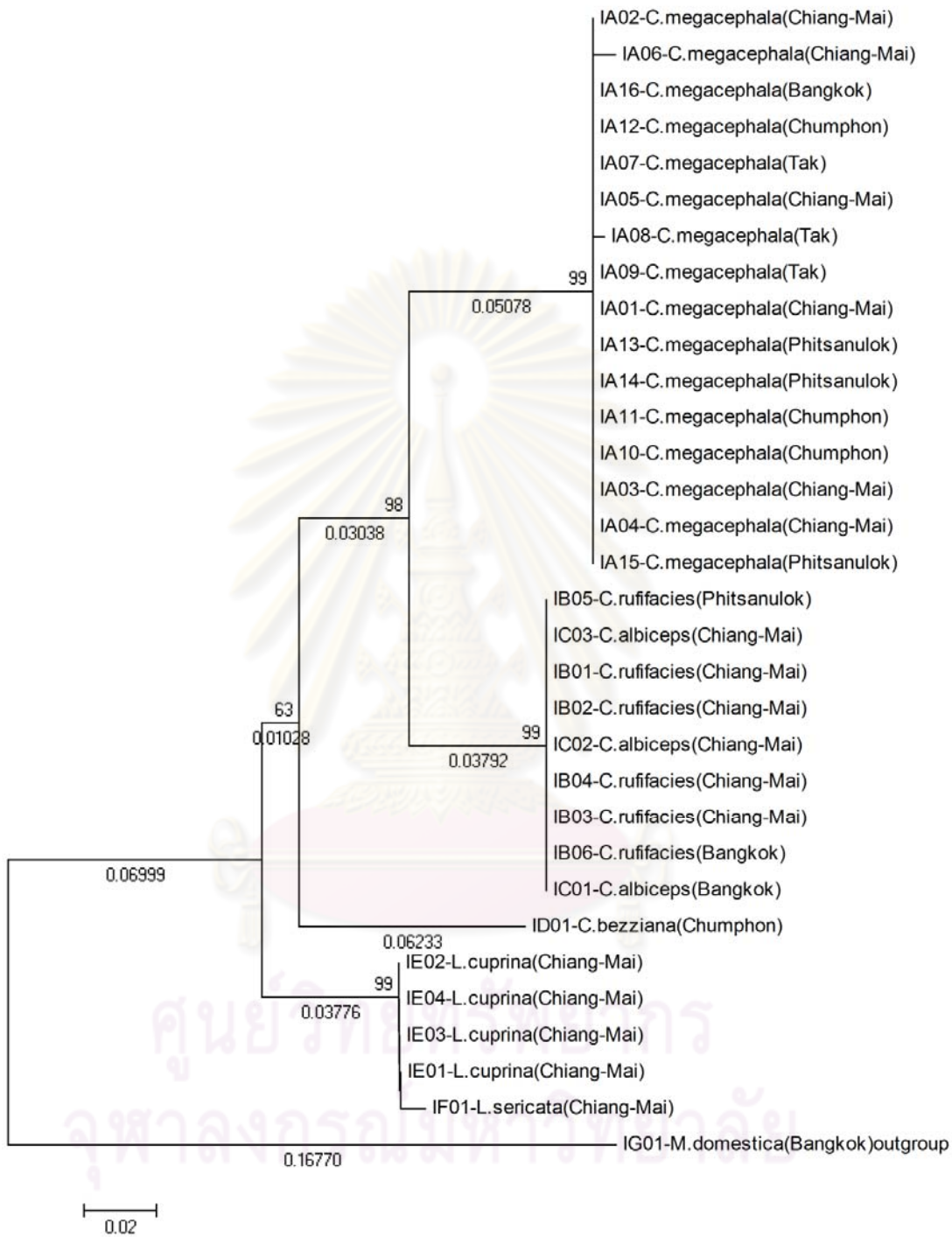
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic analysis)

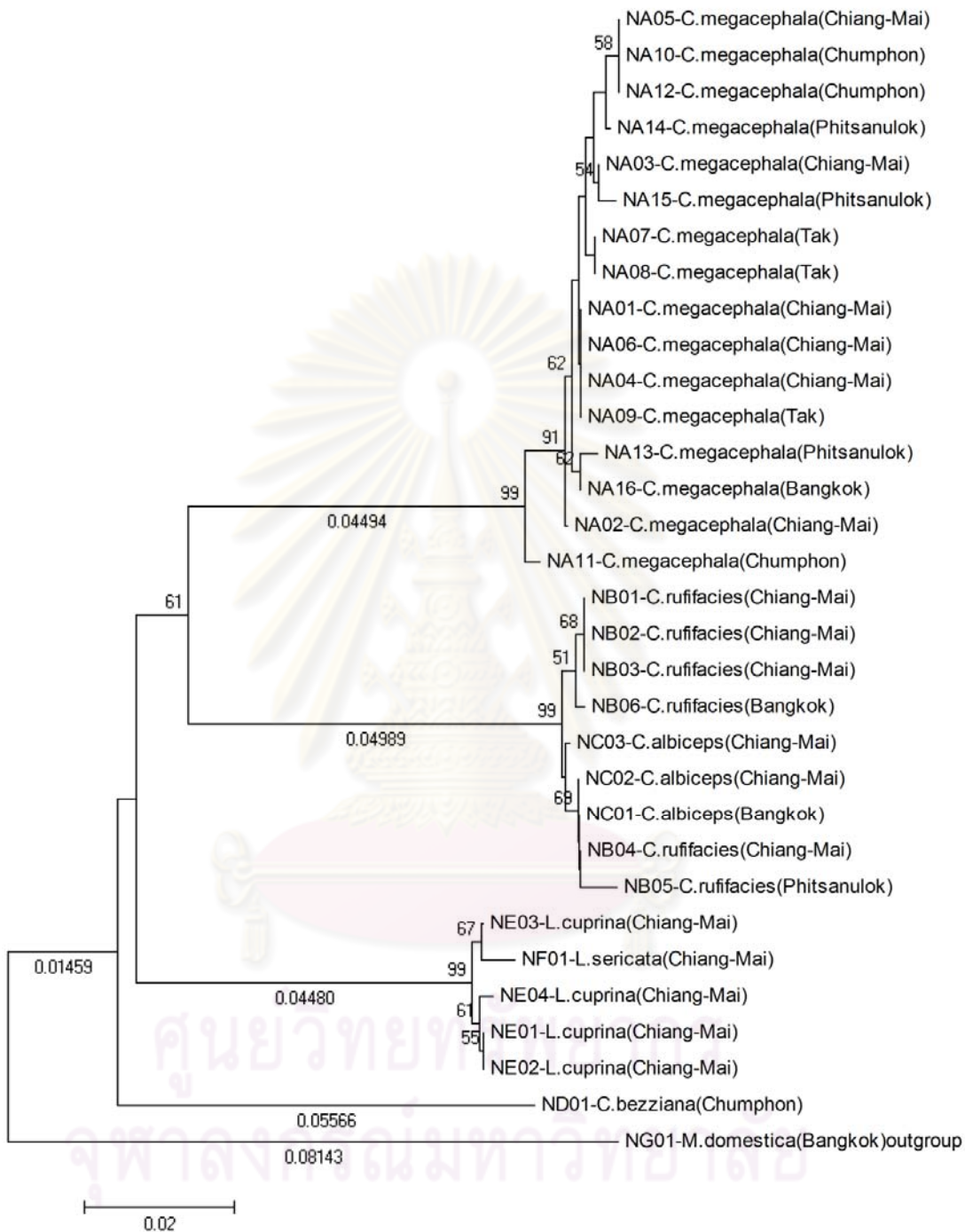
วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 (รูปที่ 4.8) และส่วนของยีน ND5 (รูปที่ 4.9) ของแมลงวันหัวเขียวในประเทศไทย คือ *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya rufifacies*, *Chrysomya albiceps*, *Chrysomya bezziana*, *Lucilia cuprina* และ *Lucilia sericata* โดยมีแมลงวันบ้านสายพันธุ์ *Musca domestica* (G01) เป็นสายพันธุ์นอกกลุ่มที่ทำการศึกษา (out group) โดยสเกล 0.02 แทน evolution distance ของจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนไปต่อนิวคลีโอไทด์ 1 ตำแหน่ง ค่าตัวเลขที่จุดตัด (node) ของแผนภูมิแสดงความน่าเชื่อถือทางสถิติของการสร้างแผนภูมิด้วย bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ กำหนดให้แสดง bootstrap value ที่มากกว่า 50 % ในแผนภูมิวิวัฒนาการ (Felsenstein, 1985) ค่าระยะห่างจะแสดงเป็นสเกลความยาวบอกรายละเอียดในภาพทรีที่เรียกว่าค่าระยะห่างทางวิวัฒนาการ (evolution distances) และจะใช้เป็นข้อมูลสรุปในแผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.9 แผนภูมิวิวัฒนาการของแมลงวันหัวเขียวจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2



