

# การจำแนกชนิดแมลงวันหัวเขียวที่มีความสำคัญทางนิติวิทยาศาสตร์ ในประเทศไทยโดยอาศัยข้อมูลสารพันธุกรรมบริเวณ second internal transcribed spacer ของ ribosomal DNA และยีน NADH dehydrogenase subunit 5

รัฐภาภรณ์ จันทร\*

เผด็จ สิริยะเสถียร\*\* อภิวัฏ ธีวสิน\*\*\*

อุษาวดี ถาวร\*\*\* กนก พงศวิทย์บุญ\*\*

Jantorn R, Siriyasatien P, Tawatsin A, Thavara U, Preativatanyou K. Identification of forensically important blowflies in Thailand based on the second internal transcribed spacer region of ribosomal DNA and the NADH dehydrogenase subunit 5 gene. Chula Med J 2012 Jan - Feb; 56(1): 101 - 13

**Problem/Background** : *Estimation of postmortem interval (PMI) is essential for supporting justice especially in legal cases. At early stage of death, the PMI can be evaluated using data from physical changes of the corpses. In case of the corpses that have died more than 48 hours, the physical change may be less accurate for prediction. The species identification of blowflies, early found on corpses, as well as the specific developmental stage are required for PMI estimation. However, it is not yet practical for morphological identification. To surpass these problems, DNA-based identification is preferentially applied.*

\* นิติศัลยแพทย์นิติเวชศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

\*\* ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

\*\*\* สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

- Objective** : *To demonstrate the application of the second internal transcribed spacer (ITS2) region and the NADH dehydrogenase subunit 5 (ND5) gene for differentiation of forensically important blowflies in Thailand.*
- Design** : *Descriptive study*
- Setting** : *Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University*
- Methods** : *Thirty-one samples of blowflies DNA from previous study were amplified for ITS2 and ND5 regions via PCR technique. Then, the PCR products were cloned using the pGEM<sup>®</sup>-T vector and transformed into Escherichia coli strain DH5 $\alpha$  competent cell. Three clones were sequenced from each sample. The DNA sequences were compared with GenBank database. For PCR-RFLP analysis, the PCR products for ITS2 and ND5 were separately digested with restriction endonucleases DraI and VspI for ND5 gene, respectively. Also, phylogenetic tree was constructed by neighbor-joining method.*
- Results** : *Sequencing reactions revealed that PCR yielded the ITS2 product size of approximately 400 bp and the ND5 product size of 437 bp. Results from PCR-RFLP analysis could separate blowflies into 4 patterns. Additionally, sequence analysis showed no significant intraspecific divergence in the same species. Phylogenetic analysis by neighbor-joining (NJ) method indicated the close relationship among them.*
- Conclusions** : *These molecular methods serve as the promising tools for molecular identification of these common blowfly species especially in case of morphological difficulties.*
- Keywords** : *Blow flies, ITS2, ND5, PCR-RFLP.*

Reprint request : Preativatanyou K. Department of Parasitology, Faculty of Medicine,  
Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

Received for publication. May 5, 2011.

รัชฎาภรณ์ จันทร, เผด็จ สิริยะเสถียร, อภิวัฏ ธวัชสิน, อุษาวดี ถาวรระ, กนก พงศนิวัตัญญู.  
การจำแนกชนิดแมลงวันหัวเขียวที่มีความสำคัญทางนิติวิทยาศาสตร์ในประเทศไทยโดยอาศัย  
ข้อมูลสารพันธุกรรมบริเวณ second internal transcribed spacer ของ ribosomal DNA  
และยีน NADH dehydrogenase subunit 5. จุฬาลงกรณ์เวชสาร 2555 ม.ค. - ก.พ.; 56(1):  
101 - 13

