

การวิเคราะห์ยีน Second Internal Transcribed Spacer (ITS2) ของแมลงวัน
หลั่งถ่าย (Sarcophagidae) ที่มีความสำคัญทางนิติวิทยาศาสตร์ในประเทศไทย

ANALYSIS OF THE SECOND INTERNAL TRANSCRIBED SPACER (ITS2)
GENE OF FORENSICALLY IMPORTANT FLESHFLY (SARCOPHAGIDAE)
IN THAILAND



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาค้นคว้าระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพภาคเกษตร

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2552

KIITL-2009-AQ-M-101-029

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

**การวิเคราะห์ยีน Second Internal Transcribed Spacer (ITS2) ของแมลงวัน
หลังลาย (Sarcophagidae) ที่มีความสำคัญทางนิติวิทยาศาสตร์ในประเทศไทย**

**ANALYSIS OF THE SECOND INTERNAL TRANSCRIBED SPACER (ITS2)
GENE OF FORENSICALLY IMPORTANT FLESHFLY (SARCOPHAGIDAE)
IN THAILAND**

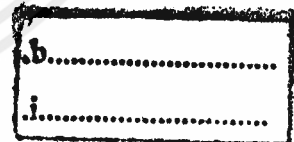


T105508

มณฑิชา นาวงษ์

MONTICHA NAWONG

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....105508
วัน,เดือน,ปี..... 24 พ.ย. 2552



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ภายในเท่านั้น ไม่ควรนำออกนอกห้องสมุดไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และนำออกจำหน่ายหรือแจกจ่ายแก่บุคคลอื่นโดยไม่ได้รับอนุญาต
พ.ศ.2552

**ANALYSIS OF THE SECOND INTERNAL TRANSCRIBED SPACER (ITS2)
GENE OF FORENSICALLY IMPORTANT FLESHFLY (SARCOPHAGIDAE)
IN THAILAND**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY
FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY**

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์ของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และ 2009 อ่างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

KMITL-2009-AG-M-101- 029



เอกสารนี้ **COPYRIGHT 2009** สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ขอสงวนสิทธิ์ในชื่อสถาบันฯ และเครื่องหมายฯ ของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOG
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การวิเคราะห์ยีน Second Internal Transcribed Spacer (ITS2) ของแมลงวันหลังลาย (Sarcophagidae) ที่มีความสำคัญทางนิติ ศึกษากฎหมายในประเทศไทย

นักศึกษา

นางสาวมณฑิชา นาวงษ์

รหัสประจำตัว

50065808

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา

เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

พ.ศ.

2552

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ.ดร.อำมร อินทร์สังข์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

รศ.นพ.ดร.เผด็จ สิริยะเสถียร

บทคัดย่อ

การระบุชนิดของแมลงได้อย่างถูกต้องไม่เพียงแต่จะให้ข้อมูลด้านการเจริญที่จำเพาะต่อแมลงแต่ละสายพันธุ์ จะช่วยนักนิติวิทยาศาสตร์ ในการประมาณการตายได้อย่างถูกต้องยิ่งขึ้น แล้วยังเป็นหลักฐานทางนิติเวชที่สำคัญอีกด้วย การระบุสายพันธุ์ของแมลงโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยามีความยุ่งยาก เนื่องมาจากความคล้ายคลึงกันของแมลงแต่ละสายพันธุ์ โดยเฉพาะในระยะตัวหนอน ในปัจจุบันการระบุสายพันธุ์ของแมลงโดยอาศัยข้อมูลสารพันธุกรรมดีเอ็นเอ สามารถระบุสายพันธุ์ของแมลงได้อย่างถูกต้อง และน่าเชื่อถือ เพื่อนำไปใช้ได้จริงในทางปฏิบัติการ การศึกษารุ่นนี้ได้แสดงการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมบริเวณ second internal transcribed spacer (ITS2) เพื่อจัดจำแนกสายพันธุ์แมลงวันหลังลายที่มีความสำคัญทางนิติเวช และพบได้บ่อยในประเทศไทย ได้แก่ *Sarcophaga dux*, *Sarcophaga peregrina* และ *Sarcophaga ruficornis* โดยอาศัยเทคนิค Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) หลังจากการทำปฏิกิริยาโพลีเมอเรส พบว่าได้สารพันธุกรรมมีขนาดเดียวในแต่ละสายพันธุ์ โดยมีความยาวในช่วง 390-401 คู่เบส ผลิตภัณฑ์ที่ได้ถูกโคลนเข้าสู่โคลนนิ่งเวกเตอร์ pTZ57R/T เพื่อทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยอาศัยไพรเมอร์ M13R ข้อมูลของนิวคลีโอไทด์ที่ได้พบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *DraI* สามารถจำแนก 3 สายพันธุ์ของแมลงวันหลังลายได้โดยให้รูปแบบ RFLP ที่แตกต่างกัน จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันหลังลายไม่พบความแตกต่างภายในสายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นเมื่อทำการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี neighbor-joining และกำหนดแบบจำลองของการแทนที่ลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Kimura-2-parameter model เพื่อพิจารณาถึงความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ในสายพันธุ์เดียวกัน แสดงถึงระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ ที่มีความใกล้เคียงกันมากได้อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นวิธีการดังกล่าวสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการจัดจำแนกเพื่อระบุสายพันธุ์แมลงวันหลังลายแต่ละชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ แม่นยำ และรวดเร็ว

Thesis Title	Analysis of the Second Internal Transcribed Spacer (ITS2) Gene of Forensically Important Fleshfly (Sarcophagidae) in Thailand
Student	Miss Monticha Nawong
Student ID.	50065808
Degree	Master of Science
Program	Agricultural Biotechnology
Year	2009
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Ammorn Insung
Thesis Co-Advisor	Assoc. Prof. Dr. Padet Siriyasatien

ABSTRACT

Accurate identification of insects collected from death scenes provides not only specific developmental data assisting forensic entomologists to determine the postmortem interval more precisely but also other kinds of forensic evidence. Considerably, morphological identification of insect was very complicated due to the similarity among species especially in early larval stages. To simplify and make the species identification more practical and reliable, DNA-based identification is preferentially considered. In this study, we demonstrate the application of second internal transcribed spacer (ITS2) sequences for differentiation of forensically important fleshfly in Thailand; *Sarcophaga dux*, *Sarcophaga peregrina* and *Sarcophaga ruficornis* by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP). The PCR yields a single 390-401 bp-sized amplicon in all fleshfly specimens. The PCR products were cloned into pTZ57R/T TA cloning vector and then verified by automated DNA sequencing using M13R primer. *DraI* restriction enzyme predicted from the sequencing data provides different RFLP profiles among these four species. Sequence analysis reveals no significant intraspecific divergence in fleshfly specimens. Accordingly, neighbor-joining tree using Kimura's 2-parameter model illustrates clustering in the same species and also shows significant genetic distances between congeneric species. These approaches serve as the promising tools for molecular identification of these common fleshfly species.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ. ดร. อัมพร อินทร์สังข์ ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ตลอดการทำวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม คือ รศ.นพ. ดร. เผด็จ สิริยะเสถียร ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำตลอดจนความอนุเคราะห์เครื่องมือ อุปกรณ์ สารเคมี ในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยดี อีกทั้งยังตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความอนุเคราะห์จากอาจารย์ทั้งสองท่านและขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง และขอกราบของพระคุณ ผศ. ดร. อมรรัตน์ พรหมบุญ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ให้คำแนะนำ และตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เพื่อความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษากระทรวงศึกษาธิการ และทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ประจำปี 2552 จากบัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ขอกราบขอบพระคุณ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างแมลงวันในการศึกษาและขอกราบขอบพระคุณท่านผู้อุทิศร่างกายเพื่อการศึกษาในครั้งนี้เป็นอย่างยิ่ง

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบังทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ให้กับข้าพเจ้า รวมทั้งพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง และพี่ น้อง ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และให้กำลังใจตลอดการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบคุณนายแพทย์กนก พดุมวิทัญญู เป็นอย่างยิ่ง ที่ให้ความรู้และคำแนะนำตลอดการทำวิจัย จนสำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณอย่างยิ่งสำหรับคุณพ่อเสนาอ และคุณแม่แม่มณฑิยา นาวงษ์ ที่ให้การสนับสนุนเป็นกำลังใจอย่างยิ่งในการศึกษา และทำวิทยานิพนธ์ตลอดมา ซึ่งประโยชน์และคุณค่าของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้ที่มีพระคุณทุกท่านตลอดจนผู้ที่สามารถนำไปใช้

เอกสารนี้ เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อไปได้ งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มณฑิชา นาวงษ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญรูป.....	VIII
สารบัญตาราง.....	X
รายการคำย่อ.....	XI
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	4
1.3 สถานที่ดำเนินงาน.....	4
1.4 ระยะเวลาการทำงาน.....	4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 แมลงวันหลังลาย (fleshfly).....	5
2.2 แมลงวันกับความสำคัญทางด้านการแพทย์และปศุสัตว์.....	8
2.3 แมลงวันกับความสำคัญทางด้านนิติกีฏวิทยา (forensic entomology).....	8
2.4 เครื่องหมายทางโมเลกุล (molecular markers).....	9
2.5 การจัดจำแนกสปีชีส์ของแมลงวัน โดยอาศัยข้อมูลทางสัณฐานวิทยา.....	10
2.6 การประยุกต์ใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลในการจำแนกสายพันธุ์.....	14
2.7 เทคนิคการจำแนกสายพันธุ์.....	20
2.8 การประยุกต์ใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสในการศึกษาความหลากหลายและเพื่อ จัดจำแนกสายพันธุ์.....	26
2.9 การศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต โดยอาศัยข้อมูลทาง	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ชีวสารสนเทศ (bioinformatic) การศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	33
3.1 ตัวอย่างทดลอง.....	33
3.2 อุปกรณ์.....	33
3.3 สารเคมี (ภาคผนวก ก).....	34
3.4 วิธีการ.....	35
3.4.1 การสกัด DNA (DNA extraction).....	35
3.4.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นยืน ITS2 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR).....	37
3.4.3 การสกัดแยก DNA ออกจากอะกาโรสเจลและการทำให้บริสุทธิ์.....	39
3.4.4 การเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ (ligation).....	39
3.4.5 การเตรียมเชื้อ <i>E.coli</i> DH5 α ให้เป็น competent cell.....	40
3.4.6 การถ่ายโอน DNA สายผสมเข้าสู่ competent cell <i>E.coli</i> DH5 α ด้วยวิธี heat shock.....	40
3.4.7 การคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานส์ฟอร์ม.....	41
3.4.8 การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โคลนด้วยเทคนิค colony PCR.....	41
3.4.9 การสกัดพลาสมิด DNA โดยใช้ QIAprep spin miniprep kit, QIAGEN [®]	41
3.4.10 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์.....	42
3.4.11 การวิเคราะห์ความหลากหลายของแมลงวันหลังลายด้วยวิธี PCR-RFLP).....	42
3.4.12 วิเคราะห์และหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแมลงวันหลังลาย.....	44
3.4.13 การขึ้นทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์ (database submission).....	44
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	46
4.1 ผลการสร้างเพิ่มปริมาณชิ้นยืน ITS2.....	46
4.1.1 ผลการการเพิ่มปริมาณชิ้นยืน ITS2 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR).....	46

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.1.2 ผลการทำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิริยาถูกโซ่โพลีเมอร์สให้บริสุทธิ์.....	47
4.1.3 ผลการโคลนผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิริยาถูกโซ่โพลีเมอร์ส เข้ากับ พลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T และ การถ่ายโอนพลาสมิด DNA ถูกผสม เข้าสู่ Competent cell <i>E.coli</i> DH5 α ด้วยวิธี chemical transformation.....	48
4.2 ผลการวิเคราะห์และตรวจสอบ DNA สายผสม.....	49
4.2.1 ผลการวิเคราะห์โคลนที่มี DNA สายผสมด้วยเทคนิค colony PCR.....	49
4.2.2 ผลการสกัดพลาสมิด DNA.....	50
4.3 ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายของแมลงวันหลังถ่ายด้วยวิธี PCR-RFLP.....	51
4.4 ผลวิเคราะห์และหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของแมลงวัน หลังถ่าย.....	53
4.4.1 ผลการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล.....	53
4.4.2 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน ITS2 ของแมลงวัน หลังถ่าย.....	53
4.4.3 ผลการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแมลงวันหลังถ่ายด้วย แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม (phylogenetic tree analysis).....	59
4.4.4 ผลการการขึ้นทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์ (database submission).....	61
บทที่ 5 วิจัยผลการทดลอง.....	62
5.1 ผลการสกัด DNA จากแมลงวันหลังถ่ายระยะตัวหนอนและตัวเต็มวัย.....	62
5.2 ผลการทำปฏิริยาถูกโซ่โพลีเมอร์สของแมลงวันหลังถ่าย.....	63
5.3 ผลการทำ PCR-RFLP.....	63
5.4 ผลการทำ sequencing และ แผนภูมิวิวัฒนาการของแมลงวันหลังถ่าย.....	65
บทที่ 6 สรุปผลการทดลองและเสนอแนะ.....	67
เอกสารที่บรรณานุกรม.....	69
ภาคผนวก ก.....	74

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก ข.....	80
ประวัติผู้เขียน.....	82



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1.1 ลักษณะตัวเต็มวัยของแมลงวันทั้ง 3 ชนิด.....	2
2.1 ลักษณะตัวเต็มวัยของแมลงวันหลังลาย.....	7
2.2 ลักษณะวงจรชีวิตของแมลงวันซึ่งแบ่งเป็นระยะไข่ ระยะตัวหนอน ระยะดักแด้ และระยะตัวเต็มวัย.....	7
2.3 ลักษณะ posterior spiracle ของแมลงวันที่มีลักษณะเฉพาะในแมลงวันแต่ละสายพันธุ์.....	10
2.4 ความแตกต่างระหว่างลักษณะ cephalopharyngeal skeleton และ posterior spiracles ของแมลงวันหัวเขียวของหนอนระยะที่ 3.....	11
2.5 การจำแนกลักษณะตัวเต็มวัยของแมลงวันหลังลายโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา...	12
2.6 ลักษณะ posterior spiracle ของแมลงวันหลังลาย (<i>Sarcophaga sp.</i>).....	13
2.7 โครงสร้างแบบ circular และองค์ประกอบของ mtDNA.....	15
2.8 การจัดเรียงตัวของกลุ่ม rRNA gene ของสิ่งมีชีวิตชนิดของยูคาริโอต	19
2.9 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณ DNA ที่ต้องการ โดยอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส.....	22
3.1 โครงสร้างของ rDNA gene.....	37
4.1 ผลลัพธ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสที่ได้จากการตรวจสอบชิ้นยืน ITS2 ทำการตรวจสอบด้วย 1 % agarose gel.....	46
4.2 ผลจากการทำผลลัพธ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสให้บริสุทธิ์ และตรวจสอบด้วย 1 % agarose gel.....	47
4.3 ผลลัพธ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสที่ได้จากการตรวจสอบโคลนที่มีชิ้นยืน ITS2 ตรวจสอบ ด้วย 1 % agarose gel.....	49
4.4 พลาสมิด DNA ถูกผสมที่ได้จากการสกัดด้วยชุดสกัดพลาสมิด QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAGEN [®] ทำการตรวจสอบด้วย 1 % agarose gel.....	50
4.5 ผลลัพธ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>DraI</i> ตรวจสอบด้วย 8 % native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)	52
4.6 ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของชิ้น ITS2 ของแมลงวันหลังลายสายพันธุ์ <i>S. dux</i>	55
4.7 ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของชิ้น ITS2 ของแมลงวันหลังลายสายพันธุ์ <i>S. peregrina</i>	56
4.8 ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของชิ้น ITS2 ของแมลงวันหลังลายชนิดสายพันธุ์ <i>S. ruficornis</i>	57

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.9 แผนภูมิวิวัฒนาการของกลุ่มแมลงวันหลังลาย (<i>Sarcophaga sp.</i>)	60
ภาคผนวก ที่ ก1 แผนที่ขึ้นของพลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T.....	79
ภาคผนวก ที่ ข1 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาถูกลูโซโพลีเมอเรสที่ได้จากการตรวจสอบชิ้นชิ้น ITS1 และ ITS2 ตรวจสอบด้วย 1 % agarose gel.....	81



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 ตัวอย่างสายพันธุ์แมลงวันหลังลายที่ทำการศึกษา.....	33
3.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยเทคนิค PCR.....	37
3.3 ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส.....	38
3.4 อัตราส่วนของสารในการเชื่อมของ insert DNA เข้ากับ vector (pTZ57R/T).....	40
3.5 อัตราส่วนของสารในการย่อยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ด้วย restriction enzyme (<i>Dra</i> I enzyme).....	43
4.1 ขนาดชิ้น DNA ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ชนิด <i>Dra</i> I ที่ทำนายโดยใช้โปรแกรม NEBCutter.....	51
4.2 รหัสโคลนของแมลงวันหลังลายที่ได้จากการ sequencing.....	54
4.3 ระยะห่างของวิวัฒนาการระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 7 แทกซา.....	60
4.4 ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของแมลงวันหลังลายในประเทศไทย และประเทศจีน.....	61
4.5 เลขทะเบียนของแมลงวันหลังลายในแต่ละสายพันธุ์ที่ทำการศึกษา.....	61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายการคำย่อ

ตัวย่อ

%	percent (เปอร์เซ็นต์)
µg	microgram (ไมโครกรัม)
µl	microlitre, 10 ⁻⁶ liter (ไมโครลิตร)
µM	micromolar (ไมโครโมลาร์)
bp	base pair (คู่เบส)
cm	centimetre (เซนติเมตร)
ddH ₂ O	deionized distilled water (น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ)
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTPs	deoxynucleotide triphosphates (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
EDTA	ethyline diamine tetraacetic acid
<i>et al.</i>	et. alii (latin), and others
EtBr	ethidium bromide
EtOH	ethanol
g	grams (กรัม)
genomic DNA	จำนวนดีเอ็นเอทั้งหมด
kb	kilobase pair (กิโลเบส)
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)
nm	nanometre (นาโนเมตร)
nt	nucleotide (หน่วยย่อยของกรดนิวคลีอิกที่ประกอบด้วยเบสที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ มีน้ำตาลที่มีธาตุคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ 5 อะตอม และหมู่ฟอสเฟตอีกหนึ่งหมู่)

° C	degree celsius (องศาเซลเซียส)
OD	optical density
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction (ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส)
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
s	svedberg coefficient
SDS	sodium dodecyl sulfate
TAE	Tris sodium acetate EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i> (polymerase)
UV	ultraviolet
V	volt (โวลต์)
V/cm	volt/ centimetre (โวลต์/เซนติเมตร)
v/v	volumn by volumn
w/v	weight by volumn

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มา

แมลงวันเป็นแมลงที่มีลำตัวขนาดเล็กถึงปานกลาง มีปีก 2 ปีก สามารถพบได้ทั่วโลก วงจรชีวิตประกอบด้วยระยะไข่ ตัวอ่อน ดักแด้ ตัวเต็ม โดยส่วนใหญ่แล้วแมลงวันตัวเมียจะออกลูกเป็นไข่และวางไข่เป็นกลุ่ม ครั้งละประมาณ 200-300 ฟอง แต่แมลงวันบางชนิด เช่น แมลงวันหลังลาย มีลักษณะพิเศษ คือ สามารถออกลูกเป็นตัวอ่อน หรือที่เราเรียกว่า ตัวหนอน (maggots) เนื่องจากมีการพัฒนาการจากระยะไข่ไปเป็นระยะตัวอ่อนรวดเร็วมากตัวอ่อนจึงฟักออกจากไข่ตั้งแต่ในท้องของแม่ (นพวรรณ บุญชู, 2551)

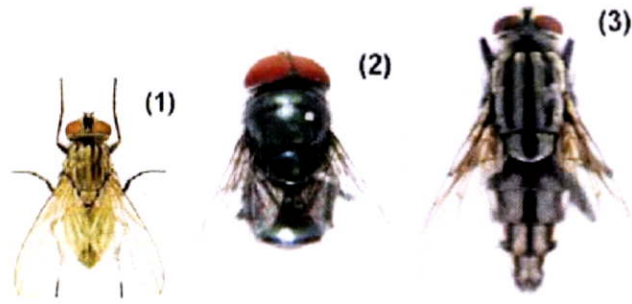
แมลงวันจะเจริญเติบโตรวดเร็วมากในช่วงฤดูร้อน ซึ่งส่วนใหญ่ใช้เวลาประมาณ 1-2 สัปดาห์ก็สามารถเจริญจากไข่เป็นตัวเต็มวัย

แมลงวันสามารถจำแนกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ในประเทศไทย ได้แก่ แมลงวันบ้าน แมลงวันหัวเขียว และแมลงวันหลังลาย โดยลักษณะง่ายๆ ที่ใช้ในการจำแนกแมลงวันทั้ง 3 กลุ่มมีดังนี้

แมลงวันบ้าน เป็นแมลงวันที่มีขนาดลำตัวเล็กยาวประมาณ 7-9 มม. สีเทาดำ ไม่สะท้อนแสง ส่วนอกด้านหลังมีแถบดำ 4 เส้น ส่วนท้องมีสีน้ำตาลใส มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Musca domestica* (รูปที่ 1.1-1)

แมลงวันหัวเขียว มีลำตัวขนาดใหญ่กว่าแมลงวันบ้าน ซึ่งยาวประมาณ 8-11 มม. ส่วนใหญ่แมลงวันหัวเขียวจะมีลักษณะเด่นคือ ลำตัวส่วนอกและท้องมีความมันวาวสะท้อนแสงสีเขียว ทำให้คนเรียกแมลงวันชนิดนี้ว่า แมลงวันหัวเขียว ทั้งๆ ที่ส่วนที่มีสีเขียวไม่ใช่ส่วนหัว อย่างไรก็ตามสีของแมลงวันหัวเขียวแต่ละชนิดก็มีความแตกต่างกันไปเช่น สีเขียว น้ำเงิน ม่วง และทองแดง แมลงวันหัวเขียวชนิดที่พบมากที่สุดในประเทศไทย มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Chrysomya megacephala* (รูปที่ 1.1-2)

แมลงวันหลังลาย โดยทั่วไปมีลำตัวขนาดใหญ่ บางชนิดมีความยาวลำตัวมากกว่า 20 มม. ส่วนอกด้านหลังมีแถบดำ 3 เส้น ส่วนท้องมีลักษณะเป็นตารางหมากรุกสีเทาสลับดำ แมลงวันหลังลายที่พบบ่อยในเขตชุมชน ส่วนใหญ่จะเป็นแมลงวันหลังลายในกลุ่ม *Sarcophaga sp.* (รูปที่ 1.1-3)



รูปที่ 1.1 ลักษณะตัวเต็มวัยของแมลงวันทั้ง 3 ชนิด (นพวรรณ บุญชู. 2551)

- (1) แมลงวันบ้าน
- (2) แมลงวันหัวเขียว
- (3) แมลงวันหลังลาย

แมลงวันกับความสำคัญทางการแพทย์

การประมาณเวลาตาย (post-mortem interval, PMI)

ข้อมูลที่สำคัญทางนิติเวชศาสตร์เกี่ยวกับการเสียชีวิตอย่างหนึ่งคือ เวลาการตาย (post-mortem interval, PMI) ในการชันสูตรพลิกศพที่ตายโดยพิศกรรมชาติ ดังนั้นการหาหลักฐานมาสนับสนุนเพื่อประมาณเวลาการตายจึงมีความสำคัญมากสำหรับแพทย์ และบุคลากรทางนิติเวชสำหรับการประมาณเวลาตายในระยะแรกนั้นสามารถใช้ข้อมูลจากการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของศพ เช่นการแข็งตัวของกล้ามเนื้อ อุณหภูมิของศพ การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของน้ำในลูกนัยน์ตา เป็นต้น แต่ในกรณีที่ศพเสียชีวิตมานานกว่า 48 ชั่วโมงแล้ว การอาศัยการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของศพจะมีความแม่นยำน้อยลงเนื่องจากศพเน่าจึงมีความจำเป็นต้องหาหลักฐานอื่นมาสนับสนุน

ปัจจุบันความรู้ทางนิติภวิทยา (forensic entomology) มีการพัฒนาไปอย่างมากและได้มีการนำมาประยุกต์ในการประมาณเวลาตาย แมลงที่มีบทบาทมากในกรณีนี้คือแมลงวันหัวเขียว (blowfly) ซึ่งมีนิสัยที่ชอบตอมสิ่งปฏิกูล รวมทั้งซากศพ แมลงวันหัวเขียวเป็นแมลงวันที่อาศัยใกล้ชิดและกับคน (synanthropic flies) ด้วยเหตุที่มันอาศัยใกล้ชิดกับคน ดังนั้นแมลงวันหัวเขียวจึงเป็นแมลงกลุ่มแรกที่เข้ามาเกี่ยวข้องกับศพ และสามารถใช้เป็นดัชนีบ่งบอกเวลาการตายได้ใกล้เคียงมาก (Greenberg. 1991; Catts and Goff. 1992; Introna *et al.* 1998 ; Benecke. 1998; Turchetto. 2001; Siriyasatien and Sirisup. 2005) เนื่องจากวงจรชีวิตของแมลงวันแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกัน ซึ่งรวมถึงระยะเวลาในการวางไข่ ช่วงระยะเวลาที่ไข่ฟักเป็นหนอน ระยะเวลาการเจริญของหนอนแมลงวัน และระยะเวลาการเข้าดักแด้จนกระทั่งออกมาเป็นตัวเต็มวัย ด้วยเหตุนี้หนอนแมลงวันที่เก็บได้จากศพจึงจำเป็นต้องระบุสายพันธุ์ (species) ว่าเป็นชนิดใดได้อย่างถูกต้อง มิฉะนั้นการประมาณเวลาการตายจะเกิดความคลาดเคลื่อนได้ (Catts and Goff. 1992) และพบว่าแมลงวันอีกกลุ่มหนึ่งที่สำคัญคือแมลงวัน

หลังลายหรือที่เรียกว่า “fleshfly” โดยแมลงวันกลุ่มนี้พบได้ทั่วไปและมีอยู่แพร่หลาย และเป็นแมลงกลุ่มหนึ่งที่ใช้ประเมินการตายของศพได้ ซึ่งหลายครั้งที่พบว่ามีการเจริญเติบโตของหนอนแมลงวันกลุ่มนี้อยู่บนศพ (Wells *et al.* 2001)

มัยเอียซิส (myiasis)

แมลงวันหลังลายจัดอยู่ใน Family Sarcophagidae สาเหตุที่เรียกแมลงวันหลังลาย เนื่องจากส่วนปล้องท้องด้านบนมีลายคล้ายตาหมากรุก สำหรับภาษาอังกฤษที่เรียกว่า fleshfly เนื่องจากชอบกินอาหารและวางไข่ในเนื้อสัตว์ทั้งที่สดและเน่าเปื่อย Family นี้ประกอบไปด้วยแมลงวันหลังลายมากกว่า 2,000 ชนิด โดยสกุลที่สำคัญของแมลงวันหลังลายมี 2 ชนิด ได้แก่ *Wohlfahrtia* และ *Sarcophaga* ซึ่งทั้งสองสกุลจะก่อให้เกิดโรคที่เรียกว่า myiasis ทั้งในคนและสัตว์ ได้แก่ *Sarcophaga haemorrhoidalis* ซึ่งพบตามธรรมชาติในทวีปยุโรป อเมริกา เอเชีย และแอฟริกา และแมลงชนิดต่างๆ ในสกุล *Wohlfahrtia* จะตอมผิวหนังปกติหรือผิวหนังที่เป็นโรคของคนและสัตว์ โดยเฉพาะบริเวณรอบๆตาและปากซึ่งอาจทำให้เกิดวิการที่รุนแรงได้ (อาคม สังข์วรานนท์. 2538) เนื่องจากวงจรชีวิต (life cycle) ของแมลงวันหลังลายบางชนิดพบว่าแมลงตัวเมียจะไม่วางไข่ แต่จะวางตัวอ่อนซึ่งถูกฟักตัวในมดลูกของแมลงแล้ว เช่นบางชนิดของแมลงในสกุล *Sarcophaga* จะออกลูกประมาณ 40-80 ตัว ตัวอ่อนมีลักษณะคล้ายตัวอ่อนของแมลงวันบ้าน และมี mouth-hook ขนาดใหญ่ และจะวางตัวอ่อนในเนื้อที่เน่าเปื่อย ในบางประเทศโดยเฉพาะในเขตร้อนชื้น แมลงวันชนิดนี้อาจจะตอมผิวหนังของคนปกติและสัตว์ หรืออาจจะวางตัวอ่อนในช่องจมูกตลอดจนในบาดแผล และแผลหลุมบนผิวหนังซึ่งจะทำให้เกิด myiasis

โดยทั่วไปแมลงวันหลังลายจะมีขนาดใหญ่กว่าแมลงวันหัวเขียวและแมลงวันบ้าน ขนาดของลำตัวจะขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมและอาหารขณะเจริญเติบโต ลำตัวสีน้ำตาลมีขนแข็งตามลำตัว ส่วนอกไม่แวววาวสะท้อนแสงเหมือนแมลงวันหัวเขียว มีแถบสีเทาพาดกลางส่วนอกด้านบน 3-4 แถบส่วนปล้องท้องด้านบนมีลายคล้ายตาหมากรุก ทั้งเพศผู้และเพศเมียตัวรวมจะแยกห่างจากกัน แต่เพศเมียตัวรวมจะแยกห่างจากกันมากกว่าตัวผู้ แมลงวันหลังลายส่วนใหญ่ขน arista ของหนวดจะเป็นพู่ขนนก (plumose) (บุญเสริม อ่วมอ่อง. 2543)

แมลงวันหลังลายออกลูกเป็นตัวอ่อน โดยอาจจะวางตัวอ่อนในบาดแผล ตัวอ่อนของแมลงวันพวกนี้จะเจริญในบาดแผล บางชนิดของแมลงวันพวกนี้จะวางตัวอ่อนในเนื้อสัตว์ที่กำลังเน่า หรือวางตัวอ่อนในสิ่งเน่าเปื่อยผุพังอื่นๆด้วย

สำหรับการศึกษาความหลากหลายของประชากรแมลงวันหลังลายโดยวิธีทางลักษณะสัณฐาน เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกรใช้งานเพื่อการศึกษานาน น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้หรือเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำ ไปใช้ ผู้เชี่ยวชาญและมีความชำนาญในการตรวจสอบ อีกทั้งในระยะที่แมลงวันยังเจริญเติบโตไม่เต็มที่จะมีลักษณะรูปร่างที่เหมือนกัน ซึ่งรายงานในประเทศไทยยังอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการ

จำแนกชนิดของหนอนแมลงวัน โดยยังไม่มีรายงานการจำแนกชนิดของหนอนแมลงวันที่ได้จากศพ โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงถูกนำมาศึกษาโดยผู้วิจัยคาดหวังว่าการตรวจวิเคราะห์ ribosomal DNA gene บริเวณ second internal transcribed spacer (ITS2) ของแมลงวันหลังตายทั้ง 3 สายพันธุ์ (species) คือ *Sarcophaga dux*, *Sarcophaga peregrine* และ *Sarcophaga ruficornis* ด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาร่วมกับการวิเคราะห์ฐานข้อมูลทางชีวภาพด้วยคอมพิวเตอร์ (bioinformatics) จะสามารถจำแนกสายพันธุ์ และความหลากหลายของแมลงวันหลังตายในรูปแบบแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม (phylogenetic tree) ได้อย่างแม่นยำ และเพื่อเป็นการรวบรวมข้อมูลพื้นฐานและคัดแยกแมลงวันหลังตายที่จะมีประโยชน์ในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ ด้านปศุสัตว์และงานด้านอื่นๆ ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อจำแนกสายพันธุ์ และจัดกลุ่มของประชากรแมลงวันหลังตาย (*Sarcophaga sp.*) จากข้อมูลลำดับเบสของ rDNA gene บริเวณ internal transcribed spacer ด้วยเทคนิค PCR-RFLP