รูปที่ 4.10 แผนภูมิวิวัฒนาการของแมลงวันหัวเขียวจากลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน ND5

Code	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 <i>C.megacephala</i> (Chiang-Mai)														
2 <i>C.megacephala</i> (Tak)	0.0													
3 <i>C.megacephala</i> (Chumphon)	0.0	0.0												
4 <i>C.megacephala</i> (Phitsanulok)	0.0	0.0	0.0											
5 <i>C.megacephala</i> (Bangkok)	0.0	0.0	0.0	0.0										
6 <i>C.ruffacies</i> (Chiang-Mai)	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0									
7 <i>C.ruffacies</i> (Phitsanulok)	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	0.0								
8 <i>C.ruffacies</i> (Bangkok)	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	0.0	0.0							
9 <i>C.albiceps</i> (Bangkok)	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	0.0	0.0	0.0						
10 <i>C.albiceps</i> (Chiang-Mai)	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	0.0	0.0	0.0	0.0					
11 <i>C.bezziana</i> (Chumphon)	15.1	15.1	15.1	15.1	15.1	13.9	13.9	13.9	13.9	13.9				
12 <i>L.cuprina</i> (Chiang-Mai)	13.1	13.1	13.1	13.1	13.1	13.2	13.2	13.2	13.2	13.2	11.9			
13 <i>L.sericata</i> (Chiang-Mai)	13.9	13.9	13.9	13.9	13.9	13.9	13.9	13.9	13.9	13.9	12.6	0.6		
14 <i>M.domestica</i> (Bangkok)	35.6	35.6	35.6	35.6	35.6	32.4	32.4	32.4	32.4	32.4	32.1	28.2	29.0	

ตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างลำดับนิวคลีโอไทด์ (%) บริเวณ ITS2 ด้วยวิธี maximum composite likelihood method

จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ภายในจีโนม *Chrysomya* พบความแตกต่างลำดับนิวคลีโอไทด์ 0.0-15.1% ภายในจีโนม *Lucilia* พบความแตกต่างลำดับนิวคลีโอไทด์ 0.6% ระหว่างจีโนม *Chrysomya* และ *Lucilia* พบความแตกต่างลำดับนิวคลีโอไทด์ 11.9-13.9%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Code	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 <i>C.megacephala</i> (Chiang-Mai)														
2 <i>C.megacephala</i> (Tak)	0.2													
3 <i>C.megacephala</i> (Chumphon)	0.7	0.5												
4 <i>C.megacephala</i> (Phitsanulok)	0.5	0.7	0.7											
5 <i>C.megacephala</i> (Bangkok)	0.2	0.5	0.5	0.2										
6 <i>C.ruffiacis</i> (Chiang-Mai)	10.7	11.0	11.0	10.7	10.4									
7 <i>C.ruffiacis</i> (Phitsanulok)	11.2	11.5	11.3	11.5	11.3	1.2								
8 <i>C.ruffiacis</i> (Bangkok)	10.7	11.0	11.3	11.0	10.7	0.2	0.9							
9 <i>C.albiceps</i> (Bangkok)	10.7	11.0	10.7	11.0	10.7	0.7	0.5	0.5						
10 <i>C.albiceps</i> (Chiang-Mai)	10.7	11.0	10.7	11.0	10.7	0.7	0.5	0.5	0.0					
11 <i>C.bezziana</i> (Chumphon)	11.8	12.1	12.4	12.1	11.8	13.3	13.6	13.0	13.0	13.0				
12 <i>L.cuprina</i> (Chiang-Mai)	10.6	10.9	10.9	10.6	10.4	9.9	10.7	10.2	10.2	10.2	10.4			
13 <i>L.sericata</i> (Chiang-Mai)	11.1	11.4	11.7	11.4	11.2	10.2	11.0	9.9	10.5	10.5	10.7	0.7		
14 <i>M.domestica</i> (Bangkok)	16.0	15.7	16.3	16.6	16.3	16.4	17.6	16.4	17.0	17.0	15.6	15.2	15.2	

ตารางที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างลำดับนิวคลีโอไทด์ (%) บริเวณส่วนของยีน ND5 ด้วยวิธี maximum composite likelihood method

จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณส่วนของยีน ND5 ภายในจีโนม *Chrysomya* พบความแตกต่างลำดับนิวคลีโอไทด์ 0.5-13.6% และภายในจีโนม *Lucilia* พบความแตกต่างลำดับนิวคลีโอไทด์ 0.7% ระหว่างจีโนม *Chrysomya* และ *Lucilia* พบความแตกต่างลำดับนิวคลีโอไทด์ 9.9-11.7%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผล

การระบุสายพันธุ์ของหนอนแมลงวันที่พบบนศพได้อย่างถูกต้องสามารถนำมาใช้ในการประมาณเวลาตาย บ่งบอกการเคลื่อนย้ายของศพ การวิจัยได้แสดงวิธีการจำแนกสายพันธุ์ด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์และเทคนิค PCR-RFLP จากบริเวณ ITS2 และส่วนของยีน ND5 ในกรณีที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่สามารถระบุได้อย่างชัดเจน โดยทำการศึกษาแมลงวันที่มีบทบาทสำคัญในงานนิติเวชศาสตร์ อันได้แก่ *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya rufifacies*, *Chrysomya bezziana*, *Lucilia cuprina* รวมทั้ง *Chrysomya albiceps*, *Lucilia sericata* ที่ยังไม่พบรายงานการศึกษาทางนิติเวชศาสตร์ในประเทศไทย (Sukontason et al., 2007) ซึ่งเป็นตัวอย่างดีเอ็นเอที่เคยทำการศึกษาก่อนหน้านี้ด้วยเทคนิคเดียวกันบริเวณยีน COI และ COII ในปี 2006 ของ Preativatanyou et al.

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS2 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ ITS2 F และ ITS2 R (Song et al., 2008b) ให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดประมาณ 400 bp ซึ่งโดยทั่วไปบริเวณ ITS2 ในแมลงมีความยาวประมาณ 200–400 bp (Irene and Annette, 2004) ส่วนบริเวณ ITS2 ในแมลงกลุ่ม Sarcophagidae มีความยาว 312-361 bp (Song et al., 2008a) และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณส่วนของยีน ND5 โดยใช้ไพรเมอร์ ND5 (a) และ ND5 (r) (ดัดแปลงจาก Zehner et al., 2004) ให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดประมาณ 400 bp สอดคล้องกับ Zehner ที่ได้ทำการศึกษาไว้ก่อนหน้านี้ในแมลงวันหลังลายโดยให้ขนาด 386 bp โดยทั้งสองบริเวณมีขนาดไม่มากสามารถเพิ่มจำนวนได้ง่ายด้วยเทคนิคพีซีอาร์

การวิเคราะห์ความหลากหลายด้วยเทคนิค PCR-RFLP จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ITS2 แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *DraI* (รูปที่ 4.5) และการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอส่วนของยีน ND5 แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *VspI* (รูปที่ 4.6) พบว่าได้ขนาดและจำนวนชิ้นผลิตภัณฑ์ สอดคล้องกับการทำนายจากการใช้โปรแกรม NEB Cutter และทั้งสองบริเวณให้รูปแบบ RFLP (RFLP pattern) ที่สามารถจำแนกสายพันธุ์ได้เป็น 4 กลุ่ม คือ 1) *Chrysomya megacephala* 2) *Chrysomya rufifacies*, *Chrysomya albiceps* 3) *Chrysomya bezziana* 4) *Lucilia cuprina*, *Lucilia sericata* โดยไม่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่าง *Chrysomya rufifacies* กับ *Chrysomya albiceps* และ *Lucilia cuprina* กับ *Lucilia sericata* วิธีการดังกล่าวสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของแมลงวันหัวเขียวที่อยู่คนละกลุ่มกันในข้างต้นออกจากกันได้

นอกจากนี้ไม่พบความแตกต่างของขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแสดงถึงอาจมีความแตกต่างน้อยภายในสายพันธุ์เดียวกันหรืออาจมีความหลากหลายภายใน (intraspecific polymorphism) เกิดขึ้นแต่เทคนิคนี้ไม่สามารถตรวจสอบได้ ซึ่งการศึกษาความหลากหลายจากลำดับนิวคลีโอไทด์จะกระทำได้ดีกว่าเนื่องจากเห็นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด แม้ว่าเทคนิค PCR-RFLP มีข้อบกพร่องในกรณีที่มีการกลายพันธุ์บริเวณ restriction site อาจมีการจำแนกสายพันธุ์ผิดพลาดหรือออกนอกกลุ่ม แต่งานวิจัยจำนวนมากชี้ให้เห็นว่าวิธีดังกล่าวเป็นวิธีที่ใช้ได้รับการยอมรับและแพร่หลายในการจำแนกสายพันธุ์แมลงวันและยังคงช่วยในการแยกสายพันธุ์หรือตัดสายพันธุ์ที่ไม่ต้องการออกไปได้ในขั้นคัดกรอง ประกอบกับการจำแนกความหลากหลายด้วยเทคนิค PCR-RFLP มีความรวดเร็ว ใช้ระยะเวลาประมาณ 6 ชั่วโมง ตั้งแต่ขั้นตอนสกัดดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ การตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จนถึงการดู RFLP pattern (Ratcliffe et al., 2003)

จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ที่ทำการศึกษากับในฐานข้อมูล GenBank พบว่า *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya rufifacies* และ *Lucilia cuprina* มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกับฐานข้อมูลคิดเป็น 99 % สามารถระบุชนิดแมลงวันได้อย่างชัดเจน ในขณะที่สายพันธุ์ *Chrysomya albiceps*, *Chrysomya bezziana* และ *Lucilia sericata* มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกับฐานข้อมูลในสปีชีส์อื่นมากกว่า (ตารางที่ 4.2) ส่งผลให้การระบุชนิดแมลงวันเหล่านี้ไม่ชัดเจน ส่วนการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณส่วนของยีน ND5 ที่ทำการศึกษา กับในฐานข้อมูล GenBank พบว่าสายพันธุ์ *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya rufifacies* และ *Lucilia sericata* มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกับฐานข้อมูลคิดเป็น 99-100 % สามารถระบุชนิดแมลงวันได้อย่างชัดเจน ในขณะที่สายพันธุ์ *Chrysomya albiceps*, *Chrysomya bezziana* และ *Lucilia cuprina* มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกับฐานข้อมูลในสปีชีส์อื่น (ตารางที่ 4.3) โดยจากข้อมูลนิวคลีโอไทด์ทั้งสองบริเวณเมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล พบความคล้ายคลึงระหว่างสปีชีส์เป็นคู่ๆคือ *Chrysomya rufifacies* กับ *Chrysomya albiceps*, *Chrysomya bezziana* กับ *Hemipyrellia ligurriens* และ *Lucilia cuprina* กับ *Lucilia sericata*

Wallman et al. (2005) กล่าวว่า *Chrysomya rufifacies* กับ *Chrysomya albiceps* และ *Lucilia cuprina* กับ *Lucilia sericata* สปีชีส์แต่ละคู่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกัน ประกอบกับมีความใกล้ชิดกันทางสายสัมพันธ์วิวัฒนาการ สำหรับ *Chrysomya bezziana* พบว่ายังมีการศึกษาไม่แพร่หลายส่งผลให้การระบุสายพันธุ์จากการเทียบกับฐานข้อมูลให้ผลคลาดเคลื่อน โดยในฐานข้อมูล GenBank พบการศึกษาในยีน COI และ COII (Wells and Sperling, 2001), cytochrome b (Cytb) (Hall et al., 2009; Ready et al, 2009), elongation factor-1 alpha (EF1a) (Ready et al., 2009), ITS2 (Marinho et al., 2007), sodium channel

alpha subunit gene (Silva and Azeredo-Espin, 2007) และ 28S rRNA gene (Stevens, 2003) การศึกษาระดับโมเลกุลของ *Chrysomya bezziana* ยังคงต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมในยีนอื่นเนื่องจากเป็นสปีชีส์ที่มีบทบาทสำคัญในการก่อโรคไม่เอียงชิดและเพื่อเป็นประโยชน์ประกอบงานนิติเวชศาสตร์

การสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการของแมลงวันหัวเขียว 6 สปีชีส์ในประเทศไทย ช่วยบ่งบอกความใกล้ชิดของแมลงวันหัวเขียวแต่ละสายพันธุ์และบ่งบอกประสิทธิภาพการจำแนกสปีชีส์จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 (รูปที่ 4.9) และบริเวณส่วนของยีน ND5 (รูปที่ 4.10) พบว่า *Chrysomya albiceps* มีความใกล้ชิดกันมากกับ *Chrysomya rufifacies* และ *Lucilia cuprina* มีความใกล้ชิดกันมากกับ *Lucilia sericata* โดยไม่พบความแตกต่างของค่า evolution distance อย่างมีนัยสำคัญ และจากความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่าง *Chrysomya rufifacies* กับ *Chrysomya albiceps* เพียง 0.0 -1.2% ส่วนระหว่าง *Lucilia cuprina* กับ *Lucilia sericata* เพียง 0.6% - 0.7% (ตารางที่ 4.4 และ 4.5) พบว่าบริเวณดังกล่าวยังไม่ประสบความสำเร็จในการจำแนกสปีชีส์ที่มีความใกล้ชิดกันมากได้ในประเทศไทย เมื่อเทียบกับการวิจัยของ Marinho et al. (2007) ที่ทำการศึกษา ITS2 ของแมลงวันหัวเขียวในแต่ละบริเวณ เช่น บราซิล ออสเตรเลีย มาเลเซีย เป็นต้น สร้างแผนภูมิวิวัฒนาการจำแนกแต่ละสปีชีส์ได้ (ภาคผนวก ค) แต่ทั้งนี้เกี่ยวข้องกับปัจจัยทางด้านภูมิศาสตร์ แต่เพื่อความมีประสิทธิภาพในการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการของแมลงวันหัวเขียวในประเทศไทยทั้ง 6 สปีชีส์นี้ ควรทำการเพิ่มกลุ่มประชากรที่ทำการศึกษาและศึกษามากกว่า 2 ยีน

โดยความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์ถูกวิเคราะห์จาก *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya rufifacies*, *Chrysomya albiceps* และ *Lucilia cuprina* ทั้งบริเวณ ITS2 และส่วนของยีน ND5 พบว่าไม่มีความแตกต่างภายในสายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 5.1) ซึ่งให้เห็นถึงความคาดเคลื่อนน้อยหรือให้ผลเหมือนกันภายในสปีชีส์เดียวกันเมื่อจำแนกความแตกต่างด้วยบริเวณ ITS2 และ ND5

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Species	Sequence variation (%)		
	ITS2	ND5	COI-COII*
<i>Chrysomya megacephala</i>	≤ 0.9	≤ 1.4	≤ 0.3
<i>Chrysomya rufifacies</i>	0.0	≤ 1.2	≤ 0.4
<i>Chrysomya albiceps</i>	0.0	≤ 0.5	-
<i>Lucilia cuprina</i>	0.0	≤ 0.2	≤ 0.3

ตารางที่ 5.1 ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์จากบริเวณ ITS2, ND5 และ COI-COII

หมายเหตุ * จากงานวิจัยของ Preativatanyou et al.

จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 และส่วนของยีน ND5 (ตารางที่ 5.2) ภายในจีนัสและระหว่างจีนัส *Chrysomya* และ *Lucilia* พบความแตกต่างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 สูงกว่าบริเวณส่วนของยีน ND5 แสดงถึงอัตราการกลายพันธุ์สูงและวิวัฒนาการที่เร็วกว่า สอดคล้องกับข้อมูลที่ว่า Ribosomal DNA เป็นที่นิยมอย่างกว้างขวางในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) ระหว่างกลุ่มสายพันธุ์ โดยทั้ง ITS1 และ ITS2 มีอัตราการวิวัฒนาการที่เร็วขึ้นกว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แปลรหัสเป็นโปรตีน (coding sequences) (Annette, 2007) โดยอัตราการกลายพันธุ์สูงมากกว่าเมื่อเวลาผ่านไปเท่าๆกันจะสะสมการกลายพันธุ์ได้มากกว่าจึงเป็นเครื่องมือวัดการเปลี่ยนแปลงทางวิวัฒนาการที่มีทั้งความไวและละเอียดกว่า

Genus	Sequence variation (%)	
	ITS2	ND5
<i>Chrysomya</i>	≤ 15.1	≤ 13.6
<i>Lucilia</i>	0.6	0.7
<i>Chrysomya</i> vs. <i>Lucilia</i>	11.9-13.9	9.9-11.7

ตารางที่ 5.2 ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างสายพันธุ์จากบริเวณ ITS2 และ ND5