- บทนำ** : การประมาณเวลาตายของศพมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการหาข้อเท็จจริง  
เพื่อให้ความเป็นธรรมให้แก่ผู้เสียชีวิต การประมาณเวลาตายในระยะแรก  
นั้นสามารถใช้ข้อมูลจากการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของศพ แต่ในกรณี  
ที่ศพเสียชีวิตมานานกว่า 48 ชั่วโมงแล้ว การอาศัยการเปลี่ยนแปลง  
ทางกายภาพของศพจะมีความแม่นยำน้อยลง แมลงวันหัวเขียวเป็นสิ่งมีชีวิต  
กลุ่มแรกที่เข้าไปตอมศพ ดังนั้นการระบุชนิดของหนอนแมลงวันและ  
ระยะการเจริญได้อย่างถูกต้องสามารถนำมาใช้ในการประมาณเวลาตายได้  
อย่างไรก็ตาม การจำแนกชนิดแมลงวันโดยอาศัยข้อมูลทางสัณฐานวิทยา  
ยังไม่เป็นที่นิยมในทางปฏิบัติ การจำแนกชนิดโดยอาศัยข้อมูลสารพันธุกรรม  
ดีเอ็นเอจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถใช้เพื่อแก้ ปัญหาดังกล่าว
- วัตถุประสงค์** : ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ second internal transcribed  
spacer (ITS2) และยีน NADH dehydrogenase subunit 5 (ND5) เพื่อ  
การจำแนกชนิดของแมลงวันหัวเขียวที่สำคัญในประเทศไทย
- รูปแบบการศึกษา** : การศึกษาเชิงพรรณนา
- สถานที่ทำการศึกษา** : ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- วิธีการศึกษา** : ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในบริเวณ ITS2 และยีน ND5 จากดีเอ็นเอต้นแบบ  
ของแมลงวันหัวเขียวจำนวน 31 ตัวอย่างโดยเทคนิคพีซีอาร์ จากนั้นทำการ  
เชื่อมต่อผลผลิตที่ได้จากขั้นตอนพีซีอาร์เข้ากับดีเอ็นเอพาหะ pGEM®-T  
และถ่ายโอนเข้าสู่คอมพิวเตอร์เซลล์ Escherichia coli สายพันธุ์ DH5α  
เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวอย่างละ 3 โคลน ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะถูก  
เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank นอกจากนี้ยังทำการศึกษาด้วย  
เทคนิค PCR-RFLP โดยอาศัยเอนไซม์ตัดจำเพาะ DraI สำหรับผลผลิต  
พีซีอาร์บริเวณ ITS2 และเอนไซม์ตัดจำเพาะ VspI สำหรับบริเวณยีน ND5  
และทำการวิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการโดยวิธี neighbor-joining

- ผลการวิจัย** : ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าบริเวณ ITS2 มีขนาดประมาณ 400 bp และส่วนของยีน ND5 มีขนาด 437 bp ผลการวิเคราะห์ PCR-RFLP สามารถจำแนกความแตกต่างได้ 4 รูปแบบ การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันหัวเขียวไม่พบความแตกต่างภายในชนิดเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญ และจากการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี neighbor-joining แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางสายวิวัฒนาการระหว่างชนิดแมลงวัน
- สรุป** : วิธีการทางอณูชีววิทยาสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการจำแนกชนิดแมลงวันหัวเขียวได้อย่างมีประสิทธิภาพ แม่นยำ โดยเฉพาะในกรณีที่ไม่สามารถจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา
- คำสำคัญ** : แมลงวันหัวเขียว, ITS2, ND5, PCR-RFLP.

วัตถุประสงค์ที่สำคัญประการหนึ่งของการชันสูตรพลิกศพที่กำหนดไว้ในกฎหมายก็คือ การระบุเวลาตาย ดังนั้นการหาหลักฐานมาสนับสนุนเพื่อประมาณระยะเวลาหลังการตาย (postmortem interval, PMI) มีความสำคัญมากสำหรับแพทย์และบุคลากรทางนิติเวช<sup>(1)</sup> การประมาณระยะเวลาหลังการตายส่วนใหญ่จะอาศัยการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับศพ เช่น การเกร็งตัวของกล้ามเนื้อบริเวณข้อต่าง ๆ การตกตะกอนของเม็ดเลือดในหลอดเลือดฝอย อุณหภูมิของศพ การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของน้ำในลูกนัยน์ตา เป็นต้น การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นดังกล่าวมีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้อง<sup>(2)</sup> ซึ่งอาจให้ผลที่ถูกต้องน้อยลงเมื่อระยะเวลาหลังการตายเพิ่มขึ้น

นิติวิทยาศาสตร์ (Forensic Entomology) เป็นอีกสาขาที่ใช้ข้อมูลทางชีววิทยาของแมลงมาใช้ เพื่อตอบปัญหาทางกฎหมายโดยมีบทบาทในการพิสูจน์ทางคดีอาญา คือ การระบุระยะเวลาหลังการตาย ซึ่งในต่างประเทศนั้นมีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง ส่วนในประเทศไทยยังมีไม่มากนัก มีเพียงไม่กี่คดีเท่านั้นที่มีการบันทึกว่าใช้แมลงในการสืบสวน เป็นการศึกษาชนิดแมลงที่พบจากซากศพ ชนิดของแมลงเหล่านั้นเป็นข้อบ่งชี้ระยะเวลาการตายของศพได้ เนื่องจากกระบวนการเน่าเปื่อยของศพจะมีการเปลี่ยนแปลงทั้งทางเคมี ชีวภาพ และกายภาพ<sup>(3-5)</sup> ซึ่งจะดึงดูดสัตว์ขาปล้อง (arthropod) และโดยเฉพาะแมลง ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตกลุ่มแรกที่เข้าถึงศพเร็วที่สุดภายในไม่กี่นาที่<sup>(6)</sup> ในกระบวนการเน่าเปื่อยแต่ละระยะจะปล่อยกลิ่นที่ดึงดูดสิ่งมีชีวิตบางชนิด โดยเฉพาะแมลงวันหัวเขียวจะเข้าถึงศพในเวลาอันรวดเร็วเป็นจำนวนมาก