1.2.2 เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม(phylogenetic tree) ของกลุ่มประชากรแมลงวันหลังตาย

1.3 สถานที่ดำเนินงาน

1.3.1 ห้องปฏิบัติการภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3.2 ห้องปฏิบัติการโครงการย่อยบัณฑิตศึกษา สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

1.4 ระยะเวลาดำเนินงาน

ใช้ระยะเวลารวมทั้งสิ้น 12 เดือน

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ทราบถึงสายพันธุ์ของหนอนแมลงวันหลังตายได้โดยอาศัยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

1.5.2 ทราบถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันหลังตายที่พบในเขตพื้นที่ประเทศไทย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แมลงวันหลังลาย (Fleshfly)

แมลงวันหลังลายเป็นสิ่งมีชีวิตที่จัดอยู่ในประเภทยูคาริโอตมีการจัดจำแนกตามหลักอนุกรมวิธานของแมลง (insect taxonomy) ดังนี้ (Lane and Crosskey, 1993)

Kingdom: Animalia

Phylum: Arthropoda

Subphylum: Atelocerata

Class: Hexapoda (Insecta)

Order: Diptera

Section: Schizophora

Family: Sarcophagidae

Common name: Fleshfly

บุญเสริม อ่วมอ่อง (2543) กล่าวว่า นิสัยการกินอาหารของแมลงวันหลังลายนั้นมีความแตกต่างกันตามสายพันธุ์ของแมลงวันหลังลาย บางสายพันธุ์ชอบหากินตามมูลสัตว์และซากสัตว์เน่าเปื่อย หรือขยะที่มีอาหารเน่าเปื่อย บางสายพันธุ์ชอบกินเนื้อสัตว์ บางสายพันธุ์ชอบอาหารที่มีรสหวาน และบางสายพันธุ์ชอบอาหารทะเล หรือผลไม้ตากแห้ง สำหรับแมลงวันหลังลายสายพันธุ์ *Sarcophaga ruficornis* พบหากินตามอุจจาระคนและมูลสัตว์ ซากสัตว์รวมทั้งอาหารตากแห้ง ในฤดูกาลที่มีไม้ผล เช่นมะม่วงชมพูออกดอกและดอกเริ่มบานจะพบแมลงวันหลังลายดูดกินน้ำหวานจากเกสรดอกไม้

แมลงวันหลังลายมีนิสัยในการใช้ขาคู่หน้าถูกันระหว่างหาอาหาร และจะชอบอาหารที่เป็นมูลสัตว์ อุจจาระคนมากกว่าอาหารชนิดอื่น มีความว่องไวสูง จากพฤติกรรมนี้ยิ่งเพิ่มโอกาสให้แมลงวันหลังลายนำเชื้อโรคโดยติดมากับขาได้มากขึ้น จากการสังเกตพบว่าที่ใดหากมีการถ่ายอุจจาระเรี่ยราด มีซากสัตว์ตายโดยไม่ฝังกลบ การสุขาภิบาลไม่ดีจะพบแมลงวันหลังลายมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปร่างลักษณะและวงจรชีวิตของแมลงวัน

นพวรรณ บุญชู (2551) กล่าวว่าแมลงวันเป็นแมลงที่มีลำตัวขนาดเล็กถึงปานกลาง มีปีก 2 ปีก สามารถพบได้ทั่วโลก มีการเจริญเติบโตแบบสมบูรณ์ (complete metamorphosis) ประกอบด้วย 4 ระยะ ระยะไข่, ระยะตัวอ่อน (หนอน) ระยะดักแด้ และระยะตัวเต็มวัย ซึ่งมีลักษณะดังนี้คือ

ระยะไข่

แมลงวันสามารถผสมพันธุ์ได้ หลังจากเป็นตัวเต็มวัยได้เพียง 18-30 ชั่วโมงเท่านั้น และผสมพันธุ์เพียงครั้งเดียว หลังจากนั้นก็จะหาแหล่งที่เหมาะสมในการวางไข่ โดยจะค้นหาแหล่งดังกล่าว โดยอาศัยกลิ่นเป็นตัวนำทาง มันจะเริ่มวางไข่ในที่ลับตา แสงแดดส่องไม่ถึง และมีความชื้นสูง โดยวางเป็นกลุ่มๆละประมาณ 120 ฟอง ตัวเมียบางตัวสามารถวางไข่ได้มากกว่า 10 ครั้งในชีวิต ดังนั้น แมลงวันตัวเมีย 1 ตัว สามารถขยายพันธุ์ได้ 200-1,000 ฟอง ไข่แมลงวันมีระยะฟักภายใน 6-12 ชั่วโมง

ระยะตัวอ่อน หรือหนอน

มีรูปร่าง เรียวยาว ปลายด้านท้องใหญ่ หัวหรือปากเรียวแหลมและแข็ง ตัวอ่อนจะกินของกำลังเน่าเหม็น มักชอบกลิ่นแอมโมเนีย หรือกลิ่นของยีสต์เป็นพิเศษ ตัวอ่อนจะกินอาหารมากจนเข้าใกล้ระยะดักแด้จึงจะหยุดกินอาหาร ระยะนี้กินเวลา 6-7 วัน

ระยะเข้าดักแด้

เมื่อหนอนหยุดกินจะเริ่มคลาน ไปสู่ที่แห้งๆ เพื่อเริ่มปรับเปลี่ยนร่างกาย โดยหดตัวเองให้สั้นลง จนมีลักษณะอ้วนสั้น ผนังลำตัวจะแข็งขึ้นเพื่อห่อหุ้มตัวหนอน ระยะนี้ใช้เวลา 3-4 วัน ก็จะเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัย

ระยะตัวเต็มวัย

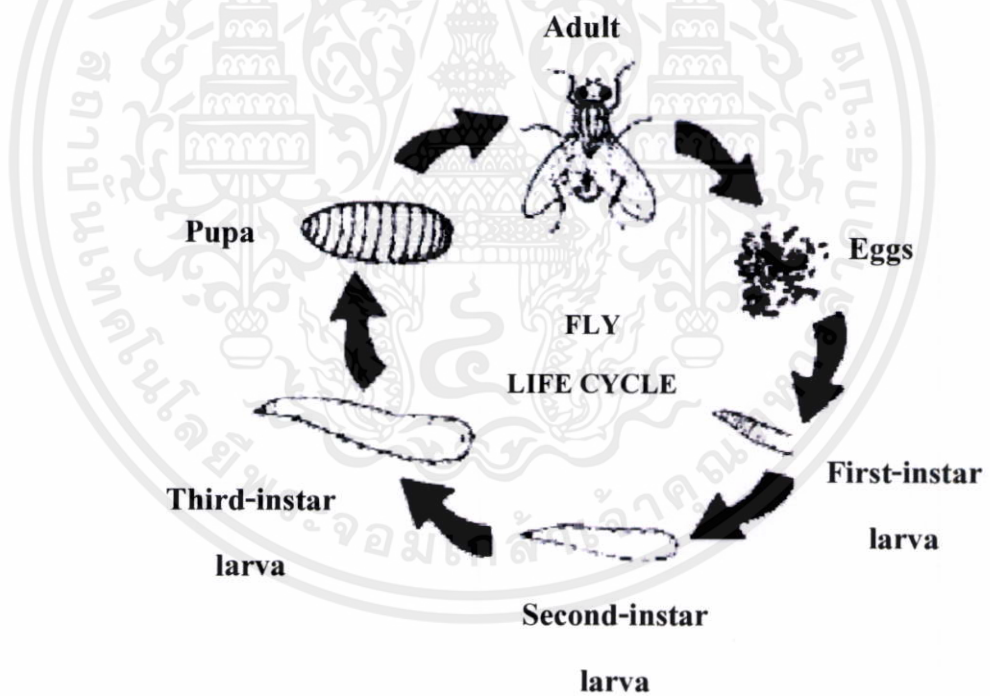
เมื่อเข้าดักแด้ และพัฒนาร่างกายสู่ภายในจนมีรูปร่างครบสมบูรณ์ก็จะเริ่มออกจากดักแด้ ซึ่งขณะที่ออกจากดักแด้ใหม่ๆ ยังบินไม่ได้ในทันที จะต้องใช้วิธีเดิน กระโดด เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 15 นาที ลำตัวและปีกเริ่มแข็งแรงขึ้นสามารถบินได้ (รูปที่ 2.1)

แต่แมลงวันหลังลาย มีลักษณะพิเศษ คือ ส่วนใหญ่ออกลูกเป็นตัว (larviparous) และเนื่องจากมีการพัฒนาการจากระยะไข่ไปเป็นระยะตัวอ่อนรวดเร็วมาก ฟักออกจากไข่ตั้งแต่ในท้องของแม่ทำให้ระยะเวลาการเจริญเติบโตของแมลงวันตั้งแต่ไข่จนเป็นตัวเต็มวัยนั้นแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของแมลงวัน และสภาพสิ่งแวดล้อม ซึ่งแมลงวันจะเจริญเติบโตรวดเร็วมากในช่วงฤดูร้อน ซึ่งส่วนใหญ่ใช้เวลาประมาณ 1-2 สัปดาห์ (รูปที่ 2.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 ลักษณะตัวเต็มวัยของแมลงวันหลังลาย (Anonymous. 2009a)



รูปที่ 2.2 ลักษณะวงจรชีวิตของแมลงวันซึ่งแบ่งเป็นระยะไข่ ระยะตัวหนอน ระยะดักแด้ และระยะตัวเต็มวัย (Siriyasatien and Sirisup. 2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 แมลงวันกับความสำคัญทางการแพทย์และปศุสัตว์

โรคมัยเอียซิส (myiasis) หมายถึงการที่มีตัวหนอนของแมลงมีปีกอาศัยตามอวัยวะและเนื้อเยื่อต่างๆของโฮสต์ซึ่งได้แก่คนและสัตว์ ตัวอ่อนมีลักษณะคล้ายตัวอ่อนของแมลงวันบ้าน และมี mouth-hook ขนาดใหญ่ (Neva *et al.* 1997; Yaghoobi *et al.* 2005) โดยเฉพาะในบางประเทศในเขตร้อนชื้น แมลงวันชนิดนี้อาจจะตอมผิวหนังของคนปกติและสัตว์ หรืออาจจะวางตัวอ่อนในช่องจมูกตลอดจนในบาดแผล โดยตัวหนอนเหล่านี้ที่ทำให้เกิด myiasis อาจจะมีกินอาหารพวกเนื้อเยื่อที่ยังมีชีวิตอยู่ หรือตายแล้วของโฮสต์ โดยอาการของโรคจะเกิดอย่างอ่อนหรือไม่ปรากฏอาการเลย และในบางรายอาจจะพบอาการอย่างรุนแรงหรืออาจทำให้โฮสต์ถึงตายได้ (อาคม สังข์วราพันธ์. 2538)

2.3 แมลงวันกับความสำคัญทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ (forensic entomology)

ข้อมูลที่สำคัญทางนิติเวชศาสตร์เกี่ยวกับการเสียชีวิตอย่างหนึ่ง คือการประมาณระยะเวลาการตายของศพ หรือเวลาการตาย (post-mortem interval, PMI) ในการชันสูตรพลิกศพที่ตายโดยผิดธรรมชาติ ดังนั้นการหาหลักฐานมาสนับสนุนเพื่อประมาณเวลาการตายจึงมีความสำคัญมากสำหรับแพทย์ และบุคลากรทางนิติเวช สำหรับการประมาณเวลาตายในระยะแรกนั้นสามารถใช้ข้อมูลจากการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของศพ เช่นการแข็งตัวของกล้ามเนื้อ อุณหภูมิของศพ การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของน้ำในลูกนัยน์ตา เป็นต้น แต่ในกรณีที่ศพเสียชีวิตมานานกว่า 48 ชั่วโมงแล้ว การอาศัยการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของศพจะมีความแม่นยำน้อยลงเนื่องจากศพเน่า จึงมีความจำเป็นต้องหาหลักฐานอื่นมาสนับสนุน ซึ่งปัจจุบันความรู้ทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ (forensic entomology) มีการพัฒนาไปอย่างมาก และได้มีการนำมาประยุกต์ในการประมาณเวลาการตาย โดยพบว่าแมลงที่มีบทบาทมากในกรณีนี้คือ แมลงวัน และได้มีการนำหนอนแมลงวันระยะต่างๆที่ พบเจอบนศพมาวิเคราะห์สายพันธุ์ทั้งทางด้านสัณฐานวิทยา และทางด้านอนุชีววิทยา เพื่อประมาณระยะเวลาการตายของศพ ซึ่งสามารถให้ความแม่นยำได้มาก เนื่องจากเมื่อเกิดการเสียชีวิต แมลงวันจะเป็นสัตว์ชนิดแรกที่เข้าไปวางไข่บนศพ และแมลงวันแต่ละสายพันธุ์ก็มีวงจรชีวิตที่มีระยะเวลาไม่เท่ากัน ทำให้เมื่อทราบชนิดและระยะของหนอนแมลงวันก็จะสามารถรู้ระยะเวลาการตายได้ โดยการทราบถึงระยะเวลาการตายหรือช่วงเวลาการตายนั้น มีประโยชน์เป็นอย่างมากในการนำไปประกอบรูปคดี เพื่อสืบหาว่า ณ เวลาก่อนเสียชีวิต ผู้ตายได้พบเจอกับบุคคลใด และระยะเวลาใดมา อันเป็นชนวนเหตุของการเสียชีวิต ซึ่งแมลงวันหลังลายเป็นแมลงวันอีกชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญ และพบได้บ่อยในสถานที่ต่างๆ ในประเทศไทย และมีรายงานว่าพบหนอนของแมลงวันหลังลายบนศพหรือบริเวณที่พบศพ จึงจำเป็นต้องศึกษาถึงวงจรชีวิต และลักษณะ

ทางสัณฐานวิทยา รวมถึงทางด้านอนุชีววิทยา เพื่อนำไปใช้ในงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ ต่อไป (Greenberg. 1991; Catts and Goff. 1992; Introna *et al.* 1998; Benecke. 1998; Turchetto. 2001; Siritasatien and Sirisup. 2005)

2.4 เครื่องหมายทางโมเลกุล (molecular markers)

สุรินทร์ ปิยะโชคมากุล (2545) กล่าวว่า ที่มาของการศึกษาเครื่องหมายทางโมเลกุล หรือ marker ก็เพื่อบ่งชี้ความแตกต่างหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของสิ่งมีชีวิต ทั้งทางปริมาณและคุณภาพ อาจเป็นการจำแนกความแตกต่างในระหว่าง และภายในสายพันธุ์ (between and within species) ระหว่างและภายในประชากร (between and within populations) หรือระหว่างแต่ละตัว (between individuals) ก็ได้ เครื่องหมายที่บ่งชี้ความแตกต่างนี้มี 2 ประเภทคือ

2.4.1 เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (morphological marker)

การบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตใช้วิธีเปรียบเทียบลักษณะภายนอกทางสัณฐานวิทยา หรือทางสรีรวิทยา ซึ่งลักษณะที่ตรวจสอบนี้มักจะเกิดขึ้นกับสภาพแวดล้อมทำให้ตรวจสอบผลผิดพลาดได้ บางครั้งต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญเป็นพิเศษและต้องมีวิธีที่จะบอกจีโนไทป์ (genotype) ที่ถูกต้องจาก ฟิโนไทป์ (phenotype) ที่ตรวจสอบได้ อย่างไรก็ตามการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยายังมีความจำเป็นต้องทำเป็นอันดับแรก แล้วจึงใช้วิธีอื่นประกอบเพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์ขึ้น หรือแก้ปัญหาในกรณีที่ไม่สามารถใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวได้

2.4.2 เครื่องหมายทางโมเลกุล (molecular marker)

เครื่องหมายทางโมเลกุลมี 2 ระดับคือ ระดับโปรตีน เป็นการตรวจสอบที่ระดับโมเลกุลของโปรตีนชนิดต่างๆ และระดับ DNA ซึ่งตรวจสอบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของ DNA

1. เครื่องหมายโปรตีน (protein marker)

การตรวจสอบสิ่งมีชีวิตโดยใช้ความแตกต่างของโมเลกุลของโปรตีน ใช้วิธีแยกโมเลกุลของโปรตีนด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส แล้วจึงย้อมดูแถบของโปรตีนจำเพาะโดยใช้สารที่เหมาะสม นอกจากนี้ยังนิยมตรวจสอบรูปแบบของเอนไซม์บางชนิด หรือไอโซไซม์ต่างๆ ข้อดีของการตรวจสอบโปรตีนคือ สามารถตรวจได้หลายตำแหน่ง ค่าใช้จ่ายไม่สูงมากนัก และแถบของโปรตีนหรือไอโซไซม์นี้ยังมีการข่มร่วมกันแบบ codominant ช่วยให้แยกความแตกต่างระหว่างแถบโปรตีนแบบโฮโมโลกัสและเฮเทอโรไซกัสได้ ข้อจำกัดของการตรวจสอบโปรตีนหรือไอโซไซม์ คือจำนวนยีนที่ตรวจสอบได้ยังมีไม่มากนัก ไม่กระจายครอบคลุมทั้งจีโนม และต้องมีการแสดงออกของยีนที่ศึกษาจึงต้องเลือกเนื้อเยื่อและระยะเวลาที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ ผลที่ได้ยังขึ้นอยู่กับชนิดของเนื้อเยื่อ ระยะของการเจริญเติบโตและสิ่งแวดล้อมด้วย นอกจากนี้โปรตีนและไอโซไซม์ยังสูญเสียสภาพธรรมชาติได้ง่าย จึงต้องวิเคราะห์ผลในเวลาจำกัด ไม่สามารถเก็บตัวอย่างไว้นานได้

2. เครื่องหมาย DNA (DNA marker)

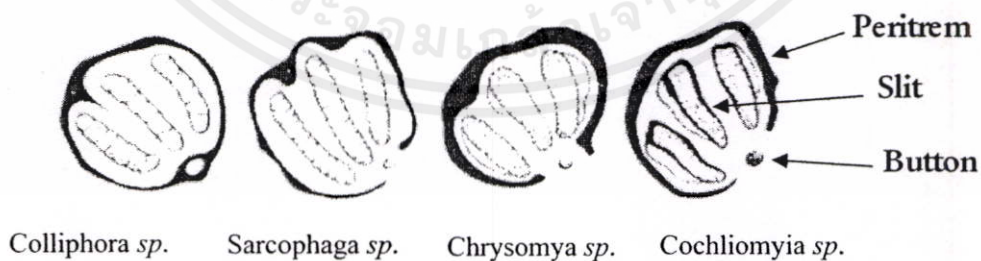
เครื่องหมาย DNA (DNA marker) หมายถึง DNA ที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตตัวหนึ่ง สายพันธุ์หนึ่ง หรือในระดับต่างสายพันธุ์ เป็น DNA ที่อยู่ที่

ตำแหน่งหนึ่งๆบนโครโมโซม (nuclear DNA) หรือ DNA ในออร์แกเนลล์ (mitochondrial DNA หรือ chloroplast DNA) การที่สามารถใช้ DNA เป็นเครื่องหมายได้เนื่องจากเกิดความแปรปรวน (variation) ของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของ DNA หรือเกิดโพลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของ DNA นั้นเอง

การตรวจสอบในระดับ DNA มีข้อดีกว่าการตรวจสอบโปรตีน คือ โมเลกุลของ DNA มีความเสถียรกว่าจึงเก็บไว้ได้นาน สามารถวิเคราะห์จากตัวอย่างที่ถูกเก็บไว้เป็นเวลายาวนานได้ และเนื่องจาก DNA เป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในเซลล์เกือบทุกเซลล์ในปริมาณเท่ากัน จึงสามารถตรวจสอบ DNA จากเนื้อเยื่อต่างๆ ทุกระยะการเจริญเติบโต หรือสภาพทางสรีรวิทยาได้โดยไม่ต้องขึ้นกับสภาพแวดล้อม ตรวจสอบ DNA จากส่วนที่เป็นยีนหรือไม่ใช่ยีนก็ได้ จะมีการแสดงออกหรือไม่ก็ได้ จึงตรวจสอบได้โดยไม่ต้องจำกัด ครอบคลุมทั้งจีโนม ประกอบกับมีวิธีตรวจสอบเครื่องหมาย DNA แบบต่างๆ ให้เลือกมากมาย ทำให้การใช้ DNA เป็นเครื่องหมายทำได้อย่างกว้างขวาง ประยุกต์ใช้ในงานด้านต่างๆ ได้ไม่จำกัด

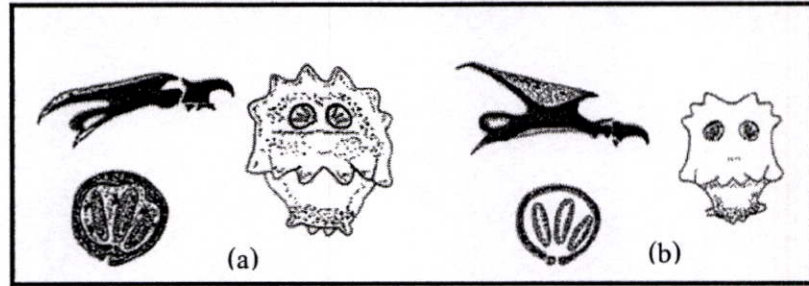
2.5 การจัดจำแนกสายพันธุ์ของแมลงวันโดยอาศัยข้อมูลทางสัณฐานวิทยา

การจำแนกสายพันธุ์ของแมลงวัน โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแมลงวัน ได้มีการศึกษามาอย่างกว้างขวาง แบ่งได้เป็นการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวเต็มวัยโดยดูจากวงจรชีวิตและลักษณะตัวเต็มวัยที่แตกต่างกัน และการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแมลงวันในระยะตัวหนอน โดยใช้ความแตกต่างของอวัยวะที่เรียกว่า posterior spiracles (รูปที่ 2.3) ซึ่งเป็นอวัยวะหายใจอยู่บริเวณด้านหลังของลำตัว ซึ่งแต่ละสายพันธุ์ก็จะมีลักษณะเฉพาะ และ cephalopharyngeal skeleton (รูปที่ 2.4) ที่มีลักษณะเป็นแผ่นกระดูกบริเวณด้านหัวของลำตัว ซึ่งแต่ละสายพันธุ์ก็จะมี ความแตกต่างกันไป (Schroeder *et al.* 2003)



รูปที่ 2.3 ลักษณะ posterior spiracle ของแมลงวันที่มีลักษณะเฉพาะในแมลงวันแต่ละสายพันธุ์ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า (Graham, 2006)

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามเผยแพร่ผลแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 ความแตกต่างระหว่างลักษณะ cephalopharyngeal skeleton และ posterior spiracles ของแมลงวันหัวเขียวของหนอนระยะที่ 3 (Thyssen and Linhares. 2007)

(a) cephalopharyngeal skeleton และ posterior spiracles ของแมลงวันหัวเขียวสายพันธุ์

Hemilucilia segmentaria

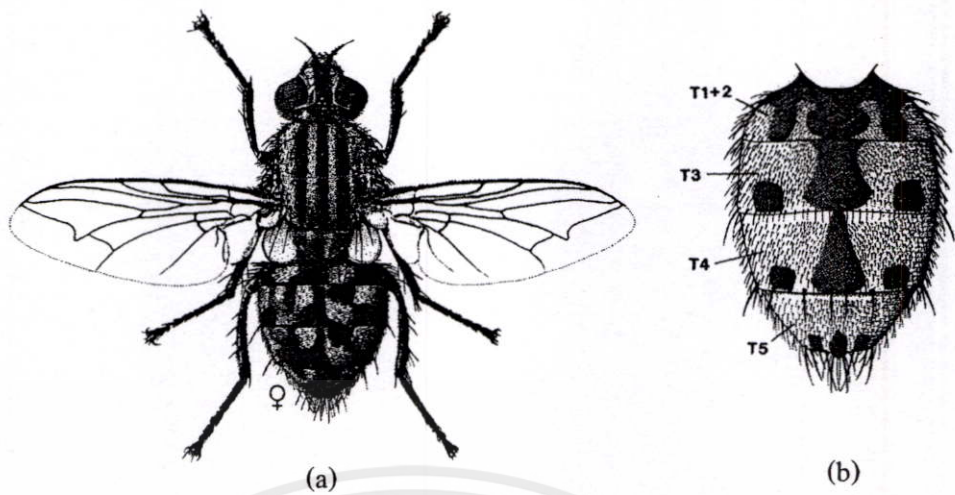
(a) cephalopharyngeal skeleton และ posterior spiracles ของแมลงวันหัวเขียวสายพันธุ์

Hemilucilia semidiaphana

การจำแนกสายพันธุ์ของแมลงวันหลังลายโดยอาศัยข้อมูลทางสัณฐานวิทยา

โดยทั่วไปแมลงวันหลังลายจะมีขนาดใหญ่ทั้งเพศผู้และเพศเมีย ตารวมจะแยกห่างจากกัน แต่เพศเมียตารวมจะแยกห่างจากกันมากกว่าเพศผู้ ซึ่งการจำแนกสายพันธุ์ของแมลงวันหลังลายส่วนใหญ่จะใช้การจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวเต็มวัย ที่หนวดแมลงวันหลังลายชนิด *ariata* มีแขนงเป็นขนละเอียดยาวคล้ายพู่ขนนก (plumose) เฉพาะตรงส่วนโคนเส้น มีลักษณะยาว และมองเห็นได้ชัด ปล้องท้องด้านบนมีลายคล้ายตารางหมากกรุมมองเห็นเป็นลักษณะมืดและสว่างสลับกันไปตามการขยับของลำตัว เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงไปตามทิศทางของแสง อาจมองเห็นเป็นสีเงิน สีเทาตุ่น หรือสีเทาออกเหลือง เป็นต้น และมีขนหยาบกระจายตรงบริเวณปลายท้อง บริเวณ notopleuron และ katepisternum ของส่วนอก ประกอบด้วยขนแข็ง (setae) ปกคลุม 3-4 เส้น ดังรูปที่ 2.5 (सानิต รัตนภุมมะ. 2546; Lane and Crosskey. 1993) และส่วนของอวัยวะ posterior spiracle ดังรูปที่ 2.6

ในประเทศไทยพบแมลงวันหลังลายสายพันธุ์ *S. ruficornis* กระจายอยู่ทั่วไปแต่ความหนาแน่นต่ำ และมีลักษณะที่เด่นชัดคือ ชนิด *ariata* ที่หนวดเป็นพู่ขนนก มีขนแข็ง notopleuron bristles 4 เส้น และมีขนแข็ง postsutural dorsocentral bristles 5 เส้น ส่วนของ propleuron ไม่มีขนปกคลุม ปล้องท้องที่ 4 ด้านล่างมีขนเล็กน้อย ปลาย femur ของขาคู่กลางมีขนแข็ง posteroventral bristles เรียงตัวคล้ายหวี tibia ขาหลังมีขนขึ้นปกคลุม หนวด palpi และ genite tergites มีสีส้มอ่อน ส่วนอกสีน้ำตาล

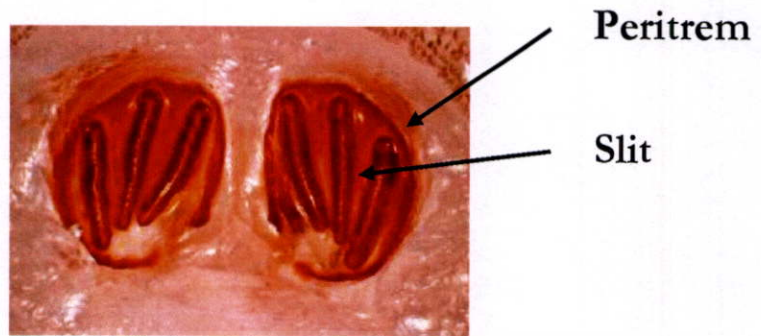


รูปที่ 2.5 การจำแนกลักษณะตัวเต็มวัยของแมลงวันหลังลาย โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Lane and Crosskey. 1993)

- (a) ลักษณะตัวเต็มวัยของแมลงวันหลังลาย (*Sarcophaga* sp.) แสดงถึงแถบดำ 3 แถบ ที่บริเวณส่วนอกด้านบน และส่วนปล้องท้องด้านบนมีลายคล้ายตารางหมากรุกสีเทาสลับดำ
- (b) ลักษณะปล้องท้องของแมลงวันหลังลายในระยะ โดเต็มวัย ของสายพันธุ์ *Wohlfahrtia magnifica*

จากรูป 2.5(b) แสดงถึงลักษณะแผ่นแข็งบริเวณด้านหลังของปล้องท้อง หรือที่เรียกว่า tergites (T) มี 1-5 แผ่น (T1-T5) และโดยทั่วไปในแมลงวันที่โตเต็มวัย แผ่นที่ 1 และ 2 จะรวมกันมองเห็นเป็นแผ่นเดียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.6 ลักษณะ posterior spiracle ของแมลงวันหลังลาย (*Sarcophaga sp.*) (Walker, 2009)

อวัยวะ posterior spiracle ของแมลงวันหลังลาย จะมีลักษณะที่เด่นชัดคือ peritrem มีลักษณะหนา และสมบูรณ์ slit มีลักษณะที่เรียงตัวกันเป็นแนวยาวอย่างสมบูรณ์ และมองเห็นได้ชัดว่าไม่มี button ซึ่งการระบุชนิดของหนอนแมลงวันจากลักษณะ posterior spiracle นั้นสามารถระบุได้เพียงว่าเป็นแมลงวันหลังลาย (*Sarcophaga sp.*) เท่านั้น ไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นสายพันธุ์ (species) ชนิดใด

เนื่องจากวงจรชีวิตของแมลงวันทั่วไปและหลังลายแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันซึ่งรวมถึงระยะเวลาในการวางไข่ ช่วงระยะเวลาที่ไข่ฟักเป็นหนอน ระยะเวลาการเจริญของหนอนแมลงวัน ระยะเวลาการเข้าดักแด้จนกระทั่งออกมาเป็นตัวเต็มวัย ทำให้ยากต่อการระบุชนิดได้อย่างถูกต้อง ซึ่งการจำแนกสายพันธุ์ของหนอนแมลงวัน โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหนอนแมลงวัน โดยอาศัยอวัยวะที่เรียกว่า posterior spiracles และ cephalopharyngeal skeleton นั้นพบว่าไม่สามารถนำมาจำแนกชนิดของหนอนแมลงวันได้ทุกชนิด และทุกระยะของการเจริญ นอกจากนี้การจำแนกสายพันธุ์ของหนอนแมลงวัน โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยานั้นจำเป็นต้องอาศัยนักกีฏวิทยาที่มีประสบการณ์และความชำนาญสูง และในกรณีที่หนอนแมลงวันที่เก็บจากที่เกิดเหตุมีอวัยวะดังกล่าวไม่สมบูรณ์ ก็จะไม่สามารถระบุสายพันธุ์ของหนอนแมลงวันได้อย่างถูกต้อง ด้วยเหตุนี้หนอนแมลงวันที่เก็บได้จากศพ จึงจำเป็นต้องระบุชนิดอย่างถูกต้องมิฉะนั้นการประมาณเวลาการตายจะเกิดความคลาดเคลื่อนได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 การประยุกต์ใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลในการจำแนกสายพันธุ์

ปัจจุบันความรู้ทางด้านอนุชีววิทยามีการพัฒนาไปอย่างมากและได้มีการนำมาประยุกต์ใช้เครื่องหมายโมเลกุลในงานที่เกี่ยวข้องกับการแพทย์โดยเฉพาะการพิสูจน์บุคคลและหลักฐานทางนิติเวชศาสตร์ ตลอดจนใช้จำแนกชนิดของหนอนแมลงวัน ซึ่งข้อดีของการใช้เทคนิคทางอนุชีววิทยาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของหนอนแมลงวันคือทำให้สามารถระบุสายพันธุ์ของหนอนแมลงวันได้อย่างถูกต้อง รวดเร็วและน่าเชื่อถือมากกว่าการระบุสายพันธุ์โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยชิ้นส่วนหนอนแมลงวันเพียงเล็กน้อยหรืออวัยวะต่างๆที่ไม่สมบูรณ์ก็สามารถนำมาใช้ระบุสายพันธุ์โดยวิธีการทางอนุชีววิทยาได้ และไม่จำเป็นต้องอาศัยนักกีฏวิทยาที่มีประสบการณ์และความชำนาญสูง ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลชนิดที่เป็นเครื่องหมาย DNA หรือ deoxyribonucleic acid จัดเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดและมีความจำเพาะต่อสิ่งมีชีวิตแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งรวมถึงหนอนแมลงวันด้วย ซึ่งสารพันธุกรรมนี้สามารถพบได้ 2 แหล่งภายในเซลล์คือ nuclear DNA ซึ่งพบอยู่ในนิวเคลียส และ mitochondrial DNA ซึ่งพบอยู่ในไมโทคอนเดรีย โดยสามารถสรุปความสำคัญได้ดังนี้

2.6.1 Mitochondrial DNA (mtDNA)

ไมโทคอนเดรียสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเองได้เนื่องจากมี DNA, ไรโบโซม และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ DNA, RNA และโปรตีนในไมโทคอนเดรีย มีโปรตีนประมาณ 700 ชนิด ซึ่งควบคุมโดยยีนที่นิวเคลียสประมาณ 95 % ส่วนที่เหลือควบคุมโดยยีนที่ไมโทคอนเดรีย โดยโครงสร้าง DNA ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นวงกลม และมีการจำลอง DNA แบบกึ่งอนุรักษ์คล้ายกับยูคาริโอตและโพรคาริโอต โดยในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีขนาดแตกต่างกัน (ลัดดา เอกสมทราเมษฐ์. 2547) mtDNA มีโครงสร้างและส่วนประกอบดังรูปที่ 2.7

โดยยีนที่สำคัญใน mtDNA ได้แก่

2.6.1.1 Ribosomal RNA (rRNA) เช่น 16S และ 12S ribosomal RNA

ไรโบโซมในไมโทคอนเดรีย มีขนาดเล็กกว่ายูคาริโอตและโพรคาริโอต คือประมาณ 55-70 S ประกอบด้วยหน่วยย่อยขนาดใหญ่ 45 S ที่มี rRNA ขนาด 16 S รวมกับโปรตีน และหน่วยย่อยขนาดเล็ก 35 S ที่มี rRNA ขนาด 12 S รวมกับโปรตีน (ลัดดา เอกสมทราเมษฐ์. 2547)

2.6.1.2 Cytochrome oxidase

เป็นบริเวณที่เรียกว่า protein coding region หรือบริเวณ ที่มีการถอดรหัสเป็นโปรตีน ซึ่งจะ เป็นโปรตีนที่กระตุ้นการออกซิไดซ์ของเอนไซม์ในปฏิกิริยาการถ่ายทอดอิเล็กตรอนจาก cytochrom ไปเป็นโมเลกุลของออกซิเจน ซึ่งจะถูกร่งปฏิกิริยาจากหน่วยย่อย 2 หน่วยคือ cytochrome oxidase subunit I (COI) และ cytochrome oxidase subunit II (COII) (Gennard. 2007) ยีนบริเวณนี้เป็นยีนที่เหมาะสมกับการศึกษาทางวิวัฒนาการ และพันธุศาสตร์ประชากร เนื่องจากยีน

วิจัยจะต้องอาศัยการจำแนกบนพื้นฐานลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแมลงวัน และได้ทำการพัฒนาฐานข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ mtDNA เพื่อใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของแมลงวันหลังลายทั้งหมด เพื่อเป็นจุดประสงค์ในการเปรียบเทียบวิวัฒนาการของตัวอย่างแมลงวันหลังลายคือ *Sarcophaga*, *Peckia*, *Blaesoxipha*, *Ravinia*, *Wohlfahrtia*, *Brachicoma* และแมลงวันบ้านที่พบบนศพที่พบในเมืองของประเทศแคนาดา หรือสหรัฐอเมริกา จากการวิเคราะห์พบว่าจำนวนเบสของยีนบริเวณ cytochrome oxidase subunit I (COI) มีขนาด 783 bp

Zehner *et al.* (2004) รายงานว่าการจัดจำแนกตัวอย่างแมลงได้อย่างชัดเจนจะเป็นข้อมูลที่สำคัญทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ได้แต่ทั้งหมดก็ไม่สามารถจำแนกได้ทุกระยะการเจริญเติบโตซึ่งแมลงวันหลังลายมีความสำคัญคือเป็นแมลงที่ช่วงเวลาหนึ่งของการเจริญจะกินซากสัตว์รวมทั้งซากศพเป็นอาหาร และเนื่องจากไม่สามารถจำแนกชนิดของแมลงในระยะตัวหนอน (larvae) หรือในระยะอื่นที่ยังเจริญเติบโตไม่เต็มที่ (immature stage) ได้ ดังนั้นการวิเคราะห์ mtDNA จึงได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้เพื่อแก้ปัญหาทางด้านนี้ โดยคัดเลือกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน cytochrome oxidase subunit I (CO I) และ NADH dehydrogenase subunits 5 (ND 5) ของแมลงวันหลังลายสายพันธุ์ยุโรป (european fleshfly) ที่พบว่ามี ความเกี่ยวข้องกันกับซากศพเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการระบุสายพันธุ์ของแมลงที่พบได้

Wallman *et al.* (2005) ทำการศึกษาแมลงวันหัวเขียว 34 สายพันธุ์ โดยใช้สารพันธุกรรมชนิด mtDNA บริเวณ CO1, CO2, ND4 และ ND4L ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ที่พบในสิ่งเน่าเปื่อยของประเทศออสเตรเลีย ผลการศึกษาพบว่ายีนทั้งสี่ชนิดที่ทำการศึกษาคือ CO1, CO2, ND4 และ ND4L มีความสัมพันธ์ร่วมกัน และมีประสิทธิภาพในการจำแนกแต่ละสายพันธุ์ออกจากกันได้ อย่างน่าเชื่อถือ อีกทั้งยังพบว่าแมลงวันหัวเขียวเหล่านี้มีสายสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันมากแม้กระทั่งอาจทำให้เกิดการระบุสายพันธุ์ของแมลงวันหัวเขียวผิดพลาดได้

2.6.2 Nuclear DNA หรือ Chromosomal DNA

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล (2545) กล่าวว่าจีโนมของยูคาริโอตประกอบด้วยส่วนของ DNA ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะ ซึ่งพบเพียง 1 ครั้งต่อ 1 จีโนม เรียกว่า single copy หรือ unique sequence DNA ในส่วนนี้โดยแท้จริงอาจมีมากกว่า 1 ชุดก็ได้ แต่มีจำนวนไม่มากนัก (low copy) และ DNA อีกส่วนหนึ่งที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่จำเพาะ ซึ่งพบส่วนของ DNA ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันหรือคล้ายคลึงกันได้หลายซ้ำ โดยในบางชุดอาจพบได้ถึง 1 ล้านซ้ำ เรียกว่า repetitive DNA หรือ repeated sequence DNA ส่วนที่มีลักษณะเป็นชุดซ้ำแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มตามลักษณะ และตำแหน่งของการกระจายตัว

2.6.2.1 กลุ่มที่อยู่ในตำแหน่งที่แน่นอนบนโครโมโซม (localized repeated sequence)

DNA ในกลุ่มนี้มีลักษณะเป็นชุดที่มีจำนวนซ้ำสูงมาก และชุดซ้ำแต่ละซ้ำเรียงต่อกันอยู่ในทิศทาง

เดียวกันตลอด (tandemly repeat) ปริมาณ DNA กลุ่มนี้ในสิ่งมีชีวิตบางชนิดมีมากกว่า 50% ของ DNA ในจีโนม DNA กลุ่มนี้ได้แก่

1. Satellite DNA พบครั้งแรกจากการนำ DNA ของยูคาริโอตมาปั่นเหวี่ยงโดย cesium chloride density gradient centrifugation พบว่าได้แถบ DNA หลักอยู่ที่ตำแหน่งหนึ่ง และได้แถบ DNA อีกหนึ่ง หรือ 2-3 แถบ ที่ชัดเจนแยกออกจากแถบหลัก จึงเรียกว่า satellite DNA ตำแหน่งของ satellite DNA มักอยู่ที่เดียวกับเฮเทอโรโครมาติน และพบอยู่ใกล้เซนโทรเมียร์และทีโลเมียร์ แต่ก็มีบางส่วนที่อยู่บริเวณส่วนกลางของโครโมโซม satellite DNA ที่อยู่ใกล้กับเซนโทรเมียร์มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ค่อนข้างเหมือนกันในสิ่งมีชีวิตหลายๆชนิด ส่วนที่อยู่บริเวณอื่นจะแตกต่างกันไป มีขนาดประมาณ 20-200 bp โดยอาจพบชุดซ้ำยาวต่อกันถึงหนึ่งแสนคู่เบส ในคนพบว่า มี satellite DNA อย่างน้อย 10 แบบ แต่ละแบบมีประมาณ 0.5-1 % ของ DNA ในจีโนม

2. Minisatellite DNA เป็น DNA ที่มีหลายชุดซ้ำขนาดสั้นกว่า satellite DNA ขนาดของแต่ละชุดยาวประมาณ 15-100 คู่เบส ในจีโนมของคนพบ minisatellite DNA ส่วนใหญ่อยู่ที่บริเวณเทโลเมียร์ หรือใกล้ๆกับเทโลเมียร์และพบกระจายอยู่ทุกโครโมโซม จำนวนชุดซ้ำที่พบแตกต่างกันมาก เรียกว่า variable number of tandem repeat (VNTR) ซึ่งเป็นที่มาในการใช้ตรวจลายพิมพ์ DNA ในคนและในสิ่งมีชีวิตอื่น โดยวิธี ไฮบริดเซชัน

3. Microsatellite DNA เป็น DNA ที่มีขนาดของชุดซ้ำสั้นมากเพียง 1-4 bp หรือไม่เกิน 10 bp ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พบลำดับนิวคลีโอไทด์ (dA, dT)_n มากถึงประมาณ 0.3 % ของ DNA ในจีโนม ชุดซ้ำ 2 bp (dinucleotide) ก็พบมาก เช่น ในคนพบ (dCA.dTG)_n มากถึงประมาณ 0.5% ของ DNA ในจีโนม ที่พบมารองลงมาคือ ชุดซ้ำ (dCT.dAG)_n พบทุกๆ 50 kb โดยประมาณ รวมกันแล้วมีมากถึงประมาณ 0.2% ของ DNA ในจีโนม ชุดซ้ำที่เป็น 3 หรือ 4 bp ก็พบได้เช่นเดียวกัน แต่พบได้น้อยกว่า เนื่องจาก microsatellite DNA มีลักษณะเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ ขนาดสั้นๆ ไม่ซับซ้อน จึงมีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า simple sequence repeat (SSR) หรือ short tandem repeat (STR) ปัจจุบันใช้ microsatellite DNA กันมากในการศึกษาแผนที่ของจีโนม และแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตโดยวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA

2.6.2.2 กลุ่มที่กระจายอยู่ทั่วไปในจีโนม (dispersed repeated sequence) DNA ของกลุ่มนี้มีจำนวนซ้ำมากและพบกระจายอยู่ทั่วไป อาจอยู่ในส่วนของอินตรอน (intron) อยู่ใกล้กับยีน อยู่ระหว่างยีน หรืออยู่ใกล้ในส่วนที่ไม่ใช่ยีนก็ได้ DNA กลุ่มนี้มีลักษณะเคลื่อนที่ได้ (transposable element) โดยมีการสร้างโมเลกุลใหม่และเคลื่อนที่ไปอยู่บนตำแหน่งอื่นบนโครโมโซม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

1. Short interspersed repeats เป็นเบสซ้ำกระจายแบบสั้น (SINES) มีขนาดประมาณ 130-300 คู่เบส พบอยู่ในจีโนมในลักษณะเดี่ยวๆ แต่มีหลายพันชุดในจีโนม SINES ในสายพันธุ์

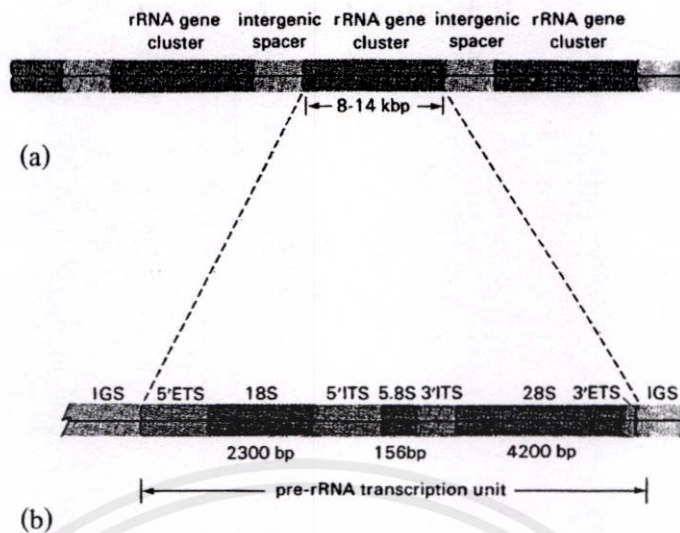
เดียวกันจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกันประมาณ 80 % แต่ในสิ่งมีชีวิตต่างสายพันธุ์กันจะเหมือนกันประมาณ 50 %

2. Long inspred repeats เป็นเบสซ้ำกระจายแบบยาว (LINEs) มีขนาดตั้งแต่ 500 bp ขึ้นไป พบประมาณ 1-2 % ในจีโนม

ในการศึกษาและวิจัยในครั้งนี้ได้เลือกศึกษาสารพันธุกรรมชนิด nuclear DNA ซึ่งมีลักษณะเป็น linear DNA ที่ขดพันแน่นอยู่ในโครโมโซม และพบว่าส่วนใหญ่เป็นบริเวณ non coding region หรือเป็นบริเวณที่ไม่มีการถอดรหัสของ RNA เป็นโปรตีน ซึ่งไม่มีการแสดงออกเป็นฟีโนไทป์ (phenotype) ของของยีนบริเวณดังกล่าวทำให้บริเวณนี้ไม่มีการคัดเลือกตามธรรมชาติ (natural selection) ทำให้มีความหลากหลายเพียงพอที่จะใช้เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมเพื่อจำแนกสิ่งมีชีวิตชนิดที่มีสายพันธุ์ใกล้ชิดกันมากได้ (closely related species) ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงเลือกใช้ยีนบริเวณ internal transcribed spacer หรือ ITS เนื่องจากมีรายงานมาก่อนหน้านี้แล้วว่าบริเวณยีน ITS มีความสามารถพอที่จะจำแนกสายพันธุ์ของแมลงที่อยู่ในกลุ่มที่มีความใกล้ชิดกันมาก โดยโครงสร้างของ ITS1 จะมีตำแหน่งตั้งอยู่ระหว่าง 18S (svdberg coefficient) และ 5.8S rRNA โดยยีน ITS2 มีตำแหน่งตั้งอยู่ระหว่าง 5.8S และ 28S rRNA ซึ่งทั้งหมดเป็นบริเวณที่มีการถอดรหัสออกมา (transcription) แต่ส่วนของยีน ITS จะถูกตัดออกเมื่อเกิดการ splicing เพื่อรวมส่วนที่จะกลายเป็น ribosomal RNA ขนาดต่างๆ ดังนั้นบริเวณยีน ITS นี้จึงไม่ได้มีผลต่อการทำงานของเซลล์ ทำให้อาจมีอัตราการผ่าเหล่าสูง (mutation) และเนื่องจากในสิ่งมีชีวิตชนิดยูคาริโอต ทุกชนิดมีตำแหน่งของ rRNA transcription unit หรือ rRNA gene อยู่มากเนื่องจากเป็น multicopy gene family ที่มีอยู่ทุกเซลล์ของสิ่งมีชีวิต (Singer and Berg. 1991) และมีความแปรปรวนอยู่สูงระหว่างสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตที่ต่างกัน แต่พบว่ามีความเหมือนกันทั้งความยาว และลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์เดียวกัน อีกทั้งยังใช้เป็นเครื่องมือทางพันธุกรรมที่ดีในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยเฉพาะในสิ่งมีชีวิตชนิดที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก (Ratcliffe *et al.* 2003)

Singer and Berg. (1991) กล่าวว่า ITS และ ETS regions จะเป็นส่วนที่เริ่มต้นกระบวนการถอดรหัสเพื่อให้ได้ rRNA precursor molecule โดยกระบวนการที่เกิดจะค่อยๆ ตัดและแยกส่วน ITS และ ETS ออก นำมาซึ่งการเกิดขึ้นของ ribosome โดยตรง อย่างไรก็ตาม transcribed spacers ประกอบไปด้วยสัญญาณสำหรับกระตุ้นการแสดงออกของ rRNA โดยโครงสร้างอย่างละเอียดของ transcription unit แสดงดังรูปที่ 2.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.8 การจัดเรียงตัวของกลุ่ม rRNA gene ของยูคาริโอต (Singer and Berg. 1991)

- (a) แต่ละกลุ่มของ rRNA gene ความยาวตั้งแต่ 8-14 kb และจะแตกต่างกันไปในแต่ละ species โดยจะแยกจากกันด้วย intergenic spacer (IGS) ที่มีความแปรปรวนสูงทางด้านความยาวแต่เมื่อเปรียบเทียบกันแล้วพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงภายใน species
- (b) กลุ่มของ rRNA gene ที่เป็นโครงสร้างหนึ่งหน่วยของ transcription unit ประกอบด้วย 5' external transcribed spacer (5'ETS), 18S rRNA coding sequence, 5' internal transcribed spacer (5'ITS หรือ ITS1), 5.8S rRNA coding sequence, 3' internal transcribed spacer (3'ITS หรือ ITS2), 28S rRNA coding sequence และ 3' ETS

Schlotterer *et al.* (1994) ทำการศึกษาบริเวณยีนของ ribosomal DNA ที่โดยทั่วไปแล้วจัดเป็นเบสที่ไม่มีการทำหน้าที่ โดยได้ทำการวิเคราะห์ส่วนของ ITS ภายในกลุ่มย่อยของแมลงหัว *Drosophila* 2 สายพันธุ์ คือ *D. pseudoobscura* และ *D. virilis* พร้อมด้วยแมลงที่มีความสัมพันธ์ห่างไกลออกไปคือแมลงวัน *Musca domestica* การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงให้เห็นถึงลักษณะเฉพาะรูปแบบการอนุรักษ์หรือการคงอยู่ตามธรรมชาติ (conservation/divergence pattern) รวมทั้งเป็นบริเวณที่มีความอนุรักษ์ของเบสมากกว่าบริเวณอื่น ยิ่งกว่านั้นการคำนวณโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) แสดงให้เห็นถึงโครงสร้างที่ยังคงอนุรักษ์ไว้ในบริเวณของยีน ITS

Ratcliffe *et al.* (2003) ได้ประยุกต์ใช้เทคนิค PCR-RFLP เพื่อจำแนกสายพันธุ์ของแมลงวันทั้ง 3 กลุ่มคือแมลงวันบ้าน (Muscidae) แมลงวันหัวเขียว (Calliphoridae) และแมลงวันหัวดำ (Sarcophagidae) โดยใช้ universal primers คือ 1975F (5' TAACAAGGTTTCCGTAGGTG 3') และ 52R (5' GTTAGTTTCTTTTCTCCCT 3') เพิ่มจำนวนยีนที่ปลาย 3' ของ 18S rRNA gene

และ 5' ของ 28S rDNA gene ตามลำดับ โดยผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาโพลีเมอเรส ที่ได้มีขนาดประมาณ 1.2 ถึง 1.5 kp ซึ่งพบว่าบริเวณดังกล่าวมีความหลากหลายระหว่างสายพันธุ์ (interspecific variation) สูง และมีความหลากหลายภายในสายพันธุ์ (intraspecific variation) ต่ำ ดังนั้นจึงเหมาะในการนำมาใช้จำแนกสายพันธุ์ของหนอนแมลงวันทั้ง 3 กลุ่มได้

Song *et al.* (2008b) ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ITS2 ทั้งหมด 29 สายพันธุ์ของแมลงชนิดที่กัดกินซากศพ (necrophagous flies) เพื่อที่จะประเมินค่าศักยภาพในการจำแนกชนิดด้วยบริเวณ ITS2 และทำการวิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ของแต่ละสายพันธุ์ พบว่ามีความผันแปรของนิวคลีโอไทด์ภายในแต่ละสายพันธุ์เล็กน้อย และยังคงพบว่ามีส่วนคาบเกี่ยวกัน (overlapping) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในชนิดเดียวกันและระหว่างชนิดกัน (intra-interspecific variation) ไม่เป็นอุปสรรคต่อการจำแนกแต่ละสปีชีส์ออกจากกัน ที่แสดงให้เห็นตามการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และในการศึกษาครั้งนี้บริเวณ ITS2 ไม่สามารถจำแนกแมลงบางสายพันธุ์ที่มีพื้นที่อยู่อาศัยต่างกันได้ และพบว่าบริเวณ ITS2 มีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงระหว่างบางสายพันธุ์ที่มีความใกล้ชิดกันมาก อาจทำให้นักนิติวิทยาศาสตร์ (forensic entomologists) จะไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ได้ และความเหมือนกันสูงของบริเวณดังกล่าว จะทำให้ยากต่อการตัดสินใจสายพันธุ์ที่ชัดเจนได้ และส่วนที่มีการคาบเกี่ยวกันระหว่างบางสายพันธุ์อาจจะไม่สามารถตรวจสอบได้จากเครื่องหมายทางโมเลกุลชนิดอื่น เช่น การวิเคราะห์บริเวณ cytochrome oxidase subunits I และ II

2.7 เทคนิคการจำแนกสายพันธุ์

2.7.1 เทคนิคการเพิ่มจำนวนยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR)

จริยา ชมวารินทร์ และคณะ (2540) กล่าวว่าเทคนิคการเพิ่มจำนวนยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction) เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณยีนหรือชิ้นส่วนของ DNA เฉพาะบริเวณที่ต้องการทำการศึกษามีจำนวนมากขึ้นกว่าเดิมหลายล้านเท่าในหลอดทดลอง

ดังนั้น เทคนิคนี้จึงมีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า *in vitro* enzymatic gene amplification วิธีนี้จึงมีประโยชน์ในการตรวจหาชิ้นส่วนหรือเพิ่มชิ้นส่วน DNA ที่ต้องการในสิ่งส่งตรวจ ค้นพบครั้งแรกโดย Kary Mullis และคณะในปี 1983 โดยใช้หลักการแบบธรรมชาติที่ว่า โดยทั่วไปสาย DNA สายคู่สามารถจับเข้าคู่กันได้เพราะชนิดของเบสคู่สม (complementary) แต่ละสายจะจับเข้าคู่กัน ดังนั้น การสังเคราะห์สาย DNA ขึ้นใหม่ในหลอดทดลองจึงใช้หลักการเดียวกัน โดยอาศัย DNA เป็นต้นแบบ (template) และอาศัย DNA สายสั้นๆ (primer) ที่สามารถจับกันได้กับ DNA ต้นแบบ ไม่ว่าจะกรณีใดทั้งคู่ ลึกทั้งหมัดเป็นจุดประสงค์เพื่อหา และต้องอ้างอิงถึงของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้ เป็นจุดเริ่มต้น และมีเอนไซม์พวก DNA polymerase ช่วยทำให้สาย DNA ยาวออกไปโดยเลือกจับ

เอานิวคลีโอไทด์ตัวใดตัวหนึ่งใน 4 ชนิด (dNTPs) เข้ามาต่อให้เป็นเบสคู่สมกับ DNA สายต้นแบบ ก็จะได้ DNA สายใหม่ขึ้น ดังนั้น ถ้าทำเช่นนี้หลายๆรอบก็จะเป็นการเพิ่มปริมาณ DNA ขึ้นได้

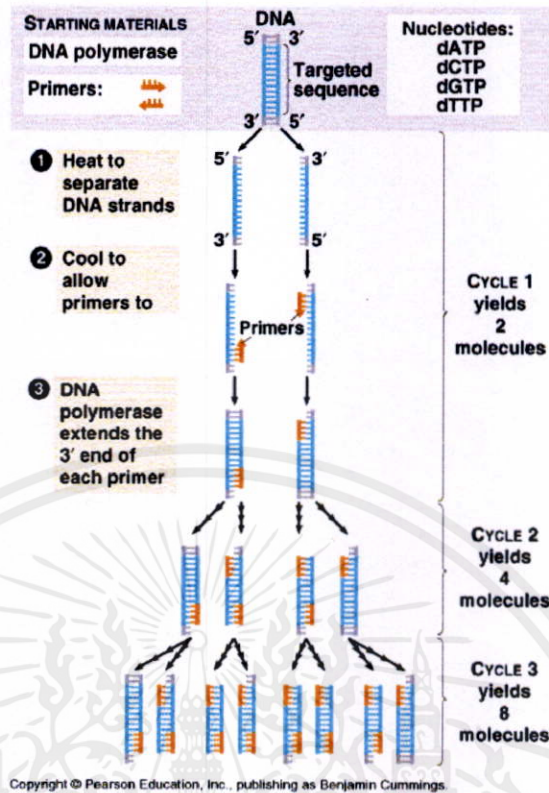
2.7.1.1 ขั้นตอนของปฏิกิริยาถูโซโพลีเมอเรส

ประกอบด้วยปฏิกิริยาสำคัญ 3 ขั้นตอน และหมุนเวียนต่อเนื่องกันไป ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน ดังนี้

1. ขั้นตอน denaturation เป็นขั้นตอนการทำให้ DNA สายคู่ (double strand) แยกเป็นสายเดี่ยว (single strand) โดยอาศัยความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ $90-95^{\circ}\text{C}$
2. ขั้นตอน primer annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงมาที่ประมาณ $45-60^{\circ}\text{C}$ เพื่อให้ primer สามารถเกาะติดกับ DNA ต้นแบบสายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สม คือเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จับคู่ได้กับนิวคลีโอไทด์สายเดิม
3. ขั้นตอน primer extension หรือ synthesis of new DNA ซึ่งเป็นขั้นตอนการขยายสาย DNA โดยการต่อลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3' ของ primer แล้วมีการขยายสาย DNA สายใหม่จากทิศทาง 5' ไปทาง 3' โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ thermostable DNA polymerase เช่น *Taq* polymerase ซึ่งปกติใช้อุณหภูมิในช่วง $70-75^{\circ}\text{C}$

ถ้าพิจารณาสาย DNA ที่เพิ่มขึ้น โดยเริ่มจากสาย DNA ต้นแบบ 1 คู่ เมื่อสิ้นสุดรอบที่ 1 จะได้สาย DNA เป็น 2 คู่ ดังนั้นเมื่อทำเช่นนี้หลายๆรอบของปฏิกิริยา PCR แล้ว DNA ที่ได้ก็จะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าของทุกๆรอบ ดังนั้นถ้าทำปฏิกิริยา PCR จำนวน n รอบผลที่ได้ตามทฤษฎีจะเท่ากับประมาณ 2^{n+1} เมื่อประสิทธิภาพการผลิต 100 % แต่โดยทั่วไปมักทำ PCR ประมาณ 30 รอบ ซึ่งจะขึ้นส่วนของ DNA เป็นจำนวนหนึ่งพันล้านเท่าของจำนวน DNA ตั้งต้น (รูปที่ 2.9)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.9 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณ DNA ที่ต้องการ โดยอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

การเพิ่มปริมาณ DNA นี้ประกอบไปด้วยขั้นตอน denaturation, annealing และ extension (Anonymous, 2009b)

2.7.1.2 องค์ประกอบของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

1. การเก็บสิ่งส่งตรวจหรือตัวอย่างเพื่อสกัด DNA โดยตัวอย่างที่ส่งตรวจอาจเป็นเนื้อเยื่อจากพืช สัตว์ หรือสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วย เช่น เลือด สารน้ำต่างๆ หรือชิ้นเนื้อที่อาจจะใหม่หรือเก่าก็ได้เช่นกัน ซึ่งสามารถนำมาสกัดเอาสารพันธุกรรมซึ่งอาจจะเป็น RNA หรือ DNA ก็ได้ โดยใช้วิธีต่างๆ รวดเร็วซึ่งมีด้วยกันหลายวิธี เช่น วิธี standard proteinase K incubation method ซึ่งสามารถสกัดเอา DNA ปริมาณน้อยๆ จากเนื้อเยื่อได้ เนื่องจากเทคนิค PCR มีความไวสูงและอาศัย DNA ปริมาณน้อยๆ ได้ ทั้งสามารถเลือกเพิ่มจำนวน DNA ช่วงสั้นๆ ได้ จึงสามารถใช้กับสิ่งส่งตรวจที่เป็นตัวอย่างที่เก็บไว้เป็นระยะเวลาานานแล้ว ทำให้มีประโยชน์นำไปใช้กับงานทางด้านโบราณคดีหรืองานนิติเวชได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

2. DNA ดั้งแบบ (template DNA) ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป้าหมาย หรือ DNA เป้าหมาย (DNA target) สามารถจะใช้ในปฏิกิริยา PCR ในลักษณะของ DNA สายเดี่ยวหรือสายคู่ก็ได้ แม้ว่าขนาดของ DNA จะไม่ใช่จุดที่มีปัญหามากนัก แต่การเพิ่มจำนวน DNA โดย DNA

มีขนาดสั้นๆและอยู่ในรูปปลายเปิด (linear DNA) จะมีประสิทธิภาพดีกว่า DNA ที่มีขนาดยาวๆ และอยู่ในรูป relaxed DNAs หรือ circular DNAs เพราะง่ายต่อการ denature และต่อการที่ primer จะเข้าไปจับ ซึ่งช่วยให้ง่ายต่อการเพิ่มจำนวน และลดผลผลิต DNA ที่ไม่จำเพาะลง

ในกรณีที่สารพันธุกรรมเป็น RNA ก็สามารถนำมาทำ PCR ได้โดยผ่านขั้นตอนการสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) จาก RNA ก่อน โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase จากนั้นเพิ่ม DNA โดยใช้ DNA polymerase ต่อไป

DNA ต้นแบบที่สกัดได้แล้วสามารถนำมาเก็บใน TE buffer หรือ น้ำที่ -20°C แต่ควรหลีกเลี่ยงสารยับยั้งในขบวนการ PCR เช่น การมี EDTA จำนวนมาก (ซึ่งจะไปเกาะติดกับ Mg^{2+}) และบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัด DNA ที่มีฟอสเฟตเป็นส่วนประกอบ เพราะอาจทำให้เกิดการตกตะกอนของแมกนีเซียมฟอสเฟต ($\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$) ได้ที่อุณหภูมิสูง นอกจากนี้ส่วนของฟีนอล (phenol) ก็ต้องกำจัดไปให้หมดเช่นกัน