จากงานวิจัยของ Preativatanyou et al. ที่ทำการจำแนกสายพันธุ์แมลงวันหัวเขียวที่สำคัญในงานนิติเวชศาสตร์ จำนวน 3 สปีชีส์ คือ *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya rufifacies* และ *Lucilia cuprina* จากบริเวณ COI และ COII ด้วยเทคนิค PCR-RFLP พบว่าสามารถจำแนกความแตกต่างได้อย่างชัดเจนใน 3 สปีชีส์ดังกล่าว สำหรับงานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษาบริเวณ ITS2 และ ND5 ด้วยเทคนิค PCR-RFLP สามารถจำแนกความแตกต่างใน 3 สปีชีส์ดังกล่าวได้เช่นเดียวกัน ประกอบกับไม่พบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าทั้ง 3 บริเวณมีประสิทธิภาพในการจำแนกระหว่างสายพันธุ์ออกจากกันและสายพันธุ์เดียวกันให้ผลเหมือนกัน โดยบริเวณ ITS2 มีการรักษาลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์ได้ดีกว่ายีน ND5 แต่เมื่อเทียบกับบริเวณ COI-COII ยังไม่ชัดเจน และบริเวณ ITS2 มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างสายพันธุ์มากกว่ายีน ND5 ซึ่งให้เห็นว่าบริเวณ ITS2 มีประสิทธิภาพในการจำแนกสายพันธุ์ได้ดีกว่ายีน ND5 ซึ่งในการศึกษานี้กล่าวได้ว่าเมื่อต้องการจำแนกแมลงวันหัวเขียว *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya rufifacies* และ *Lucilia cuprina* สามารถกระทำได้ด้วยเทคนิค PCR-RFLP จากบริเวณ ITS2, ND5 และ COI-COII และมีประสิทธิภาพเพียงพอเนื่องจากเป็นสปีชีส์ที่พบบ่อยบนศพและยังมีรายงานพบบนศพในหลายพื้นที่ทั้งในป่าและในเมือง (Sukontason et al., 2007)

นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และเทคนิค PCR-RFLP บริเวณ ITS2 และ ND5 ยังไม่ประสบความสำเร็จในการจำแนกสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกันได้ในประเทศไทย คือ *Chrysomya rufifacies* กับ *Chrysomya albiceps* และ *Lucilia cuprina* กับ *Lucilia sericata* รวมทั้งยังให้ผลที่ไม่ชัดเจนใน *Chrysomya bezziana* เนื่องจากขนาดประชากรตัวอย่างน้อยและข้อมูลอ้างอิงในฐานข้อมูล GenBank ไม่เพียงพอ

ในกรณีของการสืบสวนทางอาชญากรรม วิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) เทคนิค PCR-RFLP กระทำได้จากส่วนต่างๆ ของแมลงไม่ว่าจะเป็น ระยะเวลาตัวเต็มวัย ระยะหนอนหรือในระยะดักแต่ก็ตาม ทุกๆ ส่วนจะประกอบไปด้วยดีเอ็นเอเดียวกัน (Malgorn and Coquoz, 1999) ประกอบกับการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์สามารถกระทำได้ในตัวอย่างที่มีปริมาณน้อยหรือตัวอย่างที่ถูกเก็บไว้นานโดยในงานวิจัยนี้ได้ใช้ดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ทำการเก็บในปี 2006 รวมทั้งเทคนิค PCR-RFLP เป็นวิธีที่รวดเร็วและการระบุสปีชีส์ของแมลงวันเป็นข้อมูลประกอบการหาผู้ต้องสงสัย วิธีดังกล่าวสามารถหลีกเลี่ยงปัญหาการจำแนกชนิดของหนอนแมลงวันที่กระทำไต่จากข้อมูลทางสัณฐานวิทยา และมีผู้เชี่ยวชาญไม่มากนักที่จะสามารถจำแนกตัวอ่อนว่าเป็นแมลงชนิดใด รวมทั้งในกรณีที่ตัวอย่างอยู่ในสภาพไม่สามารถจำแนกได้ เมื่อระบุชนิดของแมลงวันได้อย่างถูกต้องถูกต้องพิจารณาร่วมกับปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของแมลงวัน เช่น อุณหภูมิ

ความขึ้น จะทำให้สามารถตัดสินใจข้อมูลเกี่ยวกับเวลาการตายได้หลังจากเก็บตัวอย่างจากที่เกิดเหตุได้เพียงไม่กี่ชั่วโมงโดยไม่จำเป็นต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญทางด้านนิติวิทยาศาสตร์

สำหรับการศึกษาความหลากหลายทางสายพันธุ์แมลงวันหัวเขียวที่ใกล้ชิดกันควรทำการศึกษาจากบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ยาวกว่านี้และมีความแปรผันของดีเอ็นเอสูงเพื่อให้ได้บริเวณข้อมูลเพียงพอ เช่น บริเวณ D-loop (displacement loop) หรือ control region ของ mitochondrial DNA ซึ่งมีขนาด 1.2 kb เป็นบริเวณที่เรียกว่า hypervariable region เป็นบริเวณเดียวในจีโนมโทคอนเดรียที่ไม่ถอดรหัสให้อะไรเลย (Anderson et. al., 1981) หรือบริเวณที่ครอบคลุม Internal transcribed spacer (ITS) ทั้งหมด โดย Nelson et al. (2008) สามารถจำแนกความแตกต่างของแมลงวันหัวเขียว *Chrysomya incisuralis* และ *Chrysomya rufifacies* ที่ไม่สามารถจำแนกได้ด้วยเทคนิค PCR-RFLP จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ที่มีขนาดประมาณ 560 bp โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่แตกต่างกันคือ 1036 bp และ 1150 bp ใน *Chrysomya incisuralis* และ *Chrysomya rufifacies* ตามลำดับ ดังนั้นในการจำแนกความแตกต่างของแมลงวันหัวเขียวระหว่าง *Chrysomya rufifacies* กับ *Chrysomya albiceps* และ *Lucilia cuprina* กับ *Lucilia sericata* ที่ไม่สามารถจำแนกได้ในการวิจัยครั้งนี้ อาจต้องสร้างไพรเมอร์ที่จำเพาะกับสปีชีส์ (species-specific primer) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนที่จำเพาะของแต่ละสปีชีส์ในบริเวณยีนที่เหมาะสมหรือการศึกษาข้อมูลการเจริญเติบโตภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกันในแต่ละสปีชีส์เพื่อประโยชน์ในการประมาณเวลาตาย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อเสนอแนะ

วิธีการวิเคราะห์ข้อมูลเชิงโมเดลเหล่านี้พบว่าเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพ เหมาะที่จะนำไปประยุกต์ใช้กับงานทางด้านการแพทย์และการปศุสัตว์ โดยเฉพาะทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ในการประมาณระยะเวลาการตายจากข้อมูลวงจรชีวิตของแมลงวันที่พบบนศพ เช่น แมลงวันหัวเขียว แมลงวันบ้าน และด้วงชนิดอื่นๆ เนื่องจากแมลงวันเป็นแมลงกลุ่มแรกที่เข้ามากิน วางไข่บนซากศพ และอาจพบได้ทั้งระยะตัวหนอนและตัวเต็มวัย ทางด้านปศุสัตว์ เช่น ในการศึกษาวิวัฒนาการของแมลงวันที่เป็นสาเหตุของโรค myiasis ในอนาคตจำเป็นต้องทำการศึกษาข้อมูลเชิงโมเดลในแมลงวันกลุ่มอื่นที่มีความสำคัญทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ และเลือกใช้เทคนิคที่เหมาะสมต่อการใช้งาน โดยการเลือกใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่นๆ เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตตัวหนึ่ง สายพันธุ์หนึ่ง หรือในระดับต่างสายพันธุ์ เพื่อที่จะพัฒนาวิธีการจำแนกสายพันธุ์ได้อย่างละเอียดและชัดเจนยิ่งขึ้น



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- บุญเสริม ช่อม่อ. 2543. แมลงวัน: กี่แก้ววิทยาและการควบคุม. กรุงเทพมหานคร: กระทรวงสาธารณสุขมหาวิทยาลัยมหิดล.
- พัชรีย์ เลิศฤทธิ. 2552. ตำราพันธุกรรมของยีนไมโทคอนเดรียในประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร: มิสเตอร์ก็อปปี (ประเทศไทย).
- สุรางค์ นุชประยูร, จินตนา จิรนา และ ญัฐิยา หิรัญกาญจน์. 2546. เวชศาสตร์โมเลกุล. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

- Adrewartha H.G. and Birch L.C. 1954. The distribution and abundance of Animals. Chicago: University of Chicago Press.
- Anderson G.S. and VanLaerhoven S.L. 1996. Initial studies on insect succession on carrion in southwestern British Columbia. J Foren Sci 41(4):617-625.
- Anderson S. et al. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature 290:457-465.
- Annette W.C. 2007. Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure. Nucleic Acids Res 35(10):3322-3329.
- Ashworth J.R. and Wall R. 1994. Responses of the sheep blowflies *Lucilia sericata* and *L. cuprina* to odour and the development of semiochemical baits. Med Vet Entomol 8:303-309.
- Azeredo-Espin A. and Lessinger A. 2006. Genetic approaches for studying myiasis-causing flies: molecular markers and mitochondrial genomics. Genetica 126:111-131.
- Barr N.B. 2009. Pathway analysis of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) using mitochondrial DNA. J Econ Entomol 102(1):401-411.
- Bohart G.E. and Gressitt J.L. 1951. Filth-inhabiting flies of Guam. Bull Bernice P Bishop Mus 204:1-152.