การจำแนกชนิดของแมลงวันที่พบบนศพได้อย่างถูกต้อง ถือว่าเป็นขั้นตอนสำคัญของนักนิติวิทยาศาสตร์ในการประมาณระยะเวลาหลังการตาย แต่การจำแนกชนิดโดยวิธีทางสัณฐานวิทยากระทำได้ยากในแมลงวันที่เจริญเติบโตไม่เต็มที่ เนื่องจากมีลักษณะรูปร่างที่เหมือนกันหรือแมลงตัวอย่างอยู่ในสภาพไม่สมบูรณ์เพียงพอที่จะสามารถจำแนกได้ นอกจากนี้ยังขาดผู้เชี่ยวชาญที่จะสามารถจำแนกตัวออกว่าเป็นแมลงชนิดใด ประกอบกับ

ความก้าวหน้าในงานวิจัยด้านพันธุวิศวกรรม ทำให้การจำแนกชนิดแมลงโดยอาศัยข้อมูลสารพันธุกรรมดีเอ็นเอจึงเป็นอีกทางเลือกที่นิยมเพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าว<sup>(7)</sup>

งานวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ second internal transcribed spacer (ITS2) ของยีน ribosomal RNA (rRNA gene, rDNA) และยีน NADH dehydrogenase subunit 5 (ND5) โดยอาศัยเทคนิค Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) ร่วมกับการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) เพื่อการจำแนกชนิดของแมลงวันหัวเขียวที่สำคัญในประเทศไทย

## วิธีการศึกษา

การศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาเชิงพรรณนาในงานวิจัยนี้ได้ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอของแมลงวันหัวเขียวบริเวณต่าง ๆ ในประเทศไทย คือ กรุงเทพมหานคร พิษณุโลก เชียงใหม่ ตาก และชุมพร จำนวน 31 ตัวอย่างจากงานวิจัยก่อนหน้านี้<sup>(9)</sup>

## การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

เป็นขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างจำเพาะซึ่งในการศึกษานี้ใช้ไพรเมอร์ 2 ชุด โดยชุดที่ 1 มีความเฉพาะเจาะจงกับปลาย 3' ของ 5.8S rRNA gene และ 5' ของ 28S rRNA gene เพื่อครอบคลุมลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ second internal transcribed spacer (ITS2) ของ rRNA gene<sup>(10)</sup> ส่วนชุดที่ 2 ครอบคลุมลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน NADH dehydrogenase subunit 5 (ND5) ของ mtDNA<sup>(11)</sup> (ตารางที่ 1)

ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 10X Taq buffer ปริมาณ 2 µl, 2 mM dNTP ปริมาณ 2 µl, 25mM MgCl<sub>2</sub> ปริมาณ 2 µl, 10 mM forward และ reverse primer, Taq DNA polymerase; Invitrogen® (5U/µl) ปริมาณ 0.2 µl, DNA template (200 ng/µl) ปริมาณ 1 µl และเติม

ตารางที่ 1. แสดงรายละเอียดของไพรเมอร์

No.	Name	Sequences (5' -3' )	Expected PCR Products (bp)	Reference
1	ITS2 F	TGCTTGGACTACATATGGTTGA	400	Song et al., 2008
	ITS2 R	GTAGTCCCATATGAGTTGAGGTT		
2	ND5 (a)	CCAAAATATTCWGATCAHCCYTG	437	Zehner et al., 2004
	ND5 (r)	GGATTAAGTGGTTTATWCTTT		

ddH<sub>2</sub>O จนได้ปริมาตรรวม 20 µl สำหรับกระบวนการ PCR เริ่มที่ DNA denaturation step เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วย 35 รอบของ denaturation step เป็นเวลา 45 วินาที annealing step เป็นเวลา 45 วินาที และ extension step 45 วินาที และจบด้วย final extension step เป็นเวลา 10 นาที โดยใช้เครื่อง GeneAmp 2400 PCR Thermal Cycler (Applied Biosystems®, USA) และทำการตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคที่ซีอาร์ด้วย 1% agarose gel electrophoresis

#### การสร้างพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมและถ่ายโอนเข้าสู่แบคทีเรีย

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่บริสุทธิ์มาเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะชนิด pGEM®-T easy (Promega, USA) โดยใช้ Rapid DNA ligation kit (Promega) โดยทำตามขั้นตอนที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ และทำการถ่ายโอน (transform) พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้จากปฏิกิริยาเชื่อมต่อเข้าสู่เซลล์ยีสต์ราดคอมพีเทนต์เซลล์ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α และเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมบนจานเพาะเชื้อที่ประกอบด้วย Luria-Bertani (LB) agar, 100 µg/mL ampicillin, 100 mM IPTG และ 50 µg/mL X-Gal (blue/white screening) บ่มจานเพาะเชื้อที่ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