3. การเลือกออกแบบ primer ที่จะใช้ต้องเลือกให้เหมาะสมกับแต่ละงานโดยอาศัยหลักการจับคู่กันแบบจำเพาะของสาย DNA ที่ต้องการตรวจหา กับ primer โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer เป็นตัวกำหนดความจำเพาะในการสังเคราะห์ DNA ดังนั้นจึงต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นำมาสังเคราะห์ primer โดยมีข้อแนะนำในการเลือกและออกแบบ primer ได้แก่

3.1 ความยาวของ primer ควรมีความยาวประมาณ 18-30 นิวคลีโอไทด์

3.2 ควรเลือก primer ที่มีการกระจายของเบสอย่างสม่ำเสมอ (random base distribution)

3.3 ควรเลือก primer ที่มีค่า G+C content อยู่ระหว่าง 50-60 %

3.4 ลักษณะของ primer มีความจำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์เป้าหมายใน DNA ต้นแบบ หลีกเลี่ยง primer ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ second structure คือต้องไม่จับกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของตนเอง (self complementary) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีการเกิด hairpin และเกิดที่ปลาย 3' ของ primer

3.5 ควรหลีกเลี่ยงลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละ primer ไม่ให้เป็นคู่สมกันเอง เพื่อป้องกันการ anneal กันเองกับ primer อีกสายหนึ่ง (cross complementary) โดยเฉพาะต้องไม่มี 3' overlap ในคู่ primer เพื่อช่วยลดการเกิด "primer dimer"

3.6 ค่า T_m (melting temperature) ของแต่ละ primer ควรใกล้เคียงกัน โดยทั่วไปอยู่ในช่วง $55-80^{\circ}\text{C}$

ซึ่งปัจจุบันมีโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ช่วยออกแบบ primers ที่เหมาะสมสำหรับงาน PCR อยู่มากจึงช่วยลดปัญหาดังกล่าวไปมาก เช่น การออกแบบ primer ด้วยโปรแกรม Primer3, โปรแกรม CODEHOP และโปรแกรม primo pro 3.4 และโปรแกรมที่ช่วยวิเคราะห์

คุณสมบัติของ primers ได้แก่ โปรแกรม Oligo Calculator และโปรแกรม OligoAnalyzer3.1 เป็นต้น (กัญญา จิระเจริญรัตน์. 2550)

4. Thermostable DNA polymerase ที่นิยมใช้กันมากที่สุดคือ Taq DNA polymerase ซึ่งแยกได้จากเชื้อแบคทีเรียที่เจริญได้ในน้ำพุร้อนที่มีชื่อว่า *Thermus aquaticus* (Taq) ซึ่งมีคุณสมบัติทนความร้อนได้สูงและไม่เสียคุณสมบัติของเอนไซม์ในขั้นตอน denature และสามารถเร่งปฏิกิริยาการสร้าง DNA ได้ที่อุณหภูมิสูงคือ 70-85 °C แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยา คือ 72 °C ซึ่ง Taq DNA polymerase เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 94 kDa แต่ข้อเสียของเอนไซม์ชนิดนี้คือ ไม่มี 3' ไป 5' exonuclease activity จึงขาดคุณสมบัติในการตรวจสอบที่เรียกว่า proofreading ทำให้เกิดการผ่าเหล่าขี้เหร่ได้

5. Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) ความเข้มข้นของ dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) ปกติอยู่ระหว่าง 50-200 μ M ของแต่ละ dNTP แต่ถ้าเป็น dNTP รวม (ทั้ง 4 ชนิด) จะมีส่วนประกอบรวมไม่เกิน 800 μ M ซึ่งเพียงพอสำหรับการสร้าง DNA ได้ประมาณ 20-26 μ g/100 μ l ของปฏิกิริยา ดังนั้นควรเลือกใช้ความเข้มข้นของ dNTP ที่ต่ำที่สุดที่เพียงพอสำหรับความยาว และส่วนประกอบของ DNA และควรปรับ pH ให้เป็นกลางประมาณ 7 และความเข้มข้นของ dNTP แต่ละชนิดที่สมดุลกัน เพื่อให้ PCR ที่เกิดขึ้นอย่างจำเพาะถูกต้องและได้ปริมาณสูง ถ้าหากมีการใช้ dNTPs ที่มีความเข้มข้นสูงเกินไป จะเกิดการต่อลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สมผิดพลาด (misincorporation)

6. Buffer ส่วนประกอบของ buffer ประกอบด้วย Tris-HCl, KCl และ MgCl₂ เป็นต้น ความเข้มข้นและสภาวะเหมาะสมของส่วนประกอบใน buffer ในการทำ PCR มีดังนี้

6.1 ความเข้มข้นของ magnesium ion (Mg²⁺) Taq DNA polymerase ต้องการ Mg²⁺ เพื่อช่วยส่งเสริมให้ปฏิกิริยาการขยายสาย DNA ดำเนินต่อไปได้โดย Mg²⁺ จะทำหน้าที่เป็น co-factor นอกจากนั้น Mg²⁺ ยังมีผลต่อความถูกต้องของการทำงานของเอนไซม์ด้วย (enzyme fidelity) ต่อการ anneal ของ primer ความจำเพาะของ DNA ที่ได้ และปริมาณ DNA เป็นต้น

6.2 pH โดย pH ที่เหมาะสมในการทำงานสำหรับ Taq DNA polymerase คือที่ pH 7-7.5 ที่อุณหภูมิ 72 °C แต่ปกติ Taq DNA polymerase จะอยู่ใน Tris buffer ซึ่งมี pH 8.5-9.0 ที่อุณหภูมิ 25 °C เนื่องจาก pH ของ Tris- buffer จะลดลงประมาณ 0.03 ของอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นแต่ละองศา ดังนั้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 72 °C จะได้ pH 7.3 นั่นเอง

7. จำนวนรอบของการทำ PCR (cycle number) จำนวนรอบในการทำ PCR ขึ้นกับปริมาณ DNA ต้นแบบตั้งต้น ถ้าใช้จำนวนรอบที่มากขึ้นเท่าใด โอกาสที่จะได้ผลผลิต PCR ผิดพลาดก็มากขึ้นตามไปด้วย เนื่องจากผลผลิต PCR ที่ได้จะมีความจำเพาะเจาะจงที่น้อยลงและเกิด background มากขึ้น แต่ใช้จำนวนรอบน้อยเกินไปผลผลิตที่ได้ก็น้อยลงด้วย

8. การตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR (PCR product) การตรวจวิเคราะห์ผลผลิตมีด้วยกันหลายวิธี ที่นิยมใช้กันทั่วไปคือ

8.1 Gel electrophoresis โดยนำผลผลิต PCR ที่สร้างได้มาแยกตามขนาด DNA โดยใช้กระแสไฟฟ้าแยก DNA บน agarose gel หรือ polyacrylamide gel เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานที่ทราบขนาดที่แน่นอน จากนั้นย้อมย้อมสี DNA ด้วย ethidium bromide แล้วนำไปส่องดูด้วยแสงอุลตราไวโอเล็ต ผลผลิต PCR ที่ดีควรให้ขึ้น DNA ที่ชัดเจน และตรงตามขนาดความต้องการ แต่ถ้ามีขนาดเล็กและแถบ DNA ไม่ชัดเจน อาจเป็น DNA ที่เป็น primer dimer ก็ได้

8.2 Direct sequencing ในกรณีต้องการรู้รายละเอียดของลำดับเบสหรือของผลผลิต PCR ว่าถูกต้องแน่นอนหรือไม่ สามารถตรวจหาลำดับเบสโดยวิธี sequencing PCR ที่เป็นสายคู่ (double strand PCR products) หรืออาจจะ sequencing PCR ที่เป็นสายเดี่ยว (single stranded PCR products)

2.7.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

วิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นได้รับการพัฒนาโดยตลอด ปัจจุบันสามารถทำได้ง่ายและไม่ยุ่งยากซับซ้อน คือ ใช้เครื่องมืออัตโนมัติที่เรียกว่า automate machine ซึ่งสามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้เร็วขึ้น โดยคัดแปลงมาจากวิธีการ dideoxy sequencing หรือเรียกอีกอย่างว่า dideoxy chain terminating method คือ ใช้เอนไซม์ DNA polymerase I เพื่อสร้างสาย DNA ที่เป็นคู่สมกับ DNA ที่ต้องการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งเป็น DNA สายคู่ โดยเริ่มจากแยก DNA สายคู่เป็น DNA สายเดี่ยวโดยใช้ความร้อน (denature) และใช้ sequencing primer ซึ่งเป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ที่ถูกออกแบบให้ปลาย 3' อยู่ใกล้กับ DNA ที่ต้องการทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้น sequencing primer จะจับกับ DNA ที่ต้องการทราบลำดับนิวคลีโอไทด์กันอย่างเหมาะสมและเอนไซม์ DNA polymerase I จะทำการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์จาก deoxyribonucleotide 4 ชนิด (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) ที่เติมลงไป ในหลอดในปริมาณที่เพียงพอ โดยจะทำการสังเคราะห์ทางปลาย 3' ต่อจาก sequencing primer นอกจากนี้จะมีการเติมสาร dideoxyribonucleotide 4 ชนิด (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP) เพื่อทำหน้าที่เป็นนิวคลีโอไทด์จบการสังเคราะห์ (chain terminator) ซึ่ง dideoxyribonucleotide ทั้ง 4 ชนิดจะถูกติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ต่างๆ กัน เนื่องจากปกติเอนไซม์ DNA polymerase ต้องการปลาย 3'-OH ในการสังเคราะห์สาย DNA แต่ dideoxyribonucleotide มีปลาย 3'-H แทน 3'-OH ดังนั้นในกระบวนการสังเคราะห์ DNA หาก DNA polymerase I ดึง dideoxyribonucleotide เข้ามาแทน deoxyribonucleotide การสังเคราะห์ก็จะหยุดเพราะขาดปลาย 3'-hydroxyl ซึ่งจะป้องกันการเกิดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์กับปลาย 5'-phosphate ของ deoxyribonucleotide ตัวที่จะเข้ามาใหม่ ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ทั้งหมดเกิดในหลอดเดียวกัน และเมื่อจบปฏิกิริยาทำการแยกชิ้นส่วน DNA ด้วยอิเล็กโทรโฟริซิสเจลช่องเดียว ซึ่งชิ้น DNA ที่สังเคราะห์ได้จะมีขนาดไม่เท่ากัน ขึ้นอยู่กับจะหยุดการสังเคราะห์ที่นิวคลีโอไทด์ตัวใดในสายนั้นๆ และ DNA สายที่มีการหยุดการสังเคราะห์ที่นิวคลีโอไทด์แต่ละตัวนี้จะมีสีฟลูออเรสเซนต์ที่ติดอยู่ต่างกัน ดังนั้นเมื่อขึ้น DNA สายที่สั้นที่สุดเคลื่อนที่ลงมาเครื่องมืออ่านสีฟลูออเรสเซนต์จากแถบ DNA บนแผ่นเจลจะบันทึกผล ที่ออกมาว่าแถบ DNA แถบแรกนั้นเป็นแถบที่มีนิวคลีโอไทด์ตัวใด และตรวจแถบถัดมาเรื่อยๆ ตามลำดับและแปลผลออกมาเป็นนิวคลีโอไทด์ตัว A, T, C

หรือ G ตามสี่ที่ติดฉลากไว้ ซึ่งข้อมูลที่ได้จะวิเคราะห์ออกมาเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ (Mülhardt. 2007)

2.8 การประยุกต์ใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ในการศึกษาความหลากหลายและเพื่อจัดจำแนกสายพันธุ์

2.8.1 เทคนิคการเพิ่มจำนวนยีนที่ต้องการเพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA cloning)

DNA cloning เป็นขั้นตอนที่สำคัญในการทำพันธุวิศวกรรม เพื่อเพิ่มจำนวนชุดของชิ้น DNA จำนวนยีนที่ต้องการภายในเซลล์ และเคลื่อนย้ายเข้าสู่เซลล์ที่ต้องการ จากการเปลี่ยนแปลงการเรียงตัวของสารพันธุกรรมหรือ DNA ในสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งเสียใหม่ โดยการตัดต่อชิ้น DNA หรือยีนของสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่งเข้าไป โดยใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา หลังจากตัดต่อ DNA ของสิ่งมีชีวิตสองชนิดเข้าด้วยกันแล้ว จะได้ DNA ใหม่ที่เรียกว่า DNA ลูกผสมหรือ recombinant DNA โดยต้องอาศัยองค์ประกอบที่สำคัญ ดังนี้

2.8.1.1 DNA fragment คือชิ้นส่วนของ DNA ที่ต้องการที่ได้มาจากตัวอย่างทดลอง โดยการสกัด DNA ทั้งหมดออกจากเซลล์ (total DNA) จากนั้นนำมาสังเคราะห์ DNA บริเวณที่จำเพาะด้วยเทคนิค PCR โดยการใช้ไพรเมอร์ (primer)

2.8.1.2 Cloning vector หรือพาหะของการโคลน ซึ่งเป็น DNA ที่มีคุณสมบัติในการถ่ายแบบได้อย่างอิสระจากโครโมโซม เนื่องจากชิ้นส่วนของ DNA หรือชิ้นส่วนของยีนที่ต้องการไม่สามารถเพิ่มจำนวนโดยการจำลองตัวเองได้ในเซลล์ผู้รับ ดังนั้นต้องมีการเชื่อมต่อกับ cloning vector เพื่อให้สามารถเพิ่มจำนวนโดยการจำลองตัวเองในเซลล์ผู้รับได้

2.8.1.3 Restriction enzyme หรือ Restriction endonuclease เป็นเอนไซม์ที่ใช้ตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ (phosphodiester bond) ของ DNA ตรงที่มีการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์อย่างจำเพาะ

2.8.1.4 DNA ligase ทำหน้าที่เชื่อมชิ้น DNA เข้าด้วยกัน โดยการสร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ระหว่างปลาย 3'-hydroxyl และ 5'-phosphate ที่อิสระของชิ้น DNA

2.8.1.5 Host คือเซลล์ให้อาศัยหรือเซลล์ผู้รับ ที่สามารถรับ recombinant DNA ที่เตรียมได้ ในการเลือกเซลล์ให้อาศัยต้องมีการพิจารณาถึงความสามารถในการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วและไม่เป็นอันตรายหรือก่อให้เกิดโรค

การถ่ายทอด recombinant DNA เข้าสู่ host โดยการนำยีนที่มีอยู่เข้าสู่เซลล์ให้อาศัย เพื่อทำการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอยู่ในเซลล์ให้อาศัยนั้นๆ ได้ ทำโดยวิธีการที่เรียกว่า ทรานส์ฟอร์มชัน (transformation) ซึ่งเป็นวิธีการที่เกิดขึ้นเองได้ในธรรมชาติของแบคทีเรียบางชนิดอยู่แล้ว ซึ่งเมื่อถูกเลี้ยงภายใต้สภาวะบางสภาวะ อาจทำให้ cell envelope เกิดลักษณะที่จะรับ DNA จากภายนอกเข้าสู่

ภายในเซลล์ได้ง่ายขึ้น เซลล์ที่เกิดลักษณะดังกล่าวนี้ เรียกว่า competent cell เมื่อทำทรานส์ฟอร์มแล้วนำทรานส์ฟอร์มเม้นท์ที่ได้ไปตรวจหา (screen) ยีนที่ต้องการ โดยวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป (ศิริพร สิทธิประณีต. 2531; อารีลักษณ์ เกษมสันต์. 2533; นภา ศิวรังสรรค์. 2547)

2.8.2 Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)

เทคนิค PCR-RFLP เป็นการเพิ่มจำนวนยีนที่สนใจด้วยวิธี PCR ก่อนแล้วจึงนำผลผลิต PCR ที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะภายใน สุรินทร์ ปิยะ โชคณากุล (2545) กล่าวว่า RFLP หมายถึง ความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาด DNA ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ซึ่ง DNA ในออร์แกเนลล์ของสิ่งมีชีวิตนั้นมีความสามารถที่จำลองโมเลกุลได้อย่างถูกต้องแม่นยำเพื่อถ่ายทอดไปสู่เซลล์ลูกหลาน แต่บางครั้งอาจมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายใน DNA ได้ เนื่องจากสภาพแวดล้อมหรือข้อผิดพลาดของเซลล์เอง เช่น การเกิดการกลายพันธุ์แบบต่าง ๆ การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้ทำให้เกิดความหลากหลายภายในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด โดยวิธี RFLP ได้โดยใช้หลักการดังนี้ คือ นำ DNA ที่ต้องการหาความแตกต่างนั้นมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่แยกได้จากแบคทีเรีย และจะตัด DNA ที่ตำแหน่งซึ่งมีการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์แบบจำเพาะ (recognition site) โดยตำแหน่งจดจำของเอนไซม์แต่ละชนิดประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ 4-6 bp ดังนั้น เมื่อใช้เอนไซม์ชนิดหนึ่งตัด DNA เป้าหมายโมเลกุลหนึ่งจะได้ชิ้น DNA ที่มีขนาดและจำนวนคงที่เสมอ ถ้า DNA เป้าหมายมาจากสิ่งมีชีวิตที่ต่างกันและมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนแปลงไป เมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน จะได้ขนาด และ จำนวนชิ้น DNA ที่แตกต่างจากเดิม เรียกว่าเกิด polymorphism หรือ RFLP แล้วทำการเปรียบเทียบชิ้นส่วน DNA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์นั้น ในทางปฏิบัติ การวิเคราะห์ RFLP ที่เกิดขึ้น ทำโดยคิดความแตกต่างของ RFLP ระหว่างตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบทีละคู่ และนับจำนวนแถบ DNA ที่แตกต่างกัน ทั้งนี้อาจวิเคราะห์ด้วยคอมพิวเตอร์ เพื่อแสดงแผนภาพความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้น

Rungroj *et al.* (2009) กล่าวไว้ในเอกสารประกอบภาคปฏิบัติการ molecular and cellular workshop ปี 2009 ว่าเทคนิค RFLP ใช้ประโยชน์ในด้านการตรวจหามิวเทชัน (mutation) หรือ single nucleotide polymorphisms; SNPs ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดโรคที่เกิดจากความผิดปกติทางพันธุกรรม โดยอาศัยหลักการของขนาดยีนที่แตกต่างกันระหว่างผู้ที่มียีนปกติและมีการเกิด mutation หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะภายใน (restriction endonuclease)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9 การศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยข้อมูลทางชีวสารสนเทศ (Bioinformatic)

2.9.1 ชีวสารสนเทศ (bioinformatic)

กัญญา จิระเจริญรัตน์ (2550) กล่าวว่า ชีวสารสนเทศ หมายถึงขบวนการศึกษาและการจัดการข้อมูลทางชีววิทยาของชีวโมเลกุล อันประกอบด้วย DNA, RNA และ โปรตีน โดยอาศัยขั้นตอนการรวบรวมข้อมูลที่มีอยู่จำนวนมาก และวิเคราะห์ด้วยวิทยาการคอมพิวเตอร์ และวิธีการสถิติ การสร้างและการสืบค้นฐานข้อมูลออนไลน์ทางอินเทอร์เน็ต การสร้างสมการอัลกอริทึม (algorithm) รวมทั้งการพัฒนาโปรแกรมในการวิเคราะห์ การคาดคะเน การทำนายโครงสร้าง การสร้างแบบจำลองปรากฏการณ์ทางชีววิทยา เพื่อในการวิเคราะห์ข้อมูลที่มีความซับซ้อน ซึ่งจะช่วยลดระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในการทำงานวิจัยได้อย่างมาก ซึ่งชีวสารสนเทศสามารถช่วยในการวิเคราะห์ข้อมูลทางด้านชีวโมเลกุล ได้ดังต่อไปนี้

2.9.1.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence analysis)

ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสาย DNA ของสิ่งมีชีวิตมีการบันทึกเข้าในฐานข้อมูลมากขึ้นเรื่อยๆ ข้อมูลที่ได้สามารถนำไปคาดคะเนลักษณะของสายพอลิเปปไทด์ที่จะเกิดขึ้น รวมทั้งตำแหน่งของบริเวณควบคุมการแสดงออกของยีนบนสาย DNA การเปรียบเทียบยีนภายในหรือระหว่างสายพันธุ์ ช่วยให้เห็นความเหมือนของสายโปรตีนที่เกิดขึ้น รวมทั้งความสัมพันธ์ของยีนในสายพันธุ์ที่ต่างกัน ปัจจุบันจึงมีการพัฒนาโปรแกรมต่างๆเพื่อมาช่วยในการวิเคราะห์ ซึ่งสามารถช่วยในการค้นหายีนที่สนใจจากฐานข้อมูลขนาดใหญ่ได้ในเวลาอันรวดเร็ว

2.9.1.2 การวิเคราะห์ชีววิทยาเชิงวิวัฒนาการ (computational evolutionary biology)

ชีววิทยาเชิงวิวัฒนาการเป็นการศึกษาด้านกำเนิดและบรรพบุรุษของสิ่งมีชีวิต รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น ชีวสารสนเทศสามารถช่วยนักวิวัฒนาการในการวิเคราะห์ความเป็นมาทางวิวัฒนาการของกลุ่มสิ่งมีชีวิตกลุ่มใหญ่ โดยวัดการเปลี่ยนแปลงของ DNA ช่วยในการเปรียบเทียบจีโนมทั้งหมดเพื่ออธิบายการศึกษาเหตุการณ์ที่ซับซ้อน เช่นการจำลองโมเลกุลของยีน

2.9.1.3 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางชีวภาพ (biodiversity analysis)

ความหลากหลายทางชีวภาพของระบบนิเวศน์อาจวัดจากจีโนมทั้งหมดที่พบในสภาพแวดล้อมหนึ่งๆ เช่น ในดิน ในน้ำพุร้อน ในทะเล โดยการใช้การบันทึกรายละเอียดต่างๆของสิ่งมีชีวิตบนฐานข้อมูลได้แก่ ชื่อ สายพันธุ์ แหล่งที่พบ ลักษณะที่ปรากฏ ข้อมูลรหัสพันธุกรรม เป็นต้น การใช้โปรแกรมจะช่วยในการคำนวณการเคลื่อนที่ของประชากร สุขภาพทางพันธุกรรมของประชากร ซึ่งช่วยในการอนุรักษ์สายพันธุ์ที่อยู่ในระดับเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์เป็นอย่างมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์และสงวนสิทธิ์ในเนื้อหาและข้อมูลทั้งหมดโดยไม่อนุญาตให้นำไปใช้

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9.1.4 การวิเคราะห์ตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์ (analysis of mutation)

การศึกษาและเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อค้นหาตำแหน่งของการกลายพันธุ์ โดยวิธีทางชีวสารสนเทศเป็นประโยชน์อย่างมาก โดยเฉพาะในโรคมะเร็ง

2.9.1.5 การศึกษาเปรียบเทียบในระดับจีโนม (comparative genomics)

เป็นการศึกษาเปรียบเทียบจีโนมของสิ่งมีชีวิตต่างๆ เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ในระดับยีน รวมทั้งการวิเคราะห์ยีนต่างๆบนโครโมโซม

2.9.1.6 การกำหนดตำแหน่งบนจีโนม (genome annotation)

การกำหนดตำแหน่งของยีนต่างๆบนจีโนมและการกำหนดองค์ประกอบต่างๆบนยีน โดยใช้โปรแกรมในการค้นหา เช่นตำแหน่งของยีนที่กำหนดโปรตีน ตำแหน่งของ rRNA และอื่นๆ ในปัจจุบันการค้นหาส่วนต่างๆบนจีโนมยังมีการพัฒนาโปรแกรมอย่างต่อเนื่อง

2.9.1.7 การวิเคราะห์การควบคุมยีน (analysis of regulation)

การควบคุมการแสดงออกของยีนเริ่มจากการส่งสัญญาณจากภายนอกเซลล์ ชีวสารสนเทศสามารถนำมาวิเคราะห์ในหลายส่วน เช่น การค้นหาโปรโมเตอร์ (promoter) การหาตำแหน่ง sequence motifs และการหาตำแหน่งของ regulatory elements เป็นต้น

2.9.1.8 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน (analysis of protein expression)

ชีวสารสนเทศเกี่ยวข้องในการวิเคราะห์ข้อมูลการตรวจวัดโปรตีนในงาน protein microarrays และ high throughput (HT) mass spectrometry (MS) ซึ่งมีข้อมูลที่ซับซ้อน โดยสามารถดึงข้อมูลของโปรตีนจากฐานข้อมูล มาเปรียบเทียบกับโปรตีนที่ได้จากการวิเคราะห์

2.9.2 ฐานข้อมูลทางด้านชีวโมเลกุล (molecular biological database)

รวบรวมแหล่งข้อมูลเฉพาะเรื่องที่เกี่ยวข้องกับ โมเลกุลชีววิทยา อันประกอบด้วย DNA, RNA และ โปรตีน และมีการเผยแพร่ทางอินเทอร์เน็ต สามารถเข้าไปสืบค้นและเข้าไปเพิ่มข้อมูลได้ทางออนไลน์ โดยข้อมูลจะถูกจัดเก็บไว้ในคอมพิวเตอร์ของเซิร์ฟเวอร์ เช่น

GenBank เป็นฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ DNA ของกระทรวงสาธารณสุข สหรัฐฯ (NIH)

UniPort เป็นฐานข้อมูลทั้งหมดของโปรตีน เพื่อการหาลำดับนิวคลีโอไทด์หรือหน้าที่ของโปรตีน

IniEnz เป็นฐานข้อมูลที่รวบรวมความรู้ทางเอนไซม์

PubMed เป็นฐานข้อมูลที่รวบรวมข้อมูลของวารสารทางการแพทย์ ซึ่งเป็นข้อมูลที่ได้จาก MEDLINE และวารสารทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพอื่นๆ

Entrez Genome ฐานข้อมูลที่สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับจีโนม โครโมโซม แผนที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ และแผนที่ทางกายภาพของยีน

สำหรับโปรแกรมทางคอมพิวเตอร์ที่ใช้เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ หรือการจัดจำแนกสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต นั้นมีอยู่มากในปัจจุบัน ซึ่งการเลือกใช้โปรแกรมขึ้นอยู่กับจุดประสงค์ของการทำงาน และ ลักษณะของข้อมูลดิบที่มี ได้แก่ ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับกรดอะมิโน ตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ เป็นต้น ตัวอย่างโปรแกรมมีดังนี้ คือ

2.9.2.1 โปรแกรม BLAST (basic local alignment search tools) เป็นโปรแกรมสำหรับการค้นหาบริเวณเฉพาะที่เหมือนกันระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สนใจกับฐานข้อมูลทางพันธุศาสตร์ สามารถเข้าถึงได้ที่ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

2.9.2.2 โปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ความเหมือนระหว่างกลุ่มยีน โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วน (local alignment) หรือเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (global alignment) สำหรับโปรแกรม Clustal W <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html> และโปรแกรมที่ติดตั้งเพื่อใช้งานบนคอมพิวเตอร์ได้คือ ClustalX1.83 และ BioEdit เป็นต้น

2.9.2.3 โปรแกรมสำหรับสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ โดยการคำนวณ algorithms ได้แก่วิธี distance matrix เช่น unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA), minimum evolution (ME), neighbor-joining (NJ) หรือวิธี maximum parsimony (MP) หรือวิธี maximum likelihood (ML) ตัวอย่างโปรแกรมคำนวณ ได้แก่ MEGA สามารถเข้าถึงได้ที่ <http://www.megasoftware.net/>, Bosque เข้าถึงได้ที่ <http://bosque.udce.cl/> และ PAUP เข้าถึงได้ที่ <http://paup.csit.fsu.edu/> เป็นต้น

2.9.2.4 โปรแกรมสำหรับหาคำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ เช่น NEB cutter version 2.0 สามารถเข้าถึงได้ที่ <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>

และโปรแกรม Webcutter version 2.0 ที่สามารถเข้าถึง อ่านคู่มือการใช้งาน และดูตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะได้ที่ <http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/> เป็นต้น

2.9.3 แผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetics tree)

ดวงกมล ทองอร่าม และคณะ (2005) กล่าวว่าสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตเป็นข้อมูลที่มีความสำคัญยิ่งในการศึกษาชีววิทยาอย่างเป็นระบบ ทั้งในการศึกษาชีววิทยาพื้นฐาน และชีววิทยาประยุกต์ เช่น สิ่งมีชีวิตที่จัดอยู่ในตำแหน่งทางอนุกรมวิธานเดียวกันต้องมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกันมากกว่าสิ่งมีชีวิตที่ถูกจัดอยู่คนละกลุ่ม และการทำนายหน้าที่ของ โปรตีนจากลำดับ DNA ของยีนนั้นจะกระทำได้อย่างถูกต้องมากยิ่งขึ้นหากว่าเป็นการทำนายจากข้อมูลเกี่ยวกับหน้าที่ของยีนที่สนใจในสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง ที่มีสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับสิ่งมีชีวิตที่ศึกษาได้ ที่มีรายงานไว้แล้วมากกว่าที่จะพิจารณาจากความคล้ายคลึงของลำดับ DNA ในยีนนั้นเพียงอย่างเดียว และเนื่องจากลักษณะของสิ่งมีชีวิตเป็นผลจากการแสดงออกของยีนในสิ่งมีชีวิตนั้นๆ การศึกษาเพื่อ

เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA จากสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆจึงเป็นข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์หาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างสิ่งมีชีวิตกลุ่มที่ศึกษาได้

แผนภูมิวิวัฒนาการหรือแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมจะแสดงความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตหรือชีวโมเลกุล โดยมีตำแหน่งที่สิ่งมีชีวิตแยกวิวัฒนาการออกจากกัน เรียกว่าปม (node) ซึ่งมีทั้งปมภายใน (internal node) และปมภายนอก (external node) และระยะทางที่แยกออกจากปมเรียกว่า กิ่ง (branch)

โดยที่แผนภูมิวิวัฒนาการที่มีราก (rooted) ซึ่งสิ่งมีชีวิตที่มีบรรพบุรุษร่วมกัน (ancestor) เรียกว่า outgroup เป็นปมภายใน จะช่วยให้แผนภูมิแสดงลำดับวิวัฒนาการของโมเลกุลได้อย่างถูกต้อง ส่วนแผนภูมิวิวัฒนาการที่ไม่มีราก (unrooted) จะแสดงเพียงความสัมพันธ์กันของโมเลกุล แต่ไม่ได้บ่งบอกถึงลำดับวิวัฒนาการ

2.9.3.1 การสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ

ในการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ จำเป็นต้องทำการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (similarity) ของยีนกลุ่มที่สนใจก่อน โดยจัดเรียง (align) ลำดับของข้อมูลทั้งหมดจนกระทั่งมีระดับของความเหมือนกัน (homology) สูงสุด เพื่อสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม (tree reconstruction) และทำการตรึงรากแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม (rooting the tree) ในขั้นตอนการค้นหาแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการนั้นแผนภูมิที่คำนวณได้จะอยู่ในรูปของแผนภูมิที่ไม่ได้ถูกตรึงรากก่อน จากนั้นจึงค่อยถูกตรึงราก (rooted) หลังจากแผนภูมิที่สั้นที่สุดที่เป็นไปได้ทั้งหมดถูกค้นพบแล้ว โดยปม (node) ของแผนภูมิที่ใกล้เคียงกับบรรพบุรุษร่วมของ taxa ทั้งหมดที่ศึกษาจะถูกนำมาใช้เป็นจุดตรึงราก ขั้นตอนดังกล่าวจะทำให้ทิศทาง (polarity) ของสมาชิกในกลุ่มที่ศึกษา ซึ่งจะใช้สิ่งมีชีวิตที่มีบรรพบุรุษร่วมกัน (ancestor) กับสิ่งมีชีวิตที่ศึกษา เรียกว่า outgroup เป็นสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม ที่บอกโปรแกรมคอมพิวเตอร์ให้ทราบถึงตำแหน่งที่เหมาะสมในการตรึงราก จากนั้นจึงคำนวณหาแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมใหม่