- Bourel B. et al. 2001. Immunohistochemical contribution to the study of morphine metabolism in Calliphoridae larvae and implications in forensic entomotoxicology. J Forensic Sci 46:596–599.
- Braack L.E.O. 1981. Visitation patterns of principal species of the insect complex at carcasses in the Kruger National Park. Koedoe 24:33-49.
- Byrd J.H. and Castner J.L. 2000. Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations. 1st ed. Florida: CRC Press LLC.
- Chapman R.E. 1982. The insects structure and function. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Chen W.Y., Hung T.H. and Shiao S.F. 2004. Molecular identification of forensically important blow fly species (Diptera: Calliphoridae) in Taiwan. J Med Entomol 41:47-57.
- Early M. and Goff M.L. 1986. Arthropod succession patterns in exposed carrion on the island of Oahu, Hawaii. J Med Entomol 23:520-523.
- Erzinclioglu Y.Z. 1983. The application of entomology to forensic medicine. Med Sci Law 10:208-215.
- Erzinclioglu Y.Z. 1989. Entomology and the forensic scientist; how insects can solve crimes. J Biol Educ 23:300–302.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39:783-791.
- Gennard D.E. 2007. Forensic Entomology: An Introduction. 1st ed. England : Wiley.
- Goff M.L. and Lord W.D. 1994. Entomotoxicology: a new area for forensic investigation. Am J Foren Med Pathol 15:51-57.
- Grassberger M. and Reiter C. 2002. Effect of temperature on development of the forensically important holarctic blow fly *Protophormia terraenovae* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Calliphoridae). Forensic Sci Int 128:177–182.
- Hall M.J., Wardhana A.H., Shahhosseini G., Adams Z.J. and Ready P.D. 2009. Genetic diversity of populations of Old World screwworm fly, *Chrysomya bezziana*, causing traumatic myiasis of livestock in the Gulf region and implications for control by sterile insect technique. Med Vet Entomol 1:51-58.

- Hall M. and Wall R. 1995. Myiasis of human and domestic animals. Adv Parasitol 35:257–334.
- Harvey M.L., Dadour I.R. and Silvana G. 2003. Mitochondrial DNA cytochrome oxidase I gene: potential for distinction between immature stages of some forensically important fly species (Diptera) in western Australia. Forensic Sci Int 131:134-139.
- Henssge C., Madea B., Knight B., Nokes L., and Krompecher T. 1995. The Estimation of the Time Since Death in the Early Postmortem Period. London: Arnold.
- Irene Y. and Annette W.C. 2004. The advantages of the ITS2 region of the nuclear rDNA cistron for analysis of phylogenetic relationships of insects: a *Drosophila* example. Mol Phylogenet Evol 30:236–242.
- Jens A., Roman K. and Richard Z. 2004. Forensic entomology. Naturwissenschaften 91:51–65.
- Lane R.P. 1975. An investigation into blowfly (Diptera: Calliphoridae) Succession on corpses. J Nat Hist 9:581-588.
- Malgorn Y. and Coquoz R. 1999. DNA typing for identification of some species of Calliphoridae an interest in forensic entomology. Forensic Sci Int 102:111–119.
- Micozzi M.S. 1991. Postmortem change in Human and Animal Remains: A systematic Approach. Springfield, IL: Thomas CC.
- Miller M.L., Lord W.D., Goff M.L., Donnelly D., McDonough E.T, Alexis J.C. 1994. Isolation of amitriptyline and nortriptyline from fly pupariae (Phoridae) and beetle exuviae (Dermestidae) associated with mummified human remains. J Forensic Sci 39:1305–1313.
- Nelson L.A., Wallman J.F., Downton M. 2008. Identification of forensically important *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) species using the second ribosomal internal transcribed spacer (ITS2). Forensic Sci Int 177:238–247.
- Nuorteva P. 1977. Sarcosaprophagous insects as forensic indicators. Forensic Medicine : A study in Trauma and Environmental Hazards, Philadelphia: W.B. Saunders Co.
- O'Brien C. and Turner B. 2004. Impact of paracetamol on the development of *Calliphora vicina* larval development. Int J Legal Med 118:188-189.
- O'Flynn M.A. and Moorehouse D.E. 1979. Species of *chrysomya* as primary flies in carrion. J Aust Entomol Soc 18:31-32.

- Pesole G., Gissi C., De Chirico A. and Saccone C. 1999. Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes. J Mol Evol 48:427-34.
- Povolny D. and Rozsypal J. 1968. Toward the autecology of *Lucilia sericata* (Meigen,1826) (Dipt.,Call) and the origin of its synanthropy. Acta Scientiarum Naturalium Academiae Scientiarum Bohemoslovacae Brno 8:1-31.
- Povolny D. and Verves Y. 1997. The flesh-flies of central Europe. Spixiana Suppl 24:1–260.
- Ratcliffe S.T., Webb D.W., Weinzievr R.A. and Robertson H.M. 2003. PCR-RFLP Identification of Diptera (Calliphoridae, Muscidae and Sarcophagidae)—A Generally Applicable Method. J Forensic Sci 48:1-3.
- Ready P.D., Testa J.M., Wardhana A.H., Al-Izzi M., Khalaj M. and Hall M.J. 2009. Phylogeography and recent emergence of the Old World screwworm fly, *Chrysomya bezziana*, based on mitochondrial and nuclear gene sequences. Med Vet Entomol 1:43-50.
- Rodriguez W.C. and Bass W.M. 1983. Insect activity and its Relationship to Decay Rates of Human Cadavers in East Tennessee. Journal of Foensic Sciences 28:423-432.
- Sangster N. et al. 2002. Resistance to antiparasitic drugs: the role of molecular diagnosis. Int J Parasitol 32:637-653.
- Schlotterer C., Hauser M.T., Haeseler A. and Tautz D. 1994. Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*. Mol Biol Evol 11(3):513-522.
- Schroeder H., Klotzbach H., Elias S., Augustin C. and Pueschel K. 2003. Use of PCR–RFLP for differentiation of *calliphorid* larvae (Diptera, Calliphoridae) on human corpses. Forensic Sci Int 132:76–81.
- Saitou N. and Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 4:406-425.
- Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Cold Spring Harbor. New York: Cold Spring Harbor Press.
- Singer M. and Berg P. 1991. Gene & Genomes. Australia; Black well Scientific.
- Smith K.G.V. 1986. A Manual of Forensic Entomology London: Trustees of the British Museum (Natural History) and Cornell University Press.

- Song Z.K., Wang X.Z. and Liang G.Q. 2008a. Molecular evolution and phylogenetic utility of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) in Calyptratae (Diptera: Brachycera). J Mol Evol 67:448-464.
- Song Z.K., Wang X.Z. and Liang G.Q. 2008b. Species identification of some common necrophagous flies in guangdong province, southern china based on the rDNA internal transcribed spacer 2 (ITS2). Forensic Sci Int 175:17-22.
- Siriyasatien P. and Sirisup N. 2005. Estimation of post-mortem interval (PMI) using data from lifecycle of flies on corpses. Chula Med J 49(4):195-200.
- Sperling F.A., Anderson G.S. and Hickey D.A. 1994. A DNA-based approach to the identification of insect species used for postmortem interval estimation. J Forensic Sci 39:418-427.
- Stevens R.J. 2003. The evolution of myiasis in blowflies (Calliphoridae). Int J Parasito 33:1105-1113.
- Sukontason K.L., Narongchai P., Sukontason K., Methanitikorn R. and Piangjai S. 2005. Forensically important fly maggots in a floating corpse: the first case report in Thailand. J Med Assoc Thai 88(10):1458-1461.
- Sukontason K. et al. 2007. Forensic entomology cases in Thailand: a review of cases from 2000 to 2006. Parasitol Res 101(5):1417-1423.
- Tomberlin J.K., Albert A.M., Byrd J.H. and Hall D.W. 2006. Interdisciplinary workshop yields new entomological data for forensic sciences: *Chrysomya rufifacies* (Diptera: Calliphoridae) established in North Carolina. J Med Entomol 43(6):1287-8.
- Van den Oever R. 1976. A review of the literature as to the present possibilities and limitations in estimating the time of death. Med Sci Law 16:269-276.
- Wallman J.F., Leys R. and Hogendoorn K. 2005. Molecular systematic of Australian carrion-breeding blowflies (Diptera: Calliphoridae) based on mitochondrial DNA. Invertebrate Systematics 19:1-15.
- Wells J.D. and Greenberg B. 1994. Effect of the red imported fire ant (Hymenoptera: Formicidae) and carcass type on the daily occurrence of postfeeding carrion-fly larvae (Diptera: Calliphoridae, Sarcophagidae). J Med Entomol 31(1):171-174.