#### การติดตามโคลนดีเอ็นเอสายผสม (positive clone selection)

ใช้เทคนิค colony PCR ในการตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมว่ามีชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจด้วย primer ที่จำเพาะต่อบริเวณ ITS2 และส่วนของยีน ND5 ดังกล่าว โดยเชื้อเชื้อที่ได้โดยเลือกเฉพาะโคลนที่มีสีขาวเพื่อเป็นต้นแบบของปฏิกิริยา PCR แทน DNA template และใช้กระบวนการ PCR ตามที่กล่าวมาก่อนหน้า จากนั้นตรวจสอบขนาดของผลผลิตที่ได้ด้วย 1% agarose gel electrophoresis นำโคลนที่ผ่านการตรวจสอบแล้วว่า มีชิ้นส่วนยีนที่สนใจมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มี ampicillin 100 µg/ml บ่มที่ 37°C, 200 รอบต่ออนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมด้วยชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ QIA Spin Miniprep Kit (QIAGEN)

#### การหาลำดับนิวคลีโอไทด์และการวิเคราะห์ผล

ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณดีเอ็นเอที่สนใจในพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมโดยใช้ ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer Applied Biosystems Division, Foster City, CA) โดยใช้ T7 promotor primer และ SP6 promotor primer เป็น primer สำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ด้วยโปรแกรม BioEdit และ ClustalX และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST N (Basic Local Alignment Search Tool)

### การวิเคราะห์ความหลากหลายด้วยเทคนิค PCR-RFLP

จำแนกความแตกต่างของจำนวนชิ้นและขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR-RFLP โดยนำผลผลิต PCR ของแมลงวันแต่ละชนิดมาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *DraI* สำหรับบริเวณ ITS2 และเอนไซม์ตัดจำเพาะ *VspI* สำหรับบริเวณยีน ND5 โดยทำตามขั้นตอนที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำและตรวจสอบด้วย 8 % native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

### การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

(Phylogenetic tree analysis)

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ผ่านการเปรียบเทียบ

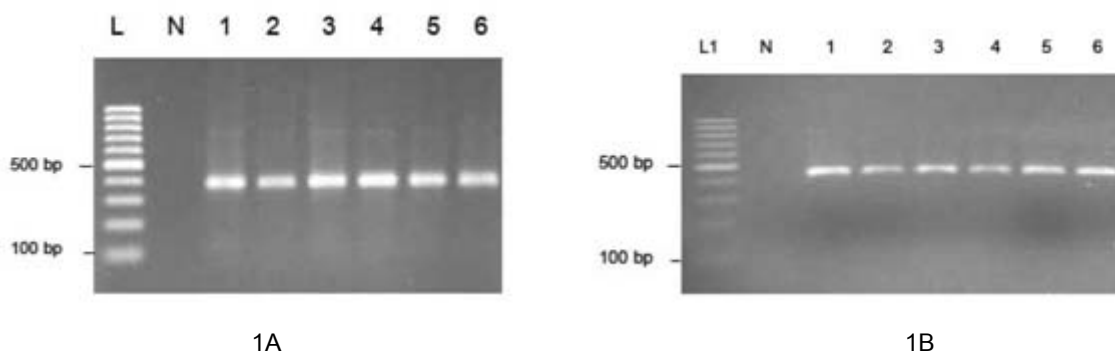
เทียบความเหมือน (multiple alignments) ด้วยโปรแกรม ClustalX มาสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA 4.1 (beta 3) แบบ Neighbor-Joining method โดยทดสอบความน่าเชื่อถือทางสถิติด้วย bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ

### ผลการวิจัย

#### ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

(polymerase chain reaction; PCR)

จากการศึกษาโดยใช้เทคนิค PCR ที่บริเวณ ITS2 และส่วนของยีน ND5 ได้ผลผลิต PCR ที่มีขนาดประมาณ 400 bp และ 437 bp ตามลำดับ (รูปที่ 1A และ รูปที่ 1B)



รูปที่ 1A และ 1B. แสดงผลผลิต PCR บริเวณ ITS2 (1A) และ ND5 (1B) จากตัวอย่างแมลงวันหัวเขียวในแต่ละชนิดโดย Lane L คือ 100 bp DNA Ladder, Lane N คือ negative control และ Lane ที่ 1-6 คือ ผลผลิต PCR บริเวณ ITS2 ของตัวอย่างแมลงวันหลังหัวเขียวชนิด *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya bezziana*, *Chrysomya rufifacies*, *Chrysomya albiceps*, *Lucilia cuprina* และ *Lucilia sericata* ตามลำดับ (ซึ่งผลผลิต PCR มีขนาดเท่ากันจากตัวอย่างทั้งหมด 31 ตัวอย่าง)

ตารางที่ 2. ขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

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

**ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายด้วยเทคนิค PCR-RFLP**

บริเวณ ITS2 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *DraI* และส่วนของยีน ND5 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *VspI* (รูปที่ 2A และ รูปที่ 2B) ตรวจสอบด้วย 8 % native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

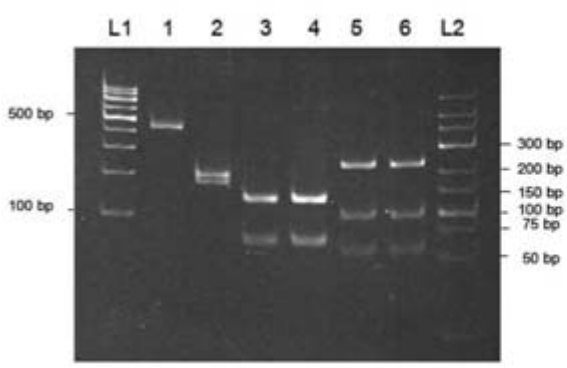
**ผลวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ**

นำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมลำดับนิวคลีโอไทด์ และทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษาบริเวณ ITS2 และส่วนของยีน ND5 กับฐานข้อมูล GenBank ที่เคยมีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ (ตารางที่ 3 และ 4) ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 และส่วนของยีน ND5 นำมาสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ด้วย Neighbor-Joining method (รูปที่ 3 และรูปที่ 4)

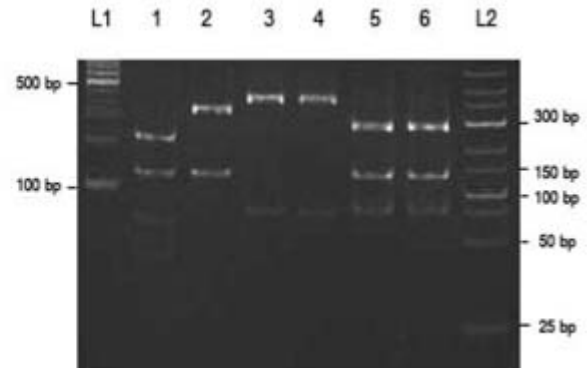
**วิจารณ์ผล**

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาความหลากหลายทางสายพันธุ์ของแมลงวันหัวเขียวในประเทศไทย โดยทำ

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอในส่วนของ second internal transcribed spacer (ITS2) ของ rDNA และ NADH dehydrogenase subunit 5 ของ mtDNA จาก การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS2 ของแมลงวันหัวเขียว ทั้ง 6 สปีชีส์ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ใช้ไพรเมอร์ ITS2 F และ ITS2 R<sup>(10)</sup> ปรากฏแถบดีเอ็นเอตามขนาดที่ประมาณไว้คือ 400 bp ดังรูปที่ 1A ซึ่งยีนส่วนนี้สามารถเพิ่มจำนวนได้ง่ายโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์<sup>(12)</sup> ขนาดของ PCR products ที่ได้สอดคล้องกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของสิ่งมีชีวิตกลุ่มแมลงซึ่งจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ประมาณ 200 - 400 bp <sup>(13)</sup> และผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 โดยการโคลนเข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะ pGEM<sup>®</sup>-T easy ยืนยันผลการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ คือให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ 360 - 391 bp ส่วนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแมลงวันหัวเขียวบริเวณส่วนของยีน ND5 ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 440 bp ดังรูปที่ 1B ซึ่งใกล้เคียงกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทดลองของ Zehner และคณะ<sup>(11)</sup> และจากการโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pGEM<sup>®</sup>-T easy และทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ให้ผลขนาดลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากันในทุกสปีชีส์คือ 437 bp



2A



2B

**รูปที่ 2A และ 2B.** แสดงรูปแบบ PCR-RFLP ของผลผลิต PCR บริเวณ ITS2 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ *DraI* (2A) และผลผลิต PCR บริเวณ ND5 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ *VspI* (2B) โดย Lane L1 คือ 100 bp DNA Ladder, Lane L2 คือ 25 bp DNA Ladder และ Lane ที่ 1-6 คือ ผลผลิต PCR บริเวณ ITS2 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของตัวอย่างแมลงวันหลังหัวเขียวชนิด *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya bezziana*, *Chrysomya rufifacies*, *Chrysomya albiceps*, *Lucilia cuprina* และ *Lucilia sericata* ตามลำดับ



ตารางที่ 3. แสดง % identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ที่ได้จากการศึกษากับฐานข้อมูล GenBank

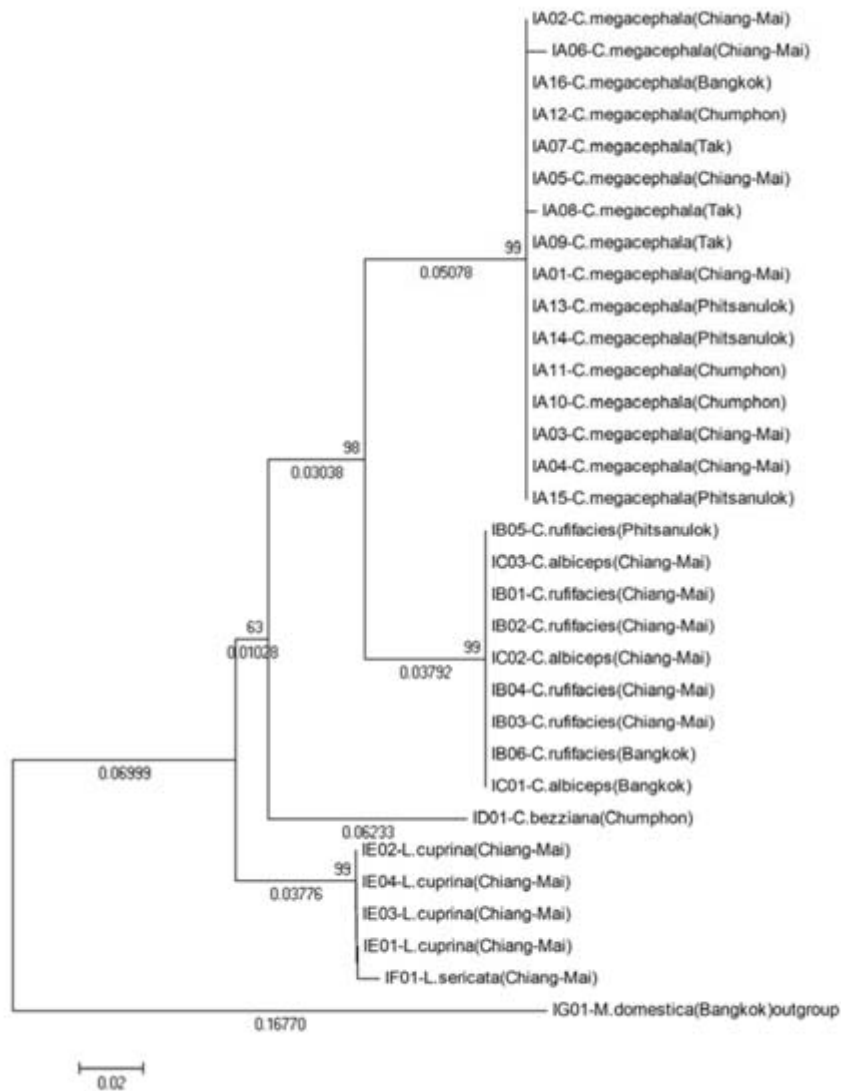
Blowfly species	Number of specimen	GenBank record or previously published ITS2		
		Accession number	% Identity	Reference
<i>Chrysomya megacephala</i>	16	EF560175.1	99%	Marinho M.AT., Junqueira A.C.M. and Azeredo-Espin A.M.L.,2007
<i>Chrysomya ruffacies</i>	6	EF560177.1	99%	Marinho M.AT., Junqueira A.C.M. and Azeredo-Espin A.M.L.,2007
<i>Chrysomya albiceps</i>	3	EF560172.1	97%	Marinho M.AT., Junqueira A.C.M. and Azeredo-Espin A.M.L.,2007
<i>Chrysomya bezziana</i>	1	EF560174.1	83%	Marinho M.AT., Junqueira A.C.M. and Azeredo-Espin A.M.L.,2007
<i>Lucilia cuprina</i>	4	EF560185.1	99%	Marinho M.AT., Junqueira A.C.M. and Azeredo-Espin A.M.L.,2007
<i>Lucilia sericata</i>	1	EF560187.1	91%	Marinho M.AT., Junqueira A.C.M. and Azeredo-Espin A.M.L.,2007

ตารางที่ 4. แสดง % identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน ND5 ที่ได้จากการศึกษากับฐานข้อมูล GenBank

Blowfly species	Number of specimen	GenBank record or previously published ND5		
		Accession number	% Identity	Reference
<i>Chrysomya megacephala</i>	16	FJ614869.1	99%	Zaidi F. and Chen X.-X., 2009
<i>Chrysomya ruffacies</i>	6	EU661319.1	100%	Yang J.B., Wang J.F. and Chen Y.C.,2008
<i>Chrysomya albiceps</i>	3	EU661319.1	99%	Yang J.B., Wang J.F. and Chen Y.C.,2008 ( <i>Chrysomya ruffacies</i> )
<i>Chrysomya bezziana</i>	1	FJ614872.1	99%	Zaidi F. and Chen X.-X., 2009 ( <i>Hemipyrellia ligurriens</i> )
<i>Lucilia cuprina</i>	4	FJ614876.1	99%	Zaidi F. and Chen X.-X., 2009 ( <i>Lucilia sericata</i> )
<i>Lucilia sericata</i>	1	FJ614876.1	98%	Zaidi F. and Chen X.-X., 2009

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันหัวเขียวในยีน ITS2 และ ND5 ที่ได้พบว่าหากนำมาทำนายผลการตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะโดยใช้โปรแกรม NEB Cutter พบว่าเอนไซม์ *DraI* และ *VspI* ตามลำดับจะได้ขนาดของชิ้น DNA ตามตารางที่ 2 และเมื่อทำการตัดยีนทั้ง 2 ยีนจากแมลงวันหัวเขียวทั้ง 6 สปีชีส์ และแสดงรูปแบบ RFLP ดังกล่าวใน 8 % native polyacrylamide gel electrophoresis ได้ลักษณะดังรูปที่ 2A สำหรับยีน ITS2 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *DraI* และรูปที่ 2B สำหรับยีน ND5 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *VspI* ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทำนายโดยใช้โปรแกรม NEB cutter เทคนิค PCR-

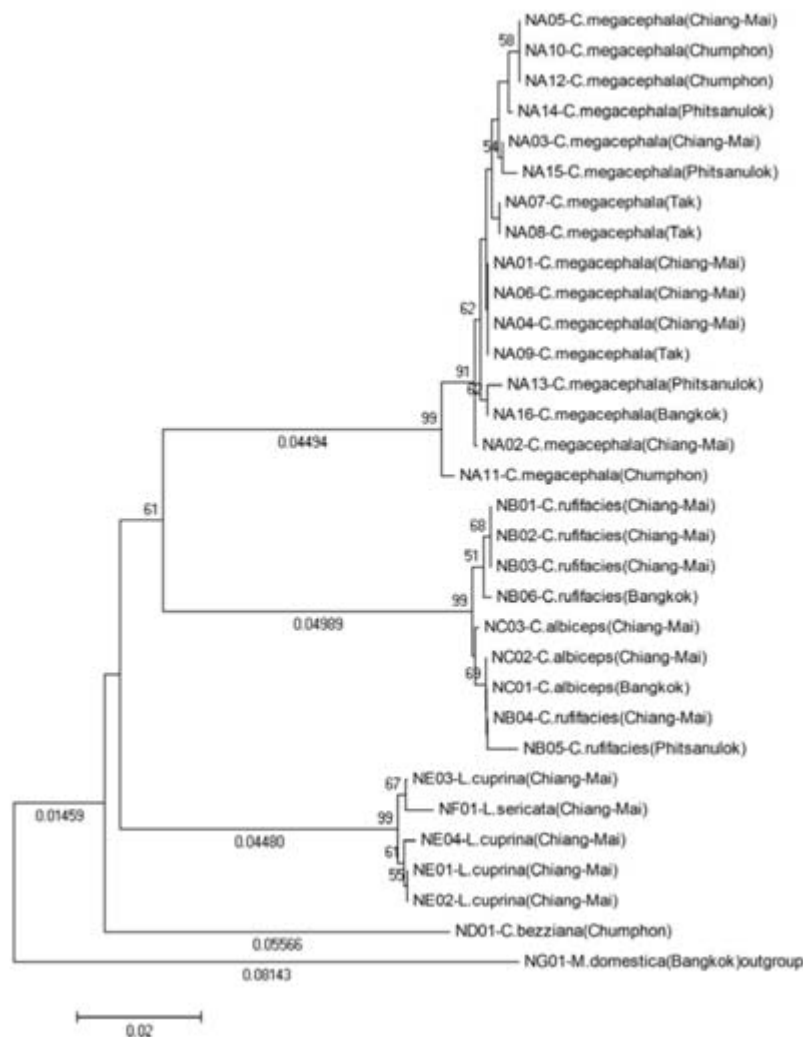
RFLP ที่เกิดจากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ITS2 แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *DraI* และการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอส่วนของยีน ND5 แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *VspI* ให้รูปแบบที่จำเพาะต่อแมลงวันหัวเขียว *Chrysomya megacephala* และ *Chrysomya bezziana* ซึ่งสามารถจำแนกแมลงวันหัวเขียวทั้ง 2 สปีชีส์ จากอีก 4 สปีชีส์ และให้รูปแบบจำเพาะต่อ *Chrysomya rufifacies* กับ *Chrysomya albiceps* (ซึ่งไม่สามารถแยก 2 สปีชีส์นี้โดย PCR-RFLP ด้วยการตัดโดยเอนไซม์ทั้ง 2 ได้) และ *Lucilia cuprina* กับ *Lucilia sericata* (ซึ่งไม่สามารถแยก 2 สปีชีส์นี้โดย PCR-RFLP ด้วยการตัดโดยเอนไซม์ทั้ง 2 ได้)



รูปที่ 3. แผนภูมิวิวัฒนาการด้วย Neighbor-Joining ของกลุ่มแมลงวันหัวเขียวในประเทศไทยจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) ของยีน ITS2 (ตารางที่ 3 และ รูปที่ 3) พบว่าสามารถจำแนกเป็น 4 กลุ่มคือ (1) *Chrysomya megacephala*, (2) *Chrysomya rufifacies* และ *Chrysomya albiceps* ซึ่งมีความใกล้เคียงกันมาก (3) *Chrysomya bezziana* และ (4) *Lucilia cuprina* และ *Lucilia sericata* ซึ่งมีความใกล้เคียงกันมาก และจากการเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้จาก GenBank พบว่ามีความเหมือนกันระหว่าง 83 - 99% (ตารางที่ 3) ส่วนการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ บริเวณส่วนของยีน ND5 (ตารางที่ 4 และรูปที่ 4) มีลักษณะคล้ายกับแผนภูมิใน ส่วนของยีน ITS2 แต่ยีน ND5 สามารถแยก *Lucilia cuprina* และ *Lucilia sericata* ออกจากกันได้ จากการ

ศึกษาของ Preativatanyou และคณะ<sup>(9)</sup> โดยใช้ PCR-RFLP โดยใช้ยีน cytochrome oxidase (CO) สามารถ จำแนก *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya rufifacies* และ *Lucilia cuprina* ที่สำรวจในประเทศไทย ออกจากกันได้แต่การศึกษาดังกล่าวไม่ได้ทำการศึกษาใน *Chrysomya albiceps*, *Chrysomya bezziana* และ *Lucilia sericata* นอกจากนี้การศึกษาของ Preativatanyou และคณะ<sup>(9)</sup> ยังพบว่าความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ ในสปีชีส์เดียวกัน (intraspecies variation) มีน้อยกว่า 1% ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ซึ่งมีความเป็นไปได้มากกว่าจะสามารถใช้เทคนิค PCR-RFLP นี้ในการบ่งบอกชนิดของแมลงวันเบื้องต้นในประเทศไทย ได้จากการศึกษาครั้งนี้



รูปที่ 4. แผนภูมิวิวัฒนาการด้วย Neighbor-Joining ของกลุ่มแมลงวันหัวเขียวในประเทศไทยจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณยีน ND5

## สรุป

ในงานวิจัยครั้งนี้เป็นการนำเสนอข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน ITS2 ของ rDNA และ ยีนND5 ของ mtDNA ในการแสดงความหลากหลายของแมลงวันหัวเขียวที่สำคัญทางนิติวิทยาศาสตร์ในประเทศไทย และการใช้เทคนิค PCR-RFLP ซึ่งสามารถแก้ปัญหาการจำแนกชนิดของหนอนแมลงวันและแมลงวันตัวเต็มวัยโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งเป็นวิธีการที่ต้องการผู้เชี่ยวชาญที่มีประสบการณ์สูง แต่การใช้เทคนิคทางอณูวิทยาซึ่งรวมถึง PCR-RFLP เป็นวิธีที่รวดเร็ว แม่นยำ และนิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในการจำแนกแมลงวันที่มีความสำคัญทางนิติวิทยาศาสตร์<sup>(9,15,16)</sup> อย่างไรก็ตามจากการศึกษานี้ยังไม่สามารถแยกแมลงวันบางสปีชีส์ซึ่งมีความใกล้เคียงกันออกจากกันได้ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความยาวของยีนที่ทำการศึกษายังไม่ยาวมากนักจึงไม่สามารถตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะที่แยกแมลงวันที่มีความใกล้เคียงกันออกจากกันได้

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## อ้างอิง

- Siriyasatien P, Sirisup N. Estimation of post-mortem interval (PMI) using data from lifecycle of flies on corpses. Chula Med J 2005 Apr; 49(4): 195-200
- Micozzi MS. Postmortem Change in Human and Animal Remains: A Systematic Approach. Springfield, Illinois: Charles C Thomas, 1991
- Coe JI, Curran WJ. Definition and time of death. In: Curran WJ, McGarry AL, Petty CS, eds. Modern Legal Medicine: Psychiatry and Forensic Science. Philadelphia: Davis, 1980: 141-64
- Henssge C, Knight B, Krompecher T, Madea B, Nokes L. The Estimation of the Time Since Death in the Early Postmortem Period. London: Edward Arnold, 1995
- Van den Oever R. A review of the literature as to the present possibilities and limitations in estimating the time of death. Med Sci Law 1976 Oct; 16(4): 269-76
- Erzinclioglu YZ. The application of entomology to forensic medicine. Med Sci Law 1983 Jan; 23(1): 57-63
- Amendt J, Krettek R, Zehner R. Forensic entomology. Naturwissenschaften 2004 Feb; 91(2): 51-65
- de Azeredo-Espin AM, Lessinger AC. Genetic approaches for studying myiasis-causing flies: molecular markers and mitochondrial genomics. Genetica 2006 Jan;126(1-2): 111-31
- Preativatanyou K, Sirisup N, Poovorawan Y, Thavara U, Tawatsin A, Sungpradit S, Siriyasatien P. Mitochondrial DNA-based identification of some forensically important blowflies in Thailand. Forensic Sci Int 2010 Oct 10; 202(1-3):97-101
- Song Z, Wang X, Liang G. Species identification of some common necrophagous flies in guangdong province, southern china based on the rDNA internal transcribed spacer 2 (ITS2). Forensic Sci Int 2008 Feb 25;175(1): 17-22
- Zehner R, Amendt J, Schutt S, Sauer J, Krettek R, Povolny D. Genetic identification of forensically important flesh flies (Diptera: Sarcophagidae). Int J Legal Med 2004 Aug;

- 118(4):245-7
12. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. San Diego: Academic Press, 1990: 315-24
13. Young I, Coleman AW. The advantages of the ITS2 region of the nuclear rDNA cistron for analysis of phylogenetic relationships of insects: a *Drosophila* example. Mol Phylogenet Evol 2004 Jan;30(1):236-42
14. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature 1981 Apr 9; 290(5806): 457-65
15. Sperling FA, Anderson GS, Hickey DA. A DNA-based approach to the identification of insect species used for postmortem interval estimation. J Forensic Sci 1994 Mar;39(2): 418-27
16. Schroeder H, Klotzbach H, Elias S, Augustin C, Püeschel K. Use of PCR-RFLP for differentiation of calliphorid larvae (Diptera: Calliphoridae) on human corpses. Forensic Sci Int 2003 Mar 12;132(1):76-81