แล้วจึงนำค่าที่ได้มาแปลงเป็นค่าระยะห่างทางวิวัฒนาการ (evolutionary distance, E_D) ซึ่ง ค่า E_D เป็นค่าที่ได้จากการคำนวณเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็น homologous โดยที่ความยาวของกิ่งที่แยกสิ่งมีชีวิตออกจากกัน เป็นสัดส่วนกับ E_D เช่น ถ้าสิ่งมีชีวิต 2 ชนิดมีใกล้เคียงกันหรือมีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกัน (similarity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงทำให้ระยะทาง (distance) ในแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมสั้น

จากนั้นระบุค่า bootstrap value ที่เป็นค่าทางสถิติในการทดสอบความน่าเชื่อถือของการสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม ซึ่งเป็นวิธีที่มีการสับเปลี่ยนค่าข้อมูลโดยการแทนที่ โดยเริ่มจากการสุ่มดึงข้อมูลลักษณะบางอย่างออกจากตาราง matrix แล้วทำให้ matrix นั้นมีขนาดเท่าเดิมโดยการเพิ่มจำนวนซ้ำของข้อมูลลักษณะอื่นขึ้นมาแทนที่ จากนั้นจึงสร้างแผนภูมิใหม่ขึ้นมา หลังจากทำการทดลองดังกล่าวไปหลายๆ รอบ แผนภูมิทั้งหมดที่สร้างขึ้นมานี้จะถูกนำมาวิเคราะห์หา

ความน่าเชื่อถือที่แต่ละกิ่งต่างๆ บนแผนภูมิ ซึ่งโดยทั่วไปค่าที่มากกว่า 95% ถือว่าเป็นผลเชิงบวก อย่างมีนัยสำคัญ วิธี bootstrap test ออกแบบโดย Felsenstein และเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากที่สุดใน การอ้างอิงในแผนภูมิของการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์

ซึ่งจากขั้นตอนทั้งหมดจะได้แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ของโมเลกุลซึ่งเรียกว่า dendrogram (Nei and Kumar. 2000; ทัศนญา จิระเจริญรัตน์. 2550)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ตัวอย่างทดลอง

ตัวอย่างแมลงวันหลังลายทั้งหมดดังตารางที่ 3.1 ซึ่งเป็นตัวอย่างของตัวหนอน และตัวเต็มวัย จากพื้นที่ต่างๆ และมีการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา จากผู้เชี่ยวชาญทางด้านกีฏวิทยา (บทที่ 2 ข้อ 2.5) โดยทำการเก็บตัวอย่างในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml และเก็บที่อุณหภูมิ -20°C หรือจนกว่าจะนำมาใช้ในการทดลอง

ตารางที่ 3.1 ตัวอย่างสายพันธุ์แมลงวันหลังลายที่ทำการศึกษา

ตัวอย่างทดลอง	ระยะการเจริญ	พื้นที่	รหัสแมลงวัน
<i>Sarcophaga dux</i>	ตัวเต็มวัย	เชียงใหม่	SdA1
<i>S. dux</i>	ตัวเต็มวัย	เชียงใหม่	SdA2
<i>S. dux</i>	ตัวหนอนระยะที่ 3	เชียงใหม่	SdL1
<i>S. peregrine</i>	ตัวหนอนระยะที่ 3	กรุงเทพมหานคร	SpL1
<i>S. peregrine</i>	ตัวเต็มวัย	กรุงเทพมหานคร	SpA1
<i>S. peregrine</i>	ตัวหนอนระยะที่ 3	เชียงใหม่	SpL2
<i>S. ruficornis</i>	ตัวเต็มวัย	เชียงใหม่	SrA1
<i>S. ruficornis</i>	ตัวเต็มวัย	เชียงใหม่	SrA2
<i>S. ruficornis</i>	ตัวหนอนระยะที่ 3	กรุงเทพมหานคร	SrL1

3.2 อุปกรณ์

1. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Eppendorf Centrifuge 5804R; Eppendorf[®], USA)
2. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Eppendorf Centrifuge 5417R; Eppendorf[®], USA)
3. ไมโครเวฟ (Intellowave; LG[®], Thailand)
4. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20°C (Whirlpool; Sanyo[®], Thailand) และ -80°C (Thermo Scientific 995; Becthai[®], USA)
5. เครื่องเพิ่มปริมาณสาร DNA (GeneAmp PCR system 2400; Applied Biosystems[®], USA)
6. เครื่องอิเล็กทรอนิกส์ (Sub-Cell GT; Bio-Rad[®], USA)
7. เครื่องถ่ายภาพเจล (Gel Doc[™] XR; Bio-Rad[®], USA)

8. กล้อง stereomicroscope (SZX9; Olympus[®], Japan)
9. เครื่องรันเจล PAGE (MiniProtein 3 cell; Bio-Rad[®], USA)
10. เครื่องกำเนิดไฟฟ้า (Power PAC 300; Bio-Rad[®], USA)
11. Dry Bath Incubator (MD-02N-220; Cleaver Scientific[®], USA)
12. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Orbital Incushaker; Labec[®], Australia)
13. เครื่องชั่งอิเล็กทรอนิกส์ (Sartorius; Scientific Promotion[®], Germany)
14. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (HEV-25/50; Hirayama[®], Japan)
15. เครื่องผสมสาร (Fine vortex; FinePCR[®], Korea)
16. ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อ (BE400; Memmert, Germany)
17. เครื่องปรับค่าความเป็นกรดด่าง (schott pH Meter; Schott Instrument[®], Germany)
18. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (smartspect[™] 3000; Bio-Rad[®], USA)
19. หลอด flacon tube ขนาด 15 ml และหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml
20. gel chamber และ กล่องพลาสติก เพื่อใช้สำหรับย้อมเจล

3.3 สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Lueria-Bertani broth (LB), LB agar, SOB solution และ SOC medium
2. สารเคมีสำหรับการเตรียม Competent cell
3. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบโคลน
4. สารเคมีที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ DNA โดยวิธีแยกขนาด DNA ในเจลอะกาโรสภายใต้กระแสไฟฟ้า (agarose gel electrophoresis)
5. สารเคมีที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ DNA โดยวิธีแยกขนาด DNA ใน native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) ภายใต้กระแสไฟฟ้า
6. สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) ของบริษัท Invitrogen[®] และ บริษัท Fermentas[®]
7. ชุดสกัด genomic DNA (Genomic DNA from tissue ; Nucleospin[®] tissue) ของบริษัท Machery-Nagel[®]
8. ชุดแยก DNA ให้บริสุทธิ์จากเจลอะกาโรสโดยใช้ ชุดสกัด DNA ออกจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit ของบริษัท QIAGEN[®] เอกสารนี้เป็นเอกสารที่เผยแพร่ไว้สำหรับงานวิจัยเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
9. สารเคมีที่ใช้ในการเชื่อม DNA ของบริษัท Invitrogen[®] ไม่ว่ากรณีใดๆก็ตาม ลิขสิทธิ์ในสิ่งพิมพ์และสื่ออิเล็กทรอนิกส์ของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
10. ชุดสกัดพลาสมิด QIAprep spin Miniprep Kit ของบริษัท QIAGEN[®]

11. ชุดสารเคมีที่ใช้ในการย่อยผลผลิตจากปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรส (เอนไซม์ *Dra* I ของบริษัท Roch[®])
12. ชุดโคลนผลผลิตจากปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรส InsTAclone[™] PCR Cloning Kit โดยใช้เวกเตอร์ pTZ57R/T ของบริษัท Fermentas[®]

หมายเหตุ : รายละเอียดและการเตรียมอยู่ภาคผนวก ก

3.4 วิธีการ

3.4.1 การสกัด DNA (DNA extraction)

การสกัด genomic DNA จากส่วนอก (thorax) ของตัวอย่างแมลงวันตัวเต็มวัย และตัวหนอนนำมาบดด้วย sterile glass homogenizer ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml แล้วทำการสกัด DNA โดยใช้ DNA extraction kits (Genomic DNA from tissue ; Nucleospin[®] tissue) และเก็บสารละลาย DNA ที่อุณหภูมิ -20 ° C ก่อนที่จะนำไปใช้งานในขั้นตอนต่อไป

3.4.1.1 การสกัด DNA โดยใช้ DNA extraction kits (Genomic DNA from tissue ; Nucleospin[®] tissue)

เตรียมตัวอย่างแมลงโดยตัดชิ้นส่วนแมลงวันบริเวณอกของตัวเต็มวัยขนาดขึ้นประมาณประมาณ 25 mg ใส่ในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml และเพื่อเตรียมการก่อนทำให้เซลล์แตก (pre-lysis) โดยเติม buffer T1 ปริมาตร 180 μ l และสารละลาย proteinase K ปริมาตร 25 μ l จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยการ vortex จากนั้นนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 56 ° C เป็นเวลา 1-3 ชั่วโมง (โดยทำการ vortex เป็นระยะๆขณะที่ทำการ incubate) ในขั้นตอนการทำให้เซลล์แตก (lysis) จะเติมสารละลาย buffer B3 ปริมาตร 200 μ l จากนั้นทำการ vortex อย่างรวดเร็วและ incubate ต่อที่อุณหภูมิ 70 ° C เป็นเวลา 10 นาที โดยในขั้นตอนการ adjust DNA binding conditions จะเติม 100 % ethanol ปริมาตร 210 μ l ในหลอดตัวอย่างและ vortex อย่างรวดเร็วเพื่อตกตะกอน DNA และทำการ bind DNA ด้วยการโหลดสารละลายที่ได้จากตัวอย่างในแต่ละหลอดใส่ใน NucleoSpin[®] Tissue Column ที่ประกอบกับ collection tube และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube ทิ้ง และทำการล้าง silica membrane โดยการล้างครั้งที่ 1 จะเติมสารละลาย buffer BW ปริมาตร 500 μ l นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที และเทของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube ทิ้ง ล้างครั้งที่ 2 เติมสารละลาย buffer B5 ปริมาตร 600 μ l นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที และทิ้งส่วนของเหลวที่ผ่านการกรอง จากนั้นทำให้ silica membrane แห้งโดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เวลา 1 นาที เพื่อทำให้ column แห้ง และสุดท้ายในขั้นตอนการเก็บ DNA จะนำ NucleoSpin[®] tissue column ใส่ในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ที่

เตรียมไว้ และเติมสารละลาย elution buffer BE ปริมาตร 100 μl (ก่อนใช้ควรนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 70 °C ก่อนนำมาใช้ เพื่อให้ได้ผลผลิต DNA เพิ่มขึ้น) จากนั้น incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที และเก็บตัวอย่าง DNA ที่ได้ที่อุณหภูมิ 20 °C และนำไปวัดค่าความเข้มข้นของ DNA ต่อไป

3.4.1.2 การวัดหาปริมาณ DNA โดยใช้ spectrophotometer

การวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) โดยใช้ spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm โดย DNA สามารถดูดกลืนแสงได้มากที่สุดที่ความยาวคลื่น 260 nm จากนั้นนำผลที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลาย DNA จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของ DNA } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A_{260} \times 50 \times \text{dilution factor}$$

ถ้าค่า A_{260} ที่วัดได้มีค่าเท่ากับ 1 แสดงว่ามีปริมาณความเข้มข้นของ DNA สายคู่ (double-stranded DNA; dsDNA) เท่ากับ 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ โดยคุณภาพของ DNA พิจารณาจากค่า A_{260}/A_{280} เพื่อประเมินความบริสุทธิ์ของ DNA เทียบกับโปรตีนที่ปนเปื้อนอยู่หลังจากการสกัดแยกตามลำดับโดย DNA ที่มีความบริสุทธิ์สูงจะมีค่า A_{260}/A_{280} เท่ากับ 1.8-1.9 (Kalp. 2002) แต่ถ้าค่าต่ำกว่า 1.8 แสดงว่ามีโปรตีนและฟีนอลปะปนอยู่ในสารละลาย หรือถ้ามากกว่า 1.9 แสดงว่ามี RNA ปนอยู่ในสารละลาย

3.4.1.3 การตรวจวิเคราะห์ DNA โดยการใช้ agarose gel electrophoresis

ซึ่งอะกาโรสชนิดผง 0.5 g เติมสารละลาย 1xTAE buffer จำนวน 50 ml (ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 % เจล; g/ml) ทำให้อะกาโรสละลายด้วยความร้อนโดยใช้เตาไมโครเวฟและทิ้งไว้ให้อุ่น (อุณหภูมิประมาณ 50 °C) เมื่อเริ่มอุ่นจึงเทเจลลงในถาด (tray) และวางหวี (comb) ไว้ทางส่วนบน ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวประมาณ 30- 45 นาที จึงถอดหวีออก จากนั้นนำถาดเจลไปวางบนเครื่องแยกขนาดชิ้นส่วน DNA ด้วยกระแสไฟฟ้าตามแนวราบ เติสารละลาย 1X TAE buffer ลงในเครื่องจนท่วมแผ่นเจล และทำการผสมตัวอย่าง DNA กับสีติดตาม (6x loading dye) ในอัตราส่วน DNA 5 μl ต่อสีติดตาม 2 μl บนกระดาษพาราฟิล์ม และหยอดลงในหลุมบนแผ่นเจล (1 หลุมต่อ 1 ตัวอย่าง) โดยใช้แถบ DNA มาตรฐานเป็น marker และต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องกำเนิดใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ 100 v เป็นเวลา 60 นาที หรือจนสีน้ำเงินของบรอมฟีนอลเคลื่อนที่มาถึงเกือบถึงขอบเจลอีกด้าน คือประมาณ 1-2 cm เมื่อเสร็จสิ้นจึงนำเจลที่ได้ไปแช่น้ำย้อม DNA (ethidium bromide; EtBr 2 mg/ml) ทิ้งไว้เป็นเวลาประมาณ 5-10 นาที ล้างด้วยน้ำเปล่าประมาณ 5 นาที และนำแผ่นเจลที่ได้ไปตรวจสอบภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ต (UV) ด้วยเครื่อง gel photodocumentation system ซึ่งสามารถมองเห็นแถบสีของ DNA ที่ติดสีย้อม ethidium bromide ; EtBr จากนั้นบันทึกภาพและนำไปวิเคราะห์ผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

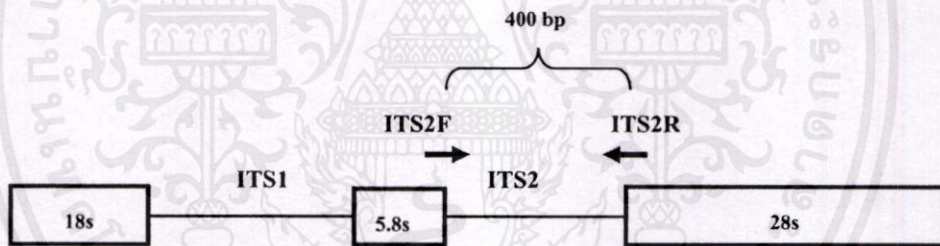
3.4.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นยืน ITS2 ด้วยปฏิกิริยาอุทกโซโพลิเมอเรส (polymerase chain reaction ; PCR)

เป็นขั้นตอนการเพิ่มจำนวน DNA ที่สนใจโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ให้มีจำนวนมากพอเพื่อจำแนกสายพันธุ์ต่อไป โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับ DNA ที่สนใจ ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณปลาย 3' ของ 5.8S rRNA gene และ 5' ของ 28S rRNA gene มาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ เพื่อให้สามารถจับกับ DNA ของแมลงได้ทุกชนิด โดยการออกแบบไพรเมอร์นั้นเลือกใช้ไพรเมอร์ดังตารางที่ 3.2 โดยมีรายละเอียดการทำงานเพื่อเพิ่มปริมาณยืน ITS2 ได้ดังรูปที่ 3.1

ตารางที่ 3.2 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยเทคนิค PCR

Primer	Primer sequence(5'-3')	Melting Temperature (T _m)
ITS2 F	TGCTTGGACTACATATGGTTGA	58 °C
ITS2 R	GTAGTCCCATATGAGTTGAGGT	61 °C

ที่มา: Song *et al.* (2008b)



รูปที่ 3.1 โครงสร้างของ rDNA gene

ที่ประกอบด้วย 18S, 5.8S และ 28S rDNA gene และทั้งสองส่วนของ internal transcribed spacers (ITS1 และ ITS2) ในสิ่งมีชีวิตกลุ่มแมลงวัน รวมทั้งไพรเมอร์ที่ใช้ใน polymerase chain reaction; PCR แสดงตามเครื่องหมายลูกศร และขนาดชิ้นผลิตภัณฑ์ที่ได้ (ดัดแปลงจาก Song *et al.* 2008b)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาอุณหภูมิโพลิเมอเรส ต้องอาศัยสารละลายที่มีส่วนประกอบ และสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมดังนี้ (ตารางที่ 3.3)

1. Initial denaturation อุณหภูมิ 94 ° C นาน 5 นาที 1 รอบ เพื่อเตรียม DNA ดั้งแบบให้แยกเป็น DNA สายเดี่ยวอย่างสมบูรณ์
2. ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณ DNA ที่ต้องการโดยอาศัยปฏิกิริยาอุณหภูมิโพลิเมอเรส ประกอบด้วย

denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 ° C นาน 1 นาที	}	30 รอบ
annealing	ที่อุณหภูมิ 47 ° C นาน 1 นาที		
extension	ที่อุณหภูมิ 72 ° C นาน 45 วินาที		
3. Final extension ที่อุณหภูมิ 72 ° C นาน 10 นาที 1 รอบ
4. เก็บผลิตภัณฑ์ที่ 4 ° C

และทำการเพิ่มปริมาณสาร DNA โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสาร DNA (GeneAmp PCR system 2400; Applied Biosystems[®], USA)

จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาอุณหภูมิโพลิเมอเรส มาตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วย 1 % agarose gel แล้วย้อมแถบ DNA ด้วย ethidium bromide และตรวจดูแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) โดยเปรียบเทียบกับ DNA ที่สกัดได้ กับแถบ DNA มาตรฐาน (100 bp DNA Ladder, Invitrogen[®]) โดยคาดว่าชิ้นผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีขนาดประมาณ 400 bp

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาอุณหภูมิโพลิเมอเรส

สาร	ปริมาณ (μl)
10X <i>Taq</i> buffer	2
2 mM dNTP	2
25mM MgCl ₂	2
10μM forward primer	1
10μM reverse primer	1
<i>Taq</i> DNA polymerase; Invitrogen [®] (5U/μl)	0.2
DNA template (200 ng/μl)	2
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	9.8
รวม	20

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษานานาชาติ ไม่อนุญาตให้ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังเป็นข้อตกลงเบื้องต้น และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.3 การสกัดแยก DNA ออกจากอะกาโรสเจลและการทำให้บริสุทธิ์

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส ด้วย 1 % agarose gel แล้วย้อมแถบ DNA ด้วย ethidium bromide และตรวจดูแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) โดยเปรียบเทียบ DNA ที่สกัดได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสกับแถบ DNA มาตรฐาน และทำการสกัดแยก DNA ที่ต้องการออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์โดยทำตามวิธีในคู่มือของ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN[®]) ดังนี้ โดยเริ่มจากการตัดแถบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส ใส่หลอด microcentrifuge เดิมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจลที่ตัดได้ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกว่าเจลละลายหมด เติม isopropanol (1 เท่าของปริมาตรตัวอย่าง) ปิเปตสารละลายที่ได้ใส่ใน spin column ที่ประกอบด้วยหลอด collection tube ปริมาตร 2 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ที่ซึ่งของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 500 µl แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ที่ซึ่งของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube ออก และเติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 µl ใน spin column และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ที่ซึ่งของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อทำให้ spin column แห้งที่ความเร็วสูงสุดหรือประมาณ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที และย้าย spin column ใส่หลอด microcentrifuge หลอดใหม่ เติม บัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 30 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5-10 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที และทำการตรวจสอบความเข้มข้นของ DNA ที่สกัดได้จากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส ด้วย 1 % agarose gel แล้วย้อมแถบ DNA ด้วย ethidium bromide และตรวจดูแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) โดยเปรียบเทียบ DNA ที่สกัดได้กับแถบ DNA มาตรฐาน

3.4.4 การเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ (ligation)

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ตามขั้นตอนในข้อที่ 3.3.3 มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T (ภาคผนวกที่ 6) โดยใช้อัตราส่วนความเข้มข้นเป็น โมลาร์ (M) ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส ต่อพลาสมิดเวกเตอร์เท่ากับ 3:1 ปฏิกิริยาการเชื่อมต่อ 20 µl ประกอบด้วย 1X Ligation buffer (40 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0.5 mM ATP (pH 7.8 at 25°C)) พลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T 55 ng/µl, T4 DNA Ligase (Fermentas[®]) ความเข้มข้น 5U/µl, ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำสารละลายทั้งหมดผสมให้เข้ากัน และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ส่วนประกอบดังตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 อัตราส่วนของสารในการเชื่อมของ insert DNA เข้ากับ vector (pTZ57R/T)

องค์ประกอบ	ปริมาตร/ปฏิกิริยา (μl)
Insert DNA (50 ng/ μl)	10
Vector (pTZ57R/T) (55 ng/ μl)	1
1X Ligation buffer	2
T ₄ DNA Ligase (5U/μl)	1
ddH ₂ O	6
ปริมาตรรวม	20

3.4.5 การเตรียมเชื้อ *E. coli* DH5α ให้เป็น competent cell

เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* DH5α บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง LB (luria-bertani) บ่มที่อุณหภูมิ 37 ° C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง เชื้อโคโลนีที่ได้มา 1 โคโลนี ใส่ในฟลาสก์ ขนาด 300 ml ที่มีอาหาร SOB (ภาคผนวกที่ 1.3) ปริมาตร 200 ml โดยทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 18 ° C เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลาประมาณ 20 ชั่วโมง นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ให้ได้ค่าประมาณ 0.6 nm (Sambrook *et al.* 1989) จากนั้นทำการถ่ายเชื้อลงหลอดเข็นตรีฟิวซ์ แล้วตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 15 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 ° C เป็นเวลา 10 นาที แล้วทิ้งส่วนใส ละลายตะกอนเบาๆ ด้วยสารละลาย TB ที่แช่เย็น (ภาคผนวกที่ 2.1) ปริมาตร 40 ml จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 10 นาที ทิ้งส่วนใส ละลายตะกอนด้วยสารละลาย TB ที่แช่เย็น (ภาคผนวกที่ 2.1) 10 ml แล้วค่อยๆ เติม DMSO 0.7 ml แล้วตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 10 นาที แบ่ง competent cell ที่ได้ในหลอด microcentrifuge แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -80 ° C

3.4.6 การถ่ายโอน DNA สายผสมเข้าสู่ competent cell *E.coli* DH5α ด้วยวิธี heat shock (Sambrook *et al.* 1989)

นำ competent cell ปริมาตร 100 μl มาตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งนาน 15-30 นาที ปิเปิดสารละลายที่ทำการเชื่อมชิ้นส่วน DNA เป้าหมายเข้ากับพลาสมิดเวคเตอร์ในข้อที่ 3.3.4. ปริมาตร 10 μl ใส่ใน competent cell ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วแช่ค่อน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที กระตุ้นด้วยความร้อน (heat shock) โดยการแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 42 ° C เป็นเวลา 50 วินาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วโดยแช่ทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 3 นาที เติมหาอาหารเลี้ยงเชื้อ LB (ภาคผนวกที่ 1.1) ปริมาตร 900 μl และนำไปบ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 rpm ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 37 ° C เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นนำสารละลายมาเกลี่ย (spread) บนจานเพาะเชื้ออาหารแข็ง LB ที่มี ampicillin 100 μg/ml, Isopropyl-B-D thiogalactoside (IPTG) ความเข้มข้น 0.5 mM และ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside (X-gal) ความเข้มข้น 80 μg/ml จากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ° C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง

3.4.7 การคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานส์ฟอร์ม

คัดเลือกโคโลนีสีขาวโดยการใช้การแสดงผลของยีนที่มีใน DNA พาหะ ได้แก่ ยีนที่ให้ลักษณะต่อต้านต่อยาแอมพิซิลลิน โดยที่ *E. coli* ที่ได้รับการถ่ายทอด DNA พาหะนั้นจะสามารถเจริญได้บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin นอกจากนี้ยังใช้เทคนิค blue/white screening เนื่องจากพลาสมิด pTZ57R/T (Fermentas®) มีบริเวณ *lacZ* gene ที่ทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์ β -galactosidase โดยจะทำการย่อยสาร X-gal เกิดเป็นโคโลนีสีฟ้า แต่พลาสมิดเวกเตอร์ที่ได้รับชิ้นส่วน DNA เข้าไปสอดแทรก จะถูกแยกออกจากกัน จึงไม่สามารถผลิตเอนไซม์ β -galactosidase ที่บริเวณ *lacZ* gene ได้จึงเกิดเป็นโคโลนีสีขาวแทน

3.4.8 การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โคลนด้วยเทคนิค colony PCR

สุ่มเลือกโคโลนีสีขาวมาตรวจสอบโคลนว่ามีชิ้นยีน ITS2 ถูกแทรกสอดสู่พลาสมิดเวกเตอร์ (plasmid vector) ด้วยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยตรงจากโคโลนี มีขั้นตอนดังนี้ เริ่มจากทำเรพลิคา (replica) โคโลนีที่ได้เก็บไว้เป็นเพลทต้นแบบ (master plates) ให้หมายเลขประจำโคโลนี จากนั้นเตรียม colony suspension โดยเขี่ย (pick up) โคโลนีเหล่านี้เป็นต้นแบบ โดยใช้วิธีการตามข้อที่ 3.3.2 ซึ่งประกอบด้วยไพรเมอร์และส่วนผสมดังตารางที่ 3.1 และ 3.2 แต่จะลดปริมาตรรวมเหลือเพียงครึ่งหนึ่งคือ 10 μ l ต่อ 1 ตัวอย่าง หลังจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส เสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์จะทำการตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วย 1 % agarose gel ตามวิธีในข้อ 3.3.1.3 โดยใช้ 100 bp DNA ladder เป็นแถบ DNA มาตรฐานเพื่อตรวจสอบการมีชิ้นส่วนของยีน ITS2 และหลังจากตรวจสอบโคลนว่ามีชิ้นส่วนของยีน ITS2 แล้วจึงเขี่ยโคโลนีที่เก็บไว้จากเพลทต้นแบบมาเลี้ยงในอาหาร LB ปริมาตร 5 ml ที่มี ampicillin 100 μ g/ml จากนั้นนำไปบ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 rpm ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 37 °C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง เพื่อนำมาสกัดพลาสมิด DNA ต่อไป

3.4.9 การสกัดพลาสมิด DNA โดยใช้ QIAprep spin miniprep kit, QIAGEN®

ตกตะกอนเซลล์ที่ได้ในข้อ 3.3.8 โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และทำการสกัดพลาสมิดตามวิธีในคู่มือของ QIAprep spin miniprep kit, QIAGEN® โดยทำการเติมสารละลาย P1 เพื่อ resuspension ปริมาตร 250 μ l แล้วผสมให้เข้ากัน และเติมสารละลาย P2 เพื่อ lysis cell ปริมาตร 250 μ l จากนั้นกลับหลอดไปมา 4-6 ครั้ง เติมน้ำละลาย N3 เพื่อ neutralization ปริมาตร 350 μ l แล้วกลับหลอดไปมา 4-6 ครั้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm (หรือประมาณ 17,900 xg) เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดของเหลวทั้งหมดใส่ใน QIAprep spin column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวที่อยู่

ภายใน collection tube ที่เติม buffer PB เพื่อ wash ปริมาตร 500 μ l แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วทิ้งของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube ที่เติมสารละลาย buffer PE 750 μ l เพื่อล้าง QIAprep spin column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที อีกครั้ง แล้วเทของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube ที่ จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งที่ความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ต่อมาย้าย spin column ไปใส่หลอด microcentrifuge หลอดใหม่ เติม buffer EB ปริมาตร 35 μ l ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 5-10 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นตรวจสอบความเข้มข้นของพลาสมิด DNA ที่สกัดได้ด้วย 1% agarose gel แล้วย้อมแถบ DNA ด้วย ethidium bromide และตรวจดูแถบ DNA ภายใตแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) โดยเปรียบเทียบ DNA ที่สกัดได้กับแถบ DNA มาตรฐาน

3.4.10 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ใช้ไพรเมอร์ M13R (5' GGATAACAATTTTCACACAGG 3') ในด้าน reverse เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS2 gene ซึ่งทำการวิเคราะห์โดยบริษัท 1st BASE DNA sequencing services ประเทศมาเลเซีย หลังจากนั้นทำการตัดเฉพาะบริเวณยีน ITS2 ที่ต้องการด้วยโปรแกรม BioEdit และ ClustalX และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบความเหมือนกับฐานข้อมูลบนอินเทอร์เน็ตด้วยโปรแกรม BLAST (basic local alignment search tools) เป็นโปรแกรมสำหรับการค้นหาบริเวณเฉพาะที่เหมือนกันระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สนใจกับฐานข้อมูลทางพันธุศาสตร์ สามารถเข้าถึงได้ที่ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> จากนั้นจึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบความแตกต่างและเหมือนภายในสายพันธุ์และระหว่างสายพันธุ์ด้วยโปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ความเหมือนระหว่างกลุ่มยีนโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (global alignment) โดยใช้โปรแกรม ClustalW และโปรแกรมที่ติดตั้งเพื่อใช้งานบนคอมพิวเตอร์ระบบวินโดวส์ คือ ClustalX1.83 และ BioEdit เป็นต้น

3.4.11 การวิเคราะห์ความหลากหลายของแมลงวันหลังลายด้วยวิธี PCR-RFLP

เป็นวิธีวิเคราะห์ความหลากหลาย (polymorphism) ของสิ่งมีชีวิตที่สนใจ โดยดูจากความยาวที่แตกต่างกันของ DNA เมื่อผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) โดยจากการเพิ่มจำนวน DNA บริเวณ ITS2 gene ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ specific primer 1 คู่ นั้นนำ DNA ที่ได้ มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Dra*I ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เลือกจากการใช้โปรแกรม NEB Cutter (สามารถเข้าถึงได้ที่ <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>) คู่อำนาจเอนไซม์ที่เหมาะสมและ ทำนายขนาดและจำนวนชิ้น DNA หลังด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยในปฏิบัติการมี ปริมาตรรวม 10 μ l ประกอบด้วย ผลผลิตพีซีอาร์, สารละลาย *Dra*I Buffer (100 mM Tris-HCL, 500

mM NaCl, 100 mM MgCl₂, 10 mM Dithioerythritol, pH 7.5 ที่อุณหภูมิ 37° C), เอนไซม์ตัดจำเพาะ *DraI* ความเข้มข้น 10 U/ μ l และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น โดยใช้อัตราส่วนตามตารางที่ 3.5 จากนั้นนำไปบ่มที่ 37° C เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง และตรวจสอบขนาดและจำนวนชิ้น DNA ที่ผ่านการตัดเอนไซม์ด้วย 8 % native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) แล้วย้อมเจล ด้วย ethidium bromide และตรวจดูแถบ DNA ภายใตแสงอัลตราไวโอเล็ต