- Wells J.D. and Sperling F.A 2001. DNA-based identification of forensically important Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae). Forensic Sci Int 120(1-2):110-115.
- Wells J., Pape D., Sperling T., and Felix A. H. 2001. DNA-based identification and molecular systematics of forensically important Sarcophagidae (Diptera). J Forensic Sci 46(5):1098-1102.
- White P.C., Bruns T., Lee S. and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics in PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. San Diego: Academic Press.
- Zehner R., Amendt J., Schütt S., Sauer J., Krettek R. and Povolný D. 2004. Genetic identification of forensically important flesh flies (Diptera: Sarcophagidae). Int J Legal Med 118: 245–247.
- Zumpt.1965. Myiasis in Man and animals in the old world. London: Butheworths.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB (Luria-Bertani medium)

Bacto-tryptone	10.0	g
Yeast-extract	5.0	g
NaCl	5.0	g

ผสมกับน้ำจนได้ปริมาตร 1 L ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิ 121 °C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 อาหารแข็งเลี้ยงเชื้อสูตร LB (Luria-Bertani agar)

Bacto-tryptone	10.0	g
Yeast-extract	5.0	g
NaCl	5.0	g
Agar	15.0	g

ผสมกับน้ำจนได้ปริมาตร 1 L จากนั้นเติม agar แล้วนำไปปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิ 121 °C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SOB

Bacto-tryptone	20.0	g
Yeast-extract	5.0	g
NaCl	0.5	g

ผสมกับน้ำจนได้ปริมาตร 1 L ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิ 121 °C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. สารเคมีสำหรับการเตรียม Competent cell

2.1 สารละลาย TB buffer ประกอบด้วย

10 mM PIPES

55 mM MnCl_2

15 mM CaCl_2

250 mM KCl

3. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบโคลน

3.1 ยาปฏิชีวนะ ampicillin เตรียมให้ความเข้มข้นสุดท้าย 100 $\mu\text{g/ml}$

กรอง ด้วย 0.22 ไมโครมิลลิฟิลเตอร์ เก็บที่ $-20\text{ }^\circ\text{C}$

3.2 สารเคมี Isopropyl-B-D thiogalactoside (IPTG)

เตรียม Stock ที่ความเข้มข้น 1M โดยละลาย 2 g ต่อน้ำ 8 ml หลังจากละลายเข้ากันแล้วปรับปริมาตรเป็น 10 ml กรองด้วย 0.22 ไมโครมิลลิฟิลเตอร์ เก็บที่ $-20\text{ }^\circ\text{C}$

3.3 สารเคมี 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside (X-gal)

ละลาย 20 mg ใน Dimethylformamide 400 μl แล้วเก็บในหลอดที่กันแสงที่อุณหภูมิจึงเก็บที่ $-20\text{ }^\circ\text{C}$

4. สารเคมีที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยวิธีแยกขนาดดีเอ็นเอในเจลอะกาโรสภายใต้กระแสไฟฟ้า (agarose gel electrophoresis)

4.1 สารละลาย 10xTAE ปริมาตร 1 L

Tris-HCl	48	g
CH ₃ COONa ₃ H ₂ O	16.4	g
Na ₂ EDTA	7.44	g

ละลายส่วนประกอบต่างๆ ในน้ำกลั่น ปรับ pH 7.7 ด้วย glacial acetic acid แล้วปรับปริมาตรเท่ากับ 1 L เมื่อใช้งานให้เจือจางความเข้มข้นของ 10xTAE เป็น 1xTAE

4.2 สารละลาย 6X loading buffer

bromophenol blue	0.01	g
Tris-HCl (pH 6.8)	1.25	ml
Glycerol	5	ml

ผสม bromophenol blue และ Tris-HCl ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 5 ml แล้วเติม glycerol 5 ml เก็บที่ 4 °C

4.3 สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.5 µg/ml

ละลายเอธิเดียมโบรไมด์จำนวน 0.5 mg ในน้ำกลั่น 1 L เก็บในขวดสีน้ำตาล (เอธิเดียมโบรไมด์เป็นสารก่อมะเร็ง ควรใส่ถุงมือเวลาเตรียมสารละลาย)

4.4 DNA มาตรฐาน 100 bp ของบริษัท Fermentas[®]

4.5 DNA มาตรฐาน 100 bp ของบริษัท Invitrogen[®]

4.6 DNA มาตรฐาน 25 bp ของบริษัท Fermentas[®]

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. สารเคมีที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ DNA โดยวิธีแยกขนาด DNA ใน native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) ภายใต้กระแสไฟฟ้า

5.1 10% ammonium persulfate

ammonium persulfate 0.1 g ในน้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ 1 ml

5.2 5x TBE buffer ปริมาตรรวม 1 L

Tris-base	54	g
Boric acid	27.5	g
0.5 M EDTA (pH 8)	20	ml

5.3 30 % Acrylamide

acrylamide	27	g
N, N'- Methylbis	1	g

เติมน้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ จนครบ 100 ml

6. สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction)

6.1 บริษัท Invitrogen[®]

10x PCR buffer Buffer (Tris-HCl 200 mM, (pH 8.4), KCl 500 mM)

2mM dNTP

25 mM MgCl₂

5 U/ μ l ของ Taq DNA Polymerase

6.2 บริษัท Fermentas[®]

1XTaq Buffer (75 mM Tris-HCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0.01% Tween 20) with (NH₄)₂SO₄

2 mM dNTP

5 M MgCl₂

5 U/ μ l ของ Taq DNA Polymerase

7. ชุดแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์จากเจลอะกาโรสโดยใช้ ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit ของบริษัท QIAGEN®

บัฟเฟอร์ QG (Solubilization buffer)

บัฟเฟอร์ PE (Wash buffer)

Isopropanol

น้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

Spin column

8. สารเคมีที่ใช้ในการเชื่อมดีเอ็นเอของบริษัท Invitrogen®

น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ

T₄ DNA ligase

T₄ DNA ligase buffer

9. ชุดสกัดพลาสมิด NucleoSpin® Plasmid Kits บริษัท MACHERY-NAGEL

สารละลาย A1 (Resuspension buffer)

สารละลาย A2 (Lysis buffer)

สารละลาย A3 (Neutralization buffer)

สารละลาย A4 (Wash buffer)

สารละลาย AE (Elution buffer) และ น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

10. ชุดสารเคมีที่ใช้ในการย่อยผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรส

4.1 เอนไซม์ *Dral* ของบริษัท Roch[®]

Dral Buffer (100 mM Tris-HCL, 500 mM NaCl, 100 mM MgCl₂, 10 mM Dithioerythritol, pH 7.5 ที่อุณหภูมิ 37° C)

เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dral* ความเข้มข้น 10 U/ μl

มีตำแหน่งจดจำของนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

TTT₃AAA

4.2 เอนไซม์ *Vspl* ของบริษัท New England Biolabs, USA

Buffer O (100 mM Tris-HCL, 500 mM NaCl, 100 mM MgCl₂, 10 mM Dithioerythritol, pH 7.5 ที่อุณหภูมิ 37° C)

เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Vspl* ความเข้มข้น 10 U/ μl

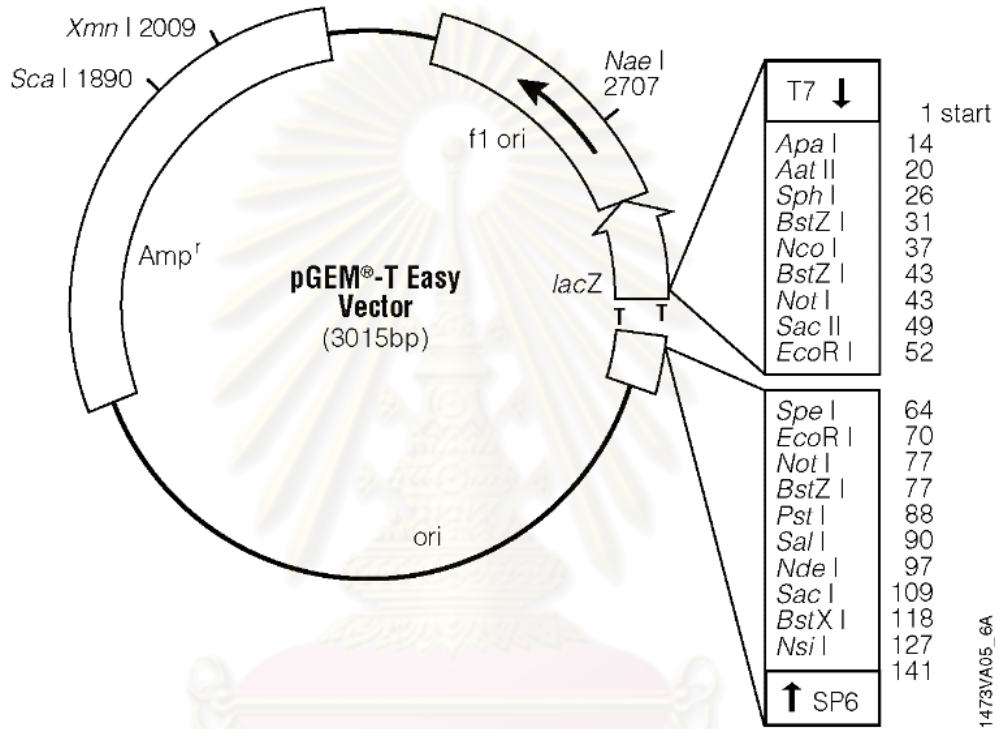
มีตำแหน่งจดจำของนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

AT₃TA₃AT

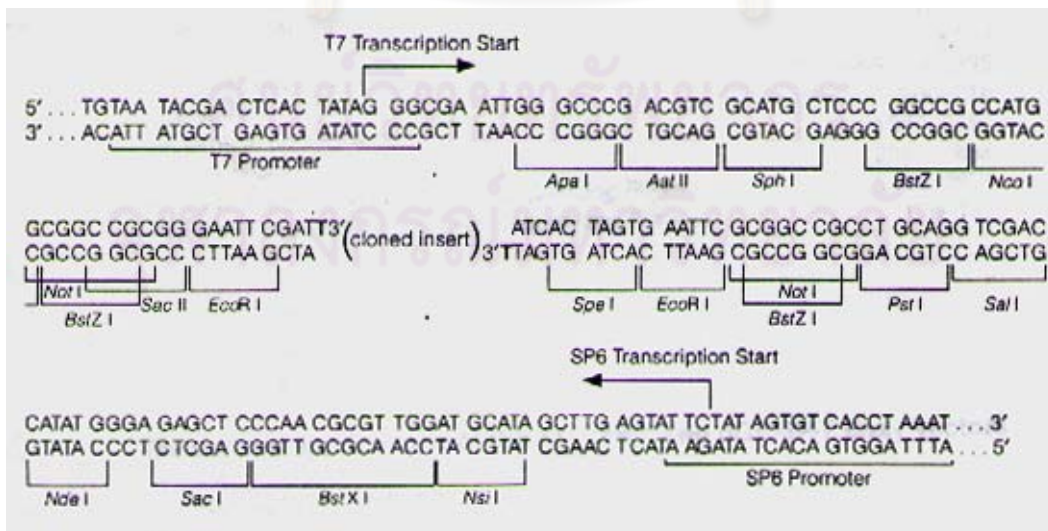
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

11. เวกเตอร์ pGEM[®]-T Easy (Promega[®])

pGEM[®]-T Easy (55 ng/ μ l) (รูปที่ ก.1)



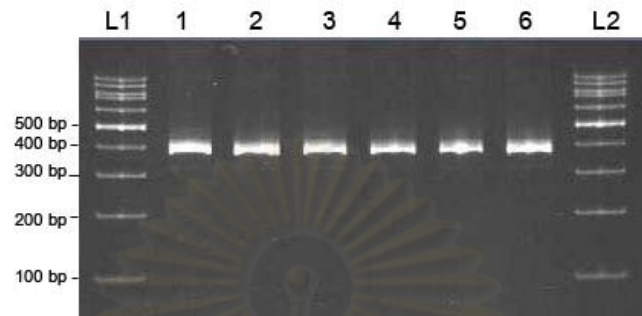
1473VA05_6A



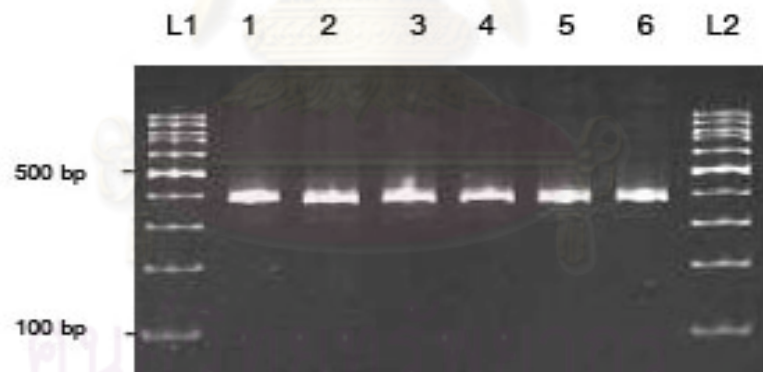
รูปที่ ก.1 แผนที่ยีนของพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM[®]-T Easy (Promega[®])

ภาคผนวก ข.

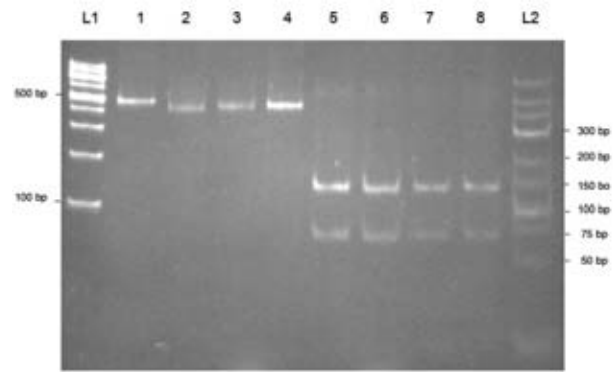
ตัวอย่างการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR-RFLP



รูปที่ ข.1 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณ ITS2 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *DraI*
 Lane L1, L2 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp และ 25 bp DNA Ladder ตามลำดับ)
 Lane ที่ 1-3 คือ *Chrysomya megacephala* จากเชียงใหม่
 Lane ที่ 4-6 คือ *Chrysomya megacephala* จากตาก



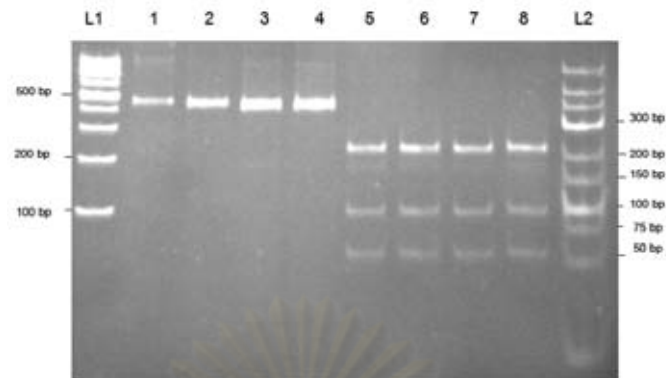
รูปที่ ข.2 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณ ITS2 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *DraI*
 Lane L1, L2 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp และ 25 bp DNA Ladder ตามลำดับ)
 Lane ที่ 1-3 คือ *Chrysomya megacephala* จากชุมพร
 Lane ที่ 4-5 คือ *Chrysomya megacephala* จากพิษณุโลก
 Lane ที่ 6 คือ *Chrysomya megacephala* จากกรุงเทพมหานคร



- รูปที่ ๑.3 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณ ITS2 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *DraI*
- Lane L1, L2 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp และ 25 bp DNA Ladder ตามลำดับ)
- Lane ที่ 1-4 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ก่อนถูกตัด
- Lane ที่ 5-6 คือ *Chrysomya rufifacies* จากเชียงใหม่
- Lane ที่ 7 คือ *Chrysomya rufifacies* จากพิษณุโลก
- Lane ที่ 8 คือ *Chrysomya rufifacies* จากกรุงเทพมหานคร



- รูปที่ ๑.4 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณ ITS2 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *DraI*
- Lane L1, L2 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp และ 25 bp DNA Ladder ตามลำดับ)
- Lane ที่ 1-3 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ก่อนถูกตัด
- Lane ที่ 4 คือ *Chrysomya albiceps* จากกรุงเทพมหานคร
- Lane ที่ 5-6 คือ *Chrysomya albiceps* จากเชียงใหม่



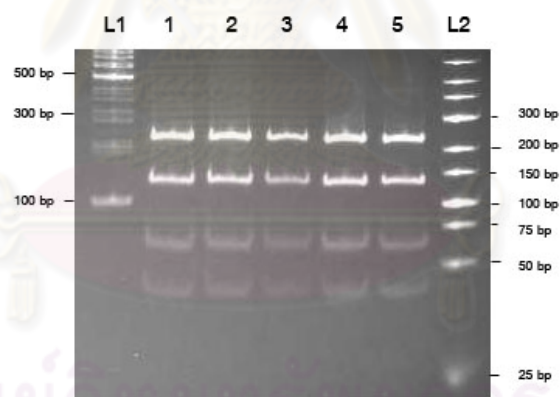
รูปที่ ๗.5 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณ ITS2 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *DraI*

Lane L1, L2 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp และ 25 bp DNA Ladder ตามลำดับ)