ตารางที่ 3.5 อัตราส่วนของสารในการย่อยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ด้วย restriction enzyme (*DraI* enzyme)

องค์ประกอบ	ปริมาตร/ปฏิกิริยา (μ l)
<i>DraI</i> Buffer	1
<i>DraI</i> enzyme (10 U/ μ l)	0.3
PCR product (400 ng/ μ l)	6
ddH ₂ O	2.7
ปริมาตรรวม	10

3.4.11.1 ขั้นตอนการเตรียม electrophoresis (PAGE)

ประกอบชุดอุปกรณ์ และทดสอบการรั่วของอุปกรณ์โดยใช้น้ำฉีดเข้าไปในช่องว่างระหว่างกระจกทั้งสองแผ่น เทส่วนผสม 8 % native polyacrylamide gel (ภาคผนวกที่ 5.4) ลงในแผ่นกระจก ใต้วี (comb) เพื่อทำหลุมแล้วทิ้งให้เจตเกิด polymerization ประมาณ 1 ชั่วโมงเมื่อเกิด polymerization นำหัวออก นำแผ่นเจลใต้วีลงใน tank รั้นเจล เติม 0.5×TBE buffer ใน electrophoresis chamber ด้านในจนท่วม ด้านนอกประมาณ ½ หรือพอท่วมเส้นลวด หยอดสารละลาย DNA มาตรฐานของ Fermentus[®] 1 μ l ผสมกับ 6x loading dye 2 μ l และหยอด DNA ตัวอย่าง 5 μ l ผสมกับ 6x loading dye 2 μ l ลงในแต่ละหลุม ปิดฝาครอบอุปกรณ์โดยต่อสายไฟจาก power supply สู้ขั้วไฟฟ้าให้ถูกต้อง ตั้ง power supply 100 v เป็นเวลา 20 นาทีเพื่อไล่เศษตะกอนก่อนรันจริง จากนั้นทำการโหลดตัวอย่าง DNA แล้วตั้งเวลาไว้เป็นเวลา 75 นาที สังเกตการเดินทางของสารละลาย DNA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.12 การวิเคราะห์และหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแมลงวันหลังลาย

3.4.12.1 การวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล (Similarity with database sequence)

วิเคราะห์โคลนที่ได้ว่ามีค่าความเหมือนหรือคล้ายคลึงกับ DNA ของแมลงวันชนิดใดในฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม BLASTN (Basic Local Alignment Search Tools) จากฐานข้อมูล NCBI ในอินเทอร์เน็ตที่ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) เพื่อใช้ในการหาค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงหรือความเหมือน (% identities) จากนั้นจึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบ (alignment) ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของแมลงวันหลังลายความแตกต่างและความเหมือนภายในสายพันธุ์และระหว่างสายพันธุ์ด้วยโปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ความเหมือนระหว่างกลุ่มยีนแบบเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (global alignment) โดยใช้โปรแกรมที่ติดตั้งเพื่อใช้งานบนคอมพิวเตอร์ระบบวินโดวส์ คือ ClustalX1.83, BioEdit และ GeneDoc version 2.7.000 เป็นต้น

3.4.12.2 การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแมลงวันหลังลายด้วยแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม (Phylogenetic tree analysis)

นำผลการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ reference sequence มาทำการเปรียบเทียบความเหมือน (multiple alignments) โดยโปรแกรม ClustalX และ GeneDoc และสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม ด้วยโปรแกรม MEGA 4.1 (beta3) (<http://www.megasoftware.net/>; Tamura *et al.* 2007) โดยวิธี distance matrix ด้วย algorithm แบบ Neighbor-Joining method และกำหนดแบบจำลองของการแทนที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide substitution) แบบ Kimura-2-parameter model เพื่อพิจารณาถึงความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งรวมอยู่ในโปรแกรม MEGA 4.1 (beta3) ทดสอบความน่าเชื่อถือทางสถิติของการสร้างต้นไม้อัตโนมัติด้วย bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ

3.4.13 การขึ้นทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์ (Database submission)

ทำการขอเลขทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์ของประชากรแมลงวันหลังลายที่ได้จากการศึกษา (accession number) กับฐานข้อมูล NCBI ในอินเทอร์เน็ตที่เวปไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/?tool=genbank>

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้ใช้ข้อมูลทางด้านชีวสารสนเทศที่มีฐานข้อมูลทางด้าน DNA ดังกล่าวอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด และมีการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับเอกสารนี้เป็นเอกสารที่ช่วยในการให้บริการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้างานวิจัยในครั้งนี้นี้ ดังนี้

1. BlastN ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจสอบความเหมือนหรือการซ้ำกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) ที่ใช้ในการศึกษาเมื่อเทียบกับฐานข้อมูลทั้งหมด ซึ่งผลการ

ตรวจสอบความเหมือนที่ได้รับจากโปรแกรม BlastN ที่ถูกต้องนั้นจะถูกตัดสินผ่านการวิเคราะห์ทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยคิดจากค่าคะแนน (scoring) ของ random hits และโปรแกรม Primer-BLAST เพื่อหาข้อมูลและความเหมือนจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่ใช้ โดยสามารถเข้าถึงได้ที่ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHomeAd

2. โปรแกรม The Bio-Web Sequence Cleaner เพื่อจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA ไม่ให้มีช่องว่าง (space), tab, ตัวเลข หรือ แม้กระทั่งเปลี่ยนอักษรตัวเล็กเป็นตัวใหญ่ในลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการ ได้ที่ http://www.cellbiol.com/scripts/cleaner/sequence_cleaner.html

3. โปรแกรม Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator เพื่อคำนวณค่า Tm (melting temperature) ของ primer ที่ออกแบบ, ตรวจสอบการเกิด self-complementarity ของ primer ที่ออกแบบ โดยสามารถเข้าถึงได้ที่ <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html> เป็นต้น

4. โปรแกรม NEBcutter V2.0 สำหรับหาดำแหน่งตัดและทำนายขนาดของนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยเข้าถึงได้ที่ <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>

5. โปรแกรม BankIt เพื่อเพิ่มข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ออนไลน์เข้าไปในฐานข้อมูล GenBank โดยสามารถเพิ่มได้ที่ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/?tool=genbank>

6. โปรแกรมเปรียบเทียบความเหมือนโดยทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทั้งหมด เช่นโปรแกรม Clustal W2 สำหรับวิเคราะห์ความเหมือนระหว่างกลุ่มอื่น โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนหรือเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด เข้าถึงการใช้งานได้ที่ <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html> และใช้โปรแกรมที่ติดตั้งเพื่อใช้งานในระบบวินโดวส์ คือ ClustalX1.83, BioEdit เพื่อปรับแก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์ เป็นต้น

7. โปรแกรม MEGA 4.1 (beta3) (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software V 4.1) เป็นลักษณะโปรแกรมที่ใช้งานได้โดยไม่เสียค่าบริการ โดยโปรแกรม MEGA 4.1 (beta3) ได้รวบรวมเอาความสามารถและแอปพลิเคชัน ต่าง ๆ เช่น ClustalW ซึ่งช่วยในการศึกษาเปรียบเทียบสายลำดับนิวคลีโอไทด์หรือกรดอะมิโนหลายสายในครั้งเดียว (computational sequence alignment) และวิธีในการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้หลากหลายวิธี เช่น distance matrix, parsimony และ likelihood โดยโปรแกรมจะอนุญาตให้ผู้ใช้งานสามารถกำหนดค่า พารามิเตอร์ได้ตามต้องการ นอกจากนี้ยังสามารถเชื่อมต่อไปยังเว็บไซต์ฐานข้อมูลชีวสารสนเทศได้โดยผ่านทางอินเตอร์เน็ตเบราว์เซอร์ โดยการติดตั้งโปรแกรม MEGA4.1 (beta3) นั้นสามารถเข้าถึงได้ที่ <http://www.megasoftware.net/features.html>. (Tamura *et al.* 2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

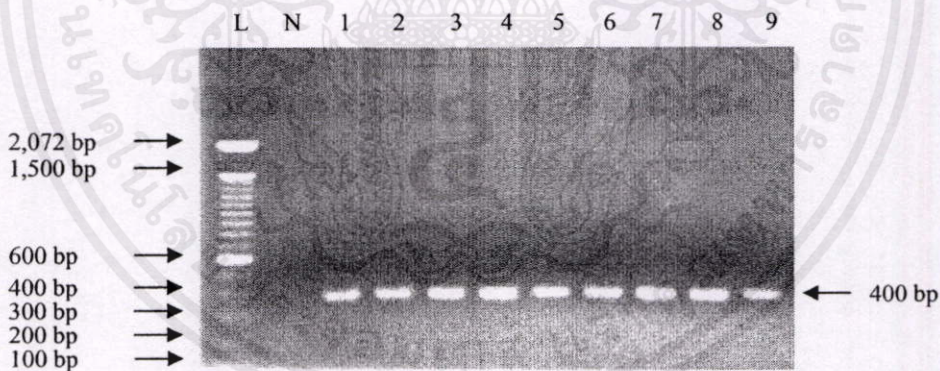
บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นยืน ITS2

4.1.1 ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นยืน ITS2 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR)

จากการเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายของชิ้นยืน ITS2 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ทั้งหมด 11 ปฏิกิริยา (20 μ l ต่อ 1 ปฏิกิริยา) โดยใช้ genomic DNA จากแมลงวันหลังลายทั้งหมด 10 ตัวอย่างที่ได้จากการสกัดในข้อ 3.3.1 เป็น DNA ด้นแบบ และใช้ไพรเมอร์ ITS2 F (5' TGCTTGACTACATATGGTTGA 3') และ ITS2 R (5' GTAGTCCCATATGAGTTGAGGT 3') จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย 1 % agarose gel ให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ คงที่ 100 V/cm เป็นเวลา 50 นาที แล้วนำเจลมาตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต เปรียบเทียบ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสกับ DNA มาตรฐาน 100 bp DNA Ladder, Invitrogen[®]) พบว่าปรากฏแถบ DNA ที่ขนาดประมาณ 400 bp (รูปที่ 4.1)

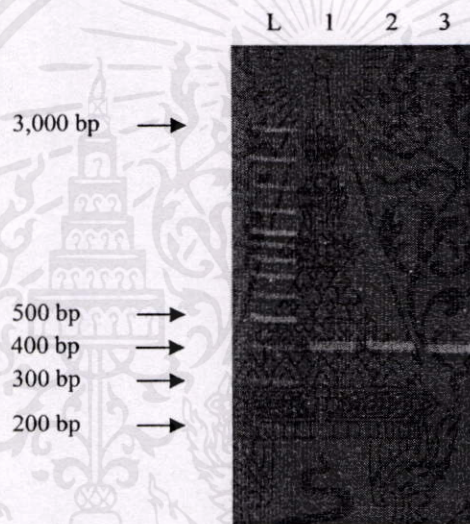


รูปที่ 4.1 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสที่ได้จากการตรวจสอบชิ้นยืน ITS2 ทำการตรวจสอบด้วย 1 % agarose gel

Lane L คือ DNA มาตรฐาน (100 bp DNA Ladder, Invitrogen[®]) Lane N คือ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อเป็น DNA ด้นแบบ และ Lane ที่ 1-9 คือ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสของ ชิ้นยืน ITS2 ของแมลงวันหลังลายทั้ง 9 ตัวอย่าง ได้แก่ SdA1, SdA2, SdL1, SpL1, SpA1, SpL2, SrA1, SrA2 และ SrL1 ตามลำดับ

4.1.2 ผลการทำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสให้บริสุทธิ์

สกัดชิ้น DNA ตัวอย่างโดยการตัดแถบ DNA ที่มีขนาดที่ต้องการ (~400 bp) ออกจากเจล แล้วนำมาสกัดแยก DNA ออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด QIAquick gel extraction kit (QIAGEN®) เพื่อกำจัดแถบ DNA ที่ไม่จำเพาะหรือสิ่งปนเปื้อนออกจากแถบ DNA ที่ต้องการ แล้วทำการตรวจสอบด้วย 1 % agarose gel โดยให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 100 V/cm เป็นเวลา 50 นาที แล้วย้อมแถบ DNA ด้วย ethidium bromide และตรวจดูแถบ DNA ที่ทำให้บริสุทธิ์ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) โดยเปรียบเทียบกับแถบ DNA มาตรฐาน 100 bp DNA Ladder, Fermentas® พบว่าปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส มีขนาดประมาณ 400 bp ซึ่งมีขนาดเท่ากับขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสก่อนการทำให้บริสุทธิ์ (รูปที่ 4.2)



รูปที่ 4.2 ผลจากการทำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสให้บริสุทธิ์ และตรวจสอบด้วย 1 % agarose gel

Lane L คือ DNA มาตรฐาน (100 นาโนกรัม 100 bp DNA Ladder, Fermentas®) และ Lane ที่ 1-3 คือ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสที่ทำให้บริสุทธิ์ ของตัวอย่างแมลงวันทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ SdA1, SpL1 และ SrA1 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 ผลการโคลนผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรส เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T และ การถ่ายโอนพลาสมิด DNA ถูกผสมเข้าสู่ Competent cell *E.coli* DH5 α ด้วยวิธี chemical transformation (Sambrook *et al.* 1989)

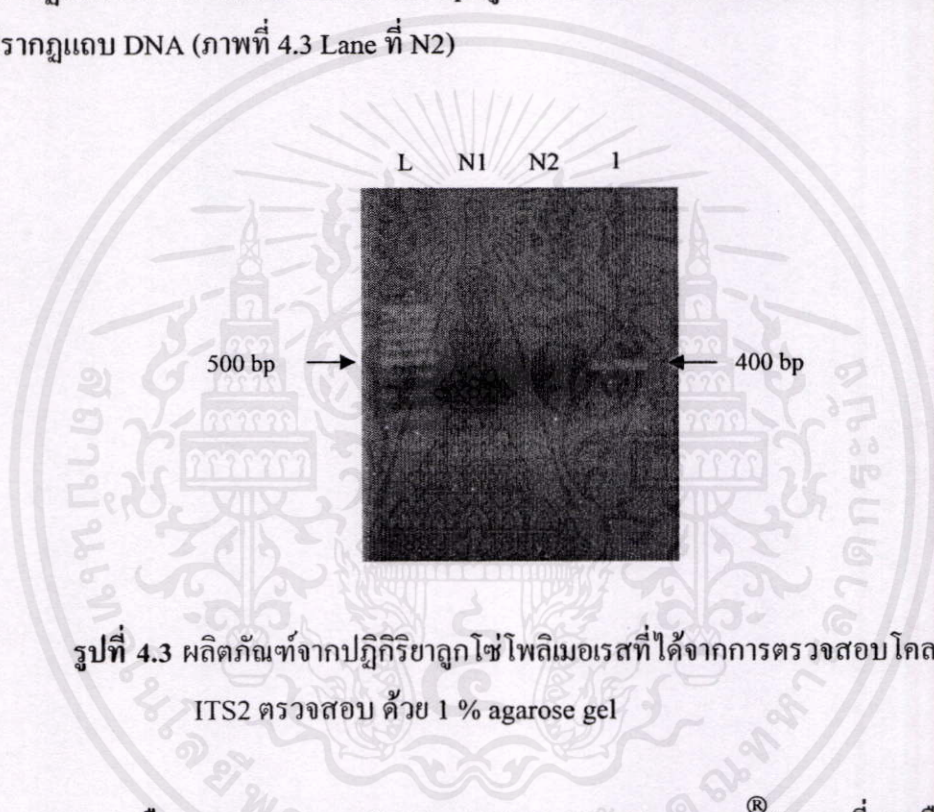
จากการนำชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรสที่ได้จากไพรเมอร์ ITS2 F และ ITS2 R ที่มีขนาดประมาณ 400 bp และผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาเชื่อมต่อเข้ากับ พลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T (Fermentas[®]) โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้านปลายมีการเติมเบส A (adenine) เนื่องมาจากการทำงานของ *Taq* polymerase ในปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรสซึ่งสามารถเชื่อมต่อกับปลาย T (thymine) ของพลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T ได้ และการเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์อาศัยเอนไซม์ T₄ DNA ligase และใช้อัตราส่วนความเข้มข้นเป็นโมลลาร์ โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรส ต่อพลาสมิดเวกเตอร์เท่ากับ 3:1 จากนั้นนำพลาสมิดที่ถูกผสมที่ได้ทั้งหมดมาทำการทรานสฟอร์มเข้าสู่ competent cell *E. coli* DH5 α ด้วยวิธี chemical transformation และคัดเลือกโคโลนีสีขาวที่เจริญบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ LB ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin, X-gal และ IPTG เนื่องจากพลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T นั้นมียีนต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ ampicillin และมี *LacZ* gene ที่ทำหน้าที่เป็นยีนคัดเลือก หรือ selective gene สำหรับการทำงานของ *lacZ* gene นั้นจะถูกชักนำด้วย IPTG ให้ผลิตเอนไซม์ β -galactosidase เพื่อย่อย substrate X-gal ได้เป็นตะกอนสีฟ้า ทำให้ได้โคโลนีสีฟ้า หากพลาสมิดที่ถูกผสมที่มีการเชื่อมต่อกับผลิตภัณฑ์ที่ต้องการกับพลาสมิดเวกเตอร์ จะไปหยุดการแสดงออกของ *LacZ* gene ทำให้ได้โคโลนีเป็นสีขาว ดังนั้นจึงใช้ blue/white screening จึงเป็นวิธีในการตรวจสอบยืนยันเป้าหมาย จากนั้นจึงสุ่มคัดเลือกโคโลนีสีขาวที่คาดว่ามิผลผลิตจากปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรส ที่ต้องการมาเก็บไว้เป็นเพลทต้นแบบ (master plates) และให้หมายเลขประจำโคโลนีเพื่อตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โคลนด้วยเทคนิค colony PCR ในขั้นตอนต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการวิเคราะห์ และตรวจสอบ DNA สายผสม

4.2.1 ผลการวิเคราะห์โคลนที่มี DNA สายผสมด้วยเทคนิค colony PCR

จากการวิเคราะห์โคลนที่มี DNA สายผสมด้วยการทำปฏิกิริยาถูกลูโซโพลีเมอเรสโดยตรงจากโคโลนี โดยเขี่ย (pick up) โคโลนีเหล่านี้มาใช้เป็น DNA ต้นแบบ และใช้ ITS2 F และ ITS2 R เป็นคู่ไพรเมอร์ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย 1 % agarose gel โดยให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 100 v/cm เป็นเวลา 50 นาที แล้วนำเจลมาตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ที่ได้กับ DNA มาตรฐาน 100 bp DNA Ladder พบว่าโคลนที่มีขึ้นยีน ITS2 จะปรากฏแถบ DNA ที่ขนาดประมาณ 400 bp (รูปที่ 4.3 Lane ที่ 1) แต่โคลนที่ไม่มีขึ้นยีน ITS2 จะไม่ปรากฏแถบ DNA (ภาพที่ 4.3 Lane ที่ N2)

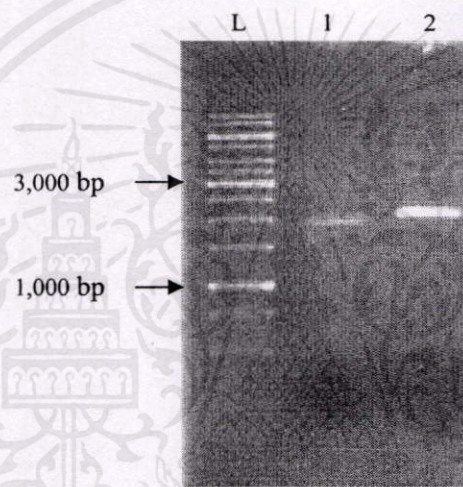


รูปที่ 4.3 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาถูกลูโซโพลีเมอเรสที่ได้จากการตรวจสอบ โคลนที่มีขึ้นยีน ITS2 ตรวจสอบ ด้วย 1 % agarose gel

Lane L คือ DNA มาตรฐาน (100 bp DNA Ladder, Fermentas[®]) Lane ที่ N1 คือผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาถูกลูโซโพลีเมอเรส ที่ใช้น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อเป็น DNA ต้นแบบ, Lane ที่ N2 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากโคลนที่ไม่มีขึ้นยีน ITS2 และ Lane ที่ 1 คือ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากโคลนที่มีขึ้นยีน ITS2

4.2.2 ผลการสกัดพลาสมิด DNA

จากการนำโคลนีสีขาวการวิเคราะห์ในข้อที่ 4.2.1 มาเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ทำการเก็บเซลล์และนำตะกอนเซลล์ที่ได้มาสกัดพลาสมิด DNA ด้วยชุด QIAprep spin miniprep kit, QIAGEN[®] และนำพลาสมิด DNA ที่สกัดได้มาตรวจสอบด้วย 1% agarose gel โดยให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 100 v/cm เป็นเวลา 50 นาที แล้วนำเจลมาตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต และเปรียบเทียบพลาสมิด DNA ที่ได้กับ DNA มาตรฐาน (1 kb DNA Ladder, Fermentas[®]) ได้ผลดัง รูปที่ 4.4 จากนั้นนำพลาสมิด DNA ที่สกัดได้ความเข้มข้นประมาณ 200 ng/ μl ปริมาตร 15 μl ไปวิเคราะห์โดยบริษัท 1st BASE DNA sequencing services ประเทศมาเลเซีย



รูปที่ 4.4 พลาสมิด DNA ลูกผสมที่ได้จากการสกัดด้วยชุดสกัดพลาสมิด QIAprep spin miniprep kit, QIAGEN[®] ทำการตรวจสอบด้วย 1% agarose gel

Lane L คือ DNA มาตรฐาน (1 kb DNA Ladder, Fermentas[®]) Lane ที่ 1 คือ พลาสมิด DNA ที่ไม่มีชิ้นยีน ITS2 และ Lane ที่ 2 คือพลาสมิด DNA ที่มีชิ้นยีน ITS2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายของแมลงวันหลังลายด้วยวิธี PCR-RFLP

การทดลองนี้ใช้โปรแกรม NEB Cutter (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>) เพื่อทำนายชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีตำแหน่งตัดภายในบริเวณยีน ITS2 และเพื่อทำนายขนาดจำนวนชิ้น DNA และรูปแบบของ RFLP ที่ได้ โดยพบว่าหลังจากศึกษาตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะและทดสอบด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *DraI* พบว่าได้รูปแบบและความยาวของนิวคลีโอไทด์ที่ตัดแตกต่างกัน ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ขนาดชิ้น DNA ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ชนิด *DraI* ที่ทำนายโดยใช้โปรแกรม NEB Cutter

สายพันธุ์ของแมลงวันหลังลาย	<i>DraI</i> digestion
<i>S. dux</i>	49, 79 และ 273 bp
<i>S. ruficornis</i>	79, 100 และ 215 bp
<i>S. peregrina</i>	85 และ 316 bp

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ในข้อ 4.1.1 นำมาวิเคราะห์ความหลากหลายของขนาด DNA ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *DraI* และตรวจสอบขนาดและจำนวนชิ้น DNA ที่ผ่านการตัดเอนไซม์ด้วย 8 % native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) โดยให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 100 V/cm เป็นเวลา 75 นาที แล้วย้อมเจดด้วย ethidium bromide และตรวจดูแถบ DNA ภายใตแสงอัลตราไวโอเล็ต โดยเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะกับ DNA มาตรฐาน 25 bp DNA Ladder (รูปที่ 4.5)



รูปที่ 4.5 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *DraI* ตรวจสอบด้วย 8 % native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

Lane L คือ DNA มาตรฐาน (25 bp DNA Ladder, Fermentas[®]) และ Lane ที่ 1-3 คือ ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ของแมลงวันหลังลายสายพันธุ์ *S. dux*, *S. ruficornis* และ *S. perigrina* ตามลำดับ และ Lane ที่ 4-6 คือผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ของแมลงวันหลังลายสายพันธุ์ *S. dux*, *S. ruficornis* และ *S. perigrina* ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *DraI* ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลวิเคราะห์และหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของแมลงวันหลังลาย

4.4.1 ผลการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล (Similarity with database sequence)

ทำการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของแมลงวันหลังลายที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ M13R (5' GGATAACAATTCACACAGG 3') ในด้าน reverse เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ITS2 ซึ่งทำการวิเคราะห์โดยบริษัท 1st BASE DNA sequencing services ประเทศมาเลเซีย หลังจากนั้นทำการตัดเฉพาะบริเวณยีน ITS2 ที่ต้องการด้วยโปรแกรม BioEdit และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบความเหมือนกับฐานข้อมูลบนอินเทอร์เน็ตด้วยโปรแกรม BLAST (basic local alignment search tools; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) เป็นโปรแกรมสำหรับการค้นหาลำดับเบสที่สนใจกับฐานข้อมูลทางพันธุศาสตร์บนระบบอินเทอร์เน็ต พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงหรือเหมือน (% identities) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันหลังลายโดย *Sarcophaga dux* (GQ424203, GQ424204, GQ424205) เหมือนกับ EF061819.1 มีค่า identities ที่ 98 %; *Sarcophaga perigrina* (GQ424206, GQ424207, GQ424208) เหมือน EF061846.1 มีค่า identities ที่ 97 %; *Sarcophaga ruficornis* (GQ4242012, GQ4242015, GQ4242016) เหมือน EU306661.1 มีค่า identities ที่ 100 % และเหมือน EF061832.1 มีค่า identities ที่ 99 % จากผลการทดลองพบว่าลำดับเบสบริเวณต้นและปลายยีนคือ 5' TGCTTGACTACATATGGTTGAGGGTTGTA 3' เป็นส่วนปลาย 3' ของ 5.8S rDNA และ 5' TATACAACCTCAACTCATATGGGACTAC 3' เป็นส่วนต้น 5' ของ 28S rDNA

4.4.2 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน ITS2 ของแมลงวันหลังลาย

จากนั้นจึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบ (alignment) ความแตกต่างและความเหมือนภายในสายพันธุ์และระหว่างสายพันธุ์ด้วยโปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ความเหมือนระหว่างกลุ่มยีนแบบเปรียบเทียบลำดับเบสทั้งหมด (global alignment) โดยใช้โปรแกรมที่ติดตั้งเพื่อใช้งานบนคอมพิวเตอร์ระบบวินโดวส์โดยใช้โปรแกรม BioEdit จัดการลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยการปรับแก้และรวมสาย DNA ที่ได้จากการ sequencing ซึ่งในกรณีนี้คือการจัดการลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการโคลนยีนเข้าสู่เวกเตอร์ และใช้โปรแกรม BioEdit สำหรับการหาตำแหน่งของไพรเมอร์หาตำแหน่งของยีน และตัดส่วนที่ไม่ใช่ยีนออก จากนั้นทำการปรับแก้ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ชัดเจนออก และปรับสาย DNA ที่ได้ให้เป็นสาย 5' ไป 3' จึงเก็บข้อมูลของสาย DNA ที่ได้ในรูปแบบ .tex และ .fasta (โดยแต่ละโคลนของแมลงวันแสดงตามตารางที่ 4.2) และใช้โปรแกรม Clustal W2 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด ซึ่งเป็นโปรแกรมสำหรับใช้งานบน

อินเทอร์เน็ตที่ <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html> เพื่อดูความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ และทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากแมลงวันหลังถ่ายแต่ละสายพันธุ์ ว่ามีความเหมือนหรือคล้ายคลึงกันของนิวคลีโอไทด์ภายในและระหว่างสายพันธุ์ โดยแสดงผล ดังรูป 4.6, 4.7 และ 4.8

ตารางที่ 4.2 รหัสโคลนของแมลงวันหลังถ่ายที่ได้จากการ sequencing

รหัสแมลงวัน	รหัสโคลน
SdA1	SdA1 clone1 และ SdA1 clone2
SdA2	SdA2 clone1 และ SdA2 clone2
SdL1	SdL1 clone1 และ SdL1 clone2
SpL1	SpL1 clone1 และ SpL1 clone2
SpA1	SpA1 clone1 และ SpA1 clone2
SpL2	SpL2 clone1 และ SpL2 clone2
SrA1	SrA1 clone1 และ SrA1 clone2
SrA2	SrA2 clone1 และ SrA2 clone2
SrL1	SrL1 clone1 และ SrL1 clone2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

SdA1 clone1	TGCTGGACTACATATGGTTGAGGGTTGTAAGACTATGCTAAAAAAGTTGCTTAATAATATTAATAAAATTTAAAGCACATATGTTACTG
SdA2 clone1	TGCTGGACTACATATGGTTGAGGGTTGTAAGACTATGCTAAAAAAGTTGCTTAATAATATTAATAAAATTTAAAGCACATATGTTACTG
SdA1 clone2	TGCTGGACTACATATGGTTGAGGGTTGTAAGACTATGCTAAAAAAGTTGCTTAATAATATTAATAAAATTTAAAGCACATATGTTACTG
SdL1 clone1	TGCTGGACTACATATGGTTGAGGGTTGTAAGACTATGCTAAAAAAGTTGCTTAATAATATTAATAAAATTTAAAGCACATATGTTACTG
SdL1 clone2	TGCTGGACTACATATGGTTGAGGGTTGTAAGACTATGCTAAAAAAGTTGCTTAATAATATTAATAAAATTTAAAGCACATATGTTACTG
SdA2 clone2	TGCTGGACTACATATGGTTGAGGGTTGTAAGACTATGCTAAAAAAGTTGCTTAATAATATTAATAAAATTTAAAGCACATATGTTACTG
Clustal Consensus	TGCTGGACTACATATGGTTGAGGGTTGTAAGACTATGCTAAAAAAGTTGCTTAATAATATTAATAAAATTTAAAGCACATATGTTACTG
SdA1 clone1	GATACTTTTCTATAAAGTGTATAAATACTAAATAGCTAAAGATACAAAACTCTCAAAATGAATAAAAAATCAGAGTATTTATAATAATTCACAGAAGTATAT
SdA2 clone1	GATACTTTTCTATAAAGTGTATAAATACTAAATAGCTAAAGATACAAAACTCTCAAAATGAATAAAAAATCAGAGTATTTATAATAATTCACAGAAGTATAT
SdA1 clone2	GATACTTTTCTATAAAGTGTATAAATACTAAATAGCTAAAGATACAAAACTCTCAAAATGAATAAAAAATCAGAGTATTTATAATAATTCACAGAAGTATAT
SdL1 clone1	GATACTTTTCTATAAAGTGTATAAATACTAAATAGCTAAAGATACAAAACTCTCAAAATGAATAAAAAATCAGAGTATTTATAATAATTCACAGAAGTATAT
SdL1 clone2	GATACTTTTCTATAAAGTGTATAAATACTAAATAGCTAAAGATACAAAACTCTCAAAATGAATAAAAAATCAGAGTATTTATAATAATTCACAGAAGTATAT
SdA2 clone2	GATACTTTTCTATAAAGTGTATAAATACTAAATAGCTAAAGATACAAAACTCTCAAAATGAATAAAAAATCAGAGTATTTATAATAATTCACAGAAGTATAT
Clustal Consensus	GATACTTTTCTATAAAGTGTATAAATACTAAATAGCTAAAGATACAAAACTCTCAAAATGAATAAAAAATCAGAGTATTTATAATAATTCACAGAAGTATAT
SdA1 clone1	AAATAAATCTTTTTTATTGAGGAAGGCTAGCATAAAAATAATTTTATGAACCTAGAAATGCCTCTTTAAATAAAAGGATTTTTTTTATTGTTATAAAA
SdA2 clone1	AAATAAATCTTTTTTATTGAGGAAGGCTAGCATAAAAATAATTTTATGAACCTAGAAATGCCTCTTTAAATAAAAGGATTTTTTTTATTGTTATAAAA
SdA1 clone2	AAATAAATCTTTTTTATTGAGGAAGGCTAGCATAAAAATAATTTTATGAACCTAGAAATGCCTCTTTAAATAAAAGGATTTTTTTTATTGTTATAAAA
SdL1 clone1	AAATAAATCTTTTTTATTGAGGAAGGCTAGCATAAAAATAATTTTATGAACCTAGAAATGCCTCTTTAAATAAAAGGATTTTTTTTATTGTTATAAAA
SdL1 clone2	AAATAAATCTTTTTTATTGAGGAAGGCTAGCATAAAAATAATTTTATGAACCTAGAAATGCCTCTTTAAATAAAAGGATTTTTTTTATTGTTATAAAA
SdA2 clone2	AAATAAATCTTTTTTATTGAGGAAGGCTAGCATAAAAATAATTTTATGAACCTAGAAATGCCTCTTTAAATAAAAGGATTTTTTTTATTGTTATAAAA
Clustal Consensus	AAATAAATCTTTTTTATTGAGGAAGGCTAGCATAAAAATAATTTTATGAACCTAGAAATGCCTCTTTAAATAAAAGGATTTTTTTTATTGTTATAAAA
SdA1 clone1	TGATAAAGAAAATGATTTTGTTCAGAGGTTTATTGTTATTTAAGAAAATTTTAAAAATATAATGTTATACAACTCAACTATGGGACTAC
SdA2 clone1	TGATAAAGAAAATGATTTTGTTCAGAGGTTTATTGTTATTTAAGAAAATTTTAAAAATATAATGTTATACAACTCAACTATGGGACTAC
SdA1 clone2	TGATAAAGAAAATGATTTTGTTCAGAGGTTTATTGTTATTTAAGAAAATTTTAAAAATATAATGTTATACAACTCAACTATGGGACTAC
SdL1 clone1	TGATAAAGAAAATGATTTTGTTCAGAGGTTTATTGTTATTTAAGAAAATTTTAAAAATATAATGTTATACAACTCAACTATGGGACTAC
SdL1 clone2	TGATAAAGAAAATGATTTTGTTCAGAGGTTTATTGTTATTTAAGAAAATTTTAAAAATATAATGTTATACAACTCAACTATGGGACTAC
SdA2 clone2	TGATAAAGAAAATGATTTTGTTCAGAGGTTTATTGTTATTTAAGAAAATTTTAAAAATATAATGTTATACAACTCAACTATGGGACTAC
Clustal Consensus	TGATAAAGAAAATGATTTTGTTCAGAGGTTTATTGTTATTTAAGAAAATTTTAAAAATATAATGTTATACAACTCAACTATGGGACTAC

รูปที่ 4.6 ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของยีน ITS2 ของแมลงวันหลังลายสายพันธุ์ *S. dux*

จากรูปที่ 4.6 แสดงผลการเปรียบเทียบความเหมือนของยีน ITS2 ของแมลงวันหลังลายสายพันธุ์ *S. dux* โดยมีรหัสโคดอนของแมลงวันหลังลายที่ได้จาก การ sequencing ดังตารางที่ 4.2 และจากรูปแสดงถึงลำดับเบสที่อนุรักษ์ (clustal consensus)

SrL1 clone1 TGCTGGACTACATATGGTTGAGGGTTGTAAGACTATGCTAAAAAAGTTCCTAAATTAATTTTATATGAAATTAAGTAAAGCACATATGTAATTACTG
SrL1 clone2 TGCTGGACTACATATGGTTGAGGGTTGTAAGACTATGCTAAAAAAGTTCCTAAATTAATTTTATATGAAATTAAGTAAAGCACATATGTAATTACTG
SrA2 clone2 TGCTGGACTACATATGGTTGAGGGTTGTAAGACTATGCTAAAAAAGTTCCTAAATTAATTTTATATGAAATTAAGTAAAGCACATATGTAATTACTG
SrA1 clone1 TGCTGGACTACATATGGTTGAGGGTTGTAAGACTATGCTAAAAAAGTTCCTAAATTAATTTTATATGAAATTAAGTAAAGCACATATGTAATTACTG
SrA1 clone2 TGCTGGACTACATATGGTTGAGGGTTGTAAGACTATGCTAAAAAAGTTCCTAAATTAATTTTATATGAAATTAAGTAAAGCACATATGTAATTACTG
SrA2 clone1 TGCTGGACTACATATGGTTGAGGGTTGTAAGACTATGCTAAAAAAGTTCCTAAATTAATTTTATATGAAATTAAGTAAAGCACATATGTAATTACTG
Clustal Consensus TGCTGGACTACATATGGTTGAGGGTTGTAAGACTATGCTAAAAAAGTTCCTAAATTAATTTTATATGAAATTAAGTAAAGCACATATGTAATTACTG

SrL1 clone1 GATAATTTTATAAAAGTGTTCAATGACTAAATCTAATAAGATACAAAACCTCTCAAAATGAATTAATAAAATCAGAGTATTTATAAAATTCACCTAAAATGTGAAA
SrL1 clone2 GATAATTTTATAAAAGTGTTCAATGACTAAATCTAATAAGATACAAAACCTCTCAAAATGAATTAATAAAATCAGAGTATTTATAAAATTCACCTAAAATGTGAAA
SrA2 clone2 GATAATTTTATAAAAGTGTTCAATGACTAAATCTAATAAGATACAAAACCTCTCAAAATGAATTAATAAAATCAGAGTATTTATAAAATTCACCTAAAATGTGAAA
SrA1 clone1 GATAATTTTATAAAAGTGTTCAATGACTAAATCTAATAAGATACAAAACCTCTCAAAATGAATTAATAAAATCAGAGTATTTATAAAATTCACCTAAAATGTGAAA
SrA1 clone2 GGTAATTTTATAAAAGTGTTCAATGACTAAATCTAATAAGATACAAAACCTCTCAAAATGAATTAATAAAATCAGAGTATTTATAAAATTCACCTAAAATGTGAAA
SrA2 clone1 GATAATTTTATAAAAGTGTTCAATGACTAAATCTAATAAGATACAAAACCTCTCAAAATGAATTAATAAAATCAGAGTATTTATAAAATTCACCTAAAATGTGAAA
Clustal Consensus GATAATTTTATAAAAGTGTTCAATGACTAAATCTAATAAGATACAAAACCTCTCAAAATGAATTAATAAAATCAGAGTATTTATAAAATTCACCTAAAATGTGAAA

SrL1 clone1 AATAAATAAATCTTTTTTATGAGGAAGGCTAGCATAAAAAATAATTTTATGAACTAGAAATGCCCTTTTAAATAAAAAGAAATTTTTTTAAAAACAG
SrL1 clone2 AATAAATAAATCTTTTTTATGAGGAAGGCTAGCATAAAAAATAATTTTATGAACTAGAAATGCCCTTTTAAATAAAAAGAAATTTTTTTAAAAACAG
SrA2 clone2 AATAAATAAATCTTTTTTATGAGGAAGGCTAGCATAAAAAATAATTTTATGAACTAGAAATGCCCTTTTAAATAAAAAGAAATTTTTTTAAAAACAG
SrA1 clone1 AATAAATAAATCTTTTTTATGAGGAAGGCTAGCATAAAAAATAATTTTATGAACTAGAAATGCCCTTTTAAATAAAAAGAAATTTTTTTAAAAACAG
SrA1 clone2 AATAAATAAATCTTTTTTATGAGGAAGGCTAGCATAAAAAATAATTTTATGAACTAGAAATGCCCTTTTAAATAAAAAGAAATTTTTTTAAAAACAG
SrA2 clone1 AATAAATAAATCTTTTTTATGAGGAAGGCTAGCATAAAAAATAATTTTATGAACTAGAAATGCCCTTTTAAATAAAAAGAAATTTTTTTAAAAACAG
Clustal Consensus AATAAATAAATCTTTTTTATGAGGAAGGCTAGCATAAAAAATAATTTTATGAACTAGAAATGCCCTTTTAAATAAAAAGAAATTTTTTTAAAAACAG

SrL1 clone1 AGAAAAATAAGGAAAATGATTTTTATTCAGAGGTATATGCTACTTAAGAAAATTTTTAAATAAAAATTTGTTATACAAACCTCAACTCATATGGGACTAC
SrL1 clone2 AGAAAAATAAGGAAAATGATTTTTATTCAGAGGTATATGCTACTTAAGAAAATTTTTAAATAAAAATTTGTTATACAAACCTCAACTCATATGGGACTAC
SrA2 clone2 AGAAAAATAAGGAAAATGATTTTTATTCAGAGGTATATGCTACTTAAGAAAATTTTTAAATAAAAATTTGTTATACAAACCTCAACTCATATGGGACTAC
SrA1 clone1 AGAAAAATAAGGAAAATGATTTTTATTCAGAGGTATATGCTACTTAAGAAAATTTTTAAATAAAAATTTGTTATACAAACCTCAACTCATATGGGACTAC
SrA1 clone2 AGAAAAATAAGGAAAATGATTTTTATTCAGAGGTATATGCTACTTAAGAAAATTTTTAAATAAAAATTTGTTATACAAACCTCAACTCATATGGGACTAC
SrA2 clone1 AGAAAAATAAGGAAAATGATTTTTATTCAGAGGTATATGCTACTTAAGAAAATTTTTAAATAAAAATTTGTTATACAAACCTCAACTCATATGGGACTAC
Clustal Consensus AGAAAAATAAGGAAAATGATTTTTATTCAGAGGTATATGCTACTTAAGAAAATTTTTAAATAAAAATTTGTTATACAAACCTCAACTCATATGGGACTAC

รูปที่ 4.8 ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของยีน ITS2 ของแมลงวันหัวถึงลายชนิดสายพันธุ์ *S. ruficornis*

จากรูปที่ 4.8 แสดงผลการเปรียบเทียบความเหมือนของยีน ITS2 ของแมลงวันหัวถึงลายสายพันธุ์ *S. ruficornis* โดยมีรหัสโคดอนของแมลงวันหัวถึงลายที่
ได้จากการ sequencing ดังตารางที่ 4.2 และจากสรุปแสดงถึงลำดับเบสที่อนุรักษ์ (clustal consensus)

จากนั้นนำลำดับเบสที่อนุรักษ์ (clustal consensus) ของแมลงวันหลังลายทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ

> *S. dux*

```
TGCTTGACTACATATGGTTGAGGGTTGTAAGACTATGCTAAATAAGTTGCTTAATAAATTTATATATTATATAAA
TTTAAAGCACATATTGTATTACTGGATACTTTTTCTATAAAGTGTTTATAAATACTAATAGCTAAAGATACAAAACC
TCTCAAATGAATAAAATCAGAGTATTTATATAATTCACAGAAGTATATAATATAATTCCTTTTTTTATTGAGGAAGG
TCTAGCATAAAATAATTTTTATGAAGTGAATGCCTCTTAATAAAAGGATTTTTTTTTTTATTGTTATAAATGAT
AAAGAAATGATTTTGTTCAGAGGTTTATTGTATTTAAGAAATTTTTAAAAATATATGTTTATACAACTCAACTCAT
ATGGGACTAC
```

> *S. peregrina*

```
TGCTTGACTACATATGGTTGAGGGTTGTAAGACTATGCTAAATAAGTTGCTTAATAAATTTATATATTTTATATA
TATGAGTTTAAAGCACATATTGTATTATTGGATACTTTTTCTATAAAGTGTTTATAAATACTAATAGCTAAAGATAC
AAAACCTCTCTAATGAATAAAATCAAAGTATTTATATAATTCCTCAGAAGTATATAAATTCCTTTTTTTATTGAGGA
AGGTCTAGCATAAAATGATTTTTTTTTTATGAAGTGAATGCCTCTTAATAAATGGAATTTTTTTTTTAATTATTAT
AAATATGTGTGATAAAGAAATGATTTTATTTCAGAGGTTATTGTATTTAAGAAATTTAAAGAAAATTTATTATACAA
CCTCAACTCATATGGGACTAC
```

> *S. ruficornis*

```
TGCTTGACTACATATGGTTGAGGGTTGTAAGACTATGCTAAATAAGTTGCTTAATAAATTTATATTTTATATGAA
TTTAAAGCACATATTGTATTACTGGATATTTTTATAAAGTGTTTATAAATACTAATATCTAAAGATACAAAACCTC
TCAAATGAATAAAATCAGAGTATTTATAAATTTCACTTAAATGTGAAAAATATAATATAATTCCTTTTTTTATTGAG
GAAGGTCTAGCATAAAATAATTTTTTATGAAGTGAATGCCTCTTAATAAAAGAATTTTTTTTTTAAACAGAGAA
AAATAAGGAAATGATTTTATTTCAGAGGTATATTGTACTTAAGAAATTTTTAATAAAAATTTGTTATACAACTCAAC
TCATATGGGACTAC
```

นำไปสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA 4.1 (beta) เพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแมลงวันหลังลาย และขึ้นทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ เพื่อขอเลขทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์ของประชากรแมลงวันหลังลายจากการศึกษากับฐานข้อมูล NCBI ในอินเทอร์เน็ตต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

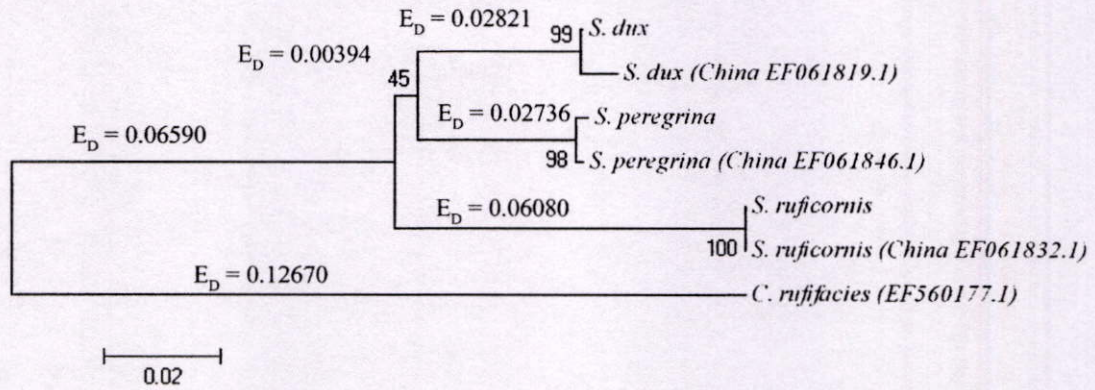
4.4.3 ผลการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแมลงวันหลังลายด้วยแผนภูมิต้นไม้

พันธุกรรม (Phylogenetic tree analysis)

เมื่อนำผลการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง (reference sequence) มาทำการเปรียบเทียบความเหมือน (multiple alignments) โดยโปรแกรม ClustaW2 และสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA 4.1 (beta) (<http://www.megasoftware.net/>; Tamura *et al.* 2007) โดยวิธี distance matrix ด้วย algorithm แบบ Neighbor-Joining method (Saitou and Nei. 1987) และกำหนดแบบจำลองของการแทนที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide substitution) แบบ Kimura-2-parameter model เพื่อพิจารณาถึงความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ และทดสอบความน่าเชื่อถือทางสถิติของการสร้างต้นไม้พันธุกรรม ด้วย bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ ซึ่งกำหนดให้แสดง bootstrap value ที่มากกว่า 50 % ในต้นไม้พันธุกรรม (Felsenstein. 1985) ค่าระยะห่างจะแสดงเป็นสเกลความยาวบอกรูปในภาพที่ เรียกว่าค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (evolutionary distances) และจะใช้เป็นข้อมูลสรุปในแผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ซึ่งค่าระยะห่างทางพันธุกรรม จะคำนวณโดยใช้ระบบ Maximum Composite Likelihood method (Tamura *et al.* 2004) โดยโปรแกรมจะทำการกำจัดส่วนที่เป็นช่องว่าง (gaps) และส่วนข้อมูลที่ขาดหาย (data missing) จากชุดของข้อมูล (complete deletion option) ที่เกิดการแทนที่ของเบสต่อตำแหน่ง (base substitutions) และชุดข้อมูลสุดท้ายที่ได้ซึ่งประกอบไปด้วยจำนวนตำแหน่งทั้งหมด 303 ตำแหน่ง จะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยแผนภูมิวิวัฒนาการ ที่สร้างด้วยโปรแกรม MEGA4.1 (Tamura *et al.* 2007)

และผลความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันหลังลาย (*Sarcophaga sp.*) ในประเทศไทย คือแมลงวันหลังลายสายพันธุ์ *S. dux* แมลงวันหลังลายสายพันธุ์ *S. perigrina* และแมลงวันหลังลายสายพันธุ์ *S. ruficornis* เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของประเทศจีนซึ่งเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง คือ *S. ruficornis* (EF061832.1), *S. peregrina* (EF061846.1) และ *S. dux* (EF061819.1) โดยมีแมลงวันหัวเขียวสายพันธุ์ *Chrysomya rufifacies* (EF560177.1) เป็นสายพันธุ์นอกกลุ่มที่ทำการศึกษา (รูปที่ 4.9)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 แผนภูมิวิวัฒนาการของกลุ่มแมลงวันหลังลาย (*Sarcophaga* sp.)

เปรียบเทียบกับแมลงวันหลังลายที่พบในประเทศจีน โดยสเกล 0.02 แทน evolution distance (E_D) ของจำนวนนิวคลีโอไทด์ ที่เปลี่ยนไปต่อนิวคลีโอไทด์ 1 ตำแหน่ง และแสดงค่า E_D ที่แต่ละกิ่งของแผนภูมิ ตัวเลขที่จุดตัด (node) ของแผนภูมิแสดงความน่าเชื่อถือทางสถิติของการสร้างแผนภูมิด้วย bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ ซึ่งแสดงเฉพาะค่า bootstrap value ที่มากกว่า 50 % (ตัวเลขสีด้าแสดงบริเวณจุดตัดของแผนภูมิ) ในแต่ละสายพันธุ์ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของประเทศจีนเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง โดยมีใช้แมลงวันหัวเขียว *Chrysomya rufifacies* (EF560177.1) เป็น out group

ผลการวิเคราะห์ระยะห่างของวิวัฒนาการระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 7 taxa จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี maximum composite likelihood method แสดงผลดังตารางที่ 4.3 จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละสายพันธุ์ นำมาวิเคราะห์ค่าความแตกต่างโดยเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างนิวคลีโอไทด์เพื่อวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ แสดงผลดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.3 ระยะห่างของวิวัฒนาการระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 7 แทกซา

	1	2	3	4	5	6	7
1 <i>S. dux</i>							
2 <i>S. peregrina</i>	0.06						
3 <i>S. ruficornis</i>	0.09	0.09					
4 <i>S. ruficornis</i> _(China_EF061832.1)	0.09	0.09	0.00				
5 <i>S. peregrina</i> _(China_EF061846.1)	0.06	0.00	0.10	0.10			
6 <i>S. dux</i> _(China_EF061819.1)	0.01	0.07	0.10	0.10	0.06		
7 <i>C. rufifacies</i> _(EF560177.1)	0.23	0.23	0.25	0.25	0.22	0.23	

ตารางที่ 4.4 ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของแมลงวันหลังลายในประเทศไทย และประเทศจีน

	1	2	3	4	5	6	7
1 <i>S. dux</i>							
2 <i>S. peregrina</i>	0.04						
3 <i>S. ruficornis</i>	0.07	0.02					
4 <i>S. ruficornis</i> _(China_EF061832.1)	0.07	0.02	0.00				
5 <i>S. peregrina</i> _(China_EF061846.1)	0.03	0.00	0.04	0.04			
6 <i>S. dux</i> _(China_EF061819.1)	0.01	0.04	0.04	0.04	0.04		
7 <i>C. rufifacies</i> _(EF560177.1)	0.16	0.07	0.03	0.03	0.10	0.11	

4.4.4 ผลการขึ้นทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์ (Database submission)

เมื่อทำการแก้ไข และจัดการกับลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย โปรแกรม BioEdit เรียบร้อยแล้วจึงขึ้นทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ เพื่อขอเลขทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์ของประชากรแมลงวันหลังลายจากการศึกษา (accession number) กับฐานข้อมูล NCBI ในอินเทอร์เน็ต ที่เว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/?tool=genbank> โดยแสดงผลเลขทะเบียนหรือ GenBank numbers ในแต่ละสายพันธุ์ของแมลงวันหลังลาย ดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 เลขทะเบียนของแมลงวันหลังลายในแต่ละสายพันธุ์ที่ทำการศึกษา

แมลงวัน	เลขทะเบียน
<i>S. dux</i>	GQ424200
<i>S. peregrina</i>	GQ424201
<i>S. ruficornis</i>	GQ424202

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 ผลการสกัด DNA จากแมลงวันหลังลายระยะตัวหนอนและตัวเต็มวัย

จากการศึกษาพบว่า การสกัด DNA จากหนอนและตัวเต็มวัยในขั้นตอนการสกัด DNA จะแตกต่างกันเรื่องของการทำให้เซลล์แตก เนื่องจากแมลงวันตัวเต็มวัย มีผนังลำตัวที่หนาเนื่องจากร่างกายประกอบไปด้วยเปลือกหรือกระดูกภายนอก (exoskeleton) ซึ่งประกอบไปด้วย สารพวกไคติน (chitin) กระดูกภายนอกของแมลงมีความแข็งแรงทำหน้าที่ป้องกันอันตรายให้อวัยวะภายใน และทำหน้าที่ยึดเกาะกับกล้ามเนื้อต่างๆ ทำให้ในขั้นตอนการทำให้เซลล์แตกก็จะต้องใช้เวลานานกว่าในระยะตัวหนอน และเพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนของ DNA จากแหล่งอื่น พวกแบคทีเรียหรือไข่ของสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่อาศัยอยู่ในลำไส้แมลง โดยทำการสกัด DNA เฉพาะบริเวณส่วนอก (thorax) ของแมลงเท่านั้น (Stevens. and Wall. 2001) เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้ ทำการศึกษาบริเวณ internal transcribed spacer ของ nuclear ribosomal DNA ซึ่งมีทั้งในสิ่งมีชีวิตชนิดโปรคาริโอตและยูคาริโอต ซึ่งถ้าหากทำการออกแบบไพรเมอร์ไม่ดีพอหรือไม่มีความจำเพาะเจาะจงกับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตกลุ่มแมลงวันดังกล่าว อาจจะทำให้เกิดปัญหาในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสได้ เนื่องจากปัญหาการปนเปื้อนของ DNA จากแหล่งอื่น (รูปที่ 1 ภาคผนวก ข) เป็นต้น โดย Hershkovitz *et al.* (1996) กล่าวว่างานศึกษาเกี่ยวกับอนุชีววิทยาทางด้าน DNA โมเลกุล นั้นควรที่จะให้ความสำคัญและระมัดระวังอย่างสูงเกี่ยวกับความสะอาดและหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนของตัวอย่างในทุกขั้นตอนการทำงานทางด้านนี้ เนื่องจากจะทำให้เกิดความผิดพลาดของข้อมูล และทำให้การวิเคราะห์ข้อมูลผิดพลาดจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ผิดพลาดในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสได้

DNA ที่สกัดได้จากแมลงวันที่โตเต็มวัย และแมลงวันในระยะตัวหนอน (larva) นั้นเมื่อสกัด DNA ตามคู่มือการสกัด (NucleoSpin[®] Tissue) ที่ออกแบบเพื่อให้มีขั้นตอนการทำงานที่รวดเร็ว และได้ genomic DNA ที่มีความบริสุทธิ์สูง และมีความเหมาะสมสำหรับการสกัด genomic DNA จากเนื้อเยื่อต่าง เซลล์แบคทีเรีย ยีสต์ ตัวอย่างทางนิติเวช (forensic samples), serum, plasma, หรือ body fluids อื่นๆ พบว่ามีความบริสุทธิ์มาก และมีปริมาณเพียงพอสำหรับการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส อีกทั้งยังพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไม่แตกต่างกัน จึงสรุปได้ว่านิวคลีโอไทด์ของหนอนแมลงวัน และนิวคลีโอไทด์ของตัวเต็มวัย ที่ได้จากแมลงวันชนิดเดียวกันมีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ second internal transcribed spacer (ITS2) ชุดเดียวกัน สอดคล้องกับ Malgom. and Coquoz (1999) กล่าวว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากส่วนต่างๆ ของแมลงไม่ว่าจะเป็น ระยะตัวเต็ม

วัย ระยะหนอน หรือ ในระยะดักแด้ก็ตาม ทุกๆส่วนจะประกอบไปด้วย DNA เดียวกัน แต่อาจจะมีจำนวน DNA เพียงเล็กน้อยแต่ก็เพียงพอสำหรับการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

5.2 ผลการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสของแมลงวันหลังลาย

จากการเพิ่มปริมาณชิ้น ITS2 ด้วยเทคนิคการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ทั้งหมด 3 สายพันธุ์ โดยใช้ genomic DNA จากแมลงวันหลังลายทั้งหมด 10 ตัวอย่างที่ได้จากการสกัดในข้อ 3.3.1 เป็น DNA คั้นแบบ และใช้ไพรเมอร์ ITS2 F และ ITS2 R พบว่าขนาดผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส หลังจากทำการวิเคราะห์ด้วย 1 % agarose gel และเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ที่ได้กับ DNA มาตรฐาน 100 bp DNA Ladder, Invitrogen®) พบว่าปรากฏแถบ DNA ที่ได้ทั้ง 10 ตัวอย่างมีขนาดประมาณ 390-401 bp ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Song *et al.* (2008a) ที่สรุปว่าความยาวของชิ้น ITS2 ของแมลงวันกลุ่ม Sarcophagidae จะมีขนาดตั้งแต่ 312 bp ถึง 361 bp ยิ่งกว่านั้น Irene and Annette (2004) ยังกล่าวว่าโดยทั่วไปบริเวณ second internal transcribed spacer (ITS2) ของสิ่งมีชีวิตกลุ่มแมลงจะมีความยาวของเบสประมาณ 200–400 bp และง่ายต่อการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

เมื่อทำการโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pTZ57R/T เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าขนาดชิ้นของ ITS2 ของแมลงวันหลังลายชนิด *S. dux* ทั้ง 3 ตัวอย่าง จำนวน 6 โคลน มีลำดับนิวคลีโอไทด์ประมาณ 390-392 bp แมลงวันหลังลายชนิด *S. perigrina* ทั้ง 3 ตัวอย่าง จำนวน 6 โคลน มีลำดับนิวคลีโอไทด์ประมาณ 401 bp แมลงวันหลังลายชนิด *S. javanica* จำนวน 2 โคลน มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 401 bp และแมลงวันหลังลายชนิด *S. ruficornis* ทั้ง 3 ตัวอย่าง จำนวน 6 โคลน มีลำดับนิวคลีโอไทด์ประมาณ 394 bp ซึ่งความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ในแต่ละสายพันธุ์พบว่ามีความยาวและลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันสอดคล้องกับการศึกษาและทดลองของ Schlotterer *et al.* (1994) ที่กล่าวว่าบริเวณดังกล่าวมีความหลากหลายระหว่าง สายพันธุ์ทั้งด้านความยาวและลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยภายในสายพันธุ์เดียวกันพบว่าความยาวและลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน

5.3 ผลการทำ PCR-RFLP

หลังจากทำการวิเคราะห์ความหลากหลายของขนาด DNA ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *DraI* และตรวจสอบขนาดและจำนวนชิ้น DNA ที่ผ่านการตัดเอนไซม์ด้วย 8 % native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) โดยเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะกับ DNA มาตรฐาน 25 bp DNA Ladder พบว่าได้ขนาดชิ้นผลิตภัณฑ์ที่ตัด ได้สอดคล้องกับการทำนายจำนวนชิ้นขึ้นที่ตัดจากการใช้โปรแกรม NEB Cutter ไม่ว่าจะใช้ DNA หนึ่งชิ้น อีกทั้งหมดก็ได้ค่อนข้างแน่นอน และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปเพื่อทำนายชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีตำแหน่งตัดภายในบริเวณชิ้น ITS2 และเพื่อทำนายขนาดจำนวนชิ้น DNA และรูปแบบของ RFLP ที่ได้ ซึ่งพบว่าได้รูปแบบและความยาวของนิวคลีโอไทด์ที่

ตัดสอดคล้องกันและสามารถจำแนกแมลงวันหลังลายแต่ละสายพันธุ์ได้อย่างชัดเจน โดยมีรูปแบบและจำนวนชิ้น DNA ที่ตัดได้ (RFLP pattern) ดังนี้ คือ *S. dux* จำนวนชิ้นที่ตัดได้จากเอนไซม์ชนิด *DraI* คือ 49, 79 และ 273 bp แมลงวันหลังลาย *S. ruficornis* จำนวนชิ้นที่ตัดได้จากเอนไซม์ชนิด *DraI* คือ 79, 100 และ 215 bp และจำนวนชิ้นที่ตัดได้จากเอนไซม์ชนิด *DraI* ของแมลงวันหลังลาย *S. peregrina* คือ 85 และ 316 bp

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเทคนิค PCR-RFLP เป็นวิธีการที่เหมาะสมสำหรับจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตในกลุ่มแมลงวันหลังลายได้อย่างชัดเจน และเทคนิค PCR-RFLP แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายในลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA บริเวณที่ศึกษา และยังเหมาะสำหรับการจำแนกความแตกต่างระหว่างกลุ่มประชากร เพื่อบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตนั้นได้อย่างชัดเจน (Schroeder *et al.* 2003) จึงเหมาะสมสำหรับจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตที่มีสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันมาก เช่น แมลงวันในระยะหนอน (larva) หรือพัฒนาเพื่อใช้กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา และยิ่งกว่านั้น Ratcliffe *et al.* (2003) กล่าวว่า PCR-RFLP เป็นวิธีการที่มีกระบวนการทำงานที่รวดเร็วเมื่อตัวอย่างแมลงที่ทำการศึกษาดำรงห้องปฏิบัติการ ระยะเวลาตั้งแต่การใช้ชุด kit สกัด DNA แบบรวดเร็ว และทำการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส จากนั้นทำการตัดผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และดูรูปแบบและจำนวนชิ้น DNA ที่ตัดได้ (RFLP pattern) บน agarose gel นั้นวิธีการทั้งหมดสามารถจัดจำแนกความแตกต่างของตัวอย่างที่ศึกษาโดยใช้เวลาประมาณ 6 ชั่วโมงเท่านั้น

แต่ถึงอย่างไรก็ตามวิธีการเหล่านี้ยังคงต้องอาศัยฐานข้อมูลทางด้าน taxonomic ของแมลงวัน หรือสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่มีความสำคัญทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ เพื่อการจำแนกสายพันธุ์อย่างรวดเร็ว และแม่นยำ โดยการนำ PCR-RFLP ในห้องปฏิบัติการ และเทคนิค PCR-RFLP ยังมีประสิทธิภาพที่สามารถจำแนก และระบุสายพันธุ์ หรือชนิดของแมลงวันหลังลายได้ทั้งในระยะที่เจริญเติบโตเต็มที่ และในระยะที่ยังมีการเจริญเติบโตไม่สมบูรณ์ได้อย่างรวดเร็ว และแม่นยำ จากการศึกษาในบริเวณ second internal transcribed spacer หรือ ITS2 ของ rDNA เช่น ในระยะตัวหนอน หรือ ในระยะดักแด้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Malgorn and Coquoz (1999) ที่ใช้เทคนิค PCR-RFLP เพื่อระบุชนิดของแมลงวันหัวเขียวในระยะที่ยังมีการเจริญเติบโตไม่สมบูรณ์ได้ง่ายและรวดเร็ว จากการศึกษาในบริเวณ cytochrome oxidase subunit I ของ mtDNA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.4 ผลการทำ sequencing และ แผนภูมิวิวัฒนาการของแมลงวันหลังลาย

และจากการทดลองขนาดชิ้น ITS2 ที่ได้จากแมลงวันหลังลายมีความยาวประมาณ 400 bp และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลบนอินเทอร์เน็ตด้วยโปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Search Tools; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) เป็นโปรแกรมสำหรับการค้นหาบริเวณเฉพาะที่เหมือนกันระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สนใจกับฐานข้อมูลทางพันธุศาสตร์บนระบบอินเทอร์เน็ต พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงหรือเหมือน (% identities) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันหลังลายแต่ละสายพันธุ์ มีค่า identities ที่ 97-99 % โดยพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากหนอนและตัวเต็มวัยของแมลงวันหลังลายไม่แตกต่างกัน และลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันในแต่ละพื้นที่ของประเทศไทยก็ไม่แตกต่างกัน หลังจาก alignment แล้ว และหลังจากทำแผนภูมิวิวัฒนาการของแมลงวันหลังลายแล้วพบว่าแต่ละสายพันธุ์มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงกัน และพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณต้นและปลายชิ้นคือ 5' TGCTTGACTACATATGGTTGAGGGTTGTA 3' เป็นส่วนปลาย 3' ของ 5.8S ribosomal DNA และ 5' TATAACAACCTCAACTCATATGGGACTAC 3' เป็นส่วนต้น 5' ของ 28S ribosomal DNA มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันในทุกสายพันธุ์ ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Annette (2007) ที่กล่าวว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณดังกล่าวเป็นบริเวณส่วนปลายของ 5.8S ribosomal DNA และส่วนต้นของ 28S ribosomal DNA ที่มีความอนุรักษ์ของเบสอยู่สูงมากในแต่ละสายพันธุ์

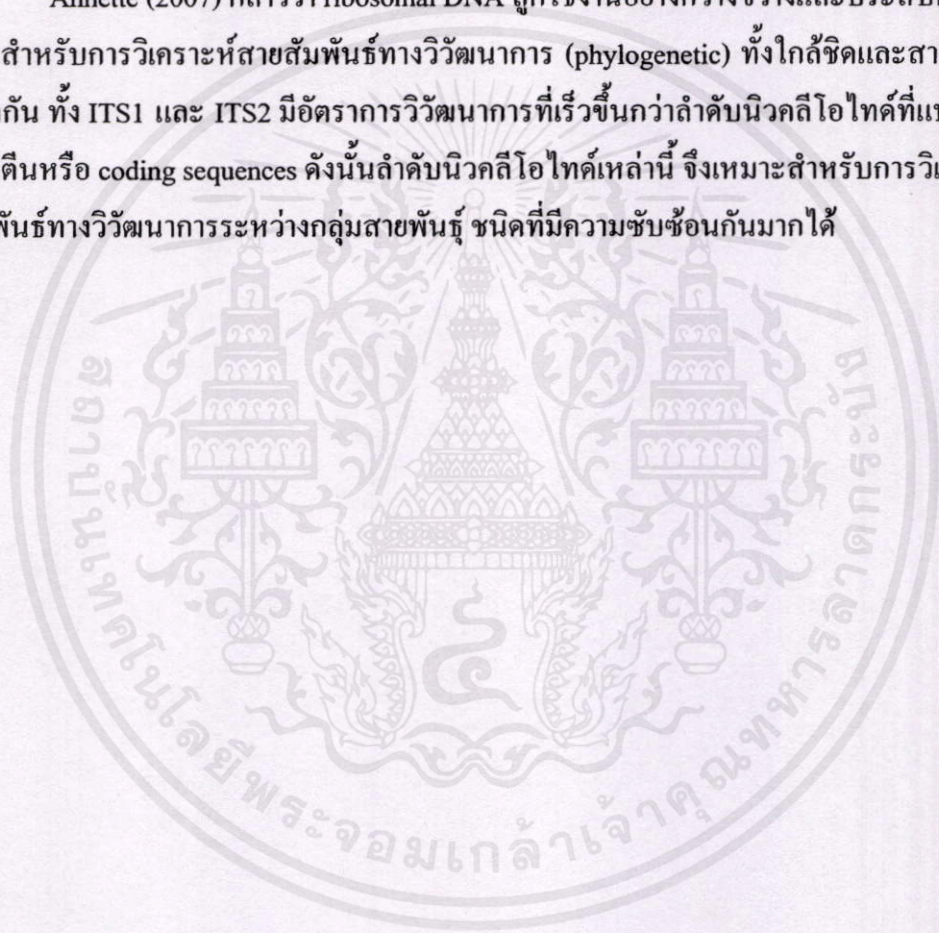
เมื่อเปรียบเทียบระยะห่างทางพันธุกรรมของแผนภูมิต้นไม้ระหว่างกลุ่มแมลงวันหัวเขียว *Chrysomya rufifacies* (EF560177.1) ที่เป็น out group ที่มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.12670 และกลุ่มแมลงวันหลังลายค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.06590 พบว่าแมลงวันหัวเขียวมีวิวัฒนาการที่ไกลกว่าแมลงวันหลังลาย และสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการภายในกลุ่มแมลงวันหลังลาย พบว่าแมลงวันหลังลายกลุ่ม *S. ruficornis* (0.06080) มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับมากกว่าแมลงวันหลังลายกลุ่มสายพันธุ์ *S. perigrina* (0.02736) ที่มีสายสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันมากกับแมลงวันหลังลายสายพันธุ์ *S. dux* (0.02821)

และเมื่อวิเคราะห์ระยะห่างทางวิวัฒนาการระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 7 สายพันธุ์ ด้วยวิธี maximum composite likelihood method และวิเคราะห์ค่าความแตกต่างระหว่างนิวคลีโอไทด์ของแต่ละสายพันธุ์ ได้ผลดังตารางที่ 4.3 และตารางที่ 4.4 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า แมลงวันหลังลายมีสายสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันมากและมีความสัมพันธ์ร่วมกันมากกับแมลงวันในกลุ่มแมลงวันหัวเขียว แสดงให้เห็นว่าสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันหลังลาย พบว่าแมลงวันหลังลายในประเทศไทยสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ *S. dux* (GQ424200), *S. perigrina* (GQ424201) และ *S. ruficornis* (GQ424202) และเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันหลังลายที่พบในแถบประเทศจีนจากการศึกษาของ Song *et al.* (2008b) พบว่ามีความแตกต่างกันไม่มาก แต่พบว่าสายพันธุ์ *S. dux* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของประเทศไทยเพียงเล็กน้อย และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *S. perigrina* และ *S. ruficornis* จาก

ประเทศจีนไม่มีความแตกต่างกับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันหลังลายในประเทศไทย จากข้อมูลสรุปได้ว่าแมลงวันหลังลายสายพันธุ์ *S. dux* ในประเทศไทยมีสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่แตกต่างกับประเทศจีนเพียงเล็กน้อย

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และ แผนภูมิวิวัฒนาการของแมลงวันหลังลายที่ได้จากการทดลองนี้พบว่าการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระดับโมเลกุลโดยการเปรียบเทียบการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของ rDNA และผลการทำ PCR-RFLP ของแมลงวันหลังลายมีความสอดคล้องกับการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ศึกษาโดยใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยา ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ อัญชลี ฐานวิสัย (2004)

Annette (2007) กล่าวว่า ribosomal DNA ถูกใช้งานอย่างกว้างขวางและประสบความสำเร็จมากสำหรับการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic) ทั้งใกล้ชิดและสายสัมพันธ์ที่ไกลกัน ทั้ง ITS1 และ ITS2 มีอัตราการวิวัฒนาการที่เร็วขึ้นกว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แปรหัสเป็นโปรตีนหรือ coding sequences ดังนั้นลำดับนิวคลีโอไทด์เหล่านี้ จึงเหมาะสำหรับการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างกลุ่มสายพันธุ์ ชนิดที่มีความซับซ้อนกันมากได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6

สรุปผลการทดลองและเสนอแนะ

จากผลการทดลองสรุปว่า ITS2 มีความยาวประมาณ 390-401 bp โดยพบว่าบริเวณดังกล่าว มีความหลากหลายทั้งความยาวและลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่าง สายพันธุ์ ทั้งนี้ภายในสายพันธุ์ เดียวกันพบว่าความยาวเท่ากันและลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อ เปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์พบว่ามีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์มากเพียงพอที่จะใช้ จำแนกชนิดของแมลงระหว่างสายพันธุ์ได้ นอกจากนี้ความหลากหลายดังกล่าวสามารถนำไปใช้ สร้าง phylogenetic tree สำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทั้งสายพันธุ์ที่มี วิวัฒนาการมาอย่างใกล้ชิดกันและสายพันธุ์ที่มีวิวัฒนาการห่างออกไปได้ โดยวิธี neighbor-joining และกำหนดแบบจำลองของการแทนที่ลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Kimura-2-parameter model เพื่อ พิจารณาถึงความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ในสายพันธุ์เดียวกัน สรุปได้ว่าแมลงวันหลังลายที่ ทำการศึกษาในครั้งนี้สามารถจัดจำแนกสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้เป็น 3 กลุ่มซึ่งสอดคล้องกับ ผล PCR-RFLP โดยนำชิ้นยีนที่ได้จากขั้นตอน PCR มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *DraI* พบว่า สามารถจำแนก 3 สายพันธุ์คือ *S. dux*, *S. ruficornis* และ *S. perigrina* โดยอาศัยรูปแบบ RFLP ที่ แตกต่างกันอย่างชัดเจนเมื่อนำไปแยกภายใต้สนามไฟฟ้าด้วย native polyacrylamide gel electrophoresis ซึ่งชนิดของแมลงวันที่ระบุได้โดยวิธี PCR-RFLP สอดคล้องกับผลการระบุชนิด ด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยา

นอกจากนี้ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันหลังลายในประเทศไทยที่ ทำการศึกษาในครั้งนี้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันหลังลายในประเทศจีน ไม่พบความ แตกต่างภายในสายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญ จึงสรุปได้ว่าข้อมูลทางพันธุกรรมของแมลงวันหลังลาย ภายในประเทศไทย และประเทศจีนมีสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกัน ดังนั้นผลการ เปรียบเทียบดังกล่าวยืนยันว่าวิธีการดังกล่าวสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการจัดจำแนก แมลงวันหลังลายซึ่งเป็นกลุ่มของแมลงวันที่สามารถพบได้ทั่วไปในประเทศไทยได้อย่างมี ประสิทธิภาพ แม่นยำ และรวดเร็ว

วิธีการทางอณูชีววิทยาเหล่านี้พบว่า เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพ เหมาะที่จะนำไป ประยุกต์ใช้กับงานทางด้าน การแพทย์ และการปศุสัตว์ โดยเฉพาะทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ในการ ประมาณระยะเวลาการตายโดยอาศัยแมลงวัน เช่น แมลงวันหัวเขียว แมลงวันบ้าน และด้วงชนิด อื่นๆ ที่คาดว่าจะมีประโยชน์ทางการแพทย์ และทางปศุสัตว์ เช่นแมลงที่เป็นสาเหตุของ โรค myiasis หรือโรคผิวหนังชนิดต่างๆ เนื่องจากแมลงวันเป็นแมลงกลุ่มแรกที่เข้ามากินและวางไข่บนซากศพ

และอาจพบได้ทั้งระยะตัวหนอนและตัวเต็มวัย วิธีการวิธีการทางอณูชีววิทยานี้สามารถจะตรวจสอบชนิดของแมลงวันได้อย่างถูกต้องและแม่นยำโดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 เนื่องจากบริเวณเหล่านี้เป็นบริเวณที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง และขึ้นส่วนเพียงเล็กน้อยของหนอนแมลงวันหรือ ตัวเต็มวัยของแมลงวัน ก็สามารถที่จะนำมาสกัด DNA เพื่อตรวจสอบทางอณูชีววิทยาได้ โดยไม่ต้องอาศัยข้อมูลทางด้านสัณฐานวิทยาของแมลงวัน ซึ่งถ้าหากอาศัยข้อมูลทางสัณฐานวิทยาของแมลงวันจะต้องใช้ข้อมูลของแมลงวันตัวเต็มวัยหรือหนอนแมลงวันที่มีชิ้นส่วนสมบูรณ์เท่านั้น หรืออาจจะต้องนำหนอนแมลงวันที่มีชีวิตมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการจนครบวงจรชีวิตกระทั่งเจริญเป็นตัวเต็มวัย ซึ่งวิธีเหล่านี้จะต้องใช้ระยะเวลาในการระบุชนิดของแมลงวันนั้นๆ

เมื่อระบุชนิดของแมลงวันได้ด้วยวิธีการทางอณูชีววิทยาแล้ว จะทำให้สามารถตัดสินใจข้อมูลเกี่ยวกับเวลาการตายได้หลังจากเก็บตัวอย่างจากที่เกิดเหตุได้เพียงไม่กี่ชั่วโมงโดยพิจารณา ร่วมกับข้อมูลการเจริญเติบโต หรืออุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของหนอนแมลงวันในแต่ละระยะการเจริญ ซึ่งวิธีการดังกล่าวสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตที่มีความสำคัญทางด้านนิติเวชศาสตร์ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด

ในอนาคตจำเป็นต้องทำการศึกษาวิธีการทางอณูชีววิทยาเพื่อตรวจสอบเครื่องหมายทางโมเลกุลชนิดอื่น ที่มีหลากหลายแตกต่างกันไป เพื่อศึกษาแมลงวันกลุ่มอื่นที่มีความสำคัญทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ และเพื่อเลือกใช้เทคนิคที่เหมาะสมต่อการใช้งาน โดยการเลือกใช้เครื่องหมาย DNA ชนิดอื่นๆ เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตตัวหนึ่ง สายพันธุ์หนึ่ง หรือในระดับต่างสายพันธุ์ เพื่อที่จะพัฒนาวิธีการจำแนกสายพันธุ์ ได้อย่างละเอียดและชัดเจนยิ่งขึ้น

การรวบรวมข้อมูลของแมลงที่มีสำคัญทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ในประเทศไทยนั้นยังคงต้องมีการศึกษาอย่างกว้างขวางกันต่อไป ดังนั้นการศึกษาและรวบรวมข้อมูลทางด้านอณูชีววิทยาเพื่อประโยชน์ในการตรวจสอบยังคงมีความจำเป็น โดยอาศัยเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่สำคัญ เช่น บริเวณขึ้น 18S – 28S rDNA ของ nuclear DNA หรือบริเวณ 16S rDNA, 12S rDNA, cytochrome oxidase gene subunit 1 และ 2 (COI, COII), NADH dehydrogenase gene และบริเวณ D-loop (displacement loop) ของ mitochondrial DNA เป็นต้น เพื่อให้มีความเหมาะสมต่อชนิดแมลงแต่ละกลุ่มที่ทำการศึกษา หรือเพื่อลดระยะเวลาในการดำเนินการ และเพิ่มความแม่นยำในการตรวจสอบชนิดแมลงนั้นๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

- กัญญา จิระเจริญรัตน์. 2550. “เอกสารประกอบการสอนวิชา ชีวสารสนเทศ (Bioinformatics)” ภาควิชาเทคโนโลยีผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- จริยา ชมวารินทร์, ชาญวิทย์ ลีลาวัฒน์, เต็มดวง ลิ้มไถบุญ, ปราณี ลิ้นนะชัย, ศิริเพ็ญ ศิริมนตรี, สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน, วีรพงศ์ ลุติตานนท์ และวิเศษ นามวาท. 2540. **PCR Technology and Application**. ภาควิชาจุลชีววิทยา. คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ดวงกมล ทองอร่าม, วุฒิพงศ์ มหาคำ และศททวูธ นามดี. 2005. “การจำแนกพืชสกุล *Caulokaempferia* K. Larsen (วงศ์จิง) โดยการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากข้อมูลทางชีววิทยาระดับโมเลกุล”. วารสารวิจัย มข. 10(1): 5-12.
- นพวรรณ บุญชู. 2551. “ความรู้เกี่ยวกับแมลงวัน ตอนที่ 1”. **จดหมายข่าวจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา มหาวิทยาลัยนเรศวร**. 5(1): 5.
- นภา ศิวรังสรรค์. 2547. **ปฏิบัติการทางพันธุวิศวกรรม**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- บุญเสริม อ่วมอ่อง. 2543. **แมลงวัน: กิจวิทยาและการควบคุม**. กงมาลาเรีย กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข. มหาวิทยาลัยมหิดล.
- ลัดดา เอกสมทราเมษฐ์. 2547. **ชีววิทยาของเซลล์**. กรุงเทพฯ: โอ เอส พริ้นติ้ง เฮ้าส์.
- ศานิต รัตนกุ่มมะ. 2546. **กิจวิทยาแม่บท**. เชียงใหม่: สิรินาฏการพิมพ์.
- ศิริพร สติธิประณีต. 2531. **พันธุวิศวกรรม: ปฏิบัติการเบื้องต้น**. หน่วยปฏิบัติการวิจัยพันธุวิศวกรรม ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุรินทร์ ปิยะ โชคณากุล. 2545. **จีโนมและเครื่องมือดีเอ็นเอ**. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อัญชลี ฐานวิสัย. 2004. “ศึกษาเปรียบเทียบการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของไรโบโซมดีเอ็นเอของแมลงวันดำในประเทศไทย”. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาสภาวะแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยมหิดล.
- อาคม สังข์วารานนท์. 2538. **กิจวิทยาทางสัตวแพทย์**. กรุงเทพฯ. โรงพิมพ์สหมิตร พริ้นติ้ง.
- อารีลักษณ์ เกษมสันต์. 2533. “ดีเอ็นเอพาหะ”. หน้า 3-5 ใน **สุมาลี ดั่งประดับกุล. คู่มือปฏิบัติการทางพันธุวิศวกรรม 1 โครงการอณูพันธุศาสตร์-พันธุวิศวกรรมศาสตร์**. กรุงเทพฯ.

Annette, W. C. 2007. “Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure”. **Nucleic Acids Res.** 35(10): 3322–3329.

- Anonymous. 2009a. **Forensic entomology**. [Online]. Available: <http://agspsrv34.agric.wa.gov.au/ento/forensic.htm>.
- Anonymous. 2009b. **What is PCR?**. [Online]. Available: http://www.pseudomonas-syringae.org/Outreach/Module_3_Home.htm.
- Benecke, M. 1998. "Six forensic entomology cases: description and commentary". **J. Forensic Sci.** 43(4): 797–805.
- Catts, E. P. and Goff, M. L. 1992. "Forensic entomology in criminal investigations". **Annu. Rev. Entomol.** 37: 253 – 272.
- Felsenstein, J. 1985. "Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap". **Evolution.** 39: 783-791.
- Gennard, D. E. 2007. **Forensic Entomology: an introduction**. England: John Wiley & Sons.
- George, W. 2009. **What does "Related to" mean when used for Human Populations?**. [Online]. Available: <http://www.andaman.org/Related%3F/Related.htm>.
- Graham, B. W. 2006. **Filth Flies**. [Online]. Available: <http://www.afpmb.org/pubs/tims/TG30/TG30.htm>.
- Greenberg, B. 1991. "Flies as forensic indicators". **J. Med. Entomol.** 28(5): 565 – 577.
- Hershkovitz, M. A. and Lewis, L. A. 1996. "Deep-level diagnostic value of the rDNA-ITS region". **Mol. Biol. Evol.** 13(9): 1276-1295.
- Introna, F. Jr., Campobasso, C. P. and Di Fazio, A. 1998. "Three case studies in forensic entomology from Southern Italy". **J. Forensic Sci.** 43(1): 210 – 214.
- 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.
- Kalp, G. C. 2002. **Cell and Molecular Biology Concept and Experiments**. New York: John Wiley & Sons.
- Korabecna, M. 2007. "The variability in the fungal ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8S rRNA gene): Its biological meaning and application in medical mycology". **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology.** 783-787.
- Lane, R. P. and Crosskey, R. W. 1993. **Medical insects and arachnids**. London: Chapman & Hall.

- 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.
- Mülhardt, C. 2007. **Molecular Biology and Genomics**. 4th ed. London: Oxford Elsevier Inc.
- Nei, M. and Kumer, S. 2000. **Molecular Evolution and Phylogenetics**. New York: Oxford University Press.
- Neva, Ç., Küroat, A. and Mehmet, H. 1997. "A case of human orotracheal myiasis caused by *Wohlfahrtia magnifica*". **Parasitol. Res.** 83: 34–36.
- Parkin, E. J. and Butlin, R. K. 2004. "Within- and between-individual sequence variation among ITS1 copies in the meadow grasshopper *Chorthippus parallelus* indicates frequent intrachromosomal gene conversion". **Mol. Biol. Evol.** 21(8):1595–1601.
- Ratcliffe, T. S., Webb, W. D., Weinzievr, A. R. and Robertson, M. H. 2003. "PCR-RFLP identification of Diptera (Calliphoridae, Muscidae and Sarcophagidae) A generally applicable method". **J. Forensic Sci.** 48(4): 1-3.
- Rungroj, N., Nettuwakul, C., Chongjaroen, N. and Sudtachat, N. 2009. "Genetic Analysis" 9-22 in **Molecular and Cellular Biology Workshop 2009**. Division of Molecular Genetic, Department of Research and Development, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University.
- 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.
- 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 Puschel, K. 2003. "Use of PCR-RFLP for differentiation of *calliphorid* larvae (Diptera, Calliphoridae) on human corpses". **Forensic Sci.Int.** 132: 76–81.
- Singer, M. and Berg, P. 1991. **Gene & Genomes**. Australia. Black well Scientific Publications. Wiley & Sons.

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามเผยแพร่ลงบนสื่อออนไลน์และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 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.
- Stevens, J. and Wall, R. 2001. "Genetic relationships between blowflies (Calliphoridae) of forensic importance". **Forensic Sci. Int.** 120: 116-123.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. 2007. "MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0". **Mol. Bio. Evol.** 24(8): 1596-1599.
- Tamura, K., Nei, M. and Kumar, S. 2004. "Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method". **Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)**. 101: 11030-11035.
- Thyssen, P. J. and Linhares, A. X. 2007. "First description of the immature stages of *Hemilucilia segmentaria* (Diptera: Calliphoridae)". **Biol. Res.** 40: 271-280.
- Turchetto, M., Lafisca, S. and Costantini, G. 2001. "Postmortem interval (PMI) determined by study sarcophagous biocenoses: three cases from the province of Venice (Italy)". **Forensic Sci. Int.** 120(1-2): 28 - 31.
- Walker, K. 2009. **Fleshfly (*Sarcophaga*) pest and diseases image library**. [Online]. Available: <http://www.padil.gov.au/viewPest.aspx?id=1988>.
- Wallman, J. F., Leys, R. and Hogendoorn, K. 2005. "Molecular systematics of Australian carrion-breeding blowflies (Diptera: Calliphoridae) base on mitochondrial DNA". **Invertebr. Syst.** 19: 1-15.
- Wells, J. D. and Stevens, J. R. 2008. "Application of DNA-based methods in forensic entomology". **Annu. Rev. Entomol.** 53: 103-120.
- Wells, J. D., Pape, T. Sperling, and Felix A. H. 2001. "DNA-based identification and molecular systematics of forensically important Sarcophagidae (Diptera)". **J. Forensic Sci.** 46(5): 1098-1102.
- Yaghoobi, R., Tirgari, S. and Sina, N. 2005. "Human auricular myiasis caused by *lucilia sericata*: clinical and parasitological considerations". **Acta Med. Iran.** 43(2): 155-157.

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.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 ปล่อยให้ร้อนที่อุณหภูมิ 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 แล้วนำไปปล่อยให้ร้อนที่อุณหภูมิ 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 ปล่อยให้ร้อนที่อุณหภูมิ 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบโคลน

3.1 ยาปฏิชีวนะ ampicillin เตรียมให้ความเข้มข้นสุดท้าย 100 µg/ml
กรอง ด้วย 0.22 ไมโครมิลลิฟิลเตอร์ เก็บที่ -20 °C

3.2 สารเคมี Isopropyl-B-D thiogalactoside (IPTG)

เตรียม Stock ที่ความเข้มข้น 1M โดยละลาย 2 g ต่อน้ำ 8 ml หลังจากละลายเข้ากันแล้ว
ปรับปริมาตรเป็น 10 ml กรองด้วย 0.22 ไมโครมิลลิฟิลเตอร์ เก็บที่ -20 °C

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

ละลาย 20 mg ใน Dimethylformamide 400 µl แล้วเก็บในหลอดที่กันแสงที่อุณหภูมิ
เก็บที่ -20 °C

4. สารเคมีที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ DNA โดยวิธีแยกขนาด DNA ในเจลอะกาโรสภายใต้ กระแสไฟฟ้า (agarose gel electrophoresis)

4.1 สารละลาย 10 xTAE 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 แล้วปรับ
ปริมาตรเท่ากับ 1 L เมื่อใช้งานให้เจือจางความเข้มข้นของ 10 xTAE 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 (เอธิเดียม

โบรไมด์เป็นสารก่อมะเร็ง ควรใส่ถุงมือเวลาเตรียมสารละลาย)

4.4 DNA มาตรฐาน 1 kb ของบริษัท Fermentas[®]

4.5 DNA มาตรฐาน 100 bp ของบริษัท Invitrogen[®]

4.6 DNA มาตรฐาน 50 bp ของบริษัท Fermentas[®]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

5.4 การเตรียม 8 % native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	2.635	ml
30% acrylamide	1.33	ml
5x TBE buffer	1	ml
10 % ammonium persulfate	35	μ l
TEMED	1.75	μ l
ปริมาตรรวม	5	ml

6. สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (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[®]

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

(NH₄)₂SO₄

2 mM dNTP

25 mM MgCl₂

5 U/ μ l ของ Taq DNA Polymerase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชุดทดสอบสำเร็จรูป (Kit)

1. ชุดสกัด genomic DNA (Genomic DNA from tissue ; Nucleospin[®] tissue) ของบริษัท Machery-Nagel[®]
 - 1.1 บัฟเฟอร์ T1 (Lysis Buffer)
 - 1.2 บัฟเฟอร์ B3
 - 1.3 บัฟเฟอร์ PB (Proteinase Buffer)
 - 1.4 Proteinase K
 - 1.5 บัฟเฟอร์ BW (Wash Buffer)
 - 1.6 บัฟเฟอร์ B5 (Wash Buffer)
 - 1.7 บัฟเฟอร์ BE (Elution Buffer)
 - 1.8 100% Ethanol
 - 1.9 NucleoSpin Tissue Columns (light green rings)
 - 1.10 Collection Tubes (2 ml)
2. ชุดแยก DNA ให้บริสุทธิ์จากเจลอะกาโรสโดยใช้ ชุดสกัด DNA ออกจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit ของบริษัท QIAGEN[®]
 - บัฟเฟอร์ QG (Solubilization buffer)
 - บัฟเฟอร์ PE (Wash buffer)
 - Isopropanol
 - น้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
 - Spin column
3. สารเคมีที่ใช้ในการเชื่อม DNA ของบริษัท Invitrogen[®]
 - น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ
 - T₄ DNA ligase
 - T₄ DNA ligase buffer
4. ชุดสกัดพลาสมิด QIAprep spin Miniprep Kit ของบริษัท QIAGEN[®]
 - สารละลาย P1 (Resuspension buffer)
 - สารละลาย P2 (Lysis buffer)
 - สารละลาย N3 (Neutralization buffer)
 - สารละลาย PB (Wash buffer)
 - สารละลาย PE
 - สารละลาย EB (Elution buffer) และ น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

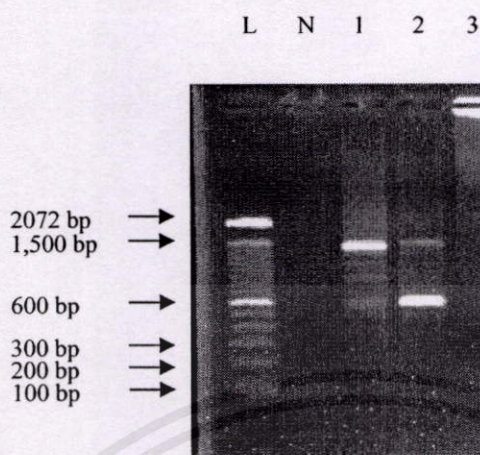
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ การศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกฉบับที่ปรับปรุงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก ข

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก ที่ ข1 ผลิตรหัสที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสที่ได้จากการตรวจสอบชิ้นยีน ITS1 และ ITS2 ตรวจสอบด้วย 1 % agarose gel

Lane L คือ DNA มาตรฐาน (100 bp DNA Ladder, Invitrogen[®]) Lane N คือ ผลิตรหัสที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสที่ใช้น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อเป็น DNA ด้นแบบ และ Lane ที่ 1 คือ ผลิตรหัสของชิ้นยีน ITS1 และ ITS2 ของ *Sarcophaga dux* Lane ที่ 2 คือ ผลิตรหัสของชิ้นยีน ITS1 และ ITS2 ของ *Sarcophaga ruficornis* Lane ที่ 3 คือ ผลิตรหัสของชิ้นยีน ITS1 และ ITS2 ของ *Sarcophaga perigrina*

จากภาพเป็นผลิตรหัสจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้คู่ไพรเมอร์ คือ

1975 F 5' TAACAAGGTTTCCGTAGGTG 3' และ 52 R 5' GTTAGTTTCTTTTCCCTCCCCT 3' (Ratcliffe *et al.* 2003) ที่จับกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณปลาย 3' ของ 18S ribosomal DNA gene และ 5' ของ 28S ribosomal DNA gene ของแมลงวันหลังลายทั้ง 3 ชนิดใน Lane 1-3 คือ *Sarcophaga dux* *Sarcophaga ruficornis* และ *Sarcophaga perigrina* ตามลำดับ ซึ่งจากการรายงานของ Ratcliffe *et al.* (2003) กล่าวว่าผลิตรหัสจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ของแมลงวันหลังลาย ที่ได้มีขนาดประมาณ 1.5 kb จะเห็นได้ว่า สปีชีส์เดียวกันไพรเมอร์คู่นี้เมื่อทำ PCR ออกมามีขนาดผลิตรหัสไม่เท่ากัน ซึ่งอาจเกิดจากการปนเปื้อนของตัวอย่าง DNA จากเชื้อรา ซึ่งพบว่าการศึกษา internal transcribed spacer ในรา มีขนาดประมาณ 380-900 bp (Korabecna. 2007) หรืออาจเกิดจาก

เอกสารออกแบบไพรเมอร์ที่ไม่จำเพาะเจาะจง ทำให้มีการผิดพลาดต่อการเข้าจับของไพรเมอร์เมื่อทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นายเอกพล ภูวนารณฤบาล เกิดเมื่อวันที่ 13 กันยายน พ.ศ.2527 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาฟิสิกส์สวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในปีการศึกษา 2548 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาฟิสิกส์สวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังในปีการศึกษา 2549-ปัจจุบัน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้