Lane ที่ 1-4 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ก่อนถูกตัด

Lane ที่ 5-7 คือ *Lucilia cuprina* จากเชียงใหม่

Lane ที่ 8 คือ *Lucilia sericata* จากเชียงใหม่



รูปที่ ๗.6 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณส่วนของยีน ND5 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัด

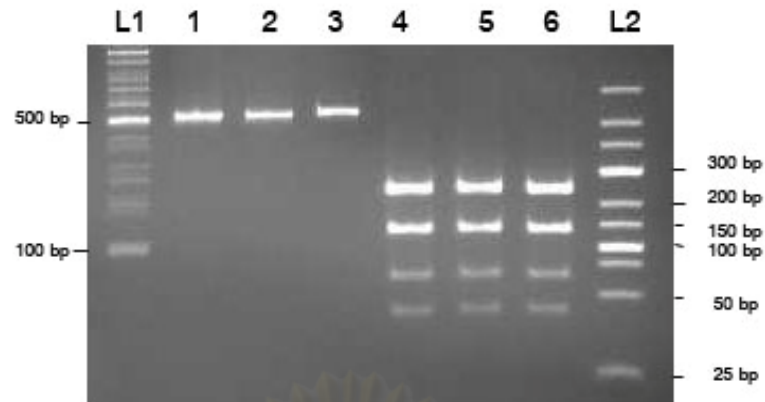
จำเพาะ *VspI*

Lane L1, L2 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp และ 25 bp DNA Ladder ตามลำดับ)

Lane ที่ 1-2 คือ *Chrysomya megacephala* จากเชียงใหม่

Lane ที่ 3-4 คือ *Chrysomya megacephala* จากตาก

Lane ที่ 5 คือ *Chrysomya megacephala* จากกรุงเทพมหานคร



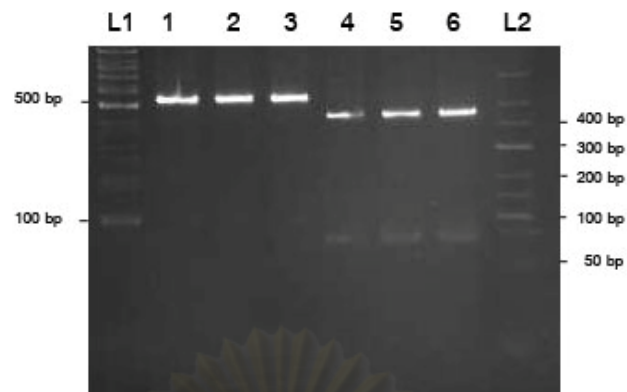
รูปที่ ๗.7 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณส่วนของยีน ND5 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *VspI*

- Lane L1, L2 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp และ 25 bp DNA Ladder ตามลำดับ)
 Lane ที่ 1-3 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ก่อนถูกตัด
 Lane ที่ 4-6 คือ *Chrysomya megacephala* จากชุมพร



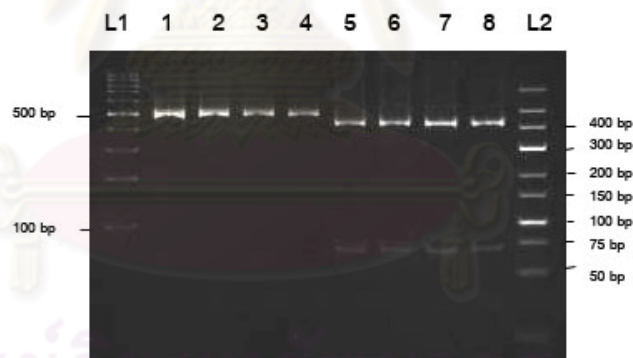
รูปที่ ๗.8 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณส่วนของยีน ND5 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *VspI*

- Lane L1, L2 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp และ 25 bp DNA Ladder ตามลำดับ)
 Lane ที่ 1-3 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ก่อนถูกตัด
 Lane ที่ 4-6 คือ *Chrysomya megacephala* จากพิษณุโลก



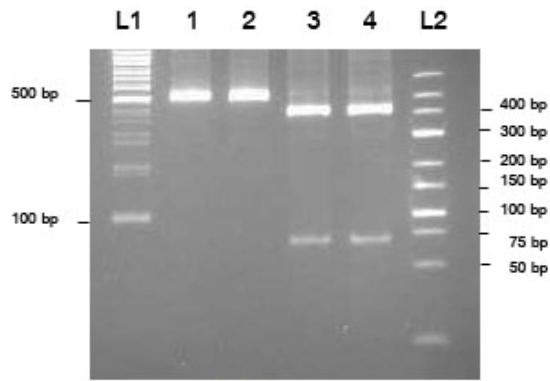
รูปที่ ๗.9 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณส่วนของยีน ND5 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *VspI*

- Lane L1, L2 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp และ 25 bp DNA Ladder ตามลำดับ)
 Lane ที่ 1-3 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ก่อนถูกตัด
 Lane ที่ 4 คือ *Chrysomya albiceps* จากกรุงเทพมหานคร
 Lane ที่ 5-6 คือ *Chrysomya albiceps* จากเชียงใหม่



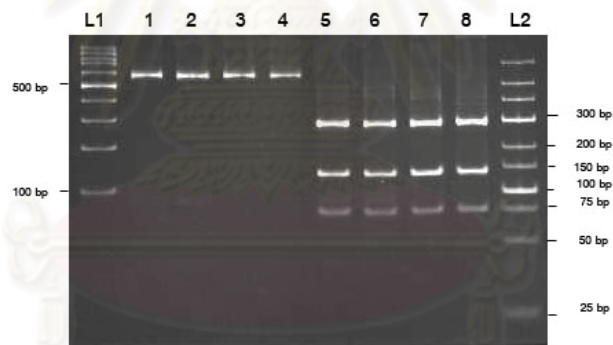
รูปที่ ๗.10 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณส่วนของยีน ND5 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *VspI*

- Lane L1, L2 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp และ 25 bp DNA Ladder ตามลำดับ)
 Lane ที่ 1-4 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ก่อนถูกตัด
 Lane ที่ 5-8 คือ *Chrysomya rufifacies* จากเชียงใหม่



รูปที่ ข.11 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณส่วนของยีน ND5 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ VspI

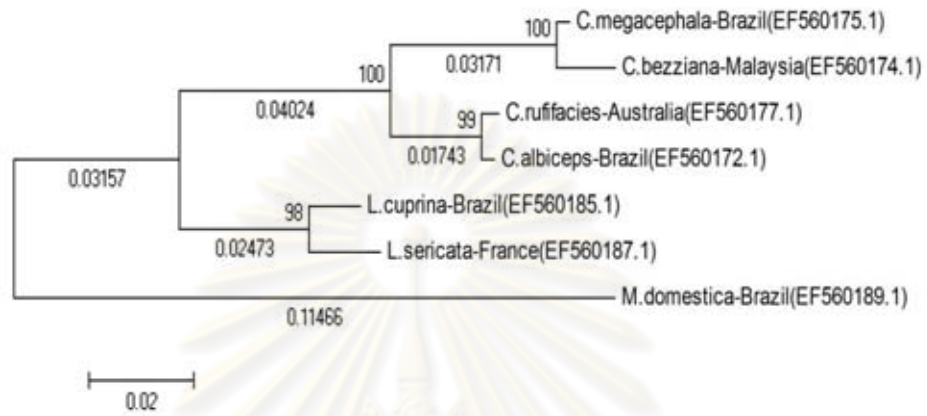
- Lane L1, L2 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp และ 25 bp DNA Ladder ตามลำดับ)
- Lane ที่ 1-2 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ก่อนถูกตัด
- Lane ที่ 3 คือ *Chrysomya rufifacies* จากกรุงเทพมหานคร
- Lane ที่ 4 คือ *Chrysomya rufifacies* จากพิษณุโลก



รูปที่ ข.12 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณส่วนของยีน ND5 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ VspI

- Lane L1, L2 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp และ 25 bp DNA Ladder ตามลำดับ)
- Lane ที่ 1-4 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ก่อนถูกตัด
- Lane ที่ 5-7 คือ *Lucilia cuprina* จากเชียงใหม่
- Lane ที่ 8 คือ *Lucilia sericata* จากเชียงใหม่

ภาคผนวก ค.



รูปที่ ค.1 แผนภูมิวิวัฒนาการจำลองจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันหัวเขียวบริเวณ ITS2 ของ Marinho et al. (2007)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ นามสกุล	นางสาวรัชฎาภรณ์ จันทร
วัน เดือน ปีเกิด	24 กันยายน พ.ศ. 2528
ที่อยู่	บ้านเลขที่ 9 หมู่ 12 ต. จิวราย อ. เมือง จ. ลพบุรี 15000
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2550 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี (เทคนิคการแพทย์) คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2550 งานวิจัยปริญญาตรี เรื่อง Identification of blood meals in <i>Armigeres subalbatus</i> by multiplex PCR.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย