



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

ปริญญา

พันธุศาสตร์

สาขา

พันธุศาสตร์

ภาควิชา

เรื่อง การระบุชนิดของยุงก้นปล่องชนิด *Anopheles cracens*, *An. scanloni* และ *An. nemophilous* ในกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus ในประเทศไทยโดยใช้ allele-specific PCR

Identification of *Anopheles cracens*, *An. scanloni* and *An. nemophilous* in Dirus Species Complex in Thailand Using Allele-Specific PCR

نامผู้วิจัย นางสาวอมรินทร์ บุญเกื้อ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์อุไรวรรณ อรัญวาสี, Dr.rer.nat)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ยงบุตร กุลอึ้ง, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การระบุชนิดของยุงก้นปล่องชนิด *Anopheles cracens*, *An. scanloni* และ *An. nemophilous* ในกลุ่ม
ชนิดซับซ้อน Dirus ในประเทศไทยโดยใช้ allele-specific PCR

Identification of *Anopheles cracens*, *An. scanloni* and *An. nemophilous* in Dirus Species Complex
in Thailand Using Allele-Specific PCR

โดย

นางสาวอุมรินทร์ บุญเกื้อ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

พ.ศ. 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุมารินทร์ บุญเกิด 2557: การระบุชนิดของยุงก้นปล่องชนิด *Anopheles cracens*, *An. scanloni* และ *An. nemophilous* ในกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus ในประเทศไทยโดยใช้ allele-specific PCR ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์) สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพันธุศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์
อุไรวรรณ อรัญวาสี, Dr.rer.nat. 121 หน้า

ยุงก้นปล่องชนิดซับซ้อนกลุ่ม *Anopheles dirus* เป็นพาหะนำโรคมalariaเรื้อรังที่พบการกระจายตัวในประเทศไทยและภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยยุงกลุ่มชนิดซับซ้อนดังกล่าวจะมีลักษณะสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันมากทำให้เกิดความผิดพลาดสูงในการจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยา การวิจัยนี้จึงได้มีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอด้วยวิธี allele-specific PCR เพื่อจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน Dirus จำนวน 3 ชนิด โดยออกแบบไพรเมอร์จำเพาะจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cytochrome oxidase subunit I* ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ ผลการทดสอบพบว่าไพรเมอร์จำเพาะดังกล่าวสามารถจำแนกชนิดยุงก้นปล่องชนิด *Anopheles cracens*, *An. scanloni* และ *An. nemophilous* ด้วยความแตกต่างของชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 236 338 และ 527 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อทดสอบผลจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus โดยวิธี allele-specific PCR จำนวน 105 ตัวอย่าง ที่เก็บจากจังหวัดเชียงใหม่ กาญจนบุรี ระนอง สตูล และสงขลา ระหว่างเดือนสิงหาคม 2554 ถึง มกราคม 2556 ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าเครื่องหมาย allele-specific PCR ที่ออกแบบสามารถจำแนกชนิดยุงก้นปล่องในกลุ่มซับซ้อน Dirus ทั้งสามชนิดได้แม่นยำและมีประสิทธิภาพ

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Umarin Boonkue 2014: Identification of *Anopheles cracens*, *An. scanloni* and *An. nemophilous* in Dirus Species Complex in Thailand Using Allele-Specific PCR. Master of Science (Genetics), Major Field: Genetics, Department of Genetics. Thesis Advisor: Assistant Professor Uraiwan Arunyawat, Dr.rer.nat. 121 pages.

Anopheles dirus species complex is widely distributed as primary malaria vectors in Thailand and Southeast Asia region. Morphological identification is very problematic for the Dirus complex species because of their similar morphologies among the sibling species, which usually lead to species misidentification. In this study, allele-specific PCR was developed to identify three species within *Anopheles dirus* complex group. The allele-specific primers were designed based on the nucleotide polymorphisms in mitochondrial *cytochrome oxidase subunit I* sequences. The results showed that these primers clearly amplified *Anopheles cracens*, *An. scanloni* and *An. nemophilous* for different PCR products size of 236, 338 and 527 base pair, respectively. The allele-specific PCR was tested on 105 mosquitoes of the *An. dirus* species complex from five locations including Chiangmai, Kanchanaburi, Ranong, Satun and Songkla provinces, collecting from August 2011 to January 2013. This result suggested that the allele-specific PCR could be correctly and effectively identified the three members of *An. dirus* species complex.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อุไรวรรณ อริญวาสน์ ประธาน
กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร. จตุพร กุลอึ้ง กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
ที่ให้คำปรึกษาในการเรียน การวางแผนงานวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่ง
เสร็จสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกศาสตราจารย์ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ และ
ประธานการสอบ อาจารย์ ดร. ประดิษฐ์ แสงทอง ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำและการตรวจแก้ไข
ข้อบกพร่องในการทำวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. เวช ชูโชติ ภาควิชาประวัติศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ศาสตราจารย์ ดร. ชีระภาพ เจริญวิริยะภาพ ดร. มณฑาทิพย์ คงมี
คุณวรรณภา ฤทธิสนธิ์ คุณกรกาญจน์า ถาอินชุม คุณฉัตรชัย ธนนไชย และทีมนักวิจัยจาก
ห้องปฏิบัติการภาควิชาภูมิวิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และคุณวิรัช วงศ์หิรัญรัตน์ นักวิชาการ
สาธารณสุข 8 และทีมนักวิจัยจากสำนักงานป้องกันควบคุมโรคติดต่อ นำโดยแมลงที่ 12 สงขลา
สำหรับตัวอย่างยุงก้นปล่องที่นำมาใช้ในงานวิจัยและให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง

ขอกราบขอบพระคุณ คณาจารย์ภาควิชาพันธุศาสตร์ทุกท่าน ที่กรุณาอบรมสั่งสอน
ถ่ายทอดวิชาความรู้ และให้กำลังใจเป็นอย่างดีเสมอมา ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่าน เพื่อนๆ พี่ๆ
และน้องๆ ในภาควิชาพันธุศาสตร์ ที่ให้คำปรึกษา เป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

งานวิจัยฉบับนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัย และพัฒนาแห่ง
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ท้ายที่สุดนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และสมาชิกทุกคนในครอบครัวที่
คอยดูแล เป็นกำลังใจ และสนับสนุนกำลังใจทรัพย์ ตลอดจนคอยช่วยเหลือในทุกสิ่งจนสำเร็จ
การศึกษา

อุมารินทร์ บุญเกื้อ
เมษายน 2557

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(9)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	38
อุปกรณ์	38
วิธีการ	42
ผลและวิจารณ์	53
สรุปและข้อเสนอแนะ	87
สรุป	87
ข้อเสนอแนะ	87
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	88
ภาคผนวก	99
ภาคผนวก ก การจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดจับช้อน Dirus	100
ภาคผนวก ข หลักเกณฑ์ในการพิจารณาสำหรับการออกแบบไพรเมอร์	112
ภาคผนวก ค การแยกขนาดของดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis	115
ภาคผนวก ง การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการศึกษา	118
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	121

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 จำนวนยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus จากแหล่งพื้นที่ศึกษา	39
2 ผลการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน Dirus จากพื้นที่ศึกษา โดยลักษณะสัณฐานวิทยา	56
3 ไพโรมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอชิ้นส่วนยีน <i>COI</i>	58
4 ไพโรมอร์ที่ใช้ในการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน Dirus จำนวน 3 ชนิด	61
5 ผลการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน Dirus จากพื้นที่ศึกษา โดยวิธี allele-specific PCR	84
6 แสดงการเปรียบเทียบผลจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน Dirus ด้วยลักษณะ สัณฐานวิทยาและการจำแนกด้วยเครื่องหมายโมเลกุล วิธี allele-specific PCR	85
ตารางผนวกที่	
ก1 ผลการจำแนกชนิดและแหล่งที่มาของตัวอย่างยุงก้นปล่อง	101

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 แสดงการกระจายตัวของยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus	5
2 กราฟรายงานจำนวนผู้ป่วยจากโรคมาลาเรียในแต่ละประเทศของ WHO ในปี 1997-2006	7
3 กราฟรายงานจำนวนผู้เสียชีวิตจากโรคมาลาเรียในแต่ละประเทศของ WHO ในปี 1997-2006	8
4 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus	9
5 แสดงลักษณะแถบสีขาวบริเวณ Maxillary palpus ของยุงก้นปล่อง กลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus	10
6 แสดงลักษณะเกล็ด (scales) บริเวณ Anteprenotum ของยุงก้นปล่อง กลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus	11
7 แสดงลักษณะแถบสีขาวบริเวณขาหลังที่ข้อพับระหว่าง Tibia และ Tarsus ของยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus	11
8 แสดงลักษณะเส้นปีก (wing veins) และลักษณะแถบเกล็ดสีเข้มและจาง ของยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus	12
9 แสดงลักษณะ accessory sector pale (ASP) spot บน vein costavein subcosta และ vein radius (R-R1) ของปีกยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus	13
10 แสดงลักษณะเกล็ด (scales) บริเวณ Abdominal sternum VI ของยุงก้นปล่อง กลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus	13
11 แสดง PSD spot บน vein radius ขาวถึง HD spot ของปีกยุงก้นปล่อง <i>An. dirus</i> <i>An. cracens</i> <i>An. scanloni</i> และ <i>An. baimaii</i> และ PSD spot บน vein radius ขาวไม่ถึง HD spot ของปีกยุงก้นปล่อง <i>An. nemophilous</i>	14
12 แสดง PSD spot บน vein radius ปรากฏจุดขาวแทรกบนปีกยุงก้นปล่อง <i>An. dirus</i> <i>An. cracens</i> <i>An. scanloni</i> และ <i>An. baimaii</i> และ PSD spot บน vein radius ไม่ปรากฏจุดขาวแทรกบนปีกยุงก้นปล่อง <i>An. nemophilous</i>	15

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
13	แสดงขาของยุงก้นปล่อง <i>An. scanloni</i> ซึ่งปรากฏแท่งสีดำยื่นเข้าไปในแถบขาบริเวณข้อต่อระหว่าง Tibia-Tarsus และแสดงขาของยุงก้นปล่อง <i>An. scanloni</i> ซึ่งไม่ปรากฏแท่งสีดำยื่นเข้าไปในแถบขาบริเวณข้อต่อระหว่าง Tibia-Tarsus	16
14	แสดงปีกยุงก้นปล่อง <i>An. scanloni</i> ซึ่งไม่ปรากฏจุดขาวบน vein 1A ที่ระดับเดียวกับ PSD spot บน vein costa และแสดงปีกยุงก้นปล่อง <i>An. scanloni</i> ซึ่งปรากฏจุดขาวบน vein 1A ที่ระดับเดียวกับ PSD spot บน vein costa	17
15	แสดงลักษณะการปรากฏเกล็ดสีดำ (dark scales) บริเวณ Abdominal sternum VI ของยุงก้นปล่อง <i>An. cracens</i> และแสดงลักษณะการไม่ปรากฏเกล็ดสีดำ (dark scales) บริเวณ Abdominal sternum VI ของยุงก้นปล่อง <i>An. dirus</i> และ <i>An. baimaii</i>	18
16	แสดงปีกยุงก้นปล่อง <i>An. dirus</i> ซึ่งลักษณะ PSD spot บน vein radius ล้ำขึ้นไปถึง PSD spot บน vein costa และยาวถึง HD ของ vein costa (1) หรือยาวถึงกึ่งกลางของ PSP spot ของ vein costa (2) และแสดงปีกยุงก้นปล่อง <i>An. baimaii</i> ซึ่งลักษณะ PSD spot บน vein radius ล้ำขึ้นไปถึง PSD spot บน vein costa (1) หรือขยายออกไปด้านข้างไม่ถึงกึ่งกลางของ PSP spot ของ vein costa (2)	19
17	แสดง Tarsomere 1 และ Tarsomere 2 ซึ่งปรากฏลักษณะจุด และแถบสีขาวของขา ยุงก้นปล่อง <i>An. scanloni</i> และ แสดง Tarsomere 1 และ Tarsomere 2 ซึ่งปรากฏลักษณะจุด และแถบสีขาวของขา ยุงก้นปล่อง <i>An. baimaii</i>	20
18	แสดงปีกของยุงก้นปล่อง <i>An. minimus</i> ไม่ปรากฏ HP spot และปีกของยุงก้นปล่อง <i>An. harisoni</i> ซึ่งปรากฏ HP spot	22
19	สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ได้จากวิธี NJ โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>ITS2</i>	26
20	แสดงตำแหน่งของยีนและส่วนที่ไม่ใช่ยีนในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ	30
21	แสดงปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR	33
22	แสดงตำแหน่งแหล่งเก็บตัวอย่างยุงก้นปล่องในประเทศไทย	39
23	แสดงสภาพภูมิประเทศของจุดเก็บตัวอย่างอำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	54
24	แสดงสภาพภูมิประเทศของจุดเก็บตัวอย่างอำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี	54

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
25	แสดงสภาพภูมิประเทศของจุดเก็บตัวอย่างอำเภอนาหวี จังหวัดสงขลา
26	แสดงลักษณะภูมิประเทศของจุดเก็บตัวอย่างอำเภอละอุ่น จังหวัดระนอง
27	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน <i>COI</i> ของยุงก้นปล่อง <i>An. cracens</i> <i>An. scanloni</i> และ <i>An. nemophilous</i> และตำแหน่งของ forward primer (COIF) และ reverse primer (COIR)
28	ผลการเพิ่มปริมาณขนาดดีเอ็นเอเป้าหมายบริเวณยีน <i>COI</i> ของยุงก้นปล่องกลุ่มชนิด ชับซ้อน Dirus ด้วยคู่ไพรเมอร์ COIF/COIR: ช่อง M คือ GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas LIFE SCIENCES, USA) ช่อง 1 คือ negative control ช่อง 2-3 คือ <i>An. cracens</i> พบว่า สามารถเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 713 คู่เบส ได้เมื่อเทียบกับขนาดกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA Marker)
29	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน <i>COI</i> ของยุงก้นปล่อง <i>An. cracens</i> <i>An. scanloni</i> และ <i>An. nemophilous</i> และตำแหน่งของ forward primer (UU) และ reverse primer (DB DC DF)
30	ผล Multiplex PCR ในการจำแนกยุงก้นปล่องชนิดทับซ้อนกลุ่ม Dirus ช่อง M คือ GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas LIFE SCIENCES, USA) ช่อง 1-5 คือ <i>An. cracens</i> ช่อง 5-10 คือ <i>An. scanloni</i> ช่อง 11-15 คือ <i>An. nemophilous</i> และ ช่อง 16 คือ negative control
31	แสดงผลการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดทับซ้อน Dirus ด้วยวิธี allele-specific PCR ซึ่งแสดงผลบน 1.5 % agarose gel
32	ผลการใช้วิธี Gradient PCR ในการทดสอบสถานะที่เหมาะสมของยุงก้นปล่อง <i>An. cracens</i> จากคู่ไพรเมอร์ UU/DB ช่อง M คือ GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas LIFE SCIENCES, USA) ช่อง 1 คือ negative control ช่อง 2-8 คือ <i>An. cracens</i> ซึ่งแสดงผลบน 1.5% agarose gel
33	ผลการทดสอบสถานะที่เหมาะสมของยุงก้นปล่อง <i>An. scanloni</i> โดยวิธี Gradient PCR จากคู่ไพรเมอร์ UU/DC ช่อง M คือ GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas LIFE SCIENCES, USA) ช่อง 1 คือ negative control ช่อง 2-8 คือ <i>An. scanloni</i> ซึ่งแสดงผลบน 1.5 % agarose gel

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
34	ผลการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของยุงก้นปล่อง <i>An. nemophilous</i> จากคู่ไพรเมอร์ UU/DF โดยวิธี Gradient PCR ซึ่งแสดงผลบน 1.5 % agarose gel ช่อง M คือ GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas LIFE SCIENCES, USA) ช่อง 1 คือ negative control ช่อง 2-8 คือ <i>An. nemophilous</i>	68
35	ผลการปรับความเข้มข้นของ MgCl ₂ ในยุงก้นปล่อง <i>An. cracens</i> โดยวิธี allele-specific PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ UU/DB	70
36	ผลการปรับความเข้มข้นของ MgCl ₂ ในยุงก้นปล่อง <i>An. scanloni</i> โดยวิธี allele-specific PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ UU/DC	70
37	ผลการปรับความเข้มข้นของ MgCl ₂ ในยุงก้นปล่อง <i>An. nemophilous</i> โดยวิธี allele-specific PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ UU/DF	71
38	ผลการปรับความเข้มข้นของ Primer ในยุงก้นปล่อง <i>An. cracens</i> โดยวิธี allele-specific PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ UU/DB	72
39	ผลการปรับความเข้มข้นของ Primer ในยุงก้นปล่อง <i>An. scanloni</i> โดยวิธี allele-specific PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ UU/DC	72
40	ผลการปรับความเข้มข้นของ Primer ในยุงก้นปล่อง <i>An. nemophilous</i> โดยวิธี allele-specific PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ UU/DF	73
41	ผลการจำแนกชนิดยุงก้นปล่อง <i>An. cracens</i> 10 ตัวอย่าง โดยวิธี allele-specific PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ UU/DB ช่อง M คือ GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas LIFE SCIENCES, USA) ช่อง 1-10 คือ <i>An. cracens</i> และช่อง 11 คือ negative control ซึ่งแสดงผลบน 1.5 % agarose gel โดยยุงก้นปล่อง <i>An. cracens</i> ได้แถบดีเอ็นเอ ขนาด 236 คู่เบส	74
42	ผลการใช้วิธี allele-specific PCR ในการจำแนกชนิดยุงก้นปล่อง <i>An. scanloni</i> 10 ตัวอย่าง ด้วยคู่ไพรเมอร์ UU/DC ซึ่งแสดงผลบน 1.5 % agarose gel แสดงแถบดีเอ็นเอ ที่มีความจำเพาะกับยุงก้นปล่อง <i>An. scanloni</i> ขนาด 338 คู่เบส ช่อง M คือ GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas LIFE SCIENCES, USA) ช่อง 1-10 คือ <i>An. scanloni</i> ช่อง 11 คือ negative control	74

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	เนื้อหา	หน้า
43	แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ UU/DF ในการจำแนกชนิดยุงก้นปล่อง <i>An. nemophilous</i> 4 ตัวอย่าง ด้วยวิธี allele-specific PCR ซึ่งแสดงผลบน 1.5 % agarose gel ช่อง M คือ GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas LIFE SCIENCES, USA) ช่อง 1-4 คือ <i>An. nemophilous</i> และช่อง 5 คือ negative control โดยยุงก้นปล่อง <i>An. nemophilous</i> จะแสดงแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับยุง <i>An. nemophilous</i> ขนาด 527 คู่เบส	75
44	ผลการใช้วิธี allele-specific PCR ในการจำแนกชนิดยุงก้นปล่อง <i>An. cracens</i> ด้วยไพรเมอร์คู่ UU/DB: ช่อง M คือ GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas LIFE SCIENCES, USA) ช่อง 1-3 คือ <i>An. cracens</i> ช่อง 4-6 คือ <i>An. scanloni</i> ช่อง 7-9 คือ <i>An. nemophilous</i> และช่อง 10 คือ negative control ซึ่งแสดงผลบน 1.5 % agarose gel พบแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับยุงก้นปล่อง <i>An. cracens</i> ขนาด 236 คู่เบส เท่านั้น	78
45	ผลการใช้วิธี allele-specific PCR ในการจำแนกชนิดยุงก้นปล่อง <i>An. scanloni</i> ด้วยไพรเมอร์คู่ UU/DC ช่อง M คือ GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas LIFE SCIENCES, USA) ช่อง 1-3 คือ <i>An. cracens</i> ช่อง 4-6 คือ <i>An. scanloni</i> ช่อง 7-9 คือ <i>An. nemophilous</i> และช่อง 10 คือ negative control ซึ่งแสดงผลบน 1.5 % agarose gel พบแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับยุงก้นปล่อง <i>An. scanloni</i> ขนาด 338 คู่เบส เท่านั้น	78
46	ผลการใช้วิธี allele-specific PCR ในการจำแนกชนิดยุงก้นปล่อง <i>An. nemophilous</i> ด้วยไพรเมอร์คู่ UU/DF ช่อง M คือ GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas LIFE SCIENCES, USA) ช่อง 1-3 คือ <i>An. cracens</i> ช่อง 4-6 คือ <i>An. scanloni</i> ช่อง 7-9 คือ <i>An. nemophilous</i> และช่อง 10 คือ negative control ซึ่งแสดงผลบน 1.5 % agarose gel เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ UU/DF พบแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับยุงก้นปล่อง <i>An. nemophilous</i> ขนาด 527 คู่เบส เท่านั้น	79
47	ผล Multiplex PCR ในการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus ช่อง M คือ GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas LIFE SCIENCES, USA) ช่อง 1 คือ <i>An. cracens</i> ช่อง 2 คือ <i>An. scanloni</i> ช่อง 3 คือ <i>An. nemophilous</i> ช่อง 4 คือ negative control	80

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
48	ผล Multiplex PCR ในการทดสอบจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus โดยใช้ allele specific primer คือ UU: forward universal primer และ DB DC DF: reverse universal primer ช่อง M คือ GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas LIFE SCIENCES, USA) ช่อง N คือ negative control B คือ <i>An. cracens</i> (236 bp) C คือ <i>An. scanloni</i> (338 bp) และ F คือ <i>An. nemophilous</i> (527 bp)	83
ภาพผนวกที่		
ก1	แถบดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษา	117

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

BLAST	=	Basic local alignment search tool
COI	=	Cytochrome c oxidase I
COII	=	Cytochrome c oxidase II
Cyt b	=	Cytochrome b
⁰ C	=	degree Celsius
D-loop	=	displacement loop
DNA	=	deoxyribonucleic acid
dNTP	=	deoxyribonucleotide triphosphate
ITS 2	=	Internal transcribed spacer 2
NCBI	=	National Center for Biotechnology Information
ng	=	nano (10 ⁻⁹) gram
PCR	=	Polymerase chain reaction
RAPD	=	Random amplified polymorphic DNA
RNA	=	ribonucleic acid
rDNA	=	ribosomal DNA
SCAR	=	Sequence characterized amplified region
SSR	=	Simple sequence repeat
SNP	=	Single nucleotide polymorphism
TAE	=	Tris-acetate, EDTA
TBE	=	Tris-borate, EDTA
TPE	=	Tris-phosphate, EDTA
WHO	=	World Health Organization
U	=	enzyme Unit
μl	=	microliter

การระบุชนิดของยุงก้นปล่องชนิด *Anopheles cracens*, *An. scanloni* และ
An. nemophilous ในกลุ่มชนิดซับซ้อน *Dirus* ในประเทศไทยโดยใช้
allele-specific PCR

Identification of *Anopheles cracens*, *An. scanloni* and *An. nemophilous* in
Dirus Species Complex Thailand Using Allele-Specific PCR

คำนำ

มาลาเรียยังเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขของประเทศไทยและหลายประเทศในเขตร้อน ในแต่ละปีมีผู้เสียชีวิตจากมาลาเรียมากกว่าล้านคนทั่วโลกการกำจัดมาลาเรียให้หมดไปเป็นเรื่องที่ทำได้ยากเนื่องจากการแพร่ระบาดของมาลาเรียขึ้นกับปัจจัย 2 ประการ คือการที่มีผู้ป่วยหรือผู้ที่มีเชื้อมาลาเรียอยู่ในกระแสเลือดและการที่มียุงก้นปล่องพาหะในชุมชนปัจจุบันแม้ว่าในบางพื้นที่ของประเทศไทยจะปลอดมาลาเรียแต่ก็ยังพบว่ามียุงก้นปล่องซึ่งมีความสามารถในการเป็นพาหะนำเชื้อมาลาเรียกลับมาแพร่ระบาดในบริเวณพื้นที่ที่เคยปลอดมาลาเรียโดยเฉพาะบริเวณชายแดนระหว่างประเทศที่มีผู้ป่วยมาลาเรียอพยพเข้ามา ดังนั้นการวางแผนควบคุมและป้องกันการแพร่ระบาดของโรคมาลาเรียอย่างมีประสิทธิภาพจึงเป็นปัญหาเร่งด่วนของหลายประเทศรวมถึงประเทศไทย วิธีการควบคุมโรคมาลาเรียได้มีการแก้ไข และปรับเปลี่ยนอยู่อย่างต่อเนื่องเพื่อลดพื้นที่ที่มีปัญหาการระบาดของโรคให้น้อยลงมากที่สุด เช่น การใช้มุ้งชุบสารเคมี (Insecticide-Treated nets: ITNs) การฉีดพ่นสารเคมีฆ่าแมลงในบ้าน (Indoor Residual Spraying: IRS) และการใช้สารเคมีกำจัดแมลงจำพวกไพรีทรอยด์แทนการใช้ดีดีทีเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้อย่างแพร่หลายในการป้องกันการระบาดของโรคมาลาเรีย แต่ปัจจุบันพบปัญหาที่สำคัญคือ ยุงพาหะมีความไวและปรับตัวต่อสารเคมีค่อนข้างเร็ว จึงเป็นข้อจำกัดต่อประสิทธิภาพในการควบคุมการระบาดของมาลาเรีย

ยุงก้นปล่องกลุ่ม *Anopheles dirus* complex เป็นพาหะหลักนำโรคมาลาเรียที่สำคัญเป็นอันดับต้นๆในประเทศไทยและหลายประเทศในเขตร้อน จากรายงานในประเทศไทยพบยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน *Dirus* ประมาณ 5 ชนิด โดยพบความสามารถในการเป็นพาหะนำโรคมาลาเรียของยุงแต่ละชนิดภายในกลุ่มซับซ้อนมีความแตกต่างกัน เช่น ยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน *Dirus* ชนิด *Anopheles dirus* *An. scanloni* และ *An. baimaii* มีบทบาทสำคัญในการเป็นพาหะนำเชื้อ

Plasmodium ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคมาลาเรีย ส่วนยุงชนิดอื่นในกลุ่มดังกล่าว เช่น *An. cracens* และ *An. nemophilous* ไม่ได้เป็นพาหะนำเชื้อมาลาเรีย โดยกลไกความสัมพันธ์ระหว่างชนิดยุงพาหะและเชื้อ *Plasmodium* ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

ปัญหาสำคัญในการควบคุมการแพร่กระจายของยุงก้นปล่องพาหะนำโรคมาลาเรียกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus คือการที่ไม่สามารถจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาได้ชัดเจน เนื่องจากยุงแต่ละชนิดมีลักษณะภายนอกที่คล้ายคลึงกันมาก (sibling species) ซึ่งพบว่ามีผลผลิตสูงในการจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาในยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อนแต่ละกลุ่ม เช่น รายงานการจำแนกชนิดยุงผลิตผลระหว่างยุงก้นปล่อง *An. minimus* และ *An. varuna* บริเวณภาคกลางของประเทศเวียดนาม (Van Bortel *et al.*, 2001) และการจำแนกชนิดยุงผลิตผลในยุงก้นปล่อง *An. minimus* และ *An. fluviatilis* ในรัฐอัสสัมของประเทศอินเดีย (Singh *et al.*, 2010) และมีรายงานการจำแนกชนิดยุงผลิตผลระหว่างยุงก้นปล่อง *An. minimus* และ *An. harrisoni* ในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของยุงก้นปล่อง *An. harrisoni* ที่เป็นพาหะของโรคมาลาเรียในประเทศไทย (Phunngam, 2012) โดยมีรายงานความผิดพลาดในการจำแนกชนิดยุงกลุ่มซับซ้อน (Complex species) แต่ละกลุ่มในอัตราสูง (Tananchai *et al.*, 2012) ซึ่งการจำแนกชนิดยุงที่ไม่ถูกต้อง มีผลกระทบอย่างมากต่อการควบคุมการแพร่กระจายของยุงก้นปล่องซึ่งเป็นพาหะนำโรคมาลาเรีย เนื่องจากความสามารถในการเป็นพาหะนำโรคของยุงแต่ละชนิดภายในกลุ่มซับซ้อนมีความแตกต่างกัน บางชนิดเป็นพาหะนำโรคที่สำคัญ ยุงบางชนิดในกลุ่มซับซ้อนเดียวกันไม่ได้เป็นพาหะนำโรคมาลาเรีย ดังนั้นความผิดพลาดในการจำแนกชนิดยุงโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาจะทำให้ใช้วิธีการในการควบคุมจัดการที่ไม่ถูกต้องและไม่ได้ประสิทธิภาพ เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว จำเป็นต้องใช้เครื่องหมายโมเลกุลในระดับดีเอ็นเอในการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน ซึ่งเป็นวิธีที่เหมาะสมทั้งด้านความสะดวก และแม่นยำ ในการจำแนกชนิดยุงที่ไม่สามารถแยกได้ด้วยความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา แม้ว่าจะมีการพัฒนาเทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอในการจำแนกยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus มาบ้างแล้ว แต่พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าวยังมีปัญหาในด้านประสิทธิภาพและความไม่เสถียรในการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus อาจเนื่องจากเทคนิคที่ใช้ในการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าวหรืออาจเนื่องจากเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนานั้นไม่จำเพาะเพียงพอต่อยุงแต่ละชนิดในกลุ่มซับซ้อนดังกล่าว ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงต้องการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอด้วยเทคนิค allele-specific PCR เพื่อให้ได้ไพรเมอร์ในการจำแนกชนิดของยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน Dirus จำนวน 3 ชนิด ได้แม่นยำและมีประสิทธิภาพมากขึ้น เพื่อประโยชน์ในการวางแผนควบคุมการแพร่กระจายของโรคมาลาเรียอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดต่อไป

วัตถุประสงค์

พัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ โดยวิธี allele-specific PCR เพื่อใช้ในการจำแนกยุงก้นปล่อง
กลุ่มชนิดซับซ้อน *Anopheles dirus* complex จำนวน 3 ชนิด



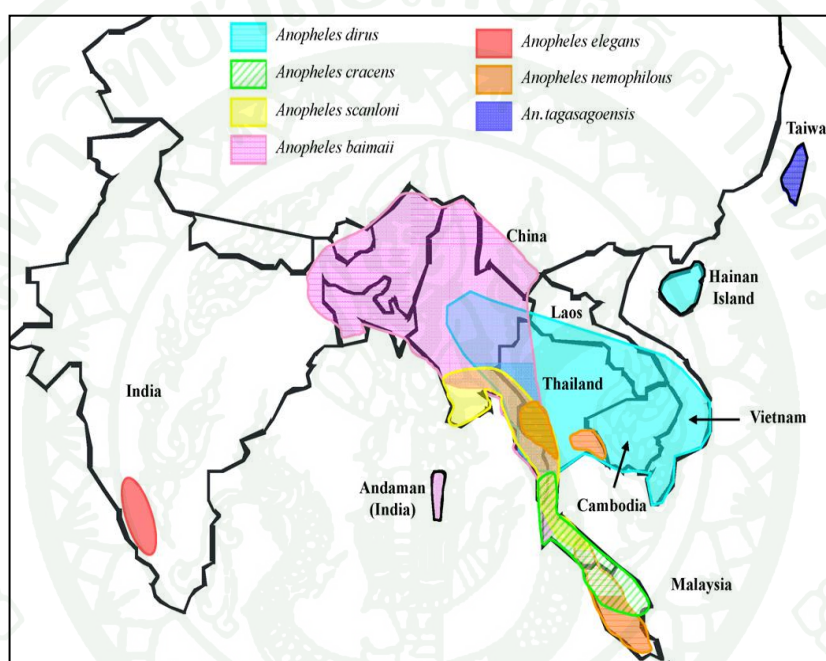
การตรวจเอกสาร

ยุงพาหะนำโรคมาลาเรีย

ยุงก้นปล่อง *Anopheles* เป็นพาหะนำโรคมาลาเรียที่สำคัญ (Cann, 1996; Rich and Ayala, 2006) โดยยุงก้นปล่องใน genus *Anopheles* ประกอบด้วยยุงก้นปล่อง จำนวน 484 ชนิด ซึ่งมีการตั้งชื่ออย่างเป็นทางการและไม่เป็นทางการสามารถแบ่งออกเป็น 6 subgenus คือ *Anopheles* (189 ชนิด) *Cellia* Theobald (239 ชนิด) *Kerteszia* Theobald (12 ชนิด) *Lophopodomyia* Antunes (6 ชนิด) *Nyssorhynchus* Blanchard (33 ชนิด) และ *Stethomyia* Theobald (5 ชนิด) (Harbach, 2004) จากรายงานพบยุงก้นปล่องประมาณ 70-80 ชนิด เป็นพาหะนำโรคมาลาเรีย โดยยุงก้นปล่องที่เป็นพาหะนำโรคมาลาเรียส่วนใหญ่ อยู่ใน subgenus *Anopheles* และ subgenus *Cellia* ส่วนยุงก้นปล่องใน subgenus *Lophopodomyia* และ *Stethomyia* ไม่เป็นพาหะนำโรคมาลาเรีย (Manguin *et al.*, 2008a) ซึ่งยุงก้นปล่อง subgenus *Cellia* เป็นพาหะนำโรคมาลาเรียที่สำคัญในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยยุงก้นปล่องที่เป็นพาหะนำโรคมาลาเรียประกอบด้วย 7 กลุ่มชนิดซับซ้อน (Complex Species) คือ กลุ่ม *Dirus* *Minimus* *Fluviatilis* *Culifacies* *Leucosphyrus* *Sundaicus* และกลุ่ม *Maculatus* (Manguin *et al.*, 2008b) ซึ่งในประเทศไทยพบว่ายุงก้นปล่องที่เป็นพาหะหลักนำเชื้อมาลาเรียคือยุงกลุ่ม *Dirus* (*An. dirus* และ *An. baimaii*) กลุ่ม *Minimus* (*An. minimus*) และกลุ่ม *Maculatus* (*An. maculatus*) ส่วนพาหะรอง เช่น *An. sundaicus* *An. aconitus* และ *An. pseudowilmori* (Rattanarithikul *et al.*, 2006) ซึ่งพบว่ายุงก้นปล่องพาหะนำโรคส่วนใหญ่ในกลุ่มซับซ้อนเดียวกันจะมีลักษณะภายนอกคล้ายคลึงกันแต่มีความสามารถในการเป็นพาหะนำโรคที่แตกต่างกัน

ยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน *Dirus* ประกอบด้วย 7 ชนิด ซึ่งมีการกระจายตัวอยู่ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้โดยยุงก้นปล่อง *An. dirus* พบบริเวณประเทศพม่า ไทย กัมพูชา ลาว เวียดนาม และเกาะไหหลำ ยุงก้นปล่อง *An. cracens* พบบริเวณคาบสมุทรทางภาคใต้ของประเทศไทยบริเวณคาบสมุทรของประเทศมาเลเซีย และบริเวณเกาะสุมาตราของประเทศอินโดนีเซีย ยุงก้นปล่อง *An. scanloni* พบในสภาพแวดล้อมที่มีลักษณะเป็นเขาหินปูน บริเวณชายแดนทางภาคใต้ของประเทศพม่า ภาคตะวันตกและภาคใต้ของประเทศไทย ซึ่งในประเทศไทยจะพบประชากรหนาแน่นเฉพาะบริเวณเกาะที่มีลักษณะเป็นหินปูนยุงก้นปล่อง *An. baimaii* พบบริเวณพื้นที่ภาคใต้ฝั่งตะวันตกของประเทศไทย (มณฑลยูนนาน) ภาคตะวันตกของประเทศไทย ประเทศพม่า

ประเทศบังกลาเทศ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และหมู่เกาะอันดามันของประเทศอินเดีย
 ยุงก้นปล่อง *An. elegans* พบบริเวณป่าแถบเนินเขาในภาคใต้ฝั่งตะวันตกของประเทศอินเดีย
 ยุงก้นปล่อง *An. nemophilous* พบบริเวณแนวตะเข็บชายแดนระหว่างประเทศ เช่น ชายแดนประเทศ
 ไทยกับประเทศมาเลเซียชายแดนประเทศไทยกับประเทศพม่าและยุงก้นปล่อง *An. takasagoensis*
 พบเฉพาะในประเทศไต้หวัน (O'Loughlin *et al.*, 2007; Sallum *et al.*, 2005; Manguin *et al.*, 2008)
 ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แสดงการกระจายตัวของยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus

ที่มา: Manguin *et al.* (2008)

ยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus

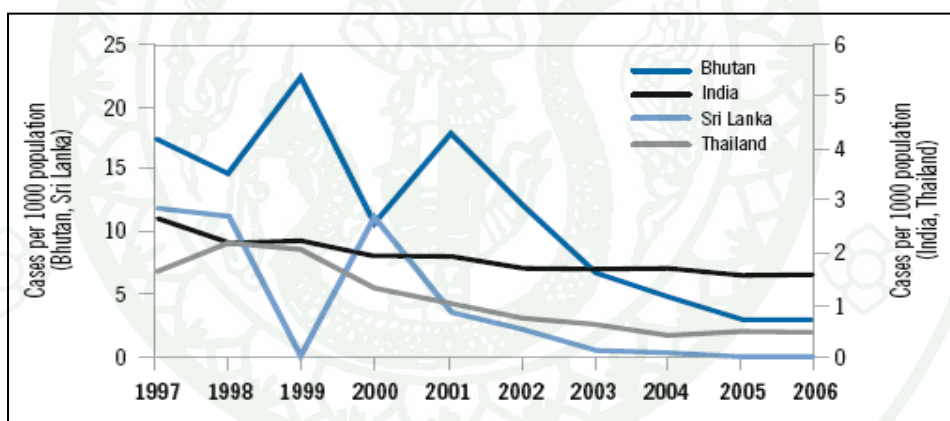
ยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus เป็นพาหะนำโรคมะลาเรียที่สำคัญในประเทศไทยและ
 ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ประกอบด้วย 7 ชนิด คือ *An. dirus* (ชนิด A) *An. cracens*
 (ชนิด B) *An. scanloni* (ชนิด C) *An. baimaii* (ชนิด D) *An. elegans* (ชนิด E) *An. nemophilous*
 (ชนิด F) และ *An. takasagoensis* Morishita (Peyton, 1989) ซึ่งยุงก้นปล่องแต่ละชนิดมีชื่อเดิมคือ

An. dirus Peyton & Harison sensu stricto (ชนิด A) ชนิด B ชนิด C ชนิด E ซึ่งยังไม่มีการตั้งชื่อ *An. nemophilous* Peyton & Ramalingam (ชนิด F) และ *An. takasagoensis* Morishita (Peyton, 1989; Peyton and Harison, 1979; Peyton and Harison, 1980; Peyton and Ramalingam, 1988; Manguin *et al.*, 2002) ซึ่งอนุกรมวิธานของยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน Dirus ทุกชนิดได้รับการแก้ไข และมีการอธิบายลักษณะทางสัณฐานวิทยาและมีชื่อทางการเป็นภาษาละตินเมื่อไม่นานมานี้ (Sullum *et al.*, 2005; Manguin *et al.*, 2008) ยุงก้นปล่องที่เป็นพาหะหลักนำโรคมาลาเรีย ได้แก่ ยุง *An. dirus* และ *An. baimaii* ซึ่งมีความสามารถในการแพร่เชื้อ *P. falciparum* และ *P. Vivax* จากรายงานพบว่ายุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus มีพฤติกรรมชอบกินเลือดคน และมีความสามารถในการทำให้เกิดโรคสูง (Baimai *et al.*, 1988b) ส่วนยุง *An. cracens* *An. scanloni* และ *An. elegans* เป็นยุงพาหะซ่อนเร้นในการแพร่เชื้อมาลาเรีย ส่วนยุงก้นปล่อง *An. nemophilous* และ *An. takasagoensis* ไม่เป็นพาหะนำโรคมาลาเรียมาสู่คน มีพฤติกรรมชอบกินเลือดสัตว์ยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus ออกหากินตอนกลางคืนถึงเช้ามืด แต่ถ้าป่าทึบมากก็หากินช่วงกลางวันด้วย (Peyton and Harison, 1980; Baimai *et al.*, 1988; Manguin *et al.*, 2008) ส่วนในประเทศไทยมีรายงานว่า พบยุงในกลุ่มนี้ทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ *An. dirus* *An. cracens* *An. scanloni* *An. baimaii* และ *An. nemophilous* (Baimai *et al.*, 1981; Baimai *et al.*, 1988a; Baimai *et al.*, 1988b) โดยยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus จะมีการกระจายตัวในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยยุงก้นปล่อง *An. dirus* พบได้ทั่วไปในหลายพื้นที่ เช่น ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคตะวันตกของประเทศไทย และยุง *An. baimaii* พบบริเวณป่าติดกับชายแดนประเทศพม่าและป่าเหมือนแร่ฝั่งตะวันตกของภาคใต้ (Baimai *et al.*, 1988b) ส่วนยุง *An. cracens* และยุง *An. nemophilous* พบส่วนใหญ่ในพื้นที่ทางภาคใต้ และบริเวณติดกับชายแดนประเทศมาเลเซีย และยุง *An. scanloni* พบบริเวณเขาหินปูนแถบภาคใต้ฝั่งตะวันออกและบางพื้นที่ในจังหวัดกาญจนบุรี (Poopittayasataporn and Baimai, 1995) ซึ่งพบการกระจายตัวของยุงก้นปล่อง 3 ชนิดหลัง น้อยกว่า 2 ชนิดแรกที่กล่าวมาข้างต้น โดยยุงทุกชนิดในกลุ่มซับซ้อน Dirus เป็นยุงป่ามักพบในป่าทึบบริเวณเนินเขา เช่น ป่าดิบชื้น ป่าผลัดใบ ป่าไผ่ หรือพื้นที่เพาะปลูก เช่น สวนผลไม้หรือสวนยางพารา เป็นต้นวางไข่ตามแอ่งน้ำนิ่ง น้ำขังหรือแอ่งน้ำตามธรรมชาติเช่น ลำธาร รอยเท้าสัตว์ (Baimai *et al.*, 1988; Oo *et al.*, 2002; Prakash *et al.*, 2002)

การวางแผนควบคุมโรคมาลาเรีย

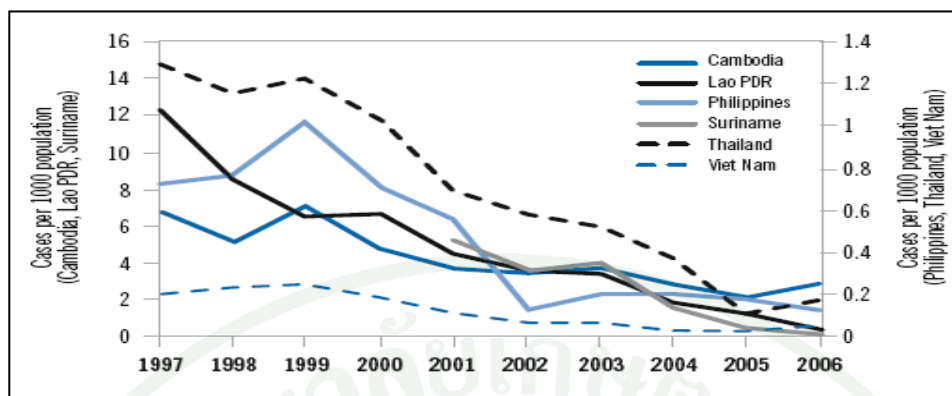
การวางแผนควบคุมการแพร่ระบาดของโรคมาลาเรียที่มีประสิทธิภาพจะทำให้การระบาดของโรคมาลาเรียมีแนวโน้มลดลง การวางแผนควบคุมโรคมีหลากหลายวิธี เช่น การใช้มุ้งชุบสารเคมี (Insecticide-Treated Nets: ITNs) การฉีดพ่นสารเคมีกำจัดแมลงในบ้าน (Indoor Residual

Spraying: IRS) (WHO, 2008) โดยในช่วงแรกมีการฉีดพ่นสารเคมีกำจัดแมลงจำพวกไพริทรอยด์ และการใช้มุ้งเคลือบสารเคมีจำพวกอีโทเฟนพรอกซ์ เคลตามเมทริน แลมป์ดา-ไซฮาโลทริน และ เพอร์เมทริน ซึ่งพบว่าแลมป์ดา-ไซฮาโลทรินมีประสิทธิภาพสูงกว่าดีดีที (Prasittisuk *et al.*, 1996; Kobayashi *et al.*, 2004) แต่ในปัจจุบันมีการส่งเสริมให้มีการใช้มุ้งและสารเคมีกำจัดแมลงจำพวก ไพริทรอยด์แทนการใช้ดีดีที เนื่องจากไม่ส่งผลกระทบต่อสภาพแวดล้อม นอกจากนี้ความสามารถ ในการต้านสารเคมีกำจัดแมลงของยุงก้นปล่องเป็นปัญหาสำคัญในการควบคุมโรคมาลาเรีย (Mehlotra and Zimmerman, 2006; WHO, 2009; WHO, 2011) ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และประเทศไทยพบว่ายุงมีการดื้อยาและมีความสามารถในการต้านสารเคมีฆ่าแมลงได้ค่อนข้างเร็ว ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลกระทบต่อการควบคุมการแพร่ระบาดของโรคมาลาเรีย (Chareonviriyaphap *et al.*, 1999; Prapanthadara *et al.*, 2000; Garros *et al.*, 2006) โดยประเทศไทย มีแนวโน้มจำนวนผู้ป่วยและผู้เสียชีวิตหลังการควบคุมการแพร่ระบาดของโรคลดลงอย่างต่อเนื่อง จากปี 1997-2006 ดังภาพที่ 2 และ ภาพที่ 3



ภาพที่ 2 กราฟรายงานจำนวนผู้ป่วยจากโรคมาลาเรียในแต่ละประเทศของ WHO ในปี 1997-2006

ที่มา: WHO (2008)

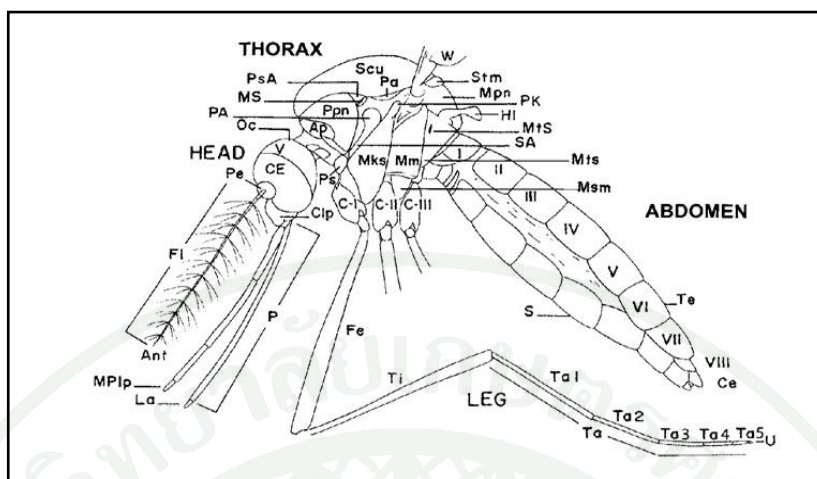


ภาพที่ 3 กราฟรายงานจำนวนผู้เสียชีวิตจากโรคมาลาเรียในแต่ละประเทศของ WHO ในปี 1997-2006

ที่มา: WHO (2008)

ลักษณะสัณฐานวิทยาของยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus

Rattanarithikul *et al.* (2006) จำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกที่คล้ายคลึง (sibling species) ลักษณะสัณฐานวิทยาของยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน Dirus อวัยวะและส่วนต่างๆของยุงก้นปล่องเพศเมียแสดงดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซัซซ็อน Dirus

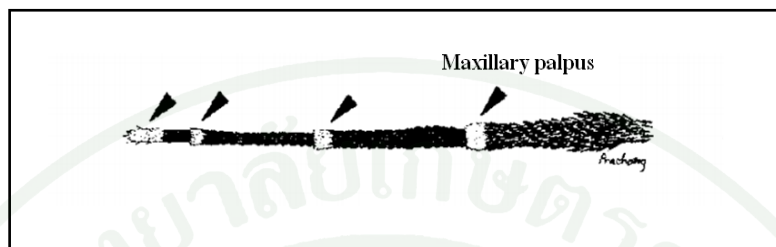
ความหมายของอักษรย่อเป็นดังต่อไปนี้ antenna (Ant), compound eye (CE), clypeus (Clp), flagellum (Fl), labellum (La), maxillary palpus (MPIp), occiput (Oc), pedicel (Pe), proboscis (P), vertex (V), antepnotum (Ap), halter (HI), mesokatepisternum (Mks), mesepimeron (Mm), mesopostnotum (Mpn), mesothoracic spiracle (MS), mesomeron (Msm), metathoracic spiracle (MtS), metepisternum (Mts), paratergite (Pa), postspiracular area (PA), prealar knob (PK), postpronotum (Ppn), proepisternum (Ps), prespiracular area (PsA), subspiracular area (SA), scutum (Scu), scutellum (Stm), wing (W), forecoxa (C-I), midcoxa (C-II), hindcoxa (C-III), femur (Fe), tarsomeres 1-5 (Ta 1-Ta 5), tibia (Ti), unguis (U), circus (Ce), tergum (Te), sternum (S), abdominal segments (I-VIII)

ที่มา: Rattanaarithikul *et al.* (2006)

ลักษณะสัณฐานวิทยาของยุงก้นปล่องกลุ่มซัซซ็อน Dirus แบ่งออกเป็น 3 ส่วน ดังนี้

1. ส่วนหัว (Head) ส่วนหัวของยุงก้นปล่องมีลักษณะกลมเชื่อมติดกับส่วนอก มีตาประกอบ (compound eyes) 1 คู่ มีหนวด (antenna) 1 คู่ มีระยางค์ปาก (maxillary palpus) จำนวน 1 คู่ แบ่งออกเป็น 5 ปล้องอยู่ติดกับส่วนของปาก (proboscis) 1 อัน มีลักษณะเป็นแท่งเรียวยาวสำหรับแทงดูดอาหาร มี labellum อยู่บริเวณปลาย proboscis ในยุงก้นปล่องเพศเมีย maxillary

palpus จะตรงและยาวเท่ากับ proboscis ส่วนยุงก้นปล่องเพศผู้ตรงปลาย maxillary palpus จะโป่งออกคล้ายกระบอง ซึ่ง maxillary palpus จะมีแถบสีขาวจำนวน 4 แถบหรือมากกว่า 4 แถบ
 ดังภาพที่ 5



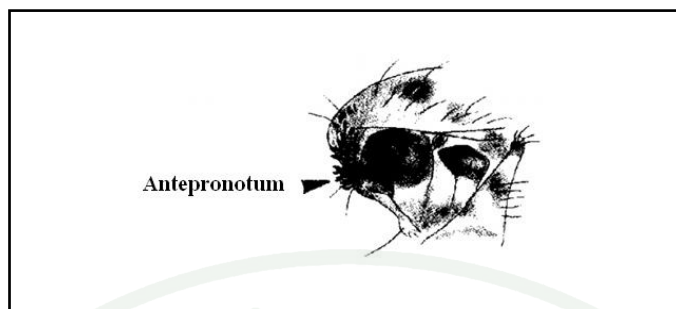
ภาพที่ 5 แสดงลักษณะแถบสีขาวบริเวณ Maxillary palpus ของยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus (ดังลูกศรชี้)

ที่มา: Rattanaarithikul *et al.* (2006)

ในยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus ส่วนของ proboscis จะยาวกว่า femur ของขาหน้าและยาวกว่า maxillary palpus เล็กน้อย และไม่มีแถบสีขาวหรือกลุ่มขนสีขาวก่อนถึง labellum (Rattanaarithikul *et al.*, 1994; Rattanaarithikul *et al.*, 2006) นอกจากนี้จะมีหนวด flagellum จำนวน 15 ปล้อง สามารถใช้เป็นเกณฑ์ในการจำแนกเพศของยุงก้นปล่องได้ ซึ่งแต่ละปล้องจะมีขนโดยรอบ โดยยุงก้นปล่องเพศเมียจะมีลักษณะสั้นและไม่หนาแน่น ส่วนยุงก้นปล่องเพศผู้ลักษณะขนจะยาวและเป็นพุ่ม เรียกว่า antenna อยู่ติดกับ proboscis

2. ส่วนอก (Thorax) แบ่งออกเป็น 3 ส่วน ซึ่งเป็นตำแหน่งที่เกี่ยวกับอวัยวะที่ใช้ในการเคลื่อนไหว ได้แก่

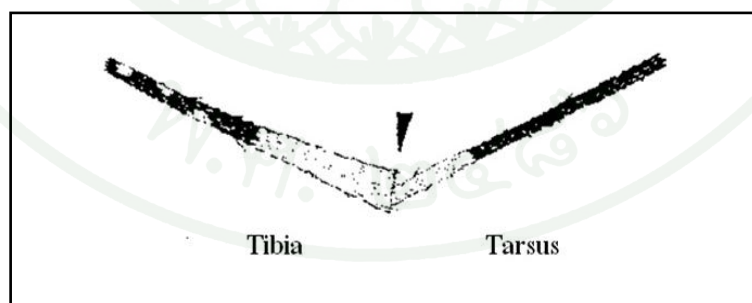
อก (Thorax) ประกอบด้วยปีกคู่ (Wings) ด้านบนของอกบริเวณ Mesopostnotum ปกคลุมด้วยขนลักษณะหยาดๆและเกล็ด (scales) ซึ่งมีสีและลวดลายต่างกันส่วนปลายอก (scutellum) จะโค้งเรียบไม่มีรอยหยักด้านข้างของอกบริเวณ Antepronotum มีเกล็ดและกลุ่มขนซึ่งใช้แยกชนิดยุงก้นปล่องได้ ดังภาพที่ 6 บริเวณด้านบนของ Proepiternum จะมีเส้นขนซึ่งเป็นลักษณะพื้นฐานของยุงก้นปล่องใน Neomyzomyia Series



ภาพที่ 6 แสดงลักษณะเกล็ด (scales) บริเวณ Anteprenotum ของยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus (ดังลูกศรชี้)

ที่มา: Rattanarithikul *et al.* (2006)

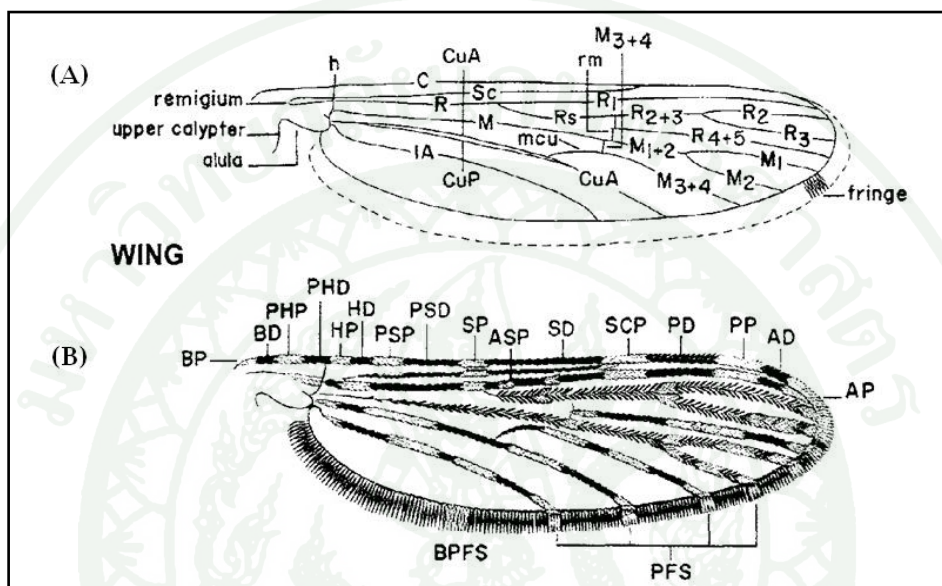
ขา (Legs) อยู่บริเวณด้านล่างของอกประกอบด้วยขา 3 คู่ คือ ขาคู่หน้า ขาคู่กลาง และ ขาคู่หลัง ซึ่งขาแมลงแบ่งออกเป็น 5 ส่วน คือ coxa (ปล้องแรกที่อยู่ติดกับส่วนอก) trochanter (ปล้องขนาดเล็กติดกับ coxa) มีลักษณะคล้ายบานพับ ได้แก่ femur (โคนขา), tibia (ขาตอนกลาง) และ tarsus (ขาตอนปลาย) ซึ่งมีอยู่ 5 ส่วน ได้แก่ Tarsomeres 1-5 (Ta 1-Ta 5) ซึ่งขาหลัง tarsomere 5 จะมีแถบดำเล็กน้อยและมีหนามงอๆ 1 คู่ เรียกว่า unguis ขนาดสั้นอยู่ที่โคนสุดบริเวณขาคู่หลังมีแถบขาวที่ข้อพับระหว่าง Tibia และ Tarsus ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะในยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน Dirus ดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 แสดงลักษณะแถบสีขาวบริเวณขาคู่หลังที่ข้อพับระหว่าง Tibia และ Tarsus ของยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus (ดังลูกศรชี้)

ที่มา: Rattanarithikul *et al.* (2006)

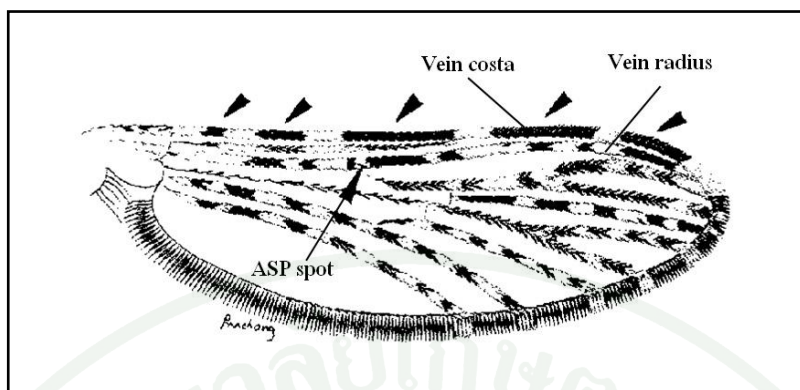
ปีก (Wing) ปีกยุงก้นปล่อง มี 2 คู่ เห็นเด่นชัดเพียง 1 คู่ โดยปีกหลังจะหดสั้นลงเรียกว่า ดั้งปีก (Halteres) ปีกคู่หน้ามีลักษณะบางใส แสบและยาว มีเส้นลายปีก (Veins) ซึ่งมีชื่อเฉพาะของแต่ละเส้นปีกและมีเกล็ดสีแตกต่างกันในยุงก้นปล่องแต่ละชนิดตรงขอบปีกด้านหลังจะมีขนเรียงเป็นแถวเรียก fringe ซึ่งเกล็ดและขนบนปีกใช้ในการแยกชนิดของยุงก้นปล่อง ดังภาพที่ 8



ภาพที่ 8 (A) แสดงลักษณะเส้นปีก (wing veins) ของยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus
(B) แสดงลักษณะแถบเกล็ดสีเข้มและจาง (dark scales and pale scales)
ของยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus

ที่มา: Rattanaarithikul *et al.* (2006)

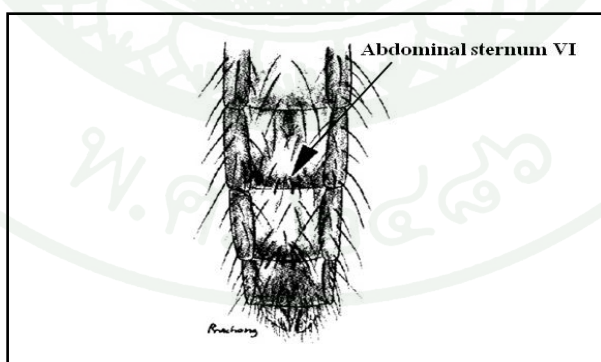
ยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus ซึ่งจัดอยู่ใน Subgenus *Cellia* ลักษณะของปีกมี accessory sector pale (ASP) spot บน vein costa vein subcosta และ vein radius (R-R1) จำนวน 4 จุดหรือมากกว่า 4 จุดด้วยกัน ดังภาพที่ 9



ภาพที่ 9 แสดงลักษณะ accessory sector pale (ASP) spot บน vein costa vein subcosta และ vein radius (R-R1) ของปีกของก้นปล่องกลุ่มชนิดขับช้อน Dirus (ดังลูกศรชี้)

ที่มา: Rattanarithikul *et al.* (2006)

3. ช่องท้อง (Abdomen) มีลักษณะกลมยาวบริเวณส่วนหลังของลำตัวเรียกว่า tergum และบริเวณส่วนช่องท้องของลำตัวเรียกว่า sternum ประกอบด้วย 10 ปล้อง แต่จะเห็นชัดเจนเพียง 8 ปล้อง (abdominal segments) ปล้องที่ 9-10 จะดัดแปลงเป็นอวัยวะสืบพันธุ์ (cercus) โดยลักษณะเกล็ด (scales) บริเวณ Abdominal sternum VI (ปล้องที่ 6) สามารถใช้จำแนกชนิดของกลุ่มขับช้อน Dirus ได้ (นิรนาม, ม.ป.ป.; Rattanarithikul *et al.*, 2006) ดังภาพที่ 10

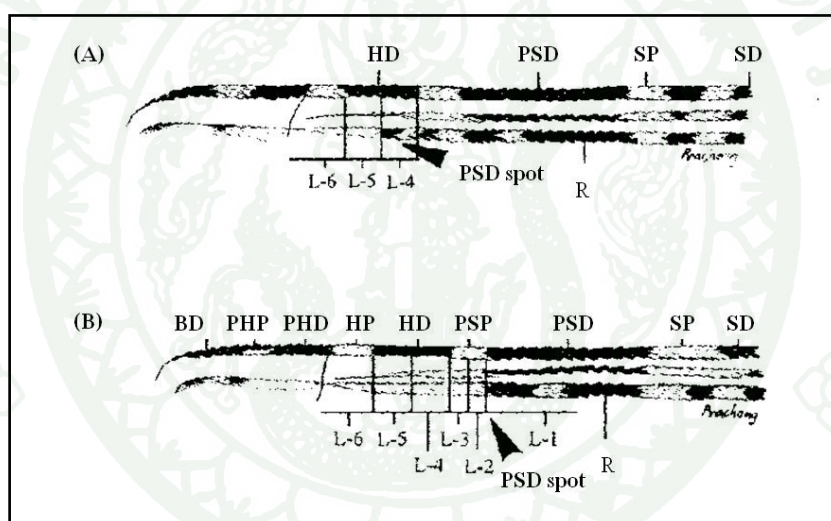


ภาพที่ 10 แสดงลักษณะเกล็ด (scales) บริเวณ Abdominal sternum VI ของก้นปล่องกลุ่มชนิดขับช้อน Dirus (ดังลูกศรชี้)

ที่มา: Rattanarithikul *et al.* (2006)

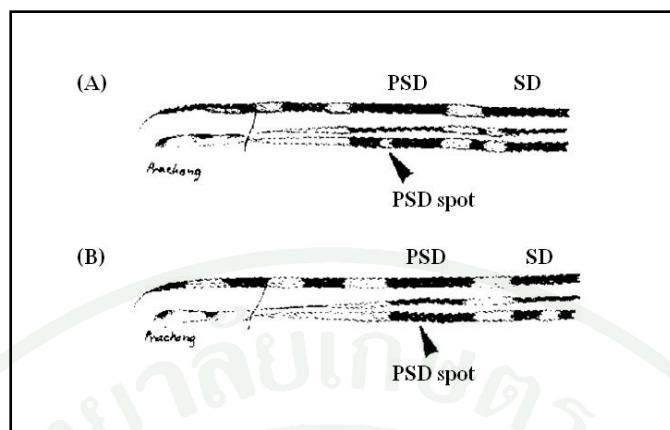
การจำแนกยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน *Dirus* ตามลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้น

Rattanaarithikul *et al.* (2006) ได้ทำการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องชนิดกลุ่มซับซ้อน *Dirus* เพศเมียตามลักษณะสัณฐานวิทยา โดยจำแนกชนิดยุง *An. dirus* *An. cracens* *An. scanloni* และ *An. baimaii* โดยเกณฑ์การจำแนกชนิด จาก 2 ลักษณะ คือ ลักษณะที่ 1 แถบดำ Presector dark (PSD) spot บน vein radius ยาวถึงกึ่งกลาง humeral dark (HD) spot (L4-L5) และ ลักษณะที่ 2 PSD spot บน vein radius มีจุดขาวแทรก และจำแนกชนิดยุง *An. nemophilous* (ชนิด F) ออกจากยุงทั้ง 4 ชนิด ดังกล่าว จากลักษณะของแถบดำ PSD spot บน vein radius ยาวไม่ถึงกึ่งกลาง HD spot (L4) และ PSD spot บน vein radius ไม่มีจุดขาวแทรก (Rattanaarithikul *et al.*, 1994; Rattanaarithikul *et al.*, 2006) ดังภาพที่ 11 และ ภาพที่ 12



ภาพที่ 11 (A) แสดง PSD spot บน vein radius ยาวถึง HD spot ของยุงก้นปล่อง *An. dirus* *An. cracens* *An. scanloni* และ *An. baimaii* (ดังลูกศรชี้)
(B) แสดง PSD spot บน vein radius ยาวไม่ถึง HD spot ของยุงก้นปล่อง *An. nemophilous* (ดังลูกศรชี้)

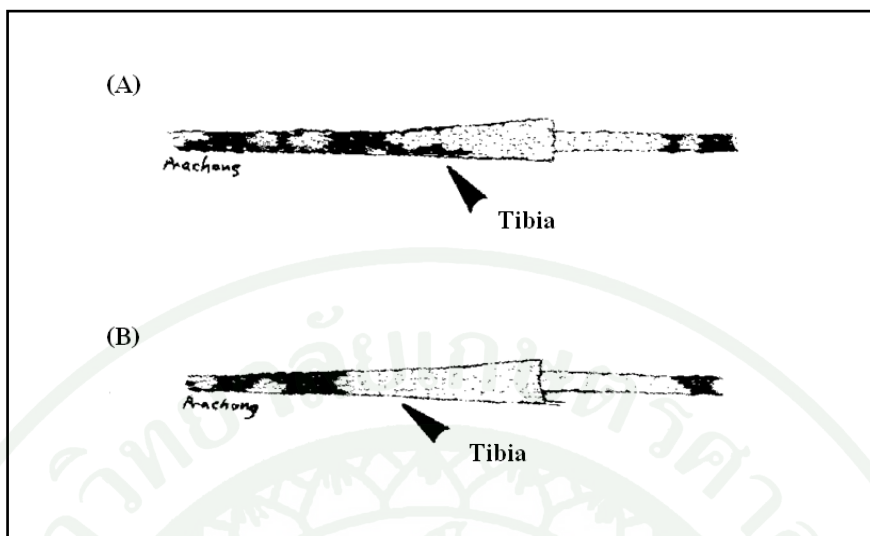
ที่มา: Rattanaarithikul *et al.* (2006)



ภาพที่ 12 (A) แสดง PSD spot บน vein radius ปรากฏจุดขาวแทรกบนปีก
ยุงก้นปล่อง *An. dirus* *An. cracens* *An. scanloni* และ *An. baimaii*
(B) แสดง PSD spot บน vein radius ไม่ปรากฏจุดขาวแทรกบนปีก
ยุงก้นปล่อง *An. nemophilous*

ที่มา: Rattarithikul *et al.* (2006)

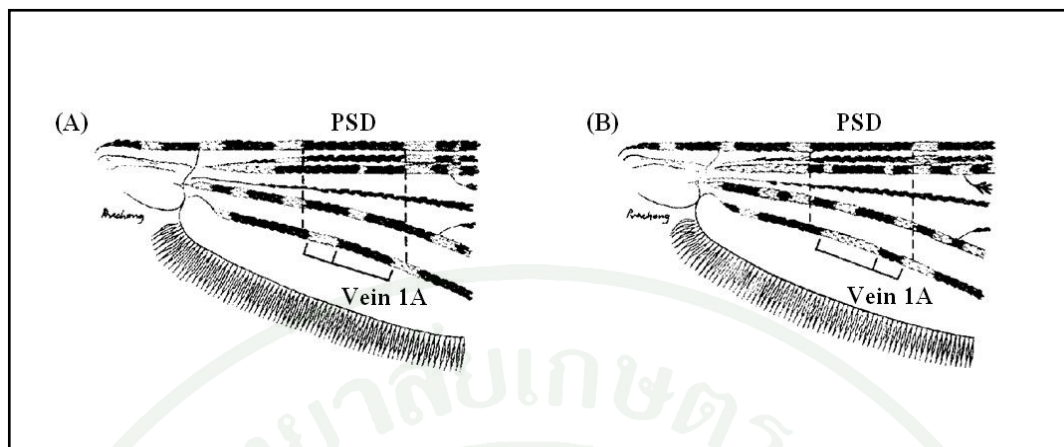
การจำแนกชนิดยุงก้นปล่อง *An. scanloni* จากยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus
แต่ละชนิด จำแนกจากลักษณะพื้นฐานวิทยา 2 ลักษณะ คือ บริเวณแถบขาวที่ข้อต่อระหว่าง
Tibia-Tarsus มีแท่งสีดำยื่นเข้าไปหรือไม่เป็นยุงก้นปล่อง *An. scanloni* และบริเวณแถบขาวที่ข้อ
ต่อระหว่าง Tibia-Tarsus ไม่มีแท่งสีดำยื่นเข้าไป ดังภาพที่ 13



ภาพที่ 13 (A) แสดงขาของยุงก้นปล่อง *An. scanloni* ซึ่งปรากฏแท่งสีดำยื่นเข้าไปในแถบขาวบริเวณข้อต่อระหว่าง Tibia-Tarsus
(B) แสดงขาของยุงก้นปล่อง *An. scanloni* ซึ่งไม่ปรากฏแท่งสีดำยื่นเข้าไปในแถบขาวบริเวณข้อต่อระหว่าง Tibia-Tarsus

ที่มา: Rattanarithikul *et al.* (2006)

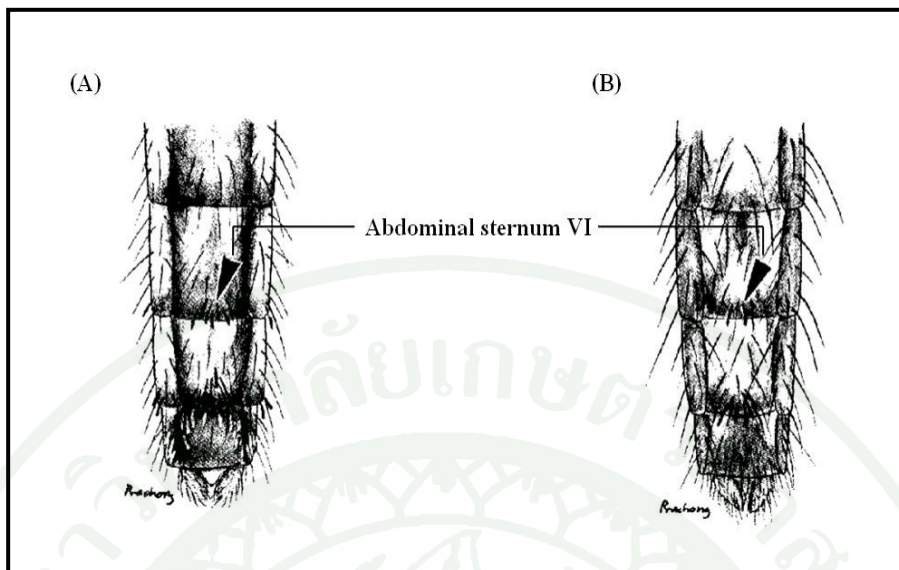
ในกรณีที่ขาของยุงก้นปล่อง *An. scanloni* ไม่ปรากฏแท่งสีดำยื่นเข้าไปในแถบขาวบริเวณข้อต่อระหว่าง Tibia-Tarsus ต้องใช้ลักษณะสันฐานวิทยาจากส่วนของเส้น vein 1A ของปีกยุงมาเป็นเกณฑ์ในการจำแนกชนิดยุง มีเกณฑ์ในการจำแนก 2 ลักษณะ คือ ลักษณะที่ 1 เส้น vein 1A ไม่มีจุดขาวยาวที่ระดับเดียวกับ presector dark (PSD) หรือถ้ามีจุดขาวก็มีความยาวน้อยกว่า PSD spot บน vein costa และไม่ยาวไปกว่าจุดขาวอื่นๆบน vein 1A และลักษณะที่ 2 คือ เส้น vein 1A มีจุดขาวยาวที่ระดับเดียวกับ PSD บน vein costa อย่างน้อยบนปีกข้างหนึ่งและบนปีกอีกข้างหนึ่ง อัตราส่วนความยาวของ PSD มักยาวกว่าจุดขาวบน vein 1A ดังภาพที่ 14



ภาพที่ 14 (A) แสดงปีกยุงก้นปล่อง *An. scanloni* ซึ่งไม่ปรากฏจุดขาวบน vein 1A ที่ระดับเดียวกับ PSD spot บน vein costa
(B) แสดงปีกยุงก้นปล่อง *An. scanloni* ซึ่งปรากฏจุดขาวบน vein 1A ที่ระดับเดียวกับ PSD spot บน vein costa

ที่มา: Rattanaarithikul *et al.* (2006)

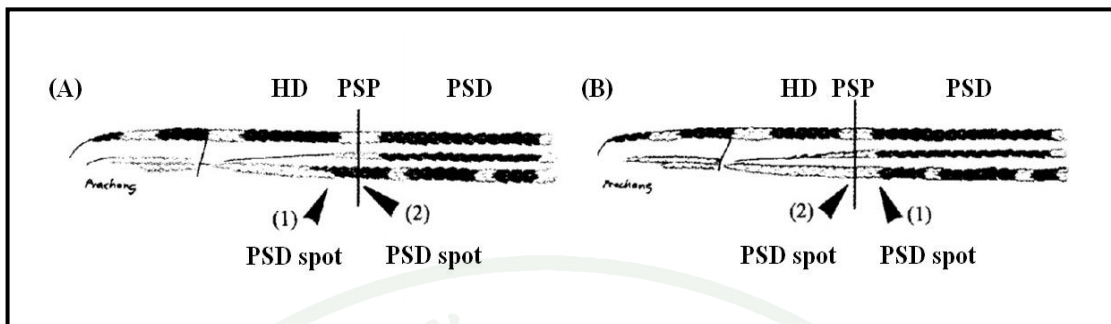
เมื่อพิจารณาลักษณะของปีกยุงก้นปล่อง *An. scanloni* ถ้ามีลักษณะฐานวิทยาดังภาพที่ 14 A คือ เส้น vein 1A ไม่มีจุดขาวยาวที่ระดับเดียวกับ PSD หรือถ้ามีจุดขาวก็มีความยาวน้อยกว่า PSD spot บน vein costa จากนั้นให้พิจารณาลักษณะของ Abdominal sternum VI (ปล้องที่ 6) ซึ่งจะมีลักษณะของเกล็ดสีดำหลายเกล็ดระบุได้ว่าเป็นยุงก้นปล่อง *An. cracens* ในการจำแนกชนิดยุงก้นปล่อง *An. cracens* ถ้าลักษณะของ Abdominal sternum VI (ปล้องที่ 6) ไม่มีเกล็ดสีดำหรือมีเกล็ดสีดำ 1-2 เกล็ดจะใช้เป็นเกณฑ์ในการจำแนกชนิดยุงก้นปล่อง *An. dirus* และ *An. baimaii* ดังภาพที่ 15



ภาพที่ 15 (A) แสดงลักษณะการปรากฏเกล็ดสีดำ (dark scales) บริเวณ Abdominal sternum VI ของยุงก้นปล่อง *An. cracens* (ดั่งลูกศรชี้)
(B) แสดงลักษณะการไม่ปรากฏเกล็ดสีดำ (dark scales) บริเวณ Abdominal sternum VI ของยุงก้นปล่อง *An. dirus* และ *An. baimaii* (ดั่งลูกศรชี้)

ที่มา: Rattanaarithikul *et al.* (2006)

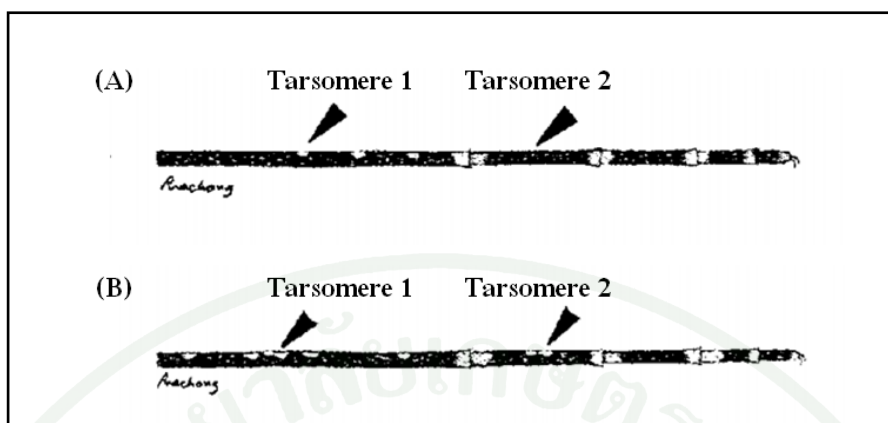
การจำแนกชนิดยุงก้นปล่อง *An. dirus* และ ยุง *An. baimaii* เมื่อพิจารณาจากลักษณะของ Abdominal sternum VI (ปล้องที่ 6) ไม่มีเกล็ดสีดำดังภาพที่ 15 B จากนั้นจำแนกยุงก้นปล่องทั้ง 2 ชนิด ออกจากกันโดยมีเกณฑ์การจำแนก 2 ลักษณะ คือ ลักษณะที่ 1 PSD spot บน vein radius ถ้าไปขึ้นไปถึง PSD spot บน vein costa อย่างน้อยบนปีกข้างหนึ่งและจะยาวถึง humeral dark (HD) ของ vein costa (1) หรือยาวถึงกึ่งกลางของ Presector pale (PSP) spot ของ vein costa (2) และ ลักษณะที่ 2 PSD spot บน vein radius ถ้าขึ้นไปถึง PSD spot บน vein costa (1) หรือขยายออกไปด้านข้างแต่จะไม่เลยกึ่งกลางของ PSP spot ของ vein costa ดังภาพที่ 16



ภาพที่ 16 (A) แสดงปีกยุงก้นปล่อง *An. dirus* ซึ่งลักษณะ PSD spot บน vein radius ล้ำขึ้นไปถึง PSD spot บน vein costa และยาวถึง HD ของ vein costa (1) หรือยาวถึงกึ่งกลางของ PSP spot ของ vein costa (2) (ดังลูกศรชี้)
(B) แสดงปีกยุงก้นปล่อง *An. baimaii* ซึ่งลักษณะ PSD spot บน vein radius ล้ำขึ้นไปถึง PSD spot บน vein costa (1) หรือขยายออกไปด้านข้างไม่ถึงกึ่งกลางของ PSP spot ของ vein costa (2) (ดังลูกศรชี้)

ที่มา: Rattanarithikul *et al.* (2006)

สำหรับการเกณฑ์การจำแนกชนิดยุงก้นปล่อง *An. scanloni* จากยุงก้นปล่อง *An. baimaii* พิจารณาจากลักษณะสัณฐานวิทยาจากส่วนของปีกจากลักษณะเส้น vein 1A มีจุดขาวยาวที่ระดับเดียวกับ PSD บน vein costa อย่างน้อยบนปีกข้างหนึ่งและบนปีกอีกข้างหนึ่งอัตราส่วนความยาวของ PSD มักยาวกว่าจุดขาวบน vein 1A ดังภาพที่ 14 B จากนั้นทำการจำแนกยุงก้นปล่อง 2 ชนิดออกจากกัน โดยยุงก้นปล่อง *An. scanloni* ใช้เกณฑ์การจำแนก 2 ลักษณะ คือ ลักษณะที่ 1 การมีจุดขาวและแถบขาวอยู่รวมกันบริเวณ Tarsomere 1 และ Tarsomere 2 ของขาหน้า แต่มีน้อยกว่าเกล็ดสีดำ และจุดขาวบน Tarsomere 1 ของขาหน้าจะไม่อยู่รวมกันและเกิดรอยกระสีขาวตลอดแนวความยาวทั้งหมดของ Tarsomere 1 ปกติพบไม่เกิน 2-4 จุด ลักษณะที่ 2 บริเวณ Tarsomere 2 จะมีลักษณะเป็นสีดำยาวอยู่ตรงกลางปกติจะไม่พบจุดขาว บางครั้งพบจุดสีขาวเพียง 1-3 จุดแยกออกมา และการจำแนกยุงก้นปล่อง *An. baimaii* ใช้เกณฑ์การจำแนก 2 ลักษณะ คือ มีจุดขาวและแถบขาวรวมกันบริเวณ Tarsomere 1 และ Tarsomere 2 ตามแนวดำมักพบมี 2 หรือมากกว่า 2 จุดอยู่รวมกัน บน Tarsomere 1 มีเกล็ดและรอยกระขาวไปตามแนวความยาวของ Tarsomere 1 อย่างน้อย 1 ขา และลักษณะที่ 2 บริเวณ Tarsomere 2 ของขาหน้ามีจุดขาวและแถบขาวอยู่รวมกันเห็นเป็นสีขาวและมีสีดำเป็นวงแคบอยู่ตรงกลาง (Rattanarithikul *et al.*, 2006) ดังภาพที่ 17



ภาพที่ 17 (A) แสดง Tarsomere 1 และ Tarsomere 2 ซึ่งปรากฏลักษณะจุดและแถบสีขาวของขา
ยุงก้นปล่อง *An. scanloni* (ดั่งลูกศรชี้)
(B) แสดง Tarsomere 1 และ Tarsomere 2 ซึ่งปรากฏลักษณะจุดและแถบสีขาวของขา
ยุงก้นปล่อง *An. baimaii* (ดั่งลูกศรชี้)

ที่มา: Rattanarithikul *et al.* (2006)

การจำแนกชนิดยุงผิด (misidentification)

ยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อนมีลักษณะภายนอกที่คล้ายคลึงกันมากไม่สามารถจำแนกชนิด
ได้ชัดเจนโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาได้ ซึ่งพบว่ามีผลผิดพลาดสูงในการจำแนกชนิดโดยใช้
ลักษณะสัณฐานวิทยา โดยมีรายงานความผิดพลาดในการจำแนกชนิดยุงกลุ่มซับซ้อนในอัตราสูง
ซึ่งการจำแนกชนิดยุงที่ไม่ถูกต้อง มีผลกระทบอย่างมากต่อการควบคุมการแพร่กระจายของพาหะ
ดังกล่าวจากรายงานพบปัญหาเกี่ยวกับการจำแนกยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน *Minimus* และ
ยุงก้นปล่องกลุ่มที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน (closely related species) ด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา
และเครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนาขึ้น (Green *et al.*, 1990; Van Bortel *et al.*, 1999, 2000; Phuc *et al.*,
2003) เช่น งานวิจัยของ Van Bortel *et al.* (2001) พบการจำแนกชนิดยุงผิดพลาดระหว่าง
ยุงก้นปล่อง *An. minimus* และ *An. varuna* บริเวณภาคกลางของประเทศเวียดนามซึ่งยุงก้นปล่อง
เพศเมียมีพฤติกรรมการกินเลือดต่างกัน โดยยุงก้นปล่อง *An. varuna* ชอบกินเลือดสัตว์และไม่เป็น
พาหะนำโรคมมาลาเรียส่วนยุงก้นปล่อง *An. minimus* ชอบกินเลือดคนและสัตว์ และเป็นพาหะนำ

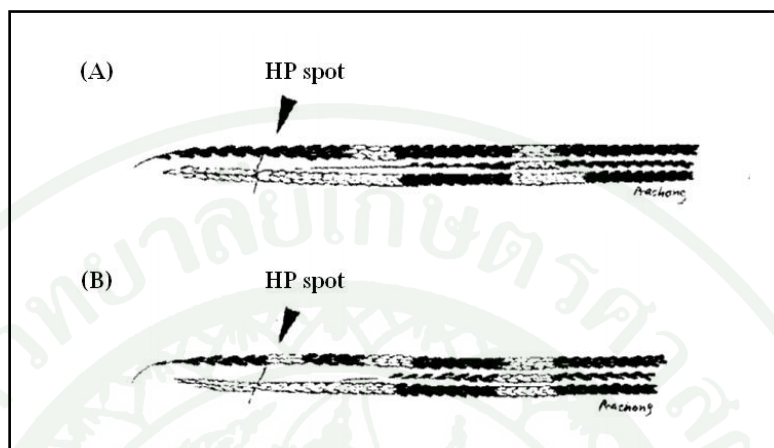
โรคมalaraเรีย ซึ่งการจำแนกชนิดยุงกัดมีผลต่อการควบคุมการระบาดของโรคมalaraเรียในพื้นที่ประเทศเวียดนาม

Cuong *et al.* (2008) ทำการจำแนกชนิดยุงกัดในปล่องกลุ่มซับซ้อน *Minimus* และ ยุงกัดในปล่องกลุ่มที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันด้วยลักษณะพื้นฐานวิทยาในประเทศเวียดนาม โดย จำแนกความแตกต่างของยุงกัดในปล่อง *An. minimus* A และ *An. minimus* C จากลักษณะการมีและไม่มี humeral pale (HP) spot บน vein costa ซึ่งผลการจำแนกมีความไม่น่าเชื่อถือ เนื่องจากพบลักษณะดังกล่าวในยุงทั้ง 2 ชนิด และจำแนกชนิดยุงกัดในปล่อง *An. aconitus* และ *An. minimus* จากส่วนเกล็ดสีจาง (pale scale) ของ proboscis ซึ่งพบว่ามีความน่าเชื่อถือในการจำแนกชนิด และใช้ลักษณะของ แอ็บสับริเวนขาหลัง (hind tarsal bane) จำแนกยุงกัดในปล่อง *An. jeyporiensis* จากยุงกัดในปล่อง *An. minimus* พบว่าไม่สามารถจำแนกชนิดยุงออกจากกันได้

Singh *et al.* (2010) พบการจำแนกชนิดยุงกัดในปล่อง *An. minimus* และ *An. fluviatilis* ในรัฐอัสสัมของประเทศอินเดียพบว่ายุงกัดในปล่อง *An. minimus* เพศเมียมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะพื้นฐานวิทยาตามฤดูกาลช่วงก่อนฤดูหนาวนำไปสู่การจำแนกชนิดยุงกัดระหว่างยุง *An. fluviatilis* และ ยุง *An. minimus* โดยปรากฏลักษณะการเพิ่มขึ้นของรอยดำบนปีกและ maxillary pulpus (palpi) โดยมีรอยสีดำบริเวณ preapical กว้างขึ้นเรียกว่า “melanism” และรอยสีขาวบริเวณ subapical จะลดลงในส่วน palpi ของยุงเพศเมีย และไม่มีรอยสีขาวแทรกอยู่บน basal third บริเวณ vein costa ของปีกนำไปสู่การจำแนกชนิดยุงกัดในรัฐอัสสัมของประเทศอินเดีย

Phunngam (2012) พบความผิดพลาดของการจำแนกชนิดยุงกัดสูงมากระหว่าง ยุงกัดในปล่อง *An. minimus* และยุง *An. harrisoni* ในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของยุงกัดในปล่อง *An. harrisoni* ที่เป็นพาหะของโรคมalaraเรียในประเทศไทยและการสร้าง Phylogenetic trees จาก ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนหลายตำแหน่ง สำหรับการจำแนกชนิดยุงกัดในปล่องจากลักษณะพื้นฐาน วิทยาจะจำแนกจากลักษณะ HP spot บน veins costa ของปีกยุงกัดในปล่อง *An. harisoni* ซึ่งจะไม่พบ บนปีกยุงกัดในปล่อง *An. minimus* (Rattanaarithikul *et al.*, 2006) ดังภาพที่ 18 ซึ่งจากการเปรียบเทียบ ผลการทดลองที่ได้ระหว่างการจำแนกชนิดด้วยลักษณะพื้นฐานวิทยาและการจำแนกชนิดโดยใช้ เครื่องหมายโมเลกุลของยุงกัดในปล่องทั้ง 2 ชนิด พบเปอร์เซ็นต์ความผิดพลาด (% error) สูงมากโดยมี เปอร์เซ็นต์ความผิดพลาดประมาณ 96.80 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการใช้ลักษณะพื้นฐานวิทยาในการ

จำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อนซึ่งมีลักษณะสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกัน (sibling species) มีความไม่น่าเชื่อและมีระดับความผิดพลาดสูง



ภาพที่ 18 (A) แสดงปีกของยุงก้นปล่อง *An. minimus* ไม่ปรากฏ HP spot (ดังลูกศรชี้)
(B) แสดงปีกของยุงก้นปล่อง *An. harisoni* ซึ่งปรากฏ HP spot (ดังลูกศรชี้)

ที่มา: Rattanarithikul *et al.* (2006)

Tananchai *et al.* (2012) ศึกษาความหลากหลายและพฤติกรรมการกินเลือดของยุงก้นปล่อง *An. dirus* และยุง *An. baimaii* ในพื้นที่เสี่ยงต่อการเกิดโรคมาลาเรียบริเวณภาคตะวันตกของประเทศไทย จากการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาพบว่ามีความไม่น่าเชื่อถือ พบการจำแนกชนิดยุงผิดพลาด (misidentification) ซึ่งเป็นอุปสรรคในการวิเคราะห์พฤติกรรมของยุงก้นปล่องซึ่งมีลักษณะภายนอกที่คล้ายคลึงกันมาก (sibling species) โดยการจำแนกชนิดยุงก้นปล่อง *An. dirus* จากลักษณะ PSD spot บน vein radius ถ้าขึ้นไปถึง PSD spot บน vein costa อย่างน้อยบนปีกข้างหนึ่งและจะยาวถึง HD ของ vein costa (1) หรือยาวถึงกึ่งกลางของ PSP spot ของ vein costa (2) และยุงก้นปล่อง *An. baimaii* จากลักษณะ PSD spot บน vein radius ถ้าขึ้นไปถึง PSD spot บน vein costa (1) หรือขยายออกไปด้านข้างแต่จะไม่เลยกึ่งกลางของ PSP spot ของ vein Costa ดังภาพที่ 17 โดยจำแนกตัวอย่างยุงก้นปล่องตามลักษณะสัณฐานวิทยาของ Rattanarithikul *et al.* (2006) และจำแนกชนิดยุงด้วยเทคนิค allele-specific PCR โดยจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน Dirus 2 ชนิด คือ ยุง *An. dirus* และยุง *An. baimaii* จำนวน 656 ตัว พบว่าเป็นยุง *An. dirus* จำนวน 598 ตัว คิดเป็น 97.2 เปอร์เซ็นต์ และยุง *An. baimaii* 58 ตัว คิดเป็น 8.8 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อระบุชนิดยุงก้นปล่อง

ปัจจุบันข้อมูลดีเอ็นเอได้กลายมาเป็นเครื่องมือหลักในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอมีข้อได้เปรียบในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากประการแรก ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอมีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบ maternal inheritance เป็นลักษณะการถ่ายทอดผ่านทางแม่ฝ่ายเดียว ประการที่สอง ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอไม่เกิด genetic recombination ไม่มีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วน และการรวมตัวกันใหม่ อัตราการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์เกิดจากการกลายพันธุ์เท่านั้น ทำให้มีความเหมาะสมในการเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอ (สุรินทร์, 2552; Yoko and Chigusa, 1991) ประการที่สาม ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอมีอัตราการกลายพันธุ์ (mutation) สูงกว่าอัตราการกลายพันธุ์ของยีนในนิวเคลียส สามารถตรวจพบความแตกต่างจากตัวอย่างที่ต้องการศึกษาได้ แม้เกิดการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย และสามารถใช้ในการติดตามวิวัฒนาการได้ ดังนั้นไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอจึงเหมาะสมที่จะนำมาในการศึกษาวิวัฒนาการและการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต

การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและระบุชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน ซึ่งมีลักษณะฐานวิธานภายนอกคล้ายคลึงกัน การศึกษาส่วนใหญ่มักใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนหรือลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีนในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอหรือนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ สำหรับยีนในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอของยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน ยีนที่มีการศึกษาโดยทั่วไป เช่น *Cyt b* *COI* *COII* เป็นต้น โดยใช้ศึกษาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันในระดับชนิดหรือสกุล เช่นงานวิจัย Dusfour *et al.* (2007) ศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Cyt b* และ *COI* และพัฒนาเทคนิค Multiplex PCR ในการระบุชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Sundaicus 3 ชนิด คือ ยุง *An. sundaicus* *An. epiroticus* และ *An. sundaicus* E ในพื้นที่แตกต่างกัน บริเวณตามแนวชายฝั่งทะเลและบนเกาะในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ผลการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Multiplex PCR จากส่วนของยีน *Cyt b* และ *COI* ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอซึ่งสามารถจำแนกได้ชัดเจน โดย *An. sundaicus* พบในทางตอนเหนือของเกาะบอร์เนียว *An. epiroticus* พบในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และยุง *An. sundaicus* E พบบนเกาะสุมาตราและเกาะชวาในประเทศอินโดนีเซีย เพื่อเป็นประโยชน์ในการศึกษาข้อมูลการกระจายตัวของยุงในแต่ละชนิด

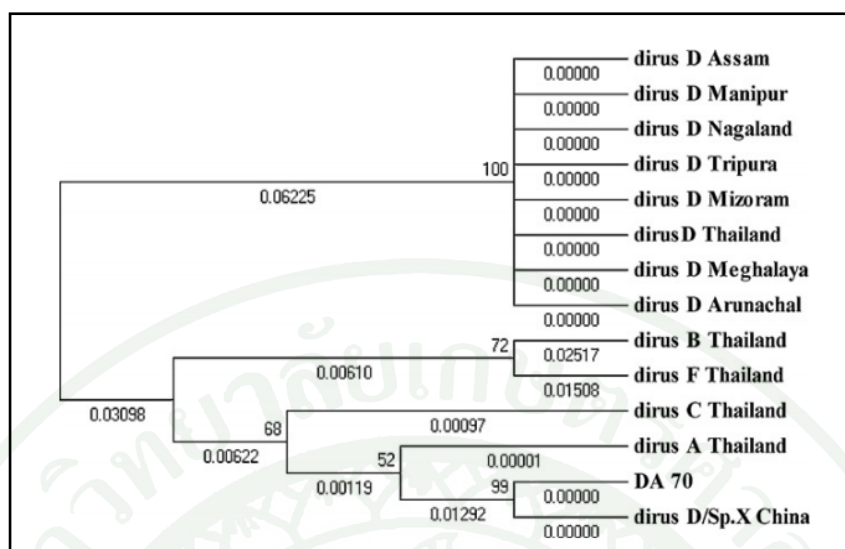
ยีนในนิวเคลียร์ดีเอ็นเอที่มีการศึกษาโดยทั่วไป คือ ยีน *ITS2* เช่นงานวิจัยของ Xu and Qu. (1997) ศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS2* ในการระบุชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน Dirus 2 ชนิด คือ *An. dirus* (ชนิด A) และ *An. baimaii* (ชนิด D) ในประเทศจีน โดย *An. dirus* มีขนาด 716 คู่เบส และ *An. baimaii* มีขนาด 710 คู่เบส จากการวิเคราะห์พบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างยุงก้นปล่องทั้ง 2 ชนิด อยู่ที่ประมาณ 5.4 % สามารถจำแนกชนิดยุงก้นปล่องออกจากกันได้

Walton *et al.* (1999) ศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS2* และพัฒนาเทคนิค allele-specific PCR ในการระบุชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus ซึ่งเป็นยุงพาหะนำโรคมาลาเรียที่สำคัญในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ผลการวิเคราะห์โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus ในประเทศไทย เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยุงก้นปล่อง *An. baimaii* จากประเทศจีน พบว่าในประเทศไทยสามารถแบ่งยุงก้นปล่องออกเป็น 5 ชนิด คือ *An. dirus* *An. cracens* *An. scanloni* *An. baimaii* และ *An. nemophilous* ส่วน *An. baimaii* จากประเทศจีน มีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างจากยุงก้นปล่อง *An. baimaii* ในประเทศไทย ซึ่งจัดให้อยู่ในชนิด X ซึ่งอาจเป็นยุงชนิดใหม่ในกลุ่มยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus โดยในประเทศไทยสามารถระบุชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน Dirus ได้เป็น 5 ชนิด คือ *An. dirus* *An. cracens* *An. scanloni* *An. baimaii* และ *An. nemophilous* ซึ่งผลจากการวิเคราะห์โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และเครื่องหมายดีเอ็นเอให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกัน จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS2* พบว่ายุง *An. dirus* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับยุง *An. scanloni* มากกว่ายุงชนิดอื่นๆ ในกลุ่มซับซ้อน Dirus

Garros *et al.* (2004) ศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS2* และพัฒนาเทคนิค allele-specific PCR ในการระบุชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Minimus และ Funestus จำนวน 10 ชนิด คือ กลุ่ม Minimus ศึกษาตัวอย่างยุง *An. minimus A* และ *An. minimus C* และกลุ่ม Funestus ศึกษาตัวอย่างยุง *An. aconitus* *An. varuna* *An. pampanai* *An. lesoni* *An. funestus* *An. vaneedeni* *An. rivulorum* และ *An. parensis* ผลจากการวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์และตรวจสอบผลโดยวิธี Multiplex PCR โดยออกแบบไพรเมอร์จำนวน 10 คู่ ที่จำเพาะกับยุงก้นปล่องแต่ละชนิด พบว่าสามารถจำแนกยุงก้นปล่องที่เป็นพาหะนำโรคมาลาเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Prakash *et al.* (2010) ใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS2* ของนิวกีร์ดีเอ็นเอ ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยวิธี Neighbour-Joining (NJ) ของยุงก้นปล่องกลุ่มชนิด ชับช้อน *Dirus* ในประเทศอินเดีย เปรียบเทียบกับยุงก้นปล่องกลุ่มชับช้อน *Dirus* ในประเทศไทย โดยการสร้างสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยุงก้นปล่อง 60 ตัวอย่าง จาก 7 รัฐ ในภาค ตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย จากการตรวจสอบผลโดยวิธี allele-specific PCR ปรากฏ แถบดีเอ็นเอขนาด 540 คู่เบส และผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS2* กับลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยุงก้นปล่อง *An. baimaii* ในประเทศไทย มีค่าความคล้ายคลึง (similarity) 100 % พบว่า เป็นยุงก้นปล่อง *An. baimaii* 59 ตัวอย่าง และ 1 ตัวอย่าง คือยุงก้นปล่อง DA-70 จาก รัฐอัสสัม ประเทศอินเดีย ซึ่งไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ โดยผลการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS2* ความยาว 786 คู่เบส ของยุงก้นปล่อง DA-70 ตรงกับ *An. baimaii* จาก มณฑลยูนนาน ประเทศจีน (Accession number: U60411) ซึ่งจัดอยู่ในชนิด X ซึ่งอาจเป็นยุงชนิดใหม่ ในกลุ่มยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดชับช้อน *Dirus*

ผลการสร้างสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS2* ของ ยุงก้นปล่อง *An. baimaii* (ชนิด D) จาก 7 รัฐ ของประเทศอินเดีย ยุงก้นปล่อง DA-70 จากรัฐอัสสัม ประเทศอินเดีย ยุงก้นปล่องชนิด X จากประเทศจีน (Accession number: U60411) และยุงก้นปล่อง กลุ่มชนิดชับช้อน *Dirus* 5 ชนิด ในประเทศไทย ด้วยวิธี NJ ดังภาพที่ 19 ทดสอบ bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ มีค่า bootstrap แตกต่างกันตั้งแต่ 52-100 % โดยสามารถจัดกลุ่มยุงก้นปล่องได้เป็น 2 กลุ่ม หลัก ดังนี้ กลุ่มที่ 1 กลุ่มยุงก้นปล่อง *An. baimaii* มีค่า bootstrap 100 % กลุ่มที่ 2 กลุ่มยุงก้นปล่อง *Anopheles* ประกอบด้วย *An. dirus* (ชนิด A) *An. cracens* (ชนิด B) *An. scanloni* (ชนิด C) *An. nemophilous* (ชนิด F) *An. baimaii* (ชนิด D) จากมณฑลยูนนาน ประเทศจีน และ ยุงก้นปล่อง DA-70 จากรัฐอัสสัม ประเทศอินเดีย ยุงก้นปล่องในกลุ่มนี้ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย กลุ่มย่อยที่ 1 ประกอบด้วย *An. cracens* และ *An. nemophilous* มีค่า bootstrap 72 % กลุ่มย่อยที่ 2 ประกอบด้วย *An. dirus* *An. scanloni* DA-70 และ *An. baimaii* จากประเทศจีน มีค่า bootstrap 68 % และ พบว่า *An. scanloni* แยกสายวิวัฒนาการออกจาก *An. dirus* DA-70 และ *An. baimaii* จาก ประเทศจีน และ *An. dirus* แยกสายวิวัฒนาการออกจาก DA-70 และ *An. baimaii* จากประเทศจีน มีค่า bootstrap 52 % พบว่า DA-70 และ *An. baimaii* จากประเทศจีน ใกล้ชิดกันมากกว่า *An. dirus* มีค่า bootstrap 99 % จะเห็นว่าค่า bootstrap สูงมาก ทำให้สามารถจัดกลุ่มยุงก้นปล่องให้อยู่ในกลุ่ม เดียวกันได้



ภาพที่ 19 สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ได้จากวิธี NJ โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS2*

ที่มา: Prakash *et al.* (2010)

จากผลการวิเคราะห์ครั้งนี้จะเห็นได้ว่า การใช้ยีน *ITS2* สามารถจัดกลุ่มยุงก้นปล่องได้เป็น 2 กลุ่ม โดยยุงก้นปล่อง *An. baimaii* มีสายวิวัฒนาการแยกออกจากยุงก้นปล่องชนิดอื่นๆ ในกลุ่ม ชับช้อน Dirus ได้อย่างชัดเจน โดย *An. baimaii* จากประเทศอินเดีย และ *An. baimaii* จากประเทศไทย จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ส่วนยุงก้นปล่องกลุ่มทับช้อน Dirus ในประเทศไทย ประกอบด้วย *An. dirus* (ชนิด A) *An. cracens* (ชนิด B) *An. scanloni* (ชนิด C) *An. nemophilous* (ชนิด F) และ *An. baimaii* (ชนิด D) จากมณฑลยูนนาน ประเทศจีน และ DA-70 จากรัฐอัสสัม ประเทศอินเดีย ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน โดย DA-70 จากรัฐอัสสัม ประเทศอินเดียและ *An. baimaii* (ชนิด D) จากมณฑลยูนนาน ประเทศจีน มีความใกล้ชิดกันมากที่สุด และอยู่ในกลุ่มเดียวกัน จึงเป็นไปได้ว่า DA-70 จะเป็นชนิดเดียวกับ *An. baimaii* (ชนิด D) จากมณฑลยูนนาน ประเทศจีน ซึ่งจัดอยู่ในชนิด X ซึ่งอาจเป็นยุงชนิดใหม่ในกลุ่มชนิดทับช้อน Dirus

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA Markers)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) เป็นตัวบ่งชี้ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของสิ่งมีชีวิตทั้งทางปริมาณ และทางคุณภาพ (สุรินทร์, 2552) ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอ

ดังกล่าวอาจมาจากส่วนของยีนที่กำหนดโปรตีนเกิดเป็นฟีโนไทป์ซึ่งสังเกตได้จากการมองเห็น และการตรวจสอบทางเคมี หรือดีเอ็นเอส่วนที่ไม่ใช่ยีน เป็นซันติเอ็นเอในจีโนมที่มีความหลากหลาย (polymorphism) ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ดีควรมีความแปรผันสูง (อมรา, 2542) นอกจากนี้ เครื่องหมายดีเอ็นเอสามารถใช้ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างชนิด และภายในชนิด (between and within species) ระหว่างประชากรและภายในประชากร (between and within population) การตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอทำได้โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) และตรวจสอบผลการแยกขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส เป็นต้น

Karp and Edward (1997) แบ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอ เป็น 3 กลุ่ม คือ

1. Hybridization based marker ได้แก่ RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) เป็นการ hybridization ระหว่างตัวตรวจสอบ (probe) กับดีเอ็นเอซึ่งถูกตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ซึ่งถูกตรึงอยู่กับแผ่นเมมเบรน โดยการทำ Southern blotting

2. Multi-locus PCR based marker เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วย เทคนิค PCR จากหลายตำแหน่งพร้อมกัน ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่เป็น arbitrary หรือ semi-arbitrary โดย เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้ไม่จำเป็นต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในจีโนมก่อน แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ตามประเภทของไพรเมอร์ที่ใช้ คือ

2.1 ไพรเมอร์ที่เป็น arbitrary โดยไพรเมอร์ชนิดนี้สามารถเริ่มต้นการสังเคราะห์สาย ดีเอ็นเอได้ แม้ว่าจะจับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้ไม่สมบูรณ์เครื่องหมายดีเอ็นเอในกลุ่มนี้ ได้แก่ RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) MAAP (Multiple Arbitrary Amplicon Profiling) AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR) เป็นต้น

2.2 ไพรเมอร์ที่เป็น semi-arbitrary เป็นไพรเมอร์ที่ได้จากตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัด จำเพาะหรือลำดับนิวคลีโอไทด์ที่กระจายทั่วไปในจีโนม เช่น ไมโครแซทเทลไลท์และ ทรานโพซอน เครื่องหมายดีเอ็นเอในกลุ่มนี้ ได้แก่ AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) MP-PCR (Microsatellite-Primed PCR)

3. Single-locus PCR based marker เป็นเครื่องหมายที่ตรวจสอบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวได้แก่ Simple Sequence Repeat (SSR) หรือ microsatellite marker

เครื่องหมายดีเอ็นเอสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างกว้างขวาง เช่น การทำแผนที่จีโนม โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ เช่น การทำแผนที่ยีน (genetic map) นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการคัดเลือกโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (Marker Assisted Selection) และเครื่องหมายดีเอ็นเอยังเป็นตัวบ่งชี้ความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตทั้งในระดับชนิดและระดับประชากร โดยเครื่องหมายโมเลกุลให้ข้อมูลที่ช่วยในการระบุลักษณะเฉพาะของแต่ละชนิด (species) และบอกถึงการกระจายตัวของประชากร ความหลากหลายทางพันธุกรรม gene flow และการอพยพระหว่างประชากร ส่วนการศึกษาภายในประชากรเครื่องหมายโมเลกุลสามารถบอกที่มาของความหลากหลายทางพันธุกรรมที่กระจายภายในประชากร (Karp and Edward, 1997)

เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด allele-specific PCR

allele-specific PCR เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาจากตำแหน่งที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอมีความแตกต่างเพียง 1 นิวคลีโอไทด์ (Single nucleotide polymorphism หรือ SNP) โดยการออกแบบไพรเมอร์ให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงด้านปลาย 3' แตกต่างกันตามชนิดของนิวคลีโอไทด์ตรงจุดที่เป็น SNP การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะเกิดขึ้นก็ต่อเมื่อนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ตรงด้านปลาย 3' กับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) เข้าคู่กันเท่านั้น ซึ่งเมื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR และตรวจสอบด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสจะปรากฏแถบดีเอ็นเอ แต่หากลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ตรงด้านปลาย 3' กับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอต้นแบบไม่เข้าคู่กัน เอนไซม์ DNA polymerase จะไม่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ได้ ทำให้ไม่มีการเพิ่มปริมาณของชิ้นดีเอ็นเอเกิดขึ้น เมื่อตรวจสอบโดยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสจึงไม่พบแถบดีเอ็นเอ (Ugozzoli and Wallace, 1991)

Intentional Mismatch Primer เป็นไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทำ alignment ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ โดยออกแบบให้ตำแหน่ง SNP อยู่ทางด้านปลาย 3' ของไพรเมอร์ (ในส่วนของ reverse primer) และออกแบบให้ตำแหน่งที่สองถัดจากปลายดังกล่าวเป็นอีกตำแหน่งที่มีลักษณะการจับคู่เบสที่ไม่เข้าคู่ (mismatch) จากนิวคลีโอไทด์ C หรือ G เป็น

นิวคลีโอไทด์ A เพื่อให้ไพรเมอร์มีความจำเพาะต่อสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆมากขึ้น ส่วนของ forward primer อาจจะเลือกบริเวณที่อนุรักษ์สำหรับสิ่งมีชีวิตทุกชนิดในกลุ่มนั้นๆ

Wilkins *et al.* (2006) ทำการศึกษายุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน Gambiæ ทางภาคตะวันออกเฉียงใต้ของแอฟริกาโดยใช้วิธี intentional mismatch primer (IMP) ในการตรวจสอบ single nucleotide polymorphism เพื่อจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน ผลการทดลองพบว่าสามารถจำแนกชนิดยุงก้นปล่องได้ชัดเจนและเหมาะสมที่จะเลือกมาใช้ในการจำแนกชนิดในยุงก้นปล่อง

ยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus มีลักษณะภายนอกที่คล้ายคลึงกัน จึงจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาได้ยากมีการจำแนกชนิดของยุงก้นปล่องด้วยเทคนิคหลากหลายแบบ มีรายงานการศึกษาจำแนกชนิดในยุงกลุ่มนี้โดยใช้ความแตกต่างของ polytene chromosome จากตัวอ่อนยุงตัวเต็มวัย และการตรวจสอบรูปแบบของ allozyme ด้วยวิธี gel electrophoresis (Baimai *et al.*, 1987; Green *et al.*, 1992) นอกจากนี้มีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอด้วยเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา PCR หลากหลายวิธีด้วยกัน เช่น งานวิจัยของ Walton *et al.* (1999b) พัฒนาเทคนิค allele-specific PCR จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Internal transcribed spacer 2 (ITS2) เพื่อจำแนกยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus 5 ชนิด คือ *An. dirus* *An. cracens* *An. scanloni* *An. baimaii* และ *An. nemophilous*

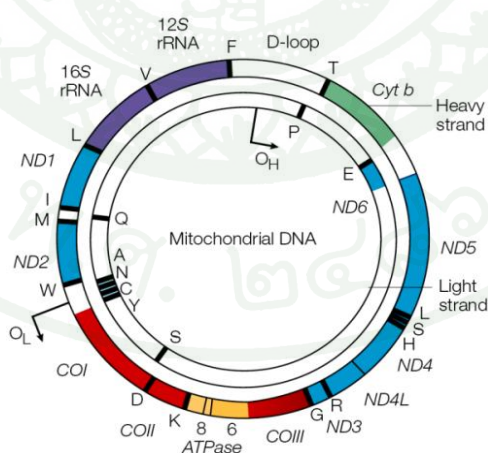
Huong *et al.* (2001) พัฒนาเทคนิค RAPD จำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *An. dirus* *An. cracens* *An. scanloni* *An. baimaii* ในประเทศไทยโดยการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะในแต่ละชนิด จากนั้น Manguin *et al.* (2002) ใช้เทคนิค RAPD และพัฒนาเครื่องหมาย SCAR โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะในการจำแนกชนิด ยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus โดยวิธี Multiplex PCR จำแนกชนิดของยุงก้นปล่องได้ทั้งหมด 4 ชนิด คือ *An. dirus* *An. cracens* *An. scanloni* *An. baimaii* และ Monthathong. (2006) ใช้เทคนิค allele-specific PCR (Walton *et al.*, 1999b) เปรียบเทียบกับ วิธี SCAR marker (Manguin *et al.*, 2002) ในการจำแนกยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus จำนวน 4 ชนิด ในประเทศไทยพบว่าวิธี rDNA ITS2 allele-specific PCR ให้ผลในการจัดจำแนกชัดเจนกว่าวิธี SCAR

Prakash *et al.* (2010) ใช้เทคนิค AS-PCR ทำการจำแนกชนิด และศึกษาการกระจายตัว ยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus บริเวณป่าทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศอินเดีย

27 แห่ง จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *ITS2* ของ rDNA โดยจำแนกชนิด ยุง *An. baimaii* เนื่องจากการสำรวจการกระจายตัวของยุง *An. baimaii* มีบทบาทสำคัญในการศึกษาการระบาดของโรคมาลาเรียในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ

ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ จะอยู่ในไมโทคอนเดรียเป็นส่วนประกอบหนึ่งในเซลล์พืช และในเซลล์สัตว์ โดยทั่วไปหน้าที่หลักของไมโทคอนเดรียในเซลล์สิ่งมีชีวิต คือ เป็นแหล่งผลิตสารพลังงานสูงเรียกว่า ATP ใช้ในการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิต (Alberts *et al.*, 2004) นอกจากนี้ ไมโทคอนเดรียยังมีส่วนเกี่ยวข้องในการกำจัดอนุมูลอิสระ ทำให้อนุมูลอิสระเกิดการเปลี่ยนแปลง ไม่เป็นพิษต่อร่างกาย ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอมีลักษณะเป็นโมเลกุลดีเอ็นเอเกลียวคู่แบบวงแหวน ยกเว้นยูคาริโอตชั้นต่ำบางชนิดที่มีจีโนมในไมโทคอนเดรียเป็นดีเอ็นเอเกลียวคู่แบบเส้นยาว จีโนมในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอของมนุษย์ และสัตว์มีขนาดประมาณ 16-20 กิโลเบส จีโนมในไมโทคอนเดรียมียีนทั้งหมด 37 ยีน กำหนดรหัส rRNA 2 ยีน กำหนดรหัสโปรตีน 13 ยีน และกำหนดรหัส tRNA 22 ยีน และส่วนที่ควบคุมการถอดรหัส (transcription) ของยีนภายในไมโทคอนเดรียจีโนม และการจำลองโมเลกุล (replication) ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอเรียกว่า control region (Meyer, 1994; Boore, 1999) ดังภาพที่ 20



ภาพที่ 20 แสดงตำแหน่งของยีนและส่วนที่ไม่ใช่ยีนในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ

ที่มา: Tuppen *et al.* (2010)

ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ มีคุณสมบัติที่สำคัญ 3 ประการ คือ ประการแรกไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอมีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบ maternal inheritance เป็นลักษณะการถ่ายทอดผ่านทางแม่ฝ่ายเดียว ประการที่สอง ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอไม่เกิด genetic recombination ไม่มีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วน และการรวมตัวกันใหม่ ลูกจะมีจีโนมในไมโทคอนเดรียที่เหมือนกับแม่เสมอ สามารถศึกษาแบบแผนการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมได้โดยตรง ประการที่สามไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอมีอัตราการกลายพันธุ์โดยรวมของยีนค่อนข้างสูงกว่าอัตราการกลายพันธุ์ของยีนในนิวเคลียสถึง 10 เท่า บริเวณที่ไม่ได้เป็นส่วนของยีน ซึ่งรวมถึงบริเวณควบคุมการจำลองโมเลกุล และการถอดรหัสเป็นอาร์เอ็นเอ ที่เรียกว่า control region หรือ displacement (D) loops หรือ hypervariable region ซึ่งมีอัตราการกลายพันธุ์ที่สูงมากในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด (สุรินทร์, 2552) อัตราการกลายพันธุ์ที่เกิดสูง เป็นอัตราการกลายพันธุ์ด้วยการแทนที่เบสแบบ transition มากกว่า transversion โดยตำแหน่งที่เกิดการแทนที่เบสในตำแหน่งที่ไม่เปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน มีอัตราการกลายพันธุ์สูงกว่าการแทนที่เบสในตำแหน่งที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนไป 4-6 เท่า (Meyer, 1993; Mayer, 1994) การที่ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียมีอัตราการกลายพันธุ์สูงทำให้พบความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์หรือพอลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) ได้มาก จึงใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตได้ทั้งภายในประชากรและระหว่างประชากรเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Dusfour *et al.* (2007) ทำการศึกษายุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน *Sundaicus* ซึ่งเป็นพาหะที่สำคัญของโรคมาลาเรียตามแนวชายฝั่งทะเล และบนเกาะในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในการจำแนกยุง 3 ชนิด ในต่างพื้นที่กัน คือ ยุง *An. sundaicus* ในทางตอนเหนือของเกาะบอร์เนียว ยุง *An. epiroticus* ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และยุง *An. sundaicus* E บนเกาะสุมาตราและเกาะชวา โดยการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Multiplex PCR จำนวน 2 เครื่องหมาย จากส่วนของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอคือ *COI* และ *Cytochrome b* จากผลการทดลองพบว่าเครื่องหมายไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอสามารถให้ผลการจำแนกได้ชัดเจน ในการทดลองนี้ใช้เทคนิค allele-specific PCR ทดสอบยุง 374 ตัวอย่าง จาก 24 ประชากรในสภาพภูมิศาสตร์ที่แตกต่างกันและงานวิจัยของ Sarma *et al.* (2012) ศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของยุงก้นปล่อง *An. baimaii* จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COII* ในบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศอินเดียดังนั้นบริเวณยีน *COI* ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอจึงเหมาะแก่การนำมาใช้พัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ

เทคนิคทางชีวโมเลกุลที่เกี่ยวข้องในการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ

เทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายเฉพาะส่วนอย่างจำเพาะในหลอดทดลอง (*in vitro*) ซึ่งต้องอาศัยองค์ประกอบของปฏิกิริยา คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) นิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นคู่สมกับปลาย 3' ของดีเอ็นเอต้นแบบ (primer) เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส (DNA polymerase) ไดออกซินิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) และบัฟเฟอร์ที่มีแมกนีเซียมเป็นองค์ประกอบ ซึ่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์เป็นปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส ซ้ำๆ หลายรอบเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอปริมาณเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ (Sambrook and Russell, 2001) ดังนั้นเทคนิค PCR จึงนิยมใช้ในการวิเคราะห์ด้านชีวโมเลกุล สามารถตรวจสอบผลการทดลองได้อย่างมีประสิทธิภาพ

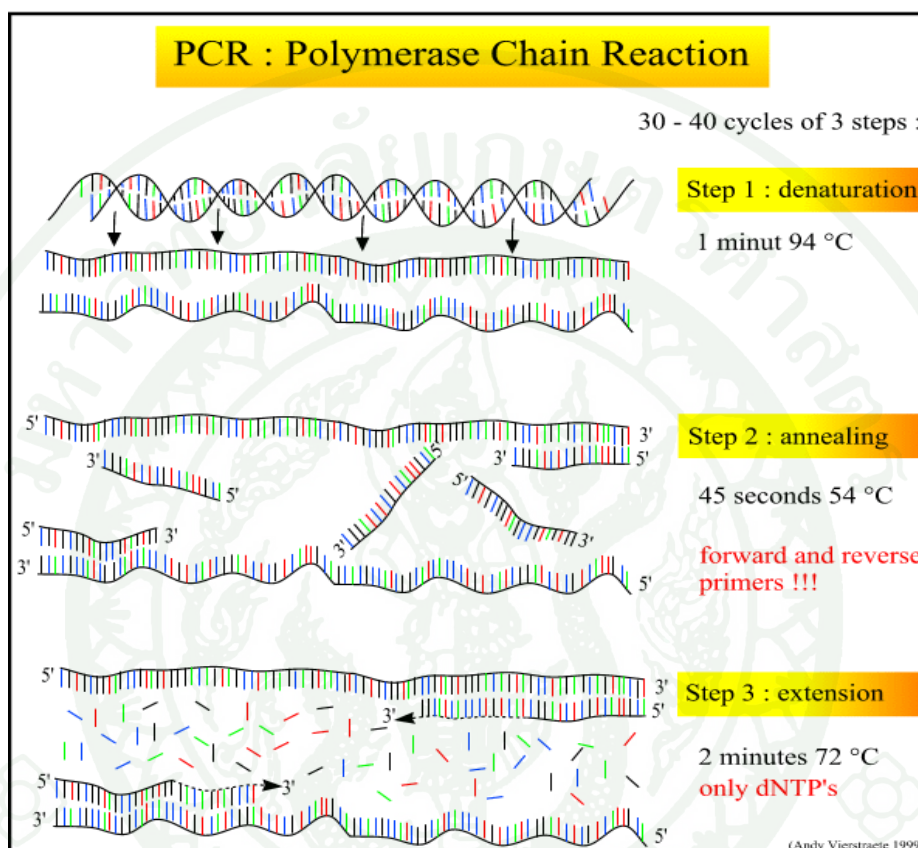
ปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นซ้ำๆ กัน หลายรอบ แต่ละรอบประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

1. Denaturation เป็นขั้นตอนที่ทำให้สายดีเอ็นเอเกลียวคู่ (Double Stranded DNA) แยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยวที่อุณหภูมิสูงประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส
2. Annealing เป็นขั้นตอนที่ไพรเมอร์เข้าไปจับกับเบสคู่สมของสายดีเอ็นเอต้นแบบที่อุณหภูมิ 40-60 องศาเซลเซียส เพื่อให้ไพรเมอร์สามารถจับกับสายดีเอ็นเอต้นแบบที่เป็นสายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับเบสคู่สม อุณหภูมิที่ใช้โดยทั่วไปควรต่ำกว่าอุณหภูมิแยกตัว (melting temperature, T_m) ของไพรเมอร์ 3-5 องศาเซลเซียส

$$T_m = ((4x (G+C) + (2x (A+T))) ^\circ C$$

3. Extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ โดยการต่อดิวคลีโอไทด์ที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ และมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากทิศ 5' ไป 3' โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ thermostable DNA polymerase เช่น *Taq* DNA polymerase อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับขั้นตอนนี้อยู่ที่ 72-78 องศาเซลเซียส

ในแต่ละรอบของปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเป้าหมาย ปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ถ้าทำ PCR จำนวน n รอบ จะได้ดีเอ็นเอเป้าหมาย 2^n เท่า ของดีเอ็นเอเริ่มต้น ดังภาพที่ 21



ภาพที่ 21 แสดงปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

ที่มา: วิเศษฐ์ (2550)

ดังนั้น การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR จึงเป็นเทคนิคทางชีวโมเลกุล ซึ่งถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลและพัฒนาเครื่องมือที่มีศักยภาพ ให้ผลการทดลองที่มีความรวดเร็ว แม่นยำ และมีประสิทธิภาพสูงขึ้น Multiplex PCR เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยใช้คู่ไพรเมอร์หลายคู่พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียวกัน โดยมีข้อจำกัด คือ ไพรเมอร์ที่นำมาใช้ต้องเป็นเบสคู่สมกัน รวมทั้งผลผลิต PCR ที่ได้จากแต่ละคู่ไพรเมอร์ต้องมีขนาดที่แตกต่างกัน นอกจากนี้

สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเหมาะสมและมีความใกล้เคียงกัน อีกทั้งยังเป็นการลดค่าใช้จ่ายและประหยัดเวลาในการตรวจสอบ และให้ผลการทดลองที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น (คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2536)

การตรวจสอบผลโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส

วิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) เป็นเทคนิคที่ใช้แยกขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอ หรือโปรตีน ตามขนาด รูปร่าง หรือประจุของโมเลกุลออกจากกันโดยใช้กระแสไฟฟ้า โดยอัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอจะขึ้นกับขนาดรูปร่างโมเลกุล เช่น โมเลกุลขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ช้ากว่าโมเลกุลขนาดเล็ก ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะมีหมู่ฟอสเฟตน้อยกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ โมเลกุลดีเอ็นเอขั้วลบจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวกของสนามแม่เหล็กไฟฟ้า (อุทัยรัตน์, 2543; Sambrook *et al.*, 1989) ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอ มีดังนี้

1. ขนาดโมเลกุลดีเอ็นเอ โมเลกุลดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่
2. รูปแบบดีเอ็นเอ (configuration) กรณีที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากัน ดีเอ็นเอที่เป็นวงแหวนที่พันเกลียวซ้อน (supercoil หรือ covalent close circular) จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอแบบเส้นตรงปลายเปิด (linear) และดีเอ็นเอแบบเส้นตรงจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอแบบวงแหวนที่มีช่องเปิด (nick circular)
3. เปอร์เซ็นต์ และชนิดของเจลถ้าเพิ่มความเข้มข้นหรือเปอร์เซ็นต์เจล โมเลกุลดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ช้าลง โดยเจลที่นิยมใช้กับกรดนิวคลีอิก คือ เจลโพลีอะครีลาไมด์ (polyacrylamide gel) ใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กระหว่าง 6-1,000 คู่เบส และเจลอะกาโรส (agarose gel) ใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ประมาณ 100-5,000 คู่เบส
4. แรงเคลื่อนไฟฟ้า (voltage) ถ้าเพิ่มแรงเคลื่อนไฟฟ้าดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ได้เร็วขึ้น ถ้าใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าสูงเกินไปดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่เร็ว แต่การแยกตัวจะไม่ดี ถ้าใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าต่ำเกินไปดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ช้า แยกตัวได้ดี แต่แถบดีเอ็นเอจะไม่คมชัดเพราะเกิดการแพร่ (diffusion) ของดีเอ็นเอ

5. บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้มี 3 ชนิด คือ TAE TBE และ TPE ซึ่งมีข้อดีและข้อเสียต่างกัน TBE นิยมใช้ที่ความเข้มข้น 0.5 เท่า มีความสามารถเป็นบัฟเฟอร์ (buffering capacity) ซึ่งใช้แยกขนาด ดีเอ็นเอได้ดี แต่สามารถเกิดปฏิกิริยากับเจลอะกาโรสได้ จึงไม่เหมาะสมกับการนำดีเอ็นเอกลับมาใช้อีก TAE ใช้ได้ทั่วไป เหมาะสำหรับกรณีที่ต้องการนำดีเอ็นเอกลับมาใช้อีก มีความสามารถในการเป็นบัฟเฟอร์ต่ำ จึงไม่ควรใช้ในกรณีทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเป็นเวลานานและควรมีการหมุนเวียนใช้ บัฟเฟอร์ (recirculation) ส่วน TPE มีความสามารถในการเป็นบัฟเฟอร์ได้ดี แยกขนาดดีเอ็นเอได้เร็ว แต่ไม่เหมาะสำหรับการสกัดดีเอ็นเอจากเจลและตกตะกอนด้วยเอธานอลเพราะจะเกิดการตกตะกอนของฟอสเฟต (Sambrook *et al.*, 1989)

การประยุกต์ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการจำแนกชนิดของยุง

ปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคทางด้าน โมเลกุลต่างๆ ให้มีความทันสมัย ง่ายในการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต ได้แก่ RFLP allele-specific PCR SCAR เป็นต้น (Monthathong, 2006)

Walton *et al.* (1999) พัฒนาเทคนิค allele-specific PCR เพื่อจำแนกยุงก้นปล่องกลุ่มชนิด ชับซ้อน Dirus ซึ่งเป็นยุงพาหะสำคัญของโรคมาลาเรียในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยจำแนกยุง 5 ชนิด ในประเทศไทยจำนวน 179 ตัวอย่าง ให้ผลในการจำแนกยุงก้นปล่องชนิด *An. dirus* *An. cracens* *An. scanloni* *An. baimaii* และ *An. nemophilous* ได้ประมาณร้อยละ 95.09 เปรียบเทียบกับวิธีการจำแนกโดยใช้ลักษณะ polytene chromosome ได้ประมาณร้อยละ 6.82 ซึ่งให้ผลไม่สอดคล้องกันระหว่างการจำแนกชนิดโดยวิธี allele-specific PCR และ polytene chromosome ซึ่งการจำแนกโดยวิธี allele-specific PCR สามารถจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มชนิด ชับซ้อน Dirus

Huong *et al.* (2001) พัฒนาเทคนิค RAPD ทำการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มชนิด ชับซ้อน Dirus ซึ่งมีลักษณะพื้นฐานวิธยาคล้ายคลึงกัน (sibling species) โดยสกัดดีเอ็นเอในระยะลูกน้ำ และระยะตัวเต็มวัย ที่เก็บรักษาไว้เป็นเวลา 14 ปี จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ ยุงก้นปล่องชนิด *An. dirus* *An. cracens* *An. scanloni* และ *An. baimaii* ในประเทศไทยโดยการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะในแต่ละชนิด ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 120 คู่เบส 75 คู่เบส 60 คู่เบส และ 172 คู่เบส ตามลำดับ ซึ่งเป็นวิธีการที่รวดเร็วและสามารถทำการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มชนิด ชับซ้อน Dirus ได้

Manonmani *et al.* (2001) ใช้เทคนิค allele-specific PCR ทำการจำแนกชนิดยุงก้นปล่อง กลุ่มชนิดซับซ้อน Fluvialis ซึ่งมีลักษณะสัณฐานวิทยาลักษณะคล้ายคลึงกัน (sibling species) 2 ชนิด ซึ่งเป็นพาหะนำโรคมาลาเรียที่สำคัญในภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ทำการจำแนกชนิดโดยใช้ *ITS2* ของ rDNA โดยใช้คู่ไพรเมอร์จำเพาะต่อยุงแต่ละชนิดปรากฏแถบ ดีเอ็นเอขนาด 350 คู่เบส ในชนิด X และแถบดีเอ็นเอขนาด 450 คู่เบส ในชนิด Y ผลจากการจำแนก ชนิดยุงก้นปล่องให้ผลรวดเร็วและมีความจำเพาะสูงในแต่ละชนิด

Garros *et al.* (2004) พัฒนาเทคนิค allele-specific PCR ในการจำแนกยุงก้นปล่องกลุ่ม ชนิดซับซ้อน Minimus และ Funestus ซึ่งเป็นพาหะนำโรคมาลาเรียที่สำคัญในทวีปแอฟริกา และ ทวีปเอเชีย ซึ่งไม่สามารถจำแนกโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาได้ทำการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องโดย ใช้ *ITS2* ของ rDNA จำนวน 10 คู่ไพรเมอร์ ตรวจสอบโดยวิธี Multiplex PCR พบว่าสามารถ จำแนกชนิดยุงที่เป็นพาหะของโรคมาลาเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ใน การศึกษาการกระจายตัวและการศึกษานิเวศวิทยาของยุงก้นปล่องแต่ละชนิด และควรแก่การพัฒนา เครื่องหมาย allele-specific PCR ไปใช้กับยุงกลุ่มอื่นๆ

Manguin *et al.* (2002) ใช้เทคนิค RAPD และพัฒนาเครื่องหมาย SCAR โดยทำการ ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะในการจำแนกชนิด ยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus โดยวิธี Multiplex PCR ตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์หลายคู่พร้อมกัน จำแนกชนิดของยุงก้นปล่องได้ทั้งหมด 4 ชนิด คือ *An. dirus* *An. cracens* *An. scanloni* และ *An. baimaii* โดยเก็บตัวอย่างยุงก้นปล่องชนิด *An. dirus* จากประเทศในแถบทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ชนิด *An. cracens* เก็บตัวอย่างจาก Perlis ประเทศมาเลเซีย ส่วนชนิด *An. scanloni* และ *An. baimaii* เก็บตัวอย่างจากบริเวณพื้นที่ประเทศไทย

Monthathong (2006) ใช้เทคนิค allele-specific PCR (Walton *et al.*, 1999) เปรียบเทียบกับ วิธี SCAR marker (Manguin *et al.*, 2002) ในการจำแนกยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus พบว่า วิธี rDNA *ITS2* allele-specific PCR ให้ผลในการจัดจำแนกชัดเจนกว่า โดยใช้คู่ไพรเมอร์ D-U/ D-AC ในการจำแนกชนิด *An. dirus* และ *An. scanloni* ซึ่งปรากฏขนาดดีเอ็นเอ 2 แบบ คือ 562 คู่เบส และ 360 คู่เบส ส่วนคู่ไพรเมอร์ D-U/ D-B จำเพาะต่อการจำแนกชนิด *An. cracens* โดยให้ ดีเอ็นเอ 1 แถบ ขนาด 510 คู่เบส และคู่ไพรเมอร์ D-U/ D-D ให้แถบดีเอ็นเอ 1 แถบ ขนาด 306 คู่เบส เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์เหล่านี้ในการจำแนกชนิดของยุงก้นปล่อง *An. dirus* จำนวน 327 ตัวอย่าง ที่เก็บ จากพื้นที่ 5 แหล่ง จากจังหวัดระยอง กาญจนบุรี และนครพนม ระหว่างเดือนสิงหาคม ถึง พฤศจิกายน พ.ศ. 2545 พบว่ามียุงก้นปล่องชนิด *An. dirus* จำนวน 300 ตัว ชนิด *An. scanloni* จำนวน 11 ตัว และชนิด *An. baimaii* จำนวน 17 ตัว โดยไม่พบชนิด *An. cracens* จากแหล่งเก็บ ตัวอย่าง

Prakash *et al.* (2006) พัฒนาเทคนิค allele-specific PCR (Walton *et al.*, 1999) ทำการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม Dirus ศึกษาตัวอย่างยุง *An. baimaii* และกลุ่ม Minimus ศึกษาจากตัวอย่างยุงก้นปล่อง *An. minimus* A ซึ่งเป็นพาหะนำโรคมาลาเรียที่สำคัญในประเทศอินเดีย ทำการจำแนกชนิดโดยใช้ *ITS2* ของ rDNA ใน รัฐอรุณาจัล (Arunachal) รัฐนากาแลนด์ (Nagaland) รัฐอัสสัม (Assam) และรัฐเมฆกัลยา (Maghalaya) ในยุง *An. baimaii* ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 479 คู่เบส และในยุงก้นปล่อง *An. minimus* จากรัฐนากาแลนด์ (Nagaland) ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 372 คู่เบส

Dusfour *et al.* (2007) พัฒนาเครื่องหมาย allele-specific PCR ในการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่ม *An. sundaicus* เป็นพาหะที่สำคัญของโรคมาลาเรีย พบส่วนใหญ่ตามแนวชายฝั่งทะเลและบนเกาะในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จากการศึกษาก่อนหน้านี้ใช้ *COI* *Cyt b* และ *ITS2* เป็นเครื่องหมายในการจำแนกยุงทั้ง 3 ชนิด ในต่างพื้นที่กัน คือ ยุง *An. sundaicus* ในทางตอนเหนือของเกาะบอร์เนียว *An. epiroticus* ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และยุง *An. sundaicus* E บนเกาะสุมาตราและเกาะชวาในประเทศอินโดนีเซีย การเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยากับทั้ง 3 ส่วนของยีนที่ใช้ในการพัฒนา จากการวินิจฉัยแสดงความไม่น่าเชื่อถือในการจำแนกความแตกต่างของยุงทั้ง 3 ชนิดได้ มีการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Multiplex PCR จำนวน 2 เครื่องหมาย จากส่วนของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอซึ่งสามารถจำแนกได้ชัดเจน ในการทดลองนี้ใช้เทคนิค PCR ทดสอบยุง 374 ตัวอย่าง จาก 24 ประชากรในสภาพภูมิศาสตร์ที่แตกต่างกัน เพื่อให้มีความเข้าใจข้อมูลการกระจายตัวของยุงในแต่ละชนิด

Prakash *et al.* (2010) ใช้เทคนิค allele-specific PCR (Prakash *et al.*, 2006) ทำการจำแนกชนิดและศึกษาการกระจายตัวของยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus บริเวณป่าทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย 27 แห่ง โดยรวบรวมตัวอย่างยุงทั้งหมด 260 ตัว จำแนกชนิดโดยใช้ *ITS2* ของ rDNA โดยจำแนกชนิด ยุง *An. baimaii* ได้มากที่สุดประมาณร้อยละ 99.63 จากการวิเคราะห์ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ขนาด 540 คู่เบส ยุงก้นปล่อง DA-70 จากรัฐอัสสัม (Assam) ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ซึ่งผลจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ยุงก้นปล่องจากรัฐอัสสัมขนาด 786 คู่เบส ตรงกับ *An. baimaii* จากมณฑลยูนนานของประเทศจีน ซึ่งจัดให้อยู่ในชนิด X ซึ่งอาจเป็นยุงชนิดใหม่ในกลุ่มยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus การสำรวจการกระจายตัวของยุง *An. baimaii* มีบทบาทสำคัญในการศึกษาการระบาดของโรคมาลาเรียในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

อุปกรณ์และวิธีการ

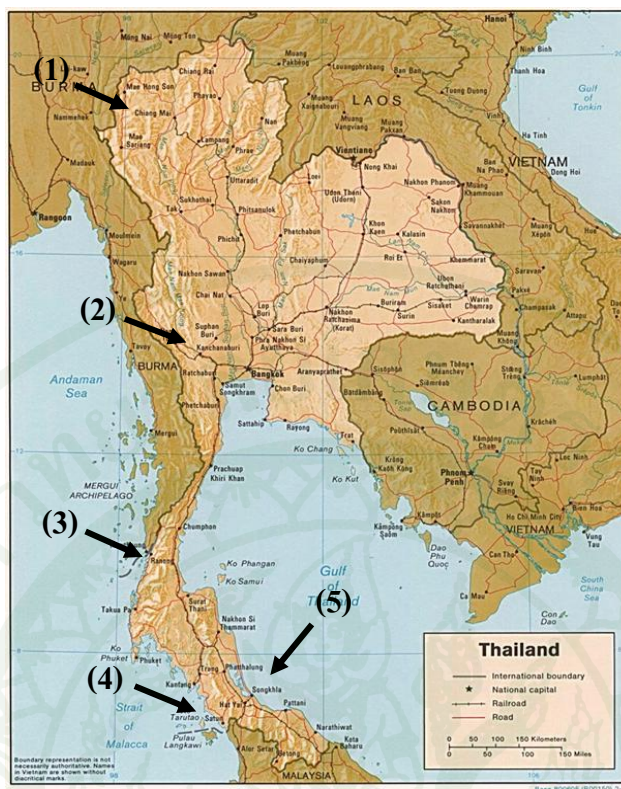
อุปกรณ์

1. ตัวอย่างยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อนDirus

การเก็บรวบรวมตัวอย่างยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus จากแหล่งพื้นที่การกระจายตัวในประเทศไทย ในช่วงเดือนสิงหาคม 2554 ถึง มกราคม 2556 โดยจำแนกตัวอย่างยุงก้นปล่องตามลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้น Rattanarithikul et al. (2006) ยุงก้นปล่องเพศเมียที่ใช้ในการทดลองมีทั้งหมด 3 ชนิด ประกอบด้วย *An. cracens* *An. scanloni* และ *An. nemophilous* โดยทำการเก็บตัวอย่างยุงตัวเต็มวัยในไนโตรเจนเหลวและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาสกัดดีเอ็นเอจำนวนทั้งหมด 105 ตัวอย่าง กำหนดพื้นที่เก็บตัวอย่างจากแหล่งพื้นที่กระจายตัวดังนี้

พื้นที่ภาคเหนือ	จังหวัดเชียงใหม่
พื้นที่ภาคตะวันตก	จังหวัดกาญจนบุรี
พื้นที่ภาคใต้ฝั่งตะวันตก	จังหวัดสตูลและจังหวัดระนอง
พื้นที่ภาคใต้ฝั่งตะวันออก	จังหวัดสงขลา

โดยแต่ละแหล่งพื้นที่กระจายตัวที่ดำเนินการเก็บตัวอย่างได้รับการอนุญาตจากเจ้าของพื้นที่และสำนักควบคุมโรคติดต่อฯ โดยแมลง กระทรวงสาธารณสุข ซึ่งพื้นที่เก็บตัวอย่างส่วนใหญ่เป็นบริเวณสวนยางพาราและป่าดิบชื้นติดเขาหินปูน บางพื้นที่มีหมู่บ้านใกล้เคียงโดยยุงก้นปล่อง *An. cracens* ได้จากอำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี และได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร. เวช ชูโชติ ห้องปฏิบัติการภาควิชาปรสิตวิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ยุงก้นปล่อง *An. scanloni* ได้จาก อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล และอำเภอนาทวี จังหวัดสงขลาได้รับความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างจาก อาจารย์ยวีร์ วงศ์หิรัญรัชต์ นักวิชาการสาธารณสุข 8 สำนักงานป้องกันควบคุมโรคติดต่อฯ โดยแมลงที่ 12 สงขลา ส่วนยุงก้นปล่อง *An. nemophilous* ได้จาก อำเภอละอุ่น จังหวัดระนอง และอำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี ได้รับความอนุเคราะห์ ศ.ดร. ชีระภาพ เจริญวิริยะภาพ ดร. มณฑาทิพย์ คงมี และทีมนักวิจัยห้องปฏิบัติการภาควิชากีฏวิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ดังภาพที่ 22



ภาพที่ 22 แผนที่แสดงตำแหน่งแหล่งเก็บตัวอย่างยุงก้นปล่องในประเทศไทย ประกอบด้วย
หมายเลข 1 คือ จังหวัดเชียงใหม่ หมายเลข 2 คือ จังหวัดกาญจนบุรี หมายเลข 3 คือ
จังหวัดระนอง หมายเลข 4 จังหวัดสตูล และหมายเลข 5 คือจังหวัดสงขลา

ตารางที่ 1 จำนวนยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus จากแหล่งพื้นที่ศึกษา

แหล่งที่	วันที่เก็บตัวอย่าง	สถานที่	จำนวน
1	22 พ.ย. 2555	อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่	20
2	30 ก.ย. 2556	อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี	4
3	7-11ม.ค. 2556	อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	80
4	23 ส.ค. 2555	อำเภอละอุ่น จังหวัดระนอง	1
5	5-9 ส.ค. 2554	อำเภอนาทวี จังหวัดสงขลา	-
รวม (ตัว)			105

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. หลอดพลาสติก (Microcentrifuge Tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
2. ไมโครปิเปตต์ชนิดปรับปริมาตรได้พร้อม Tip ขนาด 2 10 20 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
3. หลอดสำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (PCR Tube) ขนาด 200 ไมโครลิตร
4. เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (Refrigerated Centrifuge)
5. เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วต่ำ (Microcentrifuge)
6. เครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (PCR Thermal Cycle)
7. เครื่องฉายแสง Ultra Violet พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ (Gel Documentation)
8. เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม Nanodrop Spectrophotometer
9. หม้อนึ่งความดันสูง (Autoclave)
10. อุปกรณ์อื่นๆ เช่น กระดาษชำระ ซ้อนตักสาร ปากกาเคมี ถังพลาสติก ถังมือ แผ่นพลาสติก ใส่ถาดพลาสติก หนังสือ เป็นต้น

3. เครื่องคอมพิวเตอร์สำหรับวิเคราะห์ข้อมูล

เครื่องคอมพิวเตอร์ที่เชื่อมต่ออินเทอร์เน็ต ติดตั้งเครื่องปริ้นเอกสาร

4. โปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ข้อมูล

1. Blastn (Basic Local Alignment Search Tool-nucleotide) จาก <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast> ใช้เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการศึกษากับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank (<http://www.ncbi.nih.gov>)
2. CAP3 (Huang and Madan, 1999) ใช้เพื่อเชื่อมต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละครั้งจากชิ้นส่วนยีนเดียวกัน (Sequence Assembly) โดยใช้บริเวณเชื่อมต่อเป็นบริเวณที่เหลื่อมกันของผลที่ได้แต่ละครั้ง
3. BioEdit version 7.0.9.0 (Hall, 1999) โดยใช้ฟังก์ชัน Clustal W Multiple alignment (Thomson *et al.*, 1999) ใช้เพื่อทำ alignment เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์
4. Net primer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch>) ใช้สำหรับการออกแบบไพรเมอร์และคำนวณหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยา PCR

5. สารเคมีและเอ็นไซม์ในการสกัดดีเอ็นเอและการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยวิธี PCR

1. ชุดสกัดดีเอ็นเอ Genomic DNA minikit (Tissue) บริษัท Geneaid, Taiwan
2. ชุดทำ PCR Product ให้บริษัท Fermentas LIFE SCIENCES, USA

6. สารเคมีและเอ็นไซม์ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยวิธี PCR

1. 10XPCR buffer
2. $MgCl_2$
3. dNTP
4. *Taq* DNA Polymerase
5. primers
6. น้ำกลั่น (de-ionized water)

7. สารเคมีที่ใช้ใน agarose gel electrophoresis

1. Agarose
2. 0.5X TAE
3. แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder
บริษัท Fermentas LIFE SCIENCES, USA
4. Ethidium bromide

วิธีการ

1. สืบค้นข้อมูลและคัดเลือกรหัสยีนที่จะใช้ในการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ

สืบค้นข้อมูลงานวิจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องและคัดเลือกรหัสยีนที่จะใช้ในการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ เพื่อจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus โดยเลือกรหัสยีน *Cytochrome oxidase subunit I (COI)* จากไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอจากฐานข้อมูล Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov)

2. รวบรวมตัวอย่างยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus

เก็บรวบรวมตัวอย่างยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *An. cracens*, *An. scanloni* และ *An. nemophilous* จากพื้นที่การกระจายตัว 5 แหล่ง ได้แก่ อำเภอมือง จังหวัดเชียงใหม่ อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล อำเภอนาทวี จังหวัดสงขลา และอำเภอละอุ่น จังหวัดระนอง ในช่วงเดือนสิงหาคม 2554 ถึง มกราคม 2556 โดยจำแนกตัวอย่างยุงก้นปล่องตามลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของ Rattananarithikul *et al.* (2006) จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างยุงตัวเต็มวัยในไนโตรเจนเหลวและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3. การสกัดดีเอ็นเอ

ดัดแปลงจากวิธีการของ Genomic DNA Mini Kit (Tissue) Protocol (Geneaid, Taiwan) มีขั้นตอนดังนี้

3.1 บดตัวอย่างยุงก้นปล่องในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่เติมสารละลาย GT buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ให้ละเอียด

3.2 เติมสารละลาย proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ ให้ตัวอย่างผสมเป็นเนื้อเดียวกัน บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที ขณะบ่มกลับหลอด ทุกๆ 5-10 นาที

3.3 เติมสารละลาย GBT buffer ผสมให้เข้ากันโดยนำไป vortex เป็นเวลา 5 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที ขณะบ่มกลับหลอดทุกๆ 5-10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

3.4 ดูดสารละลายส่วนใสใส่หลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ตกตะกอนด้วย 100 % ethanol ที่เย็นจัด ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไป vortex ทันที เป็นเวลา 10 วินาที

3.5 แบ่งสารละลายส่วนใส ใส่ GD column ของ collectiontube ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

3.6 ย้าย GD column มายัง collection tube ใหม่ เติมสารละลาย W1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง

3.7 เติมสารละลาย wash buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร มาที่ GD column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง

3.8 ปั่นเหวี่ยง column 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้ column แห้ง

3.9 ย้าย GD column ไปยังหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม elution buffer ที่ทำการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่ - 80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้ต่อไป

4. การออกแบบไพรเมอร์เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอชิ้นส่วนยีน *COI*

ออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเป้าหมายที่สมบูรณ์และลำดับนิวคลีโอไทด์จากชิ้นส่วนยีน *COI* ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอของยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus จากฐานข้อมูล Genbank (JX219731.1 NC_020768.1 JX219733.1 DQ897948.1 AM180861.1 และ DQ897960.1) จากนั้นออกแบบ forward universal primer และ reverse universal primer โดยเลือกบริเวณที่อนุรักษ์ที่สุดสำหรับยุงชนิดที่ศึกษาโดยใช้เกณฑ์การพิจารณาสำหรับการออกแบบไพรเมอร์ (ภาคผนวก ข) โดยใช้โปรแกรม Netprimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>)

5. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณชิ้นส่วนยีน *COI*

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณชิ้นส่วนยีน *COI* โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบ คือ (COIF 5'CAACACTTATTCTGATTTT3' และ COIR5'AAAAAGTATAAAATAGCAAAT3') โดยไพรเมอร์ COIF เป็น forward universal primer และ COIR เป็น reverse universal primer โดยส่วนประกอบและขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR คัดแปลงมาจาก Dousfour *et al.* (2007) สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR ให้มีปริมาตรรวม 20 μ l ประกอบด้วย genomic DNA 20-30 ng 1X PCR reaction buffer 0.5 mM dNTPs 1.25 mM MgCl₂ 0.3 μ M ของแต่ละไพรเมอร์ *Taq* DNA polymerase (Vivantis, USA) 1 unit โดยขั้นตอนปฏิกิริยา PCR ดังนี้

initial denaturation	94 °C	5 min	} 35 cycles
denaturation	94 °C	30 sec	
annealing	48 °C	30 sec	
extension	72 °C	30 sec	
final extension	72 °C	10 min	

จากนั้นนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จากปฏิกิริยา PCR มาตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วน ดีเอ็นเอ ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นอะกาโรส 1.5 % (Vivantis, USA) ใน 0.5X TAE buffer (Vivantis, USA) ความต่างศักย์ไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น ตรวจสอบผลภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต

6. การส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์และการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (multiple sequence alignment)

นำผลผลิต PCR ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์ด้วยเอนไซม์ Exonuclease I และ Fast AP™ Thermosensitive alkaline phosphatase (Fermentas LIFE SCIENCES, USA) โดยเอนไซม์ Exonuclease I (Exo I) จะทำหน้าที่ย่อยสลายไพรเมอร์ส่วนเกินและเอนไซม์ Fast AP™ Thermosensitive alkaline phosphatase จะทำหน้าที่ย่อยสลาย dNTPs จากนั้นส่งตัวอย่าง PCR product ที่ได้จากยีน *COI* เพื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท MacroGen ประเทศเกาหลี (<http://www.macrogen.com>) โดยในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีนเป้าหมายใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบคือ COIF และ COIR จากนั้นทำการเชื่อมต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากฐานข้อมูล Genbank เพื่อสร้างเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์จากชิ้นส่วนยีนเป้าหมายที่สมบูรณ์ โดยใช้โปรแกรม CAP3 (Huang and Madan, 1999) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยุงก้นปล่องจากฐานข้อมูล Genbank โดยใช้โปรแกรม Blastn จาก <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast> เพื่อตรวจสอบว่าเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์เป้าหมายจริง จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ multiple sequence alignment ด้วยโปรแกรม BioEdit version 7.0.9.0 (Hall, 1999) โดยใช้ฟังก์ชัน Clustal W Multiple alignment (Thomson *et al.*, 1999) และตรวจสอบความถูกต้องด้วยบุคคลอีกรอบหนึ่ง จากนั้นออกแบบไพรเมอร์และหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยา PCR โดยโปรแกรม Net primer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>)

7. การออกแบบ allele specific primer จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน *COI*

ออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน *COI* ของไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอ ความยาว 713 คู่เบส จากยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus จำนวน 3 ชนิด คือ *An. cracens* *An. scanloni* และ *An. nemophilous* จากการส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนจากฐานข้อมูล Genbank รวมทั้งหมด 119 ตัวอย่างโดยยุงก้นปล่อง *An. cracens* ออกแบบไพรเมอร์จากการส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยุงก้นปล่อง *An. cracens* รหัส 0902-4 (ภาคผนวก ก1) จากภาควิชาปรสิตวิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี (<http://www.macrogen.com>) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ รวมทั้งหมด 3 ตัวอย่าง ส่วนยุง *An. scanloni* ออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากฐานข้อมูล Genbank (AM180861.1) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ รวมทั้งหมด 113 ตัวอย่าง และยุง *An. nemophilous* ออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากฐานข้อมูล Genbank (DQ897960.1) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากฐานข้อมูล Genbank รวมทั้งหมด 3 ตัวอย่าง โดยทำการเชื่อมต่อดำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์กับลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนที่ได้จากฐานข้อมูล Genbank เพื่อสร้างเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์จากชิ้นส่วนยีน *COI* ที่สมบูรณ์จากนั้นออกแบบ allele-specific primer จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* โดยให้ตำแหน่ง polymorphic site ที่มีความจำเพาะในยุงแต่ละชนิดอยู่ทางด้านปลาย 3' ของ reverse primer และกำหนดให้นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่สองถัดจากปลายดังกล่าวเป็นตำแหน่งที่เป็น intentional mismatch เพื่อเพิ่มความจำเพาะต่อยุงแต่ละชนิดมากขึ้น ส่วนตำแหน่งของ forward primer เลือกบริเวณที่อนุรักษ์สำหรับยุงทั้ง 3 ชนิดที่ศึกษา โดยใช้เกณฑ์การพิจารณาสำหรับการออกแบบไพรเมอร์ (ภาคผนวก ข) โดยใช้โปรแกรม Net primer (<http://www.premierbiosorf.com/netprimer/>)

8. การทดสอบสถานะที่เหมาะสมของ allele-specific primer ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน *COI* ด้วยวิธี allele-specific PCR

8.1 การทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมด้วยวิธี Gradient PCR

นำ allele-specific primer คือ UU DB DC และ DF โดยไพรเมอร์ UU เป็น forward universal primer และ DB DC และ DF เป็น reverse specific primer สำหรับยุงก้นปล่องกลุ่มชนิด

หับซ็อน Dirus ชนิด *An. cracens* *An. scanloni* และ *An. nemophilous* โดยขนาดชิ้นส่วน allele-specific PCR มีขนาด 236 388 และ 527 คู่เบส ตามลำดับ ที่พัฒนาขึ้นจากชิ้นส่วนของยีน *COI* โดยการนำดีเอ็นเอจากยุงก้นปล่องทั้ง 3 ชนิด มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR จากนั้นตรวจสอบผลการแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นอะกาโรส 1.5 % แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ภาคผนวก ค) ทำการปรับสภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธี Gradient PCR เช่น ปรับอุณหภูมิช่วง annealing ให้มีค่าแตกต่างจากอุณหภูมิโดยเริ่มจากอุณหภูมิที่ 42 องศาเซลเซียสถึงอุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับคู่ไพรเมอร์

การปรับสภาวะสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR ให้มีปริมาตรรวม 20 μ l ประกอบด้วย genomic DNA 20-30 ng, 1X PCR reaction buffer 0.5 mM dNTPs 0.5-1.5 mM $MgCl_2$ 0.1-0.5 μ M ของแต่ละไพรเมอร์ *Taq* DNA polymerase (Vivantis, USA) 1 unit ส่วนประกอบและขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR ดัดแปลงมาจาก Dousfour *et al.* (2007) โดยขั้นตอนปฏิกิริยา PCR ดังนี้

initial denaturation	94 °C	5 min	} 35 cycles
denaturation	94 °C	30 sec	
annealing	42-54 °C	30 sec	
extension	72 °C	30 sec	
final extension	72 °C	10 min	

จากนั้นนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จากปฏิกิริยา PCR มาตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นอะกาโรส 1.5 % (Vivantis, USA) ใน 0.5X TAE buffer (Vivantis, USA) ความต่างศักย์ไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตรวจสอบผลภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต

8.2 การปรับสภาวะของสารในการทำปฏิกิริยา PCR

8.2.1 การปรับความเข้มข้นของ $MgCl_2$

นำ allele-specific primer คือ UU DB DC และ DF โดยไพรเมอร์ UU เป็น forward universal primer และ DB DC และ DF เป็น reverse specific primer สำหรับยุงก้นปล่อง กลุ่มชนิดชั้บช้อน Dirus ชนิด *An. cracens* *An. scanloni* และ *An. nemophilous* โดยขนาดชิ้นส่วน allele-specific PCR มีขนาด 236 388 และ 527 คู่เบส ตามลำดับ ที่พัฒนาขึ้นจากชิ้นส่วนของยีน *COI* โดยการนำดีเอ็นเอจากยุงก้นปล่องทั้ง 3 ชนิด มาทำการปรับสภาวะการทำปฏิกิริยา PCR เช่น ปรับความเข้มข้นของ $MgCl_2$ โดยเริ่มจากความเข้มข้น 0.5 mM ถึง 1.5 mM จนกระทั่งได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ $MgCl_2$ เท่ากับ 1.25 mM ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมกับไพรเมอร์แต่ละคู่

8.2.2 การปรับความเข้มข้นของ Primer

นำ allele-specific primer ที่พัฒนาขึ้นจากชิ้นส่วนของยีน *COI* โดยไพรเมอร์ UU เป็น forward universal primer และ DB DC และ DF เป็น reverse specific primer สำหรับยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดชั้บช้อน Dirus ชนิด *An. cracens* *An. scanloni* และ *An. nemophilous* โดยขนาดชิ้นส่วน allele-specific PCR มีขนาด 236 388 และ 527 คู่เบส ตามลำดับ โดยการนำดีเอ็นเอจากยุงก้นปล่องทั้ง 3 ชนิด มาทำการปรับสภาวะการทำปฏิกิริยา PCR เช่น ปรับความเข้มข้นของไพรเมอร์โดยเริ่มจากความเข้มข้น 0.1 μM ถึง 0.5 μM จนกระทั่งได้ความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์ เท่ากับ 0.3 μM ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมกับไพรเมอร์แต่ละคู่

การปรับสภาวะสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR ให้มีปริมาตรรวม 20 μl ประกอบด้วย genomic DNA 20-30 ng, 1X PCR reaction buffer 0.5 mM dNTPs 0.5-1.5 mM $MgCl_2$ 0.1-0.5 μM ของแต่ละไพรเมอร์ *Taq* DNA polymerase (Vivantis, USA) 1 unit ส่วนประกอบและขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR ดัดแปลงมาจาก Dousfour *et al.* (2007) โดยขั้นตอนปฏิกิริยา PCR ดังนี้

initial denaturation	94 °C	5 min	
denaturation	94 °C	30 sec	} 35 cycles
annealing	48 °C	30 sec	
extension	72 °C	30 sec	
final extension	72 °C	10 min	

จากนั้นนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จากปฏิกิริยา PCR มาตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นอะกาโรส 1.5 % (Vivantis, USA) ใน 0.5X TAE buffer (Vivantis, USA) ความต่างศักย์ไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตรวจสอบผลภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต

8.3 การทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมโดยใช้ไพรเมอร์ที่ละคู่ด้วยวิธี allele-specific PCR

นำ allele-specific primer คือ UU DB DC และ DF โดยไพรเมอร์ UU เป็น forward universal primer และ DB DC และ DF เป็น reverse specific primer สำหรับยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus ชนิด *An. cracens* *An. scanloni* และ *An. nemophilous* โดยขนาดชิ้นส่วน allele-specific PCR มีขนาด 236 388 และ 527 คู่เบส ตามลำดับ ที่พัฒนาขึ้นจากชิ้นส่วนของยีน *COI* โดยการนำดีเอ็นเอจากยุงก้นปล่องทั้ง 3 ชนิด มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR จากนั้นตรวจสอบผลการแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นอะกาโรส 1.5 % แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ภาคผนวก ค) หลังการปรับสภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธี Gradient PCR เช่น ปรับอุณหภูมิช่วง annealing ให้มีค่าแตกต่างจากอุณหภูมิโดยเริ่มจากอุณหภูมิที่ 42 องศาเซลเซียส ถึงอุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับคู่ไพรเมอร์ จากนั้นเลือกตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ที่ละคู่ ได้แก่ UU/DB UU/DC และ UU/DF เพื่อเลือกสภาวะที่เหมาะสมกับคู่ไพรเมอร์ พบว่าอุณหภูมิช่วง annealing ที่ 48 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดสำหรับไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่

การปรับสภาวะสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR ให้มีปริมาตรรวม 20 µl ประกอบด้วย genomic DNA 20-30 ng, 1X PCR reaction buffer 0.5 mM dNTPs 1.25 mM MgCl₂

0.3 μ M ของแต่ละไพรเมอร์ *Taq* DNA polymerase (Vivantis, USA) 1 unit ส่วนประกอบและขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR ดัดแปลงมาจาก Dousfour *et al.* (2007) โดยขั้นตอนปฏิกิริยา PCR ดังนี้

initial denaturation	94 °C	5 min	} 35 cycles
denaturation	94 °C	30 sec	
annealing	48 °C	30 sec	
extension	72 °C	30 sec	
final extension	72 °C	10 min	

จากนั้นนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จากปฏิกิริยา PCR มาตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นอะกาโรส 1.5 % (Vivantis, USA) ใน 0.5X TAE buffer (Vivantis, USA) ความต่างศักย์ไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตรวจสอบผลภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต

9. การทดสอบจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน *Dirus* ด้วยวิธี allele-specific PCR

ทดสอบประสิทธิภาพของ allele-specific primer คือ UU DB DC และ DF โดยไพรเมอร์ UU เป็น forward universal primer และไพรเมอร์ DB DC และ DF เป็น reverse specific primer สำหรับยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน *Dirus* ชนิด *An. cracens* *An. scanloni* และ *An. nemophilous* โดยชิ้นส่วน allele-specific PCR มีขนาด 236 238 และ 527 คู่เบส ตามลำดับ โดยใช้คู่ไพรเมอร์ คือ COIF และ COIR โดยไพรเมอร์ COIF เป็น forward universal primer และ COIR เป็น reverse universal primer เป็น positive control หลังจากได้สภาวะที่เหมาะสมในปฏิกิริยา PCR โดยใช้อุณหภูมิที่ดีที่สุดในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR ของยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน *Dirus* ทั้ง 3 ชนิด คือ อุณหภูมิช่วง annealing ที่ 48 องศาเซลเซียสรวมทั้งการปรับความเข้มข้นสุดท้ายของส่วนประกอบในปฏิกิริยา PCR จากนั้นทำการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์และยืนยันผลการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน *Dirus* 5 ชนิด จากการเลือกตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ที่ละคู่ที่จำเพาะกับชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน *Dirus* ชนิดละ 3 ตัวอย่าง

สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR ให้มีปริมาตร 20 μ l ประกอบด้วย genomic DNA 20-30 ng 1X PCR reaction buffer 0.5 mM dNTPs 1.25 mM $MgCl_2$ 0.3 μ M ของแต่ละไพรเมอร์ *Taq* DNA polymerase (Vivantis, USA) 1 unit ส่วนประกอบและขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR คัดแปลงมาจาก Dousfour *et al.* (2007) โดยขั้นตอนปฏิกิริยา PCR ดังนี้

initial denaturation	94 °C	5 min	
denaturation	94 °C	30 sec	} 35 cycles
annealing	48 °C	30 sec	
extension	72 °C	30 sec	
final extension	72 °C	10 min	

จากนั้นนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จากปฏิกิริยา PCR มาตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นอะกาโรส 1.5 % (Vivantis, USA) ใน 0.5X TAE buffer (Vivantis, USA) ความต่างศักย์ไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตรวจสอบผลภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต

10. การทดสอบผลการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน Dirus โดยวิธี Multiplex PCR

ทดสอบผลการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน Dirus ด้วยวิธี Multiplex PCR โดยใช้ allele specific primer คือ UU DB DC และ DF โดยไพรเมอร์ UU เป็น forward universal primer และไพรเมอร์ DB DC และ DF เป็น reverse specific primer สำหรับยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus ชนิด *An. cracens* *An. scanloni* และ *An. nemophilous* โดยชิ้นส่วน allele-specific PCR มีขนาด 236 238 และ 527 คู่เบส ตามลำดับโดยส่วนประกอบและขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR ดังนี้

สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา MultiplexPCR ให้มีปริมาตร 20 μ l ประกอบด้วย genomic DNA 20-30 ng 1X PCR reaction buffer 0.5 mM dNTPs 1.25 mM $MgCl_2$ 0.3 μ M ของแต่ละไพรเมอร์ *Taq* DNA polymerase (Vivantis, USA) 1 unit ซึ่งส่วนประกอบและขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR คัดแปลงมาจาก Dousfour *et al.* (2007) โดยขั้นตอนปฏิกิริยา PCR ดังนี้

pre-denature	94 °C	5 min	
denaturation	94 °C	30 sec	} 35 cycles
annealing	48 °C	30 sec	
extension	72 °C	30 sec	
final extension	72 °C	10 min	

จากนั้นนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จากปฏิกิริยา PCR มาตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วน ดีเอ็นเอ ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นอะกาโรส 1.5 % (Vivantis, USA) ใน 0.5X TAE buffer (Vivantis, USA) ความต่างศักย์ไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น ตรวจสอบผลภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต

11. การทดสอบประสิทธิภาพผลจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ็อน Dirus โดยวิธี allele-specific PCR

ทดสอบประสิทธิภาพการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องชนิดซับซ็อนกลุ่ม Dirus ด้วยวิธี Multiplex PCR โดยใช้ allele-specific primer ที่ออกแบบขึ้นมาทดสอบจำแนกชนิดยุงก้นปล่อง ชนิดซับซ็อนกลุ่ม Dirus ชนิด *An. cracens* *An. scanloni* และ *An. nemophilous* จากแหล่งพื้นที่ กระจายตัว 5 แหล่งคือ พื้นที่ภาคเหนือ (จังหวัดเชียงใหม่) พื้นที่ภาคตะวันตก (จังหวัดกาญจนบุรี) พื้นที่ภาคใต้ฝั่งตะวันตก (จังหวัดสตูลและจังหวัดระนอง) พื้นที่ภาคใต้ฝั่งตะวันออก (จังหวัด สงขลา) เพื่อตรวจสอบและยืนยันความเสถียรและประสิทธิภาพของ allele-specific primer ในการศึกษา

ผลและวิจารณ์

1. การเก็บตัวอย่างยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus และการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องตามลักษณะสัณฐานวิทยา

จากการเก็บตัวอย่างยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus เพศเมีย จากพื้นที่การกระจายตัว 5 แหล่ง ระหว่างเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2554 ถึง มกราคม พ.ศ. 2556 โดยเก็บตัวอย่างยุงได้ทั้งหมด 105 ตัว ซึ่งพบจำนวนมากที่สุดจาก อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล จำนวน 80 ตัว รองลงมา คือ อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี จำนวน 4 ตัวอย่าง และอำเภอละอุ่น จังหวัดระนอง จำนวน 1 ตัว โดยยุงก้นปล่องจากจังหวัดเชียงใหม่ ได้รับการอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จำนวน 20 ตัว ส่วนบริเวณอำเภอเมือง จังหวัดสงขลา ไม่พบตัวอย่างดังกล่าว จากการศึกษาพื้นที่กระจายตัวของยุงก้นปล่อง พบว่าบริเวณที่พบตัวอย่างยุงก้นปล่องส่วนใหญ่จะเป็นบริเวณสวนยางพาราหรือป่าดิบชื้น โดยพื้นที่ทำการเก็บตัวอย่างในภาคใต้บางพื้นที่จะเป็นป่าดิบชื้นติดกับเขาหินปูน มีหมู่บ้านใกล้เคียงจำนวนน้อย ในบางพื้นที่ไม่พบตัวอย่าง อาจเนื่องมาจากช่วงเวลาทำการเก็บตัวอย่างยังไม่ใช่ระยะที่มีการแพร่ระบาด หรือมีการวางแผนควบคุมการแพร่ระบาดของโรคมาลาเรีย

การจำแนกชนิดยุงก้นปล่องตามลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้น (Rattanaarithikul *et al.*, 2006) จากพื้นที่ศึกษาบริเวณภาคใต้ฝั่งตะวันออก และภาคใต้ฝั่งตะวันตก พบว่า ยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus ส่วนใหญ่ คือ ยุงก้นปล่อง *An. scanloni* พบที่อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล มีจำนวน 41 ตัวนอกจากนี้ผลการจำแนกจากลักษณะสัณฐานวิทยา พบยุงก้นปล่อง *An. baimaii* จำนวน 39 ตัวอย่าง ในการศึกษาครั้งนี้ผลที่ได้สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่ระบุว่ายุงก้นปล่อง *An. scanloni* ส่วนใหญ่พบในสภาพแวดล้อมที่เป็นเขาหินปูนแถบภาคใต้ ดังภาพที่ 23



ภาพที่ 23 แสดงสภาพภูมิประเทศของจุดเก็บตัวอย่างอำเภอมะนัง จังหวัดสตูล

ส่วนยุงก้นปล่อง *An. baimaii* พบบริเวณป่าติดกับชายแดนประเทศพม่า และป่าเหมืองแร่ฝั่งตะวันตกของภาคใต้ นอกจากนี้พบยุงก้นปล่อง *An. dirus* บริเวณอำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่ระบุว่ายุงก้นปล่อง *An. dirus* พบได้ทั่วไปในหลายพื้นที่ เช่น ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคตะวันตกซึ่งสภาพภูมิประเทศบริเวณจุดเก็บตัวอย่างเป็นป่าดิบชื้น มีการปลูกยางพาราทดแทน แต่ยังคงสภาพป่าดิบชื้นไว้ ดังภาพที่ 24



ภาพที่ 24 แสดงสภาพภูมิประเทศของจุดเก็บตัวอย่างอำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี

จากพื้นที่ศึกษาไม่พบยุงก้นปล่อง *An. cracens* บริเวณอำเภอนาหว้า จังหวัดสงขลา ซึ่งอาจมีผลมาจากช่วงที่ทำการเก็บตัวอย่างไม่ใช่ระยะการแพร่กระจายพันธุ์ ผลที่ได้ไม่สอดคล้องกับรายงาน

ก่อนหน้านี้ที่ระบุว่าพบยุงก้นปล่อง *An. cracens* ส่วนใหญ่ในพื้นที่ทางภาคใต้และบริเวณติดกับชายแดนประเทศมาเลเซีย ซึ่งการวิจัยครั้งนี้ครอบคลุมพื้นที่ดังกล่าวแต่ไม่พบตัวอย่งยุงก้นปล่อง ซึ่งบริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่างเป็นส่วนยางพารามีหมู่บ้านใกล้เคียงจำนวนน้อย อยู่ในสภาพภูมิประเทศที่เป็นป่าดิบชื้น ดังแสดงในภาพที่ 25



ภาพที่ 25 แสดงสภาพภูมิประเทศของจุดเก็บตัวอย่างอำเภอนาทวี จังหวัดสงขลา

ซึ่งยุงก้นปล่อง *An. cracens* ได้รับการอนุเคราะห์ตัวอย่างจากห้องปฏิบัติการภาควิชาปรสิตวิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในขณะที่พบยุงก้นปล่อง *An. nemophilous* ที่อำเภอละอุ่น จังหวัดระนอง จำนวน 1 ตัว ซึ่งบริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่างมีลักษณะเป็นเนินเขา ซึ่งมีลักษณะเป็นป่าดิบชื้น และมีการเพาะปลูกยางพารา แต่ยังคงสภาพป่าดิบชื้นไว้ ดังภาพที่ 26



ภาพที่ 26 แสดงลักษณะภูมิประเทศของจุดเก็บตัวอย่างอำเภอละอุ่น จังหวัดระนอง

จากผลที่ได้ไม่สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่ระบุว่ายุงก้นปล่อง *An. nemophilous* พบส่วนใหญ่ในพื้นที่ทางภาคใต้และบริเวณติดกับชายแดนประเทศมาเลเซีย (Poopittayasataporn and Baimai, 1995; Baimai *et al.*, 1988b; Manguin *et al.*, 2008) ซึ่งผลการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus จากพื้นที่การกระจายตัวทั้ง 5 แหล่ง จาก 3 ภูมิภาคของประเทศไทย ได้แก่ พื้นที่ภาคเหนือ (อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่) พื้นที่ภาคตะวันตก (อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี) พื้นที่ภาคใต้ฝั่งตะวันตก (อำเภอละอุ่น จังหวัดระนอง และอำเภอมะนัง จังหวัดสตูล) และพื้นที่ภาคใต้ฝั่งตะวันออก (อำเภอนาทวี จังหวัดสงขลา) ในช่วงเดือนสิงหาคม 2554 ถึง มกราคม 2556 โดยจำแนกตัวอย่างยุงก้นปล่องตามลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของ Rattanarithikul *et al.* (2006) จำนวนทั้งหมด 105 ตัวอย่าง ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน Dirus จากพื้นที่ศึกษา โดยลักษณะสัณฐานวิทยา

แหล่งที่	วันที่เก็บตัวอย่าง	สถานที่	ชนิด					รวม
			<i>An. dirus</i>	<i>An. cracens</i>	<i>An. scanloni</i>	<i>An. baimaii</i>	<i>An. nemophilous</i>	
1	22 พ.ย. 2555	อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่	-	20	-	-	-	20
2	30 ก.ย. 2556	อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี	4	-	-	-	-	4
3	7-11 ม.ค. 2556	อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	-	-	41	39	-	80
4	23 ส.ค. 2555	อำเภอละอุ่น จังหวัดระนอง	-	-	-	1	-	1
5	5-9 ส.ค. 2554	อำเภอนาทวี จังหวัดสงขลา	-	-	-	-	-	-
รวม			4	20	41	40	-	105

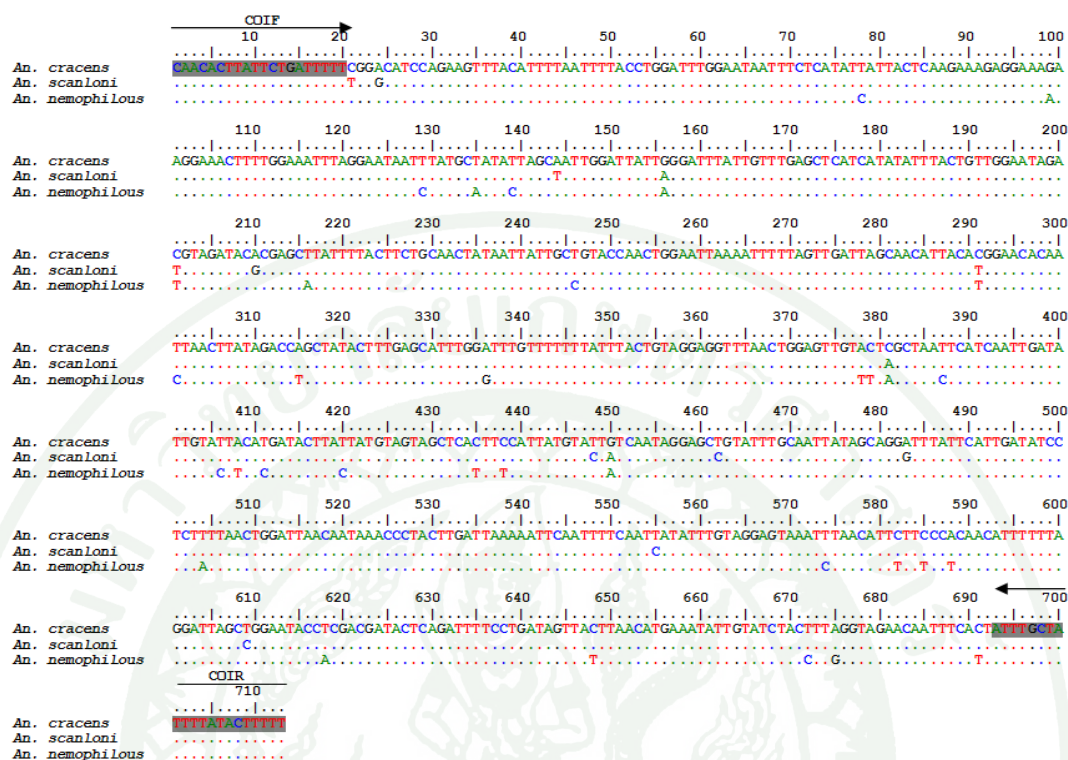
2. การสกัดดีเอ็นเอยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus

ตัวอย่างยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus จากพื้นที่กระจายตัว ได้แก่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี อำเภอละอุ่น จังหวัดระนอง และอำเภอมะนัง จังหวัดสตูล โดยทำการเก็บตัวอย่างยุงตัวเต็มวัยในไนโตรเจนเหลวและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ

-80 องศาเซลเซียส จากนั้นสกัดดีเอ็นเอตัวอย่างยุงก้นปล่องเพศเมียทั้ง 3 ชนิด โดยชุดสกัด Genomic DNA Minikit (Geneaid, Taiwan) เพื่อสกัด total genomic DNA และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตโดยใช้ spectrophotometer พบว่าสัดส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตรต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร (A_{260}/A_{280}) ได้ค่าเฉลี่ยประมาณ 1.6-1.9 บ่งบอกถึงความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอมีปริมาณดีเอ็นเอประมาณ 15-40 ng จากยุงก้นปล่องแต่ละตัวอย่างจากการทดลองพบว่าสามารถสกัดดีเอ็นเอได้ตามต้องการ คือ 20-30 ng โดยตรวจสอบผลจากการนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณยีน *COI* ซึ่งเป็นบริเวณเป้าหมายและตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นอะกาโรส 1.5% พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณยีน *COI* ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอได้แสดงว่าสามารถสกัดดีเอ็นเอได้เป็นผลสำเร็จ หลังการสกัดดีเอ็นเอของยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus จากแหล่งพื้นที่กระจายตัวจำนวนทั้งหมด 105 ตัวอย่าง

3. การออกแบบไพรเมอร์เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอชิ้นส่วนยีน *COI*

ออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์และลำดับนิวคลีโอไทด์จากชิ้นส่วนยีน *COI* ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอของยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus 3 ชนิด ได้แก่ *An. cracens* *An. scanloni* และ *An. nemophilous* ได้คู่ไพรเมอร์คือ COIF 5'CAACACTTATTC TGATTTT3' และ COIR 5'AAAAAGTATAAAATAGCAAAT3' ซึ่ง COIF เป็น forward universal primer และ COIR เป็น reverse universal primer ซึ่งให้ผลผลิตขนาด 713 คู่เบส ข้อมูลไพรเมอร์ดังกล่าวแสดงดังภาพที่ 27 และตารางที่ 3



ภาพที่ 27 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน *COI* ของยุงก้นปล่อง *An. cracens* *An. scanloni* และ *An. nemophilous* และตำแหน่งของ forward primer (COIF) และ reverse primer (COIR)

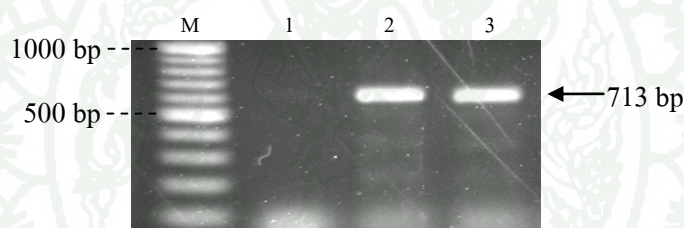
ตารางที่ 3 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอชิ้นส่วนยีน *COI*

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์(5'-3')	อุณหภูมิ Tm (°C)
COI F	CAACACTTATTCTGATTTTT	44.7
COIR	AAAAAGTATAAAATAGCAAAT	44.7

4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอชิ้นส่วนยีน *COI*

นำ total genomic DNA ของยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus ใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณบริเวณชิ้นส่วนยีน *COI* ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้

คู่ไพรเมอร์ (COIF 5'CAACACTTATTCTGATTTTT3' และ COIR 5'AAAAAGTATAAAATAGC AAAT3') ซึ่งผลจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ PCR product ขนาดประมาณ 713 คู่เบส เมื่อเทียบขนาดกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานพบว่า PCR product ที่ได้มีความจำเพาะเจาะจงและไม่เกิดชิ้นดีเอ็นเอที่เป็น nonspecific product เพราะฉะนั้นสรุปได้ว่า PCR product ที่ได้เป็นบริเวณเป้าหมายที่ต้องการจริง นอกจากนี้ผลจากการใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ Genomic DNA Minikit (Geneaid, Taiwan) ซึ่งบัฟเฟอร์ที่ใช้มีความเหมาะสมต่อตัวอย่างทำให้สารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์และจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตโดยใช้ spectrophotometer พบว่าสัดส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตรต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร (A260/A280) ได้ค่าเฉลี่ยประมาณ 1.6-1.9 บ่งบอกถึงความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอทำให้ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์และคุณภาพดีจึงสามารถเพิ่มปริมาณ PCR product ได้ดีซึ่ง PCR product ที่เพิ่มปริมาณได้จะถูกนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไปดังภาพที่ 28



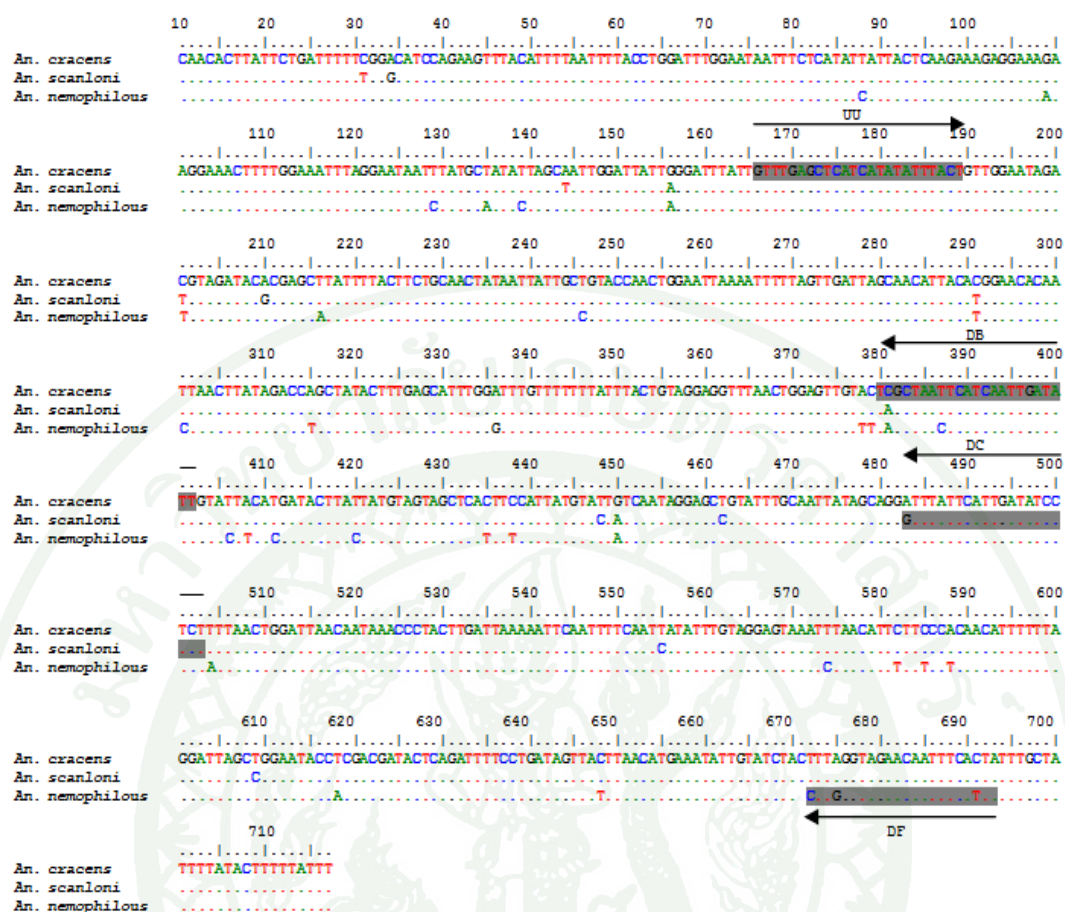
ภาพที่ 28 ผลการเพิ่มปริมาณขนาดดีเอ็นเอเป้าหมายบริเวณยีน *COI* ของยุงก้นปล่องกลุ่มชนิด ชับซ้อน Dirus ด้วยคู่ไพรเมอร์ COIF/COIR ช่อง M คือ GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder ช่อง 1 คือ negative control ช่อง 2-3 คือ *An. cracens* พบว่าสามารถเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 713 คู่เบส ได้เมื่อเทียบขนาดกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA Marker)

5. การออกแบบ allele-specific primer จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน *COI*

การออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน *COI* ของไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอ ความยาว 713 คู่เบส ของยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดทับซ้อน Dirus จำนวน 3 ชนิด คือ *An. cracens* *An. scanloni* และ *An. nemophilous* โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากการส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนจากฐานข้อมูล Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) รวมทั้ง 119 ตัวอย่าง โดยยุงก้นปล่อง *An. cracens* ออกแบบไพรเมอร์จากการส่งหาลำดับ

นิวคลีโอไทด์ของยุงก้นปล่อง *An. cracens* รหัส 0902-4 จากภาควิชาปรสิตวิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่บริษัท MacroGen ประเทศเกาหลี (<http://www.macrogen.com>) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการส่งหาลำดับเบสรวมทั้งหมด 3 ตัวอย่าง ส่วนยุง *An. scanloni* ออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากฐานข้อมูล Genbank (AM180861.1) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์รวมทั้งหมด 113 ตัวอย่าง และยุง *An. nemophilous* ออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากฐานข้อมูล Genbank (DQ897960.1) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากฐานข้อมูล Genbank รวมทั้งหมด 3 ตัวอย่าง โดยทำการเชื่อมต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์กับลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนที่ได้จากฐานข้อมูล Genbank เพื่อสร้างเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์จากชิ้นส่วนยีน COI ที่สมบูรณ์

ผลการออกแบบ allele-specific primer คือ UU DB DC และ DF สำหรับยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus จำนวน 3 ชนิด โดยไพรเมอร์ UU เป็น forward universal primer และ DB DC DF เป็น reverse specific primer สำหรับยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus ชนิด *An. cracens* *An. scanloni* และ *An. nemophilous* โดยชิ้นส่วน allele-specific PCR มีขนาด 236 388 และ 527 คู่เบสตามลำดับตำแหน่งและข้อมูลไพรเมอร์ดังกล่าว ดังแสดงในภาพที่ 29 และตารางที่ 4



ภาพที่ 29 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน COI ของยุงก้นปล่อง *An. cracens* *An. scanloni* และ *An. nemophilous* และตำแหน่งของ forward primer (UU) และ reverse primer (DB DC DF)

ตารางที่ 4 ไพรมเมอร์ที่ใช้ในการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน Dirus จำนวน 3 ชนิด

ไพรมเมอร์	ชนิดยุงก้นปล่อง	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	อุณหภูมิ Tm(°C)	ขนาด (คู่เบส)
UU	-	GTTTGAGCTCATCATATATTTACT	50.7	-
DB	<i>An. cracens</i>	AATATCAATTGATGAATTAGAGA	48.9	236
DC	<i>An. scanloni</i>	AGAGGATATCAATGAATAAGC	50.7	338
DF	<i>An. nemophilous</i>	TAATGAAATTGTTCTACCCAAG	52.2	527

การเลือกตำแหน่งออกแบบ allele-specific primer จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน *COI* โดยเลือกบริเวณอนุรักษ์สำหรับยุงทั้ง 3 ชนิด ออกแบบ forward specific primer: UU (ตำแหน่งที่ 166-189) และออกแบบ reverse specific primer สำหรับยุง *An. cracens*: DB (ตำแหน่งที่ 380-402) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยุงก้นปล่อง *An. cracens* มี polymorphic site 5 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่ง 156 201 291 381 และ 450 ทำการออกแบบไพรเมอร์โดยให้ทางด้านปลาย 3' เป็นนิวคลีโอไทด์ A และตำแหน่งถัดจากปลายดังกล่าวเป็นตำแหน่ง polymorphic site ที่มีความจำเพาะเป็นนิวคลีโอไทด์ G และกำหนดให้ตำแหน่งที่สองถัดจากตำแหน่ง polymorphic site เป็นตำแหน่ง intentional mismatch จากนิวคลีโอไทด์ C เป็นนิวคลีโอไทด์ A จากนั้นออกแบบ reverse specific primer สำหรับจำแนกชนิดยุงก้นปล่อง *An. scanloni*: DC (ตำแหน่งที่ 483-503) ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์มีตำแหน่ง polymorphic site 8 ตำแหน่ง คือตำแหน่ง 21 24 144 210 448 484 555 และ 609 จากนั้นออกแบบไพรเมอร์โดยให้ตำแหน่ง polymorphic site ที่มีความจำเพาะในแต่ละชนิดอยู่ทางด้านปลาย 3' เป็นนิวคลีโอไทด์ C ตำแหน่งที่สองถัดจากปลายดังกล่าวเป็นตำแหน่ง intentional mismatch จากนิวคลีโอไทด์ G เป็น นิวคลีโอไทด์ A และออกแบบ reverse specific primer สำหรับจำแนกชนิดยุงก้นปล่อง *An. nemophilous*: DF (ตำแหน่งที่ 672-693) สำหรับยุงก้นปล่อง *An. nemophilous* ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์มีตำแหน่ง polymorphic site 26 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่ง 78 99 129 135 139 301 315 336 378 381 387 406 408 411 420 435 438 505 574 582 585 588 618 648 672 และ 675 ออกแบบไพรเมอร์โดยให้ตำแหน่ง polymorphic site ที่มีความจำเพาะในแต่ละชนิดอยู่ทางด้านปลาย 3' เป็นนิวคลีโอไทด์ G โดยไม่ได้กำหนดตำแหน่งที่สองถัดจากปลายดังกล่าวเป็นตำแหน่ง intentional mismatch เนื่องจากตำแหน่งที่สี่ถัดจากปลาย 3' มีตำแหน่ง polymorphic site ซึ่งน่าจะมีความจำเพาะต่อการจำแนกชนิดยุงก้นปล่อง *An. nemophilous* วิธีการออกแบบไพรเมอร์มีความสำคัญต่อปฏิกิริยาบางครั้งไพรเมอร์ที่ออกแบบจับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้ไม่ดี หรือมีนิวคลีโอไทด์คู่สมภายในไพรเมอร์เดียวกัน ควรออกแบบไพรเมอร์ใหม่โดยเพิ่มหรือลดความยาวลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือเปลี่ยนตำแหน่งออกแบบไพรเมอร์ เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้าน 3' ของไพรเมอร์จะส่งผลต่อปฏิกิริยาอย่างมาก (สุรินทร์, 2552) นอกจากนี้ควรมี melting temperature และเปอร์เซ็นต์ GC content ใกล้เคียงกันและควรมีเบส G หรือ C ที่ปลาย 3' OH ทั้งส่วนของ forward และ reverse ไพรเมอร์ (ปาริชาติ, 2547) และต้องมีการตรวจสอบคุณภาพและขนาดของไพรเมอร์รวมทั้งอุณหภูมิช่วง annealing เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ต้องสามารถเพิ่มจำนวนได้ด้วยเทคนิค PCR ผลการออกแบบไพรเมอร์สำหรับจำแนกชนิดยุงก้นปล่อง *An. cracens*: DB และ *An. scanloni*: DC กำหนดให้ตำแหน่งที่สองถัดจากทางด้านปลาย 3' เป็นตำแหน่ง mismatch จากนิวคลีโอไทด์ C หรือ G เป็น นิวคลีโอไทด์ A เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Wilkin *et al.* (2006) ซึ่งใช้วิธี intentional mismatch primer จากการออกแบบไพรเมอร์โดยการเลือกตำแหน่ง

polymorphic site ที่มีความจำเพาะกับยุงแต่ละชนิดอยู่ทางด้านปลาย 3' ในส่วนของ reverse primer และออกแบบกำหนดให้ตำแหน่งที่สามถัดจากปลายดังกล่าวเป็นอีกตำแหน่งที่มีลักษณะการจับคู่ นิวคลีโอไทด์ที่ไม่จำเพาะ (intentional mismatch) เพื่อให้ไพรเมอร์มีความจำเพาะกับสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ มากขึ้น ส่วนของ forward primer อาจเลือกบริเวณที่อนุรักษ์สำหรับยุงทุกชนิดในกลุ่มที่ศึกษา โดยการตรวจสอบ SNP เพื่อจำแนกชนิดยุงกลุ่มซับซ้อน *Anopheles gambiae* complex ทางภาคตะวันออกเฉียงใต้ของแอฟริกาได้เป็นผลสำเร็จและเป็นวิธีที่เหมาะสมในการใช้ในการจำแนกชนิดยุงกันปล่อง และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sun *et al.* (2011) ที่ออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มความจำเพาะในการจำแนกโสมสายพันธุ์ Yoonpoog ได้เป็นผลสำเร็จ โดยใช้ SNP marker ในปฏิกิริยา Real-time PCR โดยการออกแบบไพรเมอร์ให้ polymorphic site ที่มีความจำเพาะกับโสมแต่ละชนิดอยู่ทางด้านปลาย 3' และออกแบบกำหนดให้ตำแหน่งที่สองถัดจากทางด้านปลาย 3' เป็นตำแหน่ง mismatch จากนิวคลีโอไทด์ C หรือ G เป็นนิวคลีโอไทด์ A โดยขึ้นแรกออกแบบเปรียบเทียบผลการจำแนกระหว่างกำหนดให้ตำแหน่ง mismatch เป็นตำแหน่งที่สองกับกำหนดให้ตำแหน่ง mismatch ตำแหน่งที่สามถัดจากทางด้านปลาย 3' ในส่วนของ reverse primer ส่วนของ forward primer อาจเลือกบริเวณที่อนุรักษ์สำหรับโสมทุกชนิดในกลุ่มที่ศึกษาพบว่าการออกแบบไพรเมอร์ให้ polymorphic site ที่มีความจำเพาะกับโสมแต่ละชนิดอยู่ทางด้านปลาย 3' และออกแบบกำหนดให้ตำแหน่งที่สองถัดจากทางด้านปลาย 3' เป็นตำแหน่ง mismatch จากนิวคลีโอไทด์ C หรือ G เป็น นิวคลีโอไทด์ A สามารถจำแนกโสมสายพันธุ์ Yoonpoog ได้เป็นผลสำเร็จ

สำหรับยุงกันปล่อง *An. cracens* ได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ DB โดยให้ตำแหน่ง polymorphic site ที่มีความจำเพาะเป็นนิวคลีโอไทด์ G และทางด้านปลาย 3' เป็นนิวคลีโอไทด์ A กำหนดให้ตำแหน่งที่สองถัดจากปลายดังกล่าวเป็นตำแหน่ง intentional mismatch จากนิวคลีโอไทด์ C เป็น นิวคลีโอไทด์ A เพื่อเพิ่มความจำเพาะของไพรเมอร์สำหรับการจำแนกชนิดมากขึ้น ซึ่งจะให้แถบดีเอ็นเอขนาด 236 คู่เบส และยุงกันปล่อง *An. scanloni* ออกแบบไพรเมอร์ DC โดยกำหนดให้ตำแหน่งที่สองถัดจากทางด้านปลาย 3' เป็นตำแหน่ง mismatch จากนิวคลีโอไทด์ C หรือ G เป็น นิวคลีโอไทด์ A ซึ่งจะให้แถบดีเอ็นเอขนาด 338 คู่เบส จากการออกแบบไพรเมอร์ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Sun *et al.* (2011) ส่วนยุงกันปล่อง *An. nemophilous* ออกแบบไพรเมอร์ DF โดยให้ตำแหน่ง polymorphic site ที่มีความจำเพาะกับชนิดยุงกันปล่องทางด้านปลาย 3' เป็นนิวคลีโอไทด์ G โดยไม่ได้กำหนดตำแหน่งที่สองถัดจากปลายดังกล่าวเป็นตำแหน่ง intentional mismatch เนื่องจากตำแหน่งที่สี่ถัดจากปลาย 3' จากมีตำแหน่ง polymorphic site ซึ่งน่าจะมีความจำเพาะต่อการจำแนกชนิดยุงกันปล่อง *An. nemophilous* ซึ่งจะให้แถบดีเอ็นเอขนาด 527 คู่เบส ผลการออกแบบ allele-specific primer คือ UU DB DC และ DF โดยไพรเมอร์ UU เป็น forward universal

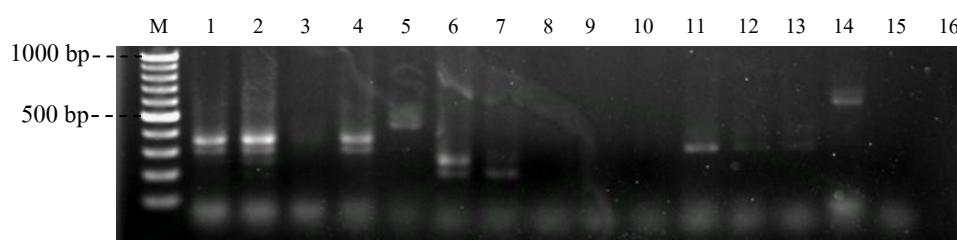
primer และไพรเมอร์ DB DC DF เป็น reverse specific primer สำหรับจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus จำนวน 3 ชนิด คือ *An. cracens* *An. scanloni* และ *An. nemophilous* พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยุงก้นปล่องทั้ง 3 ชนิด

ผลการตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค Multiplex PCR โดยใช้ allele-specific primer คือ UU เป็น forward universal primer และ DB DC DF เป็น reverse specific primer สำหรับจำแนกยุงก้นปล่องชนิด *An. cracens* *An. scanloni* และ *An. nemophilous* และสามารถจำแนกความแตกต่างของยุงก้นปล่องโดยให้ขนาดชิ้นส่วน allele-specific PCR ขนาด 236 338 และ 527 คู่เบส ตามลำดับ ในการทดลองนี้จึงเลือกออกแบบ allele-specific primer จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนของยีน *COI* จากตำแหน่ง polymorphic site ที่มีความจำเพาะกับยุงก้นปล่องแต่ละชนิด ซึ่งเป็นยีนที่มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะกับชนิดของยุงก้นปล่องสูง แม้ว่าดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียมีการเรียงตัวของยีนแบบอนุรักษ์ แต่มีอัตราการกลายพันธุ์โดยรวมสูงกว่าการกลายพันธุ์ของยีนในนิวเคลียสถึง 10 เท่า ซึ่งมีอัตราการกลายพันธุ์สูงมากในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ทำให้พบความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือ polymorphic site สามารถตรวจสอบความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตได้ดีทั้งภายในประชากรและระหว่างประชากร (สุรินทร์, 2552) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Dousfour *et al.* (2007) โดยพัฒนาเทคนิค Multiplex PCR จำนวน 2 เครื่องหมาย จากส่วนของยีน *COI* และ *Cytb* ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ ในการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน *Anopheles sundaicus* complex ทดสอบยุง 374 ตัวอย่างจาก 24 ประชากรในสภาพภูมิศาสตร์ที่แตกต่างกัน ซึ่งสามารถจำแนกชนิดได้อย่างชัดเจน

6. การทดสอบสถานะที่เหมาะสมของ allele-specific primer ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน *COI* ด้วยวิธี allele-specific PCR

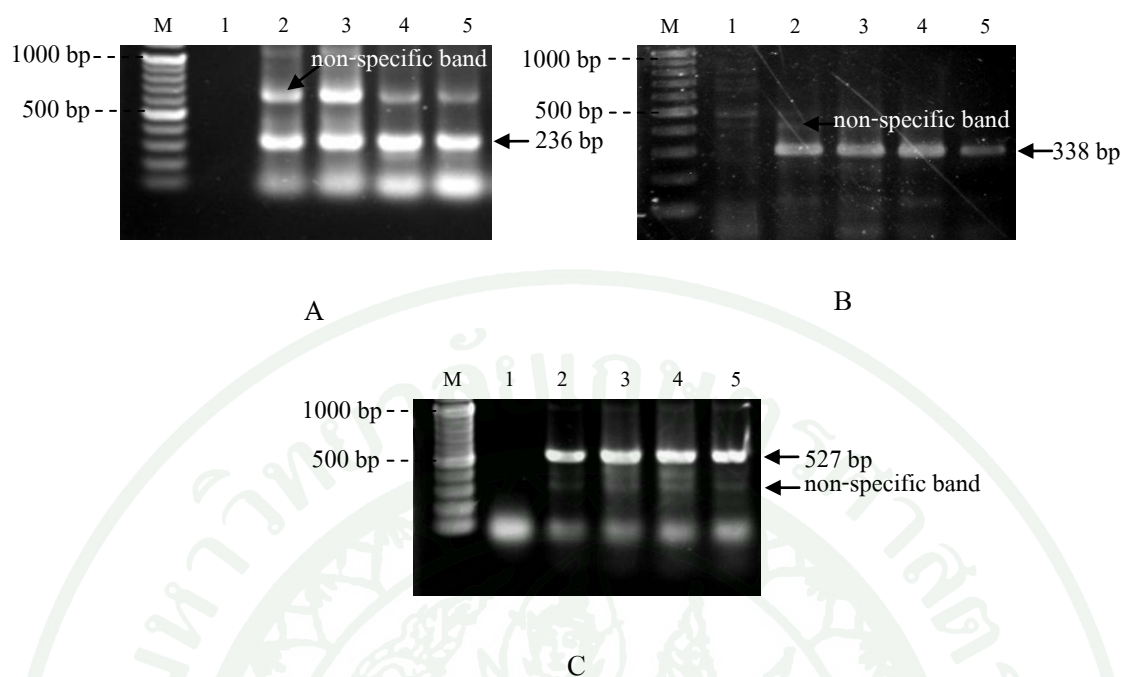
การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนของยีน *COI* ด้วยวิธี allele-specific PCR เพื่อจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus 3 ชนิด คือ ยุง *An. cracens* *An. scanloni* และ *An. nemophilous* จากการทดสอบเพื่อเลือกสถานะที่เหมาะสมของ allele-specific primer คือ UU DB DC และ DF โดยไพรเมอร์ UU เป็น forward universal primer และไพรเมอร์ DB DC และ DF เป็น reverse specific primer สำหรับยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus ชนิด *An. cracens* *An. scanloni* และ *An. nemophilous* โดยให้ขนาดชิ้นส่วน allele-specific PCR มีขนาด 236 238 และ 527 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อใช้ปฏิกิริยาที่รวมไพรเมอร์หลายสายพร้อมกัน (Multiplex PCR) พบว่าเกิด

แถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะ (non-specific band) เป็นจำนวนมาก และบางตัวอย่างไม่เกิดแถบดีเอ็นเอรวมทั้งเกิดเบสคู่สมภายในไพรเมอร์เดียวกัน (primer-dimer) ดังภาพที่ 30



ภาพที่ 30 ผล Multiplex PCR ในการจำแนกยุงก้นปล่องชนิดซับซ้อนกลุ่ม Dirus: ช่อง M คือ GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas LIFE SCIENCES, USA) ช่อง 1- 5 คือ *An. cracens* ช่อง 5-10 คือ *An. scanloni* ช่อง 11-15 คือ *An. nemophilous* และ ช่อง 16 คือ negative control

จากนั้นจึงเลือกตรวจสอบผลการจำแนกโดยใช้ไพรเมอร์ที่ละคู่ที่จำเพาะกับชนิดยุงก้นปล่อง ได้แก่ คู่ไพรเมอร์ UU/DB ซึ่งจำเพาะต่อยุง *An. cracens* ซึ่งจะให้แถบดีเอ็นเอขนาด 236 คู่เบส และคู่ไพรเมอร์ UU/DC ซึ่งจำเพาะต่อยุง *An. scanloni* ซึ่งจะให้แถบดีเอ็นเอขนาด 338 คู่เบส ส่วนคู่ไพรเมอร์ UU/DF ซึ่งจำเพาะต่อยุง *An. nemophilous* ซึ่งจะให้แถบดีเอ็นเอขนาด 527 คู่เบส ซึ่งจากผลการทดลองในช่วงแรกพบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอแบบไม่จำเพาะ และเกิดการมีเบสคู่สมภายในไพรเมอร์เดียวกัน ดังภาพที่ 31



ภาพที่ 31 แสดงผลการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus ด้วยวิธี allele-specific PCR ซึ่งแสดงผลบน 1.5 % agarose gel

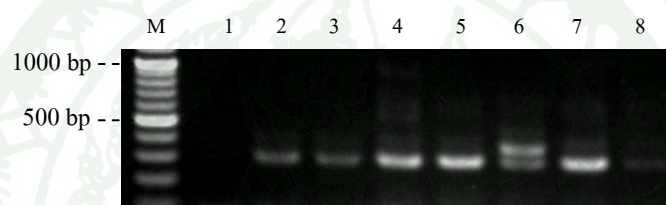
- (A) จากการใช้คู่ไพรเมอร์ UU/DB ในการจำแนกยุงก้นปล่องชนิดยุงก้นปล่อง *An. cracens* แสดงผลของแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะ และแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยุงก้นปล่องชนิด *An. cracens* ขนาด 236 คู่เบส (ช่องที่ 2-5)
- (B) ผลการจำแนกชนิดยุงก้นปล่อง *An. scanloni* ด้วยคู่ไพรเมอร์ UU/DC พบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยุงก้นปล่องชนิด *An. cracens* ขนาด 338 คู่เบส (ช่องที่ 2-5) และแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะเกิดขึ้น
- (C) แสดงผลของตัวอย่างที่เกิดแถบดีเอ็นเอแบบไม่จำเพาะจากคู่ไพรเมอร์ UU/DF ในการจำแนกยุงก้นปล่องชนิดยุงก้นปล่อง *An. nemophilous* และแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยุงก้นปล่องชนิด *An. nemophilous* ขนาด 527 คู่เบส (ช่องที่ 2-5)

เนื่องจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ในช่วงแรกเกิดแถบดีเอ็นเอแบบไม่จำเพาะ หรือสถานะที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ยังไม่เหมาะสม จึงจำเป็นต้องปรับสถานะที่เหมาะสมในปฏิกิริยา PCR โดยความเข้มข้นของส่วนประกอบและขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Dousfour *et al.* (2007) โดยความเข้มข้นสุดท้ายของสารในปฏิกิริยา ประกอบด้วย genomic DNA 20-30 ng 1X PCR reaction buffer 0.5 mM dNTPs 0.5-1.5 mM $MgCl_2$ 0.1-0.5 uM ของแต่ละ

ไพรเมอร์ *Taq* DNA polymerase (Vivantis, USA) 1 unit และทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในปฏิกิริยา PCR ด้วยวิธี Gradient PCR

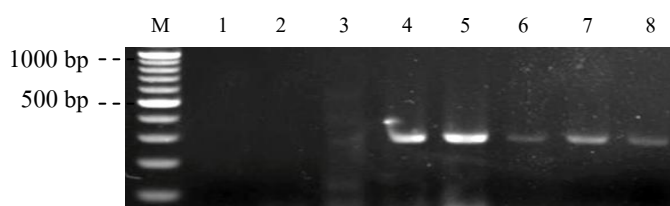
6.1 การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมด้วยวิธี Gradient PCR

เนื่องจาก allele-specific primer ที่ได้จากการออกแบบมีอุณหภูมิช่วง annealing แตกต่างกัน จึงต้องทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในปฏิกิริยา PCR โดยการกำหนดอุณหภูมิช่วง annealing โดยเริ่มจากอุณหภูมิช่วง annealing ที่ 42 องศาเซลเซียส ถึง 54 องศาเซลเซียส ดังภาพที่ 32-34



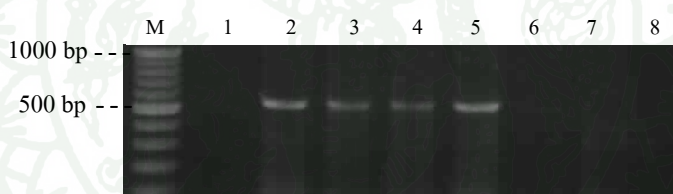
Lane 2 42.4 °C Lane 4 46 °C Lane 6 49.8 °C Lane 8 54.2 °C
Lane 3 44.2 °C Lane 5 48 °C Lane 7 52.4 °C

ภาพที่ 32 ผลการใช้วิธี Gradient PCR ในการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของยุงก้นปล่อง *An. cracens* จากคู่ไพรเมอร์ UU/DB ช่อง M คือ GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentus LIFE SCIENCES, USA) ช่อง 1 คือ negative control ช่อง 2-8 คือ *An. cracens* ซึ่งแสดงผลบน 1.5 % agarose gel



Lane 2 42.4 °C Lane 4 46 °C Lane 6 49.8 °C Lane 8 54.2 °C
 Lane 3 44.2 °C Lane 5 48 °C Lane 7 52.4 °C

ภาพที่ 33 ผลการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของยุงก้นปล่อง *An. scanloni* โดยวิธี Gradient PCR จากคู่ไพรเมอร์ UU/DC ช่อง M คือ GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas LIFE SCIENCES, USA) ช่อง 1 คือ negative control ช่อง 2-8 คือ *An. scanloni* ซึ่งแสดงผลบน 1.5 % agarose gel



Lane 2 42.4 °C Lane 4 46 °C Lane 6 49.8 °C Lane 8 54.2 °C
 Lane 3 44.2 °C Lane 5 48 °C Lane 7 52.4 °C

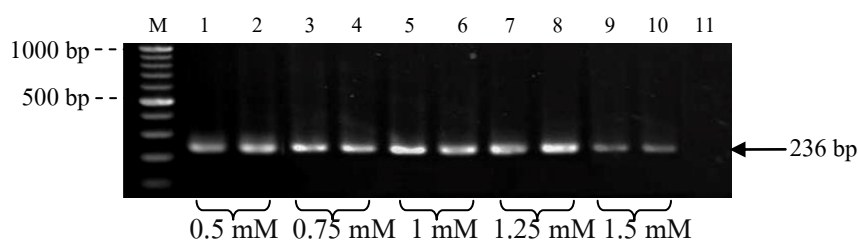
ภาพที่ 34 ผลการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของยุงก้นปล่อง *An. nemophilous* จากคู่ไพรเมอร์ UU/DF โดยวิธี Gradient PCR ซึ่งแสดงผลบน 1.5 % agarose gel ช่อง M คือ GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas LIFE SCIENCES, USA) ช่อง 1 คือ negative control ช่อง 2-8 คือ *An. nemophilous*

จากการทดลองปรับสภาวะที่เหมาะสมในปฏิกิริยา PCR พบว่า อุณหภูมิที่ดีที่สุดในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ของยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus ทั้ง 3 ชนิด คือ pre-denature ที่ 94 °C เป็นเวลา 5 นาที denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่ 48 °C เป็นเวลา 30 วินาที extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 30 วินาที โดยทำซ้ำทั้ง 3 ขั้นตอน 35 รอบ และสุดท้ายด้วย final extension 72 °C เป็นเวลา 10 นาที หลังจากการปรับสภาวะที่เหมาะสมและปรับวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Gradient PCR พบว่าอุณหภูมิช่วง annealing ที่ 48 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดสำหรับไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ นอกจากนี้มีการปรับความเข้มข้นอะกาโรส เป็น 1.5 % และการปรับแรงเคลื่อนไฟฟ้าในการแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis เป็น 50 โวลต์ พบว่าแถบดีเอ็นเอแบบไม่จำเพาะและแบนที่เกิดจากการมีเบสคู่สมภายในไพรเมอร์เดียวกันได้หายไป ทำให้เห็นความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอชัดเจนขึ้น

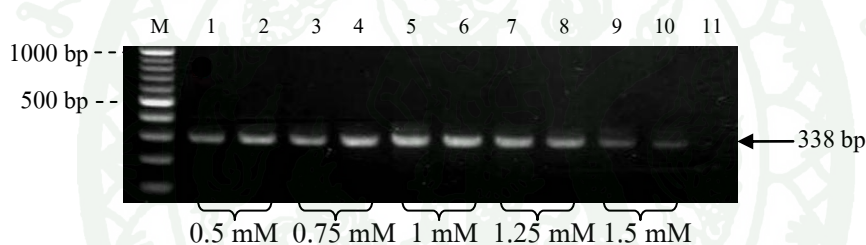
6.2 การปรับสภาวะของสารในการทำปฏิกิริยา PCR

6.2.1 การปรับความเข้มข้นของ $MgCl_2$

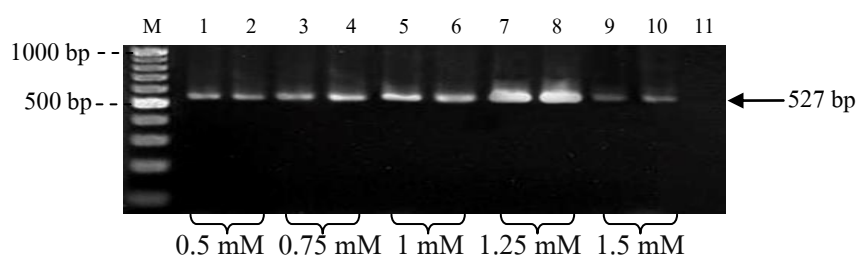
นำ allele-specific primer คือ UU DB DC และ DF โดยไพรเมอร์ UU เป็น forward universal primer และ DB DC และ DF เป็น reverse specific primer สำหรับยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus ชนิด *An. cracens* *An. scanloni* และ *An. nemophilous* โดยขนาดชิ้นส่วน allele-specific PCR มีขนาด 236 388 และ 527 คู่เบส ตามลำดับ ที่พัฒนาขึ้นจากชิ้นส่วนของยีน *COI* โดยการนำดีเอ็นเอจากยุงก้นปล่องทั้ง 3 ชนิด มาทำการปรับความเข้มข้นของ $MgCl_2$ โดยเริ่มจากความเข้มข้น 0.5 mM ถึง 1.5 mM จนกระทั่งได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมกับไพรเมอร์แต่ละคู่ ดังภาพที่ 35-37



ภาพที่ 35 ผลการปรับความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ในยุงก้นปล่อง *An. cracens* โดยวิธี allele-specific PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ UU/DB ช่อง M คือ GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas LIFE SCIENCES, USA) ช่อง 1-10 คือ *An. cracens* และช่อง 11 คือ negative control ซึ่งแสดงผลบน 1.5 % agarose gel โดยยุงก้นปล่อง *An. cracens* ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 236 คู่เบส



ภาพที่ 36 ผลการปรับความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ในยุงก้นปล่อง *An. scanloni* โดยวิธี allele-specific PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ UU/DC ซึ่งแสดงผลบน 1.5 % agarose gel ช่อง M คือ GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas LIFE SCIENCES, USA) ช่อง 1-10 คือ *An. scanloni* และช่อง 11 คือ negative control โดยยุงก้นปล่อง *An. scanloni* ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 338 คู่เบส



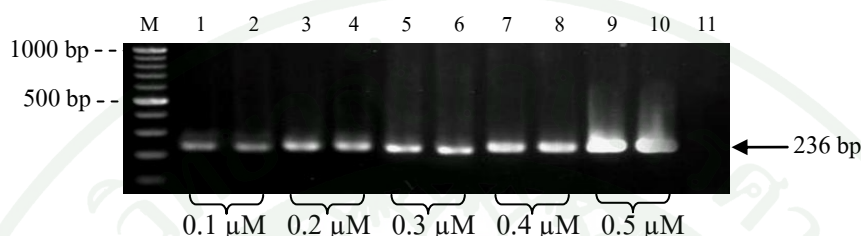
ภาพที่ 37 ผลการปรับความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ในยุงก้นปล่อง *An. nemophilous* ด้วยไพรเมอร์ UU/DF โดยวิธี allele-specific PCR ซึ่งแสดงผลบน 1.5 % agarose gel ช่อง M คือ GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas LIFE SCIENCES, USA) ช่อง 1-10 คือ *An. nemophilous* และช่อง 11 คือ negative control โดยยุงก้นปล่อง *An. nemophilous* จะได้แถบดีเอ็นเอขนาด 527 คู่เบส

จากการทดลองปรับสภาวะที่เหมาะสมในปฏิกิริยา PCR โดยปรับความเข้มข้นของ $MgCl_2$ โดยเริ่มจากความเข้มข้น 0.5 mM ถึง 1.5 mM พบว่า ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 1.25 mM เหมาะสมที่สุดสำหรับ allele-specific primer และใช้อุณหภูมิช่วง annealing ที่ 48 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดสำหรับไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ ในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ของยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus ทั้ง 3 ชนิด คือ pre-denature ที่ 94 °C เป็นเวลา 5 นาที denaturation ที่ 94 °C เป็น เวลา 30 วินาที annealing ที่ 48 °C เป็นเวลา 30 วินาที extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 30 วินาที โดยทำซ้ำทั้ง 3 ขั้นตอน 35 รอบ และสุดท้ายด้วย final extension 72 °C เป็นเวลา 10 นาที นอกจากนี้มีการปรับความเข้มข้นอะกาโรส เป็น 1.5 % และการปรับแรงเคลื่อนไฟฟ้าในการแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis เป็น 50 โวลต์ หลังจากการปรับสภาวะที่เหมาะสม พบว่าแถบดีเอ็นเอแบบไม่จำเพาะหายไป และทำให้เห็นขนาดของแถบดีเอ็นเอชัดเจนขึ้น

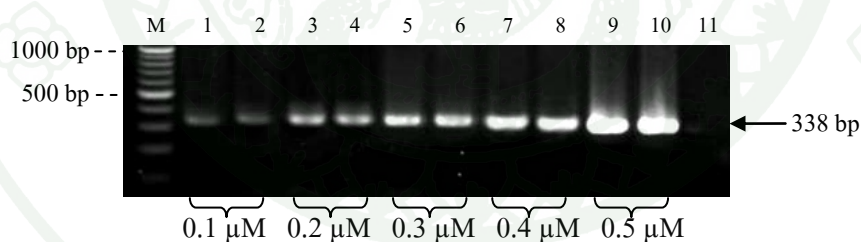
6.2.2 การปรับความเข้มข้นของ Primer

นำ allele-specific primer ที่พัฒนาขึ้นจากชิ้นส่วนของยีน COI โดยไพรเมอร์ UU เป็น forward universal primer และ DB DC และ DF เป็น reverse specific primer สำหรับยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus ชนิด *An. cracens* *An. scanloni* และ *An. nemophilous* โดย

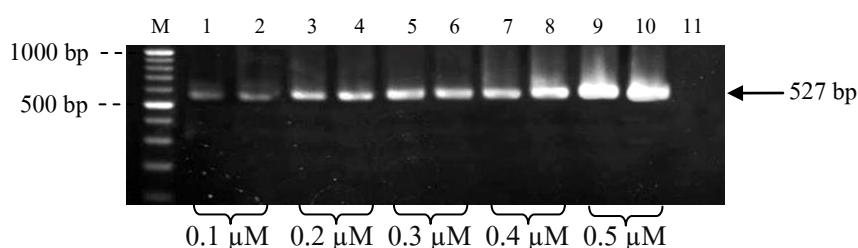
ขนาดชิ้นส่วน allele-specific PCR มีขนาด 236 388 และ 527 คู่เบส ตามลำดับ โดยการนำดีเอ็นเอจากยุงก้นปล่องทั้ง 3 ชนิด มาทำการปรับความเข้มข้นของไพรเมอร์โดยเริ่มจากความเข้มข้น 0.1 μM ถึง 0.5 μM จนกระทั่งได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่เหมาะสมกับแต่ละคู่ไพรเมอร์ ดังภาพที่ 38-40



ภาพที่ 38 ผลการปรับความเข้มข้นของ Primer ในยุงก้นปล่อง *An. cracens* โดยวิธี allele-specific PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ UU/DB ช่อง M คือ GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas LIFE SCIENCES, USA) ช่อง 1-10 คือ *An. cracens* และช่อง 11 คือ negative control ซึ่งแสดงผลบน 1.5 % agarose gel โดยยุงก้นปล่อง *An. cracens* ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 236 คู่เบส



ภาพที่ 39 ผลการปรับความเข้มข้นของ Primer ในยุงก้นปล่อง *An. scanloni* โดยวิธี allele-specific PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ UU/DC ซึ่งแสดงผลบน 1.5 % agarose gel ช่อง M คือ GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas LIFE SCIENCES, USA) ช่อง 1-10 คือ *An. scanloni* และช่อง 11 คือ negative control โดยยุงก้นปล่อง *An. scanloni* ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 338 คู่เบส



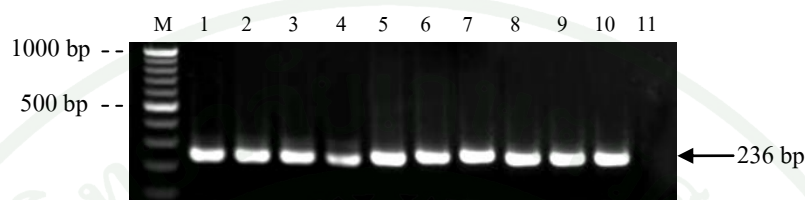
ภาพที่ 40 ผลการปรับความเข้มข้นของ Primer ในยุงก้นปล่อง *An. nemophilous* ด้วยคู่ไพรเมอร์ UU/DF โดยวิธี allele-specific PCR ซึ่งแสดงผลบน 1.5 % agarose gel ช่อง M คือ GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas LIFE SCIENCES, USA) ช่อง 1-10 คือ *An. nemophilous* และช่อง 11 คือ negative control โดยยุงก้นปล่อง *An. nemophilous* จะได้แถบดีเอ็นเอขนาด 527 คู่เบส

จากการทดลองปรับสภาวะที่เหมาะสมในปฏิกิริยา PCR โดยปรับความเข้มข้นของไพรเมอร์ โดยเริ่มจากความเข้มข้น 0.1 μM ถึง 0.5 μM พบว่า ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 0.3 μM เหมาะสมที่สุดสำหรับ allele-specific primer และใช้อุณหภูมิช่วง annealing ที่ 48 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดสำหรับไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ ในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ของยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus ทั้ง 3 ชนิด คือ pre-denature ที่ 94 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 5 นาที denaturation ที่ 94 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่ 48 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 30 วินาที extension ที่ 72 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 30 วินาที โดยทำซ้ำทั้ง 3 ขั้นตอน 35 รอบ และสุดท้ายด้วย final extension 72 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 10 นาที นอกจากนี้มีการปรับความเข้มข้นอะกาโรส เป็น 1.5 % และการปรับแรงเคลื่อนไฟฟ้าในการแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis เป็น 50 โวลต์ หลังจากการปรับสภาวะที่เหมาะสมของ พบว่าแถบดีเอ็นเอแบบไม่จำเพาะหายไป และแบนที่เกิดจากการมีเบสคู่สมภายในไพรเมอร์เดียวกันได้หายไป และทำให้เห็นขนาดของแถบดีเอ็นเอชัดเจนขึ้น

6.3 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้ไพรเมอร์ที่ละคู่ด้วยวิธี allele-specific PCR

จากการนำคู่ไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ คือ UU/DB UU/DC และ UU/DF มาทำการทดสอบจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อนชนิด Dirus 3 ชนิด โดยไพรเมอร์ คู่ UU/DB นำมาใช้ทดสอบกับยุงก้นปล่อง *An. cracens* จำนวน 10 ตัวอย่าง ไพรเมอร์คู่ UU/DC ทดสอบกับยุง *An. scanloni* จำนวน 10 ตัวอย่าง และคู่ไพรเมอร์ UU/DF นำมาใช้ทดสอบกับยุงก้นปล่อง

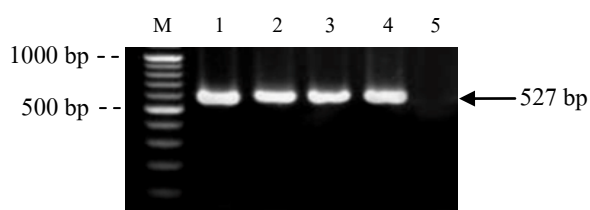
An. nemophilous จำนวน 4 ตัวอย่าง พบว่าผลที่ได้ค่อนข้างจำเพาะต่ออุณหภูมิที่ใช้ในการเพิ่มขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำหรับยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อนชนิด *An. cracens* *An. scanloni* และ *An. nemophilous* โดยให้ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่จำเพาะขนาด 236 338 และ 527 คู่เบส ตามลำดับ ดังภาพที่ 41-43



ภาพที่ 41 ผลการจำแนกชนิดยุงก้นปล่อง *An. cracens* 10 ตัวอย่าง โดยวิธี allele-specific PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ UU/DB ช่อง M คือ GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas LIFE SCIENCES, USA) ช่อง 1-10 คือ *An. cracens* และช่อง 11 คือ negative control ซึ่งแสดงผลบน 1.5 % agarose gel โดยยุงก้นปล่อง *An. cracens* ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 236 คู่เบส



ภาพที่ 42 ผลการใช้วิธี allele-specific PCR ในการจำแนกชนิดยุงก้นปล่อง *An. scanloni* 10 ตัวอย่างด้วยคู่ไพรเมอร์ UU/DC ซึ่งแสดงผลบน 1.5 % agarose gel แสดงแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับยุงก้นปล่อง *An. scanloni* ขนาด 338 คู่เบส ช่อง M คือ GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas LIFE SCIENCES, USA) ช่อง 1-10 คือ *An. scanloni* ช่อง 11 คือ negative control



ภาพที่ 43 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ UU/DF ในการจำแนกชนิดยุงก้นปล่อง

An. nemophilous 4 ตัวอย่าง ด้วยวิธี allele-specific PCR ซึ่งแสดงผลบน 1.5 % agarose gel ช่อง M คือ GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas LIFE SCIENCES, USA) ช่อง 1-4 คือ *An. nemophilous* และช่อง 5 คือ negative control โดยยุงก้นปล่อง *An. nemophilous* จะแสดงแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับยุง *An. nemophilous* ขนาด 527 คู่เบส

จากผลการทดสอบจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ยุง *An. cracens* *An. scanloni* และ *An. nemophilous* โดยใช้ allele-specific primer คือ UU DB DC และ DF โดยการทดสอบผลแต่ละคู่ไพรเมอร์ คือ UU/DB UU/DC และ UU/DF พบว่าหลังจากการปรับสภาวะที่เหมาะสมในปฏิกิริยา PCR ผลที่ได้ค่อนข้างจำเพาะต่ออนุกรมที่ใช้ในการเพิ่มขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ที่พัฒนาขึ้นจากชิ้นส่วนยีน *COI* เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Monthathong (2006) ซึ่งใช้เทคนิค (Walton *et al.*, 1999) ในการจำแนกยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus ในประเทศไทย โดยใช้ปฏิกิริยารวมไพรเมอร์หลายสายพร้อมกัน (Multiplex PCR) ได้แถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะเป็นจำนวนมาก แต่หากปรับสภาวะของปฏิกิริยา PCR ให้เหมาะสมและเลือกใช้ไพรเมอร์ที่ละคู่ที่จำเพาะกับชนิดยุงโดยใช้คู่ไพรเมอร์ D-U/ D-AC ในการจำแนกชนิด *An. dirus* และ *An. scanloni* ซึ่งปรากฏขนาดแถบดีเอ็นเอ 562 คู่เบส และ 360 คู่เบส ส่วนคู่ไพรเมอร์ D-U/ D-B จำเพาะต่อการจำแนกชนิด *An. cracens* โดยให้แถบดีเอ็นเอ ขนาด 510 คู่เบส และคู่ไพรเมอร์ D-U/ D-D ให้แถบดีเอ็นเอ ขนาด 306 คู่เบส พบว่าสามารถแยกขนาดแถบดีเอ็นเอได้ชัดเจนขึ้น และคล้ายงานวิจัยของ Prakash *et al.* (2006) ที่พัฒนาเทคนิค allele-specific PCR โดยการพัฒนาอนุกรมและสภาวะที่เหมาะสมในปฏิกิริยา PCR ดัดแปลงมาจากวิธีการ Walton *et al.* (1999) ในการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus ชนิด *An. baimaii* จากส่วนของยีน *ITS2* ของ rDNA ซึ่งเป็นพาหะนำโรคมาลาเรียที่สำคัญในประเทศอินเดีย โดยปรับสภาวะที่เหมาะสมในปฏิกิริยา PCR โดยการปรับอุณหภูมิช่วง annealing เป็น 51 องศาเซลเซียส รวมทั้งเพิ่มจำนวนรอบในการทำปฏิกิริยา PCR โดยการทำให้ซ้ำทั้ง 3 ขั้นตอน 35 รอบ และเปลี่ยนมาใช้เอนไซม์ DNA

polymerase และบัฟเฟอร์ที่มีประสิทธิภาพสูง อย่างไรก็ตามไพรเมอร์ที่พัฒนาขึ้นเมื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR สามารถแสดงแถบดีเอ็นเอได้อย่างจำเพาะสามารถนำมาใช้ทดสอบจำแนกชนิดยุงกันปล่องกลุ่มซับซ้อน Dirus ทั้ง 3 ชนิดได้

เครื่องหมาย allele-specific PCR เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาจากตำแหน่งที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอมีความแตกต่างเพียง 1 นิวคลีโอไทด์ (Single nucleotide polymorphism หรือ SNP) โดยการออกแบบไพรเมอร์ให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 3' แตกต่างกันตามชนิดของนิวคลีโอไทด์ตรงจุดที่เป็น SNP การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะเกิดขึ้นก็ต่อเมื่อนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ตรงด้านปลาย 3' กับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอต้นแบบ เข้าคู่กันเท่านั้น ซึ่งเมื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR และตรวจสอบด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสจะปรากฏแถบดีเอ็นเอ แต่หากนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ทางด้านปลาย 3' กับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอต้นแบบ ไม่เข้าคู่กัน เอนไซม์ DNA polymerase จะไม่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ได้ ทำให้ไม่มีการเพิ่มปริมาณของชิ้นดีเอ็นเอเกิดขึ้น เมื่อตรวจสอบโดยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสจึงไม่พบแถบดีเอ็นเอ (Ugozzoli and Wallace, 1991) สำหรับการตรวจสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์เมื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR และตรวจสอบด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสจะปรากฏแถบดีเอ็นเอมีความจำเพาะแบบ single-locus แสดงว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบมีความจำเพาะต่อบริเวณเดียว แต่การที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทุกตัวอย่างอาจจะต้องมีการปรับสภาวะในปฏิกิริยา PCR ให้เหมาะสมต่อไป ส่วนไพรเมอร์ที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เลยถึงแม้จะมีการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิแล้ว อาจเนื่องมาจากไพรเมอร์ที่ออกแบบจับกันเองหรือเกิดโครงสร้างที่ไม่เหมาะสม ควรออกแบบไพรเมอร์ใหม่โดยเพิ่มหรือลดความยาวลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือเปลี่ยนตำแหน่งออกแบบไพรเมอร์ เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 3' ของไพรเมอร์จะส่งผลต่อปฏิกิริยาอย่างมาก (สุรินทร์, 2552) นอกจากนี้ควรมี melting temperature และ เปอร์เซ็นต์ GC content ใกล้เคียงกัน รวมถึงควรมีเบส G หรือ C ทางด้านปลาย 3' OH ทั้ง forward primer และ reverse primer และมีเบสคู่สมภายในไพรเมอร์เดียวกัน เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ต้องสามารถเพิ่มจำนวนได้ด้วยเทคนิค PCR (ปาริชาติ ศรีจำเริญ, 2547)

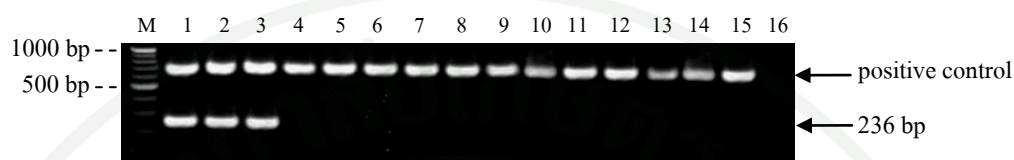
ส่วนไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอแบบไม่จำเพาะ (non-specific band) อาจเกิดจากตำแหน่งที่ไพรเมอร์เข้าไปจับกับดีเอ็นเอมีมากกว่า 1 ตำแหน่ง ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะหรือสภาวะที่ใช้ไม่เหมาะสม เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Dusfour *et al.* (2007) ที่พบสภาวะไม่เหมาะสมในการพัฒนาเครื่องหมาย allele-specific PCR เกิดแถบดีเอ็นเอแบบไม่จำเพาะในการจำแนกชนิด

ยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Sundaicus 3 ชนิด คือ *An. sundaicus* *An. epiroticus* และ *An. sundaicus* E ซึ่งเป็นพาหะที่สำคัญของโรคมาลาเรียในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Multiplex PCR จำนวน 2 เครื่องหมาย จากส่วนไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอจึงแก้ปัญหาโดยการปรับอุณหภูมิช่วง annealing ให้เหมาะสม และลดความเข้มข้นของ $MgCl_2$ รวมทั้งเพิ่มความเข้มข้นของคูไพรเมอร์ซึ่งใช้เป็น positive control ในปฏิกิริยา Multiplex PCR ซึ่งสามารถจำแนกได้ชัดเจน

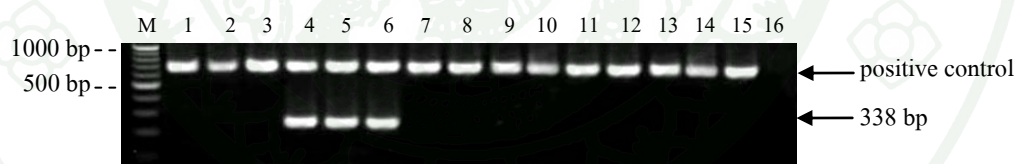
7. การทดสอบจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus ด้วยวิธี allele-specific PCR

ทดสอบประสิทธิภาพของ allele-specific primer คือ UU DB DC และ DF โดยไพรเมอร์ UU เป็น forward universal primer และไพรเมอร์ DB DC และ DF เป็น reverse specific primer สำหรับยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus ชนิด *An. cracens* *An. scanloni* และ *An. nemophilous* โดยขึ้นส่วน allele-specific PCR มีขนาด 236 238 และ 527 คู่เบส ตามลำดับ โดยใช้คูไพรเมอร์ คือ COIF และ COIR โดยไพรเมอร์ COIF เป็น forward universal primer และ COIR เป็น reverse universal primer เป็น positive control หลังจากได้สภาวะที่เหมาะสมในปฏิกิริยา PCR จากการปรับความเข้มข้นสุดท้ายของสารในปฏิกิริยา และเลือกใช้อุณหภูมิที่ดีที่สุดในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR ของยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus ทั้ง 3 ชนิด คือ อุณหภูมิช่วง annealing ที่ 48 องศาเซลเซียส โดยความเข้มข้นของส่วนประกอบและขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR คัดแปลงมาจากวิธีการของ Dousfour *et al.* (2007) ประกอบด้วย genomic DNA 20-30 ng 1X PCR reaction buffer 0.5 mM dNTPs 1.25 mM $MgCl_2$ 0.3 uM ของแต่ละไพรเมอร์ Taq DNA polymerase (Vivantis, USA) 1 unit ขั้นตอนปฏิกิริยา PCR เริ่มจาก pre-denature ที่ 94 °C เป็นเวลา 5 นาที denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่ 48 °C เป็นเวลา 30 วินาที extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 30 วินาที โดยทำซ้ำทั้ง 3 ขั้นตอน 35 รอบ และสุดท้ายด้วย final extension 72 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ และยืนยันผลการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน Dirus 5 ชนิด จากการเลือกตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ที่ละคู่ที่จำเพาะกับชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus ชนิดละ 3 ตัวอย่าง จากการแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นอะกาโรส 1.5 % ซึ่งจะให้เห็นขนาดชิ้นส่วน allele-specific PCR มีขนาด 236 238 และ 527 คู่เบส ตามลำดับได้แก่ คูไพรเมอร์ UU/DB ซึ่งจำเพาะต่อยุงก้นปล่อง *An. cracens* พบว่าจะเกิดแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับตัวอย่างยุงก้นปล่อง *An. cracens* เท่านั้น ซึ่งปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน ขนาด 236 คู่เบส ดังภาพที่ 44 คูไพรเมอร์ UU/DC พบว่าจะ

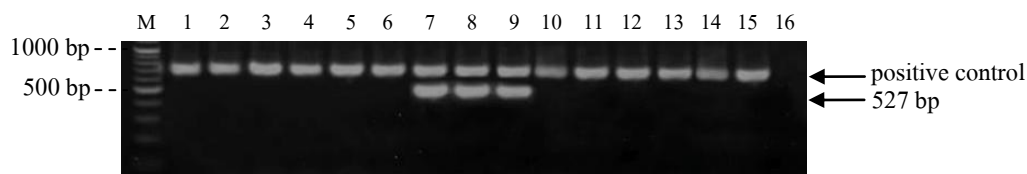
เกิดแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับตัวอย่างยุงก้นปล่อง *An. scanloni* เท่านั้น ซึ่งปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน ขนาด 338 คู่เบส ดังภาพที่ 45 คู่ไพรเมอร์ UU/DF พบว่าจะเกิดแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับตัวอย่าง ยุงก้นปล่อง *An. nemophilous* เท่านั้น ซึ่งปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน ขนาด 527 คู่เบส ดังภาพที่ 46



ภาพที่ 44 ผลการใช้วิธี allele-specific PCR ในการจำแนกชนิดยุงก้น *An. cracens* ด้วยไพรเมอร์คู่ UU/DB : ช่อง M คือ GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas LIFE SCIENCES, USA) ช่อง 1-3 คือ *An. cracens* ช่อง 4-6 คือ *An. scanloni* ช่อง 7-9 คือ *An. nemophilous* ช่อง 10-12 คือ *An. dirus* ช่อง 13-15 คือ *An. baimaii* และ ช่อง 16 คือ negative control ซึ่งแสดง ผลบน 1.5 % agarose gel พบแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับยุงก้นปล่อง *An. cracens* ขนาด 236 คู่เบส เท่านั้น



ภาพที่ 45 ผลการใช้วิธี allele-specific PCR ในการจำแนกชนิดยุงก้นปล่อง *An. scanloni* ด้วยไพรเมอร์คู่ UU/DC : ช่อง M คือ GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas LIFE SCIENCES, USA) ช่อง 1-3 คือ *An. cracens* ช่อง 4-6 คือ *An. scanloni* ช่อง 7-9 คือ *An. nemophilous* ช่อง 10-12 คือ *An. dirus* ช่อง 13-15 คือ *An. baimaii* และช่อง 16 คือ negative control ซึ่งแสดงผลบน 1.5 % agarose gel พบแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับยุงก้นปล่อง *An. scanloni* ขนาด 338 คู่เบส เท่านั้น



ภาพที่ 46 ผลการใช้วิธี allele-specific PCR ในการจำแนกชนิดยุงก้นปล่อง *An. nemophilous*

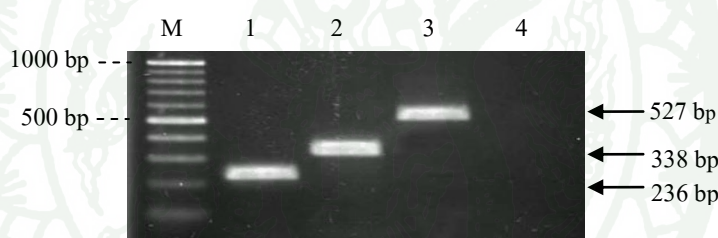
ด้วยไพรเมอร์คู่ UU/DF ช่อง M คือ GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas LIFE SCIENCES, USA) ช่อง 1-3 คือ *An. cracens* ช่อง 4-6 คือ *An. scanloni* ช่อง 7-9 คือ *An. nemophilous* ช่อง 10-12 คือ *An. dirus* ช่อง 13-15 คือ *An. baimaii* และ ช่อง 16 คือ negative control ซึ่งแสดงผลบน 1.5 % agarose gel เมื่อใช้ไพรเมอร์ UU/DF พบแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับยุงก้นปล่อง *An. nemophilous* ขนาด 527 คู่เบส เท่านั้น

เมื่อนำไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ มาใช้ตรวจสอบยืนยันผลการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องซ้ำซ้อน Dirus ทั้ง 3 ชนิด คือ คู่ไพรเมอร์ UU/DB UU/DC และ UU/DF พบว่าสามารถจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มซ้ำซ้อน Dirus พบแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับยุงก้นปล่องชนิด *An. cracens* มีขนาด 236 คู่เบส สำหรับ *An. scanloni* และ *An. nemophilous* มีขนาด 338 และ 527 คู่เบส ตามลำดับ หลังจากการพัฒนาอุณหภูมิและสภาวะในการทำปฏิกิริยา PCR ให้เหมาะสมในการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มซ้ำซ้อน Dirus ทั้ง 3 ชนิด แสดงให้เห็นว่า allele-specific primer ที่ออกแบบสามารถแยกขนาดแถบดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจน สามารถนำไปใช้ในการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มซ้ำซ้อน Dirus จำนวน 3 ชนิด ได้

นอกจากนี้หลังจากการทดสอบยืนยันผลการจำแนกและการปรับสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา PCR สามารถทดสอบผลการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มซ้ำซ้อน Dirus ด้วยวิธี Multiplex PCR ซึ่งเป็นวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยใช้ไพรเมอร์หลายคู่พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียวกัน ซึ่งสามารถใช้ทดสอบผลการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มซ้ำซ้อน Dirus อีกทั้งยังเป็นการประหยัดเวลาและลดค่าใช้จ่ายและให้ผลการทดลองที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น

8. การทดสอบผลการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน Dirus โดยวิธี Multiplex PCR

Multiplex PCR เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยใช้คู่ไพรเมอร์หลายคู่พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียวกัน โดยไพรเมอร์ที่นำมาใช้ต้องเป็นเบสคู่สมกัน รวมทั้ง PCR product ที่ได้จากแต่ละคู่ไพรเมอร์ต้องมีขนาดที่แตกต่างกัน นอกจากนี้สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR ต้องเหมาะสมอีกทั้งยังเป็นการลดค่าใช้จ่ายและประหยัดเวลาในการตรวจสอบ และให้ผลการทดลองที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น เมื่อทดสอบการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน Dirus ด้วยวิธี Multiplex PCR โดยใช้ไพรเมอร์ UU เป็น forward universal primer และ DB DC และ DF เป็น reverse specific primer พบว่าสามารถจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน Dirus จำนวน 3 ชนิด คือชนิด *An. cracens* *An. scanloni* และ *An. nemophilous* พบแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับยุงก้นปล่องชนิด *An. cracens* มีขนาด 236 คู่เบส สำหรับ *An. scanloni* และ *An. nemophilous* มีขนาด 338 และ 527 คู่เบส ตามลำดับดังภาพที่ 47



ภาพที่ 47 ผล Multiplex PCR ในการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus ช่อง M คือ GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas LIFE SCIENCES, USA) ช่อง 1 คือ *An. cracens* ช่อง 2 คือ *An. scanloni* ช่อง 3 คือ *An. nemophilous* ช่อง 4 คือ negative control

จากการทดสอบจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus ด้วยวิธี Multiplex PCR ในการทดสอบประสิทธิภาพของ allele specific primer คือ UU DB DC และ DF โดยไพรเมอร์ UU เป็น forward universal primer และไพรเมอร์ DB DC และ DF เป็น reverse specific primer สำหรับจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus หลังจากการพัฒนาอุณหภูมิและเลือกสภาวะที่เหมาะสมในปฏิกิริยา PCR รวมทั้งทดสอบประสิทธิภาพของ allele specific primer จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ละคู่และจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยวิธี Multiplex PCR โดยใช้ปฏิกิริยารวมไพรเมอร์หลายสายพร้อมกัน ให้ผลเหมือนการเพิ่มปริมาณ

ดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ระบุโดยพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอด้วยวิธี Multiplex PCR ของยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus ทั้ง 3 ชนิดคือ อุณหภูมิช่วง annealing ที่ 48 องศาเซลเซียส โดยความเข้มข้นของส่วนประกอบและขั้นตอนของปฏิกิริยา Multiplex PCR คัดแปลงมาจากวิธีการของ Dousfour *et al.* (2008) ประกอบด้วย genomic DNA 20-30 ng 1X PCR reaction buffer 0.5 mM dNTPs 1.25 mM MgCl₂ 0.3 uM ของแต่ละไพรเมอร์ Taq DNA polymerase (Vivantis, USA) 1 unit ขั้นตอนปฏิกิริยา PCR เริ่มจาก pre-denature ที่ 94 °C เป็นเวลา 5 นาที denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่ 48 °C เป็นเวลา 30 วินาที extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 30 วินาที โดยทำซ้ำทั้ง 3 ขั้นตอน 35 รอบ และสุดท้ายด้วย final extension 72 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตรวจสอบการแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นอะกาโรส 1.5 % พบว่าสามารถจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่ม ซับซ้อน Dirus จำนวน 3 ชนิด คือชนิด *An. cracens* *An. scanloni* และ *An. nemophilous* พบแถบ ดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับยุงก้นปล่องชนิด *An. cracens* มีขนาด 236 คู่เบส สำหรับ *An. scanloni* และ *An. nemophilous* มีขนาด 338 และ 527 คู่เบส ตามลำดับ

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าวิธี Multiplex PCR สามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบผลการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus จำนวน 3 ชนิด ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อลด ระยะเวลา และค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบผลการจำแนกชนิดยุงก้นปล่อง เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Manguin *et al.* (2002) โดยใช้เทคนิค Multiplex PCR ในการจำแนกชนิดของยุงก้นปล่องกลุ่มชนิด ซับซ้อน Dirus ได้ทั้งหมด 4 ชนิด คือ *An. dirus* *An. cracens* *An. scanloni* *An. baimaii* ในภูมิภาค เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และงานวิจัยของ Garros *et al.* (2004) ซึ่งพัฒนาเทคนิค allele-specific PCR ในการจำแนกยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Minimus และ Funestus ซึ่งเป็นพาหะนำโรคมาลาเรียที่สำคัญในทวีปแอฟริกา จากส่วนของยีน ITS2 ของ rDNA ตรวจสอบด้วยวิธี Multiplex PCR พบว่า สามารถจำแนกชนิดยุงที่เป็นพาหะของโรคมาลาเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพและสอดคล้องกับ งานวิจัยของ Dusfour *et al.* (2007) ซึ่งพัฒนาวิธีการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Multiplex PCR จำนวน 2 เครื่องหมาย จากส่วนไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอในการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Sundaicus จำนวน 3 ชนิด คือ *An. sundaicus* *An. epiroticus* และ *An. sundaicus* E ได้อย่างชัดเจน

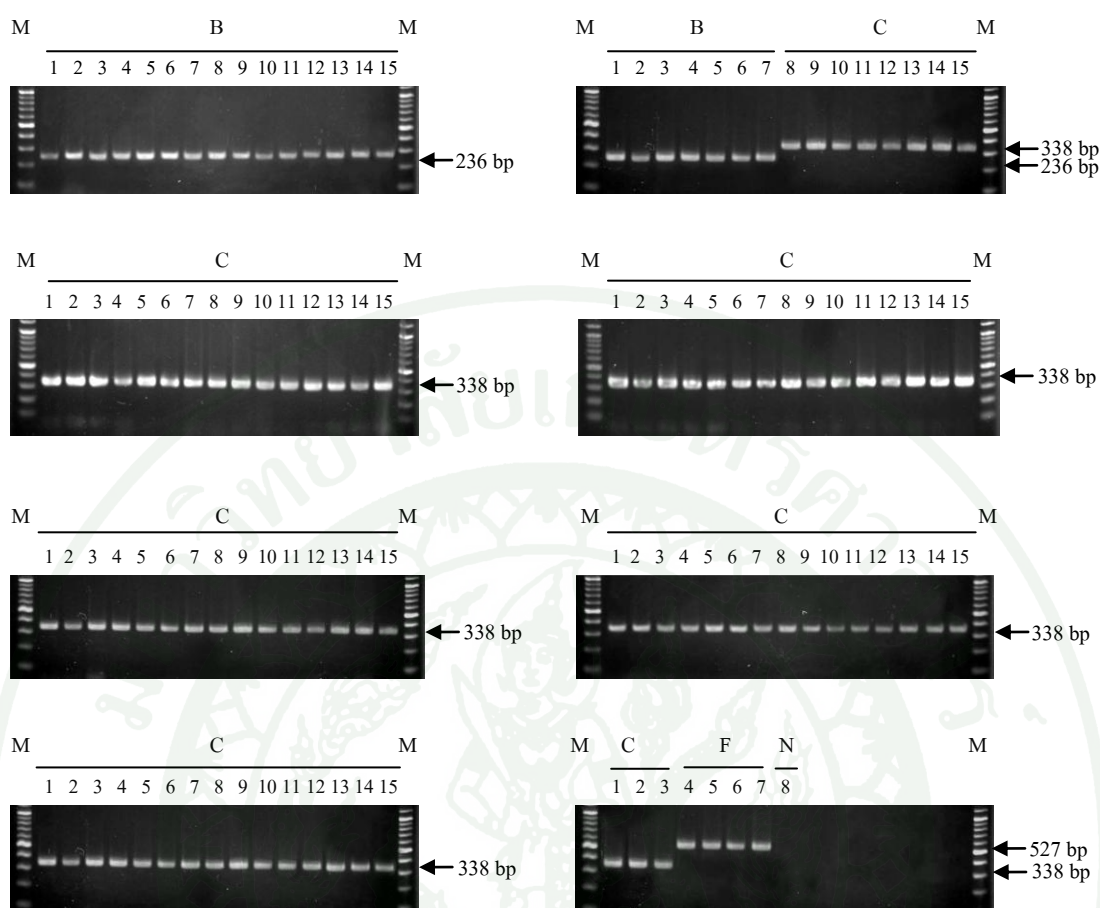
การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอโดยวิธี allele-specific PCR เพื่อจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่ม ซับซ้อน Dirus โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบจากส่วนของยีน COI จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เป้าหมายโดยใช้ปฏิกิริยารวมไพรเมอร์หลายสายพร้อมกัน (Multiplex PCR) ที่ทำการศึกษาครั้งนี้

สามารถจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน Dirus ชนิด *An. cracens* *An. scanloni* และ *An. nemophilous* ตามขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้อย่างจำเพาะและชัดเจน ซึ่งเป็นวิธีการที่เหมาะสมทั้งด้านความแม่นยำ ความสะดวก และถูกต้องในการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องที่ไม่สามารถจำแนกได้โดยใช้ความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา แม้ว่าจะมีการพัฒนาเทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอในการจำแนกยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus มาบ้างแล้ว เช่น งานวิจัยของ Walton *et al.* (1999) ที่พัฒนาเครื่องหมาย allele-specific PCR โดยออกแบบไพรเมอร์จากส่วนของยีน *ITS2* แต่พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าวยังมีปัญหาในด้านประสิทธิภาพและความไม่เสถียรในการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus

9. การทดสอบประสิทธิภาพผลจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน Dirus จากพื้นที่ศึกษาโดยวิธี allele-specific PCR

ทดสอบประสิทธิภาพการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus ด้วยวิธี Multiplex PCR จากยุงก้นปล่องเพศเมีย 3 ชนิด ได้แก่ *An. cracens* *An. scanloni* และ *An. nemophilous* จำนวน 105 ตัวอย่าง จากพื้นที่กระจายตัว 5 แหล่ง คือ พื้นที่ภาคเหนือ (จังหวัดเชียงใหม่) พื้นที่ภาคตะวันตก (จังหวัดกาญจนบุรี) พื้นที่ภาคใต้ฝั่งตะวันตก (จังหวัดสตูลและจังหวัดระนอง) พื้นที่ภาคใต้ฝั่งตะวันออก (จังหวัดสงขลา) โดยใช้ allele-specific primer คือ UU DB DC และ DF โดยไพรเมอร์ UU เป็น forward universal primer และไพรเมอร์ DB DC DF เป็น reverse specific primer สำหรับจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus ชนิด *An. cracens* *An. scanloni* และ *An. nemophilous* พบว่าสามารถจำแนกความแตกต่างของยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อนที่ศึกษาได้อย่างชัดเจน โดยแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับยุงก้นปล่องชนิด *An. cracens* มีขนาด 236 คู่เบส สำหรับ *An. scanloni* และ *An. nemophilous* มีขนาด 338 และ 527 คู่เบส

ดั่งภาพที่ 48



ภาพที่ 48 ผล Multiplex PCR ในการทดสอบจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus โดยใช้ allele specific primer คือ UU: forward universal primer และ DB DC DF: reverse universal primer ช่อง M คือ GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas LIFE SCIENCES, USA) ช่อง N คือ negative control B คือ *An. cracens* (236 bp) C คือ *An. scanloni* (338 bp) และ F คือ *An. nemophilous* (527 bp)

ผลการทดสอบประสิทธิภาพการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus จากแหล่งพื้นที่กระจายตัวจำนวน 105 ตัวอย่าง พบว่าส่วนใหญ่เป็นยุงก้นปล่อง *An. scanloni* จากอำเภอมะนัง จังหวัดสตูล จำนวน 80 ตัว ยุงก้นปล่อง *An. nemophilous* จำนวน 4 ตัว และยุงก้นปล่อง *An. cracens* จำนวน 1 ตัว และยุงก้นปล่อง *An. cracens* จำนวน 20 ตัว ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการภาควิชาปรสิตวิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ แต่ไม่พบยุงก้นปล่อง *An. dirus* และ *An. baimaii* จากการจำแนกด้วยวิธี allele-specific PCR จากแหล่งพื้นที่กระจายตัวที่ศึกษานอกจากนี้พบว่ายุงก้นปล่อง *An. scanloni* พบที่อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล ในบริเวณ

สภาพแวดล้อมที่มีลักษณะเป็นเขาหินปูนแถบภาคใต้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยก่อนหน้านี้ที่ระบุว่ายุงก้นปล่อง *An. scanloni* พบส่วนใหญ่ในพื้นที่ภาคตะวันตกและในสภาพแวดล้อมที่เป็นเขาหินปูนแถบพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย และยุงก้นปล่อง *An. cracens* พบเฉพาะอำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรีจากพื้นที่ศึกษาไม่พบยุงก้นปล่อง *An. cracens* บริเวณอำเภอนาทวี จังหวัดสงขลา ซึ่งอาจมีผลมาจากช่วงที่ทำการเก็บตัวอย่างไม่ใช่ระยะการแพร่กระจายพันธุ์ของยุงก้นปล่อง ในขณะที่ยุงก้นปล่อง *An. nemophilous* พบที่อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี จำนวน 3 ตัว และพบที่อำเภอละอุ่น จังหวัดระนอง จำนวน 1 ตัว ซึ่งผลที่ได้ไม่สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่ระบุว่ายุงก้นปล่อง *An. cracens* และยุงก้นปล่อง *An. nemophilous* พบส่วนใหญ่ในพื้นที่ทางภาคใต้และบริเวณติดชายแดนประเทศมาเลเซีย (Poopipattayasataporn and Baimai, 1995) ซึ่งการวิจัยครั้งนี้ครอบคลุมพื้นที่ดังกล่าวแต่ไม่พบตัวอย่าง ผลการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน Dirus จากพื้นที่ศึกษา โดยวิธี allele-specific PCR ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน Dirus จากพื้นที่ศึกษา โดยวิธี allele-specific PCR

แหล่งที่	วันที่เก็บตัวอย่าง	สถานที่	ชนิด			รวม
			<i>An. cracens</i>	<i>An. scanloni</i>	<i>An. nemophilous</i>	
1	22 พ.ย. 2555	อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่	20	-	-	20
2	30 ก.ย. 2556	อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี	1	-	3	4
3	7-11 ม.ก. 2556	อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	-	80	-	80
4	23 ส.ค. 2555	อำเภอละอุ่น จังหวัดระนอง	-	-	1	1
5	5-9 ส.ค. 2554	อำเภอนาทวี จังหวัดสงขลา	-	-	-	-
รวม			21	80	4	105

จากการเก็บตัวอย่างยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus เพศเมีย ทั้งหมด 105 ตัว จากพื้นที่การกระจายตัว 5 แหล่ง ระหว่างเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2554 ถึง มกราคม พ.ศ. 2556 มาทดสอบผลจากการจำแนกชนิดด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาของ Rattanaarithikul *et al.* (2006) และการจำแนกโดยวิธี

allele-specific PCR จากนั้นเปรียบเทียบประสิทธิภาพผลการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน dirus ด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาและการจำแนกเครื่องหมายโมเลกุล วิธี allele-specific PCR เพื่อตรวจสอบความผิดพลาดของผลการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน Dirus ดังกล่าว ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงการเปรียบเทียบผลจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน dirus ด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาและการจำแนกด้วยเครื่องหมายโมเลกุล วิธี allele-specific PCR

แหล่งที่มา	จำนวนตัว (ชนิดยุง)		% ความผิดพลาด
	ลักษณะสัณฐานวิทยา	เครื่องหมายดีเอ็นเอ	
อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่	20 (<i>An. cracens</i>)	20 (<i>An. cracens</i>)	0
อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี	4 (<i>An. dirus</i>)	1 (<i>An. cracens</i>) 3 (<i>An. nemophilous</i>)	100
อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	41 (<i>An. scanloni</i>) 39 (<i>An. baimaii</i>)	80 (<i>An. scanloni</i>)	48.75
อำเภอละอุ่น จังหวัดระนอง	1 (<i>An. baimaii</i>)	1 (<i>An. nemophilous</i>)	100
อำเภอนาทวี จังหวัดสงขลา	-	-	-

หมายเหตุ รายละเอียดเกี่ยวกับผลการจำแนกดังแสดงในตารางภาคผนวก ก1

จากผลการเปรียบเทียบการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน Dirus ด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาและการจำแนกโดยวิธี allele-specific PCR จากการเก็บตัวอย่างยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus เพศเมีย ทั้งหมด 105 ตัวอย่าง พบว่าเป็นยุงก้นปล่อง *An. cracens* จำนวน 20 ตัวอย่าง จากห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ซึ่งผลจากการจำแนกชนิดด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาของ Rattanarithikul *et al.* (2006) และการจำแนกโดยวิธี allele-specific PCR ให้ผลการจำแนกไม่แตกต่างกันโดยไม่พบความผิดพลาดในการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องชนิดดังกล่าว ในขณะที่ยุงก้นปล่อง *An. dirus* จำนวน 4 ตัวอย่าง จากอำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี ผลการจำแนกด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาพบว่าเป็นยุงก้นปล่อง *An. dirus* ทั้งหมดซึ่งต่างจากผลการจำแนกโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล พบว่าเป็นยุงก้นปล่อง *An. cracens* จำนวน 1 ตัวอย่าง มีความผิดพลาด

การจำแนกชนิด 25% และเป็นยุงก้นปล่อง *An. nemophilous* จำนวน 3 ตัวอย่าง ซึ่งมีความผิดพลาดในการจำแนกชนิด 75% จากการทดสอบผลการจำแนกโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล ซึ่งพบความผิดพลาดในการจำแนก 100 % ส่วนยุงก้นปล่อง *An. scanloni* จำนวน 80 ตัวอย่าง จากอำเภอมะนัง จังหวัดสตูล ซึ่งมีจำนวนตัวอย่างมากที่สุดจากแหล่งพื้นที่ที่ทำการศึกษาทั้งหมด จากผลการจำแนกด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาพบว่าเป็นยุงก้นปล่อง *An. scanloni* จำนวน 41 ตัวอย่าง และ ยุง *An. baimaii* จำนวน 39 ตัวอย่าง ซึ่งผลที่ได้มีความแตกต่างจากการจำแนกโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล ซึ่งผลการจำแนกพบว่าเป็นยุงก้นปล่อง *An. scanloni* จำนวนทั้งหมด 80 ตัวอย่าง ซึ่งมีความผิดพลาดในการจำแนกชนิด 48.75 % และยุงก้นปล่อง *An. nemophilous* จำนวน 1 ตัวอย่าง จากอำเภอละอุ่น จังหวัดระนอง จากการจำแนกด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาพบว่าเป็นยุงก้นปล่อง *An. baimaii* ซึ่งต่างจากผลการจำแนกโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล พบว่าเป็นยุงก้นปล่อง *An. nemophilous* จากการทดสอบผลการจำแนกโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล ซึ่งพบความผิดพลาดในการจำแนก 100 %

อย่างไรก็ตามการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน Dirus ยังพบความผิดพลาดในการจำแนกโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาเช่นเดียวกับยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อนกลุ่มอื่นๆ ซึ่งการจำแนกชนิดยุงกลุ่มซับซ้อนโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยามีความไม่น่าเชื่อถือและพบความผิดพลาดในระดับสูง (Tananchai *et al.*, 2012) การตรวจสอบผลการจำแนกโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลจึงเหมาะแก่การนำมาใช้ทดสอบผลการจำแนกชนิด ซึ่งมีความรวดเร็วและน่าเชื่อถือ การจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus โดยวิธี allele-specific PCR เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการนำมาใช้จำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อนซึ่งมีลักษณะสัณฐานวิทยาล้ำคล้ายคลึงกัน (sibling species)

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอโดยวิธี allele-specific PCR เพื่อจำแนกชนิดยุงก้นปล่อง กลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus ทั้ง 3 ชนิด โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะจากส่วนของยีน *COI* สามารถจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน Dirus ชนิด *An. cracens* *An. scanloni* และ *An. nemophilous* ด้วยความแตกต่างของชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 236 338 และ 527 คู่เบส ตามขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้อย่างจำเพาะและมีประสิทธิภาพโดยทดสอบจำแนกชนิดยุงก้นปล่องจำนวน 105 ตัวอย่าง จากแหล่งพื้นที่กระจายตัว 5 แหล่ง จากจังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดกาญจนบุรี จังหวัดสตูล จังหวัดระนอง และจังหวัดสงขลาพบว่าสามารถจำแนกชนิดยุงก้นปล่อง *An. cracens* จำนวน 21 ตัว *An. scanloni* จำนวน 80 ตัว และ *An. nemophilous* จำนวน 4 ตัว

ข้อเสนอแนะ

1. ควรเพิ่มจำนวนกลุ่มตัวอย่างและแหล่งพื้นที่กระจายตัวของยุงกลุ่มที่ศึกษามาทดสอบการจำแนกชนิด เพื่อตรวจสอบและยืนยันความเสถียรและประสิทธิภาพของ allele-specific primer ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้
2. การเก็บตัวอย่างยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus จากแหล่งพื้นที่กระจายตัวควรเป็นช่วงการกระจายพันธุ์ของยุงก้นปล่อง และเก็บตัวอย่างในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมกับยุงแต่ละชนิด
3. การออกแบบไพรเมอร์ในการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus ควรออกแบบให้จำเพาะต่อยุงทุกชนิดในกลุ่มซับซ้อนเพื่อความแม่นยำและประสิทธิภาพในการจำแนกชนิดก้นปล่อง
4. ควรมีการทดสอบ Limit of Detection ในการหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ด้วยเทคนิค PCR

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

คณะเทคนิคการแพทย์. 2536. ทฤษฎีและการประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR technology.

พิมพ์ครั้งที่ 1 สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.

นิรนาม. ม.ป.ป. ยุงพาหะ (Mosquito vectors). แหล่งที่มา: <http://www.mcf-service.com/mosquito.htm>, 10 ตุลาคม 2556.

ปาริชาติ ศรีจำเริญ. 2547. การประเมินค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างไก่พื้นเมืองไทย (*Gallus gallus domesticus*) ด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์-พีซีอาร์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภาควิชาพันธุศาสตร์. 2542. การฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเทคนิคพื้นฐานทางพันธุวิศวกรรม. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วิเศษฐ์ ลีลามานิตย์. 2550. เทคนิคชีวเคมีขั้นสูง: การวิจัยทางเภสัชศาสตร์และการพัฒนาาใหม่. พิมพ์ครั้งที่ 1 บริษัท พี.เอส.พรินท์, นนทบุรี.

ศกลวรรณ ประสิทธิ์วิไล. 2547. การหาลำดับเบสและเปรียบเทียบยีน Ca-ATPase ในข้าว *Oryza sativa* พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กับพืชชนิดอื่น. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรินทร์ ปิยโชคนากุล. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. พิมพ์ครั้งที่ 1 สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อมรา คัมภีรานนท์. 2542. พันธุศาสตร์มนุษย์. พิมพ์ครั้งที่ 1 บริษัท เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัลพับลิเคชั่น จำกัด, กรุงเทพฯ.

อุทัยรัตน์ ณ นคร. 2543. พันธุศาสตร์สัตว์น้ำ. พิมพ์ครั้งที่ 2 สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Alberts, B., D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and P. Walter. 2004.
Essential Cell Biology. 2nd Ed. Garland Science, New York.

Awise, J.C. 1994. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. Chapman and Hall,
 New York.

Baimai, V. 1989. Speciation and species complexes of the *Anopheles* malaria vector in Thailand,
 pp. 146-162. **In Proceeding of the 3rd conference on malaria research
 18-20 October**. Chaingmai University, Thailand.

Boore, J.L. 1999. Survey and summary animal mitochondrial genomes. **Nucleic Acids Res** 27:
 1767-1780.

_____, R. G. Andre, B. A. Harrison and L. Somchit. 1981. Karyotype differentiation of three
Anopheles taxa in the *balabacensis* complex of Southeast Asia (Diptera: Culicidae).
Genetica 89: 157-166.

_____, R.G. Andre, B.A. Harison, U. Kijchalao and L. Panthusiri. 1987. Crossing and
 chromosomal evidence for two additional sibling species within the taxon *Anopheles*
dirus (Diptera: Culicidae) in Thailand. **Proceeding of the Entomological Society of
 Washington** 89: 157-166.

_____, U. Kijchalao, P. Sawadwongporn and C. A. Green. 1988a. Geographic distribution and
 biting behaviour of four species of the *Anopheles dirus* complex (Diptera: Culicidae) in
 Thailand. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health** 19: 151-
 161.

_____, R. E. Harbach and U. Kijchalao. 1988b. Cytogenetic evidence of a fifth species within
 the taxon *Anopheles dirus* (Diptera: Culicidae) in Thailand. **Journal of the American
 Mosquito Control Association** 4: 333-338.

- Chareonviriyaphap, T., B. Aum-aung and S. Ratanatham. 1999. Current insecticide resistance patterns in mosquito vectors in Thailand. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health** 30(1): 184-194.
- Crooijmans, R. M. A., A. B. F. Groen, A. J. van Kampen, S. van der Beek, J. J. van der Poel and M. A. M. Groenen. 1996. Microsatellite polymorphism in commercial broiler and layer lines estimated using pooled blood samples. **Poultry Science** 75: 904-909.
- Cuong do, M., N.T. Van, Q. Tao le, T.L. Chau, N. Anh le, N.X. Thanh and R.D. Cooper. 2008. Identification of *Anopheles minimus* complex and related species in Vietnam. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health** 39(5):827-831.
- Dusfour I., J. Blondeau. R.E. Harbach, I Vythilingham, V. Baimai, H. D. Trung, T. Sochant, M. J. Bangs and S. Manguin. 2007. Polymerase chain reaction identification of three members of the *Anopheles sundaicus* (Diptera: Culicidae) complex, malaria vectors in Southeast Asia. **Journal of Medical Entomology** 44(5): 723-731.
- Garros, C., L. Coetzee, M. Coosemans and S. Manguin. 2004a. A single multiplex assay to identify major malaria vectors within the African and Asian malaria vectors within the *Anopheles funestus* and *An. minimus* groups. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 70: 583-590.
- _____, L. Koekemoer, L. Kamau, T. S. Awolola, W. Van Bortel, M, Coetzee, M. Coosemans and S. Manguin. 2004b. Restriction fragment length polymorphism method for the identification of major African and Asian malaria vectors within the *Anopheles funestus* and *An. minimus* groups. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 70: 260-265.

- Garros, C., W. Van Bortel, H. D. Trung, M. Coosemans and S. Manguin. 2006. Review of the Minimus Complex of *Anopheles*, main malaria vector in Southeast Asia: from taxonomic issues to vector control strategies. **Tropical Medicine and International Health** 11(1): 102-114.
- Green, C.A., L.E. Munstermann, S.G. Tan, S. Panyim and V. Baimai. 1992. Population genetic evidence for species A, B, C and D of the *Anopheles dirus* complex in Thailand and enzyme electromorphs for their identification. **Medical and Veterinary Entomology** 6: 29-36.
- _____, R.F. Gass, L.E. Munstermann and V. Baimai. 1990. Population genetic evidence for two species in *Anopheles minimus* in Thailand. **Medical and Veterinary Entomology** 4: 25-34.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Window 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series** 41: 95-98.
- Harbach, R.E. 2004. The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. **Bulletin of Entomological Research** 94: 537-553.
- Huong, N. T., P. Sonthayanon, A. J. Ketterman and S. Panyim. 2001. A Rapid polymerase chain reaction based method for identification of the *Anopheles dirus* sibling species. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health** 32: 615-620.
- Huang, X. and A. Madan. 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research** 9: 868-877.

- Karp, A. and K.T. Edwards. 1997. DNA marker: a global overview. pp 1-13 In G. Caetano-Anolles and P.M. Gresshoff (eds). **DNA Marker Protocols, Applications And Overviews**. Wiley-Liss Inc., New York.
- Kobayashi, J., S. Phompida, T. Toma, S. Looareensuwan, H. Toma and I. Miyagi. 2004. The effectiveness of impregnated bed net in malaria control in Laos. **Acta Tropica** 89(3): 299-308.
- Manonmani, A. M., H. Townson, T. Adeniran, P. Jambulingam, S. Saha and T. Vijayakumar. 2001. rDNA-ITS2 polymerase chain reaction assay for the sibling species of *Anopheles fluviatilis*. **Acta Tropica**. 78: 3-9.
- Manguin, S., C. Garros, I. Dusfour, R. E. Harbach and M. Coosemans. 2008b. Bionomics, taxonomy, and distribution of major malaria vector taxa of *Anopheles* subgenus *Cellia* in Southeast Asia: An updated review. **Infection Genetics and Evolution**. 8: 489-503.
- Manguin, S., P. Carnevale and J. Mouchet. 2008a. **Biodiversity of Malaria in the World**. John Libbey Eurotext, France.
- _____, P. Kengne, L. Sonnier, L. R. E. Harbach, V. Baimai, H. D. Trung and M. Coosemans. 2002. SCAR markers and multiplex PCR-based identification of isomorphic species in the *Anopheles dirus* complex in Southeast Asia. **Asian Medical Veterinary Entomology** 16: 46-54.
- Mehlotra, R.K. and P.A. Zimmerman. 2006. Resistance to antimalarial drugs: parasite and host genetic factors. In K.R. Dronamraju and P. Arese, eds. **Malaria: Genetic and Evolutionary Aspects**. Springer, New York.

- Meyer, A. 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. *In* P.W. Hochachka and T.P. Monnsen (ed.). **Molecular Biology Frontiers**. Elsevier Science Publishers, Netherlands.
- _____. 1994. DNA technology and phylogeny of fish. *In* A.R. Beaumont (ed.). **Genetic and Evolution of Aquatic Organisms**. Chapman & Hall, London.
- Monthathong, M. 2006. Identification of the *Anopheles dirus* species complex in Thailand using rDNA ITS2 Allele specific PCR (ASPCR) and Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) Markers. **KKU Research Journal** 11(3): 180-190.
- O' Loughlin, S.M., P. Somboon and C. Walton. 2007. High levels of population structure caused by habitat islands in malarial vector *Anopheles scanloni*. **Heredity** 99: 31-40.
- Oo, T.T., V. Storch and N. Becker. 2002. Studies on the bionomics of *Anopheles dirus* (Culicidae: Diptera) in Mudon, Mon State, Myanmar. *Journal of Vector Ecology* 27: 44-54.
- Peyton, E. L. 1989. A new classification for the Leucophyrus Group of *Anopheles* (*Cellia*). **Mosquito Systematics** 21: 197-205.
- _____ and B. A. Harison. 1979. *Anopheles* (*Cellia*) *dirus*, a new species of the Leucosphyrus group from Thailand (Diptera: Culicidae). **Mosquito System** 11: 40.
- _____ and B. A. Harison. 1980. *Anopheles* (*Cellia*) *takasagoensis* Morishita 1946, an additional species in the Balabacensis complex of Southeast Asia (Diptera: Culicidae). **Mosquito Systematics** 12: 335-347.

- Peyton, E. L. and S. Ramalingam. 1988. *Anopheles (Cellia) nemophilous*, a new species of the Leucophyrus Group from peninsular Malaysia and Thailand (Diptera: culicidae). **Mosquito Systematics** 20: 272-299.
- Phuc, H.K., A.J. Ball, L. Son, N.V. Hanh, N.D. Tu, N.G. Lien, A. Verardi and H. Townson. 2003. Multiplex PCR assay for malaria vector *Anopheles minimus* and four related species in the Myzomyia Series from Southeast Asia. **Medical and Veterinary Entomology** 17(4): 423-428.
- Phunngam, P. 2012. **Population genetic study of *Anopheles harrisoni* (Diptera: Culicidae) and sequence-based multilocus phylogenetic reconstruction of malaria vectors in Thailand**. M.E. Thesis, Kasetsart University.
- Poopitayasataporn, A. and V. Baimai. 1995. Polytene chromosome relationships of five species of the *Anopheles dirus* complex in Thailand. **Genome** 38: 426-434.
- Prapanthadara, L., S. Koottathep, N. Promtet, W. Suwonkerd, A.J. Ketterman and P. Somboon. 2000. Correlation of glutathione S-transferase and DDT dehydrochlorinase activities with DDT susceptibility in *Anopheles* and *Culex* mosquitos from northern Thailand. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health** 31(Supplement 2): 111-118.
- Prasittisuk, M., C. Prasittisuk, V. Pothichiti, B. Aum-aung and P. Mongklankul. 1996. The effect of pyrethroid impregnated mosquito nets on field malaria vector population in experimental huts and in individual local houses. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health** 27(3): 610-616.
- Prakash, A., C. Walton, D. R. Bhattacharaya, S. M. O'Loughlin, P. K. Mohapatra and J. Mahanta. 2006. Molecular characterization and species identification of *Anopheles dirus* and *An. minimus* complexes in northeast India using rDNA ITS2. **Acta Tropica** 100: 156-161.

- Prakash, A., D. R. Bhattacharyya, P. K. Mohapatra and J. Mahanta. 2002. Physicochemical characteristics of breeding habitats of *Anopheles dirus* (Diptera: Culicidae) in Assam, India. **Journal of Environmental Biology** 23: 95-100.
- _____, D. K. Sarma, D. R. Bhattacharyya, P. K. Mohapatra, K. Bhattacharjee, K. Das and J. Mahanta. 2010. Spatial distribution and r-DNA second internal transcribed spacer characterization of *Anopheles dirus* (Diptera: Culicidae) complex species in northeast India. **Acta Tropica** 114: 49-54.
- Rattanarithikul, R. and P. Panthusiri. 1994. Illustrated keys to the medically important mosquitoes of Thailand. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health** 25(Supplement 1):1-66.
- _____, B. A. Harrison, R. E. Harbarch, P. Panthusiri and R. E. Coleman. 2006. Illustrated keys to the mosquitoes of Thailand IV. *Anopheles*. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health** 37(Supplement 2):1-128.
- _____, E. Konishi and K. J. Linthicum. 1996. Detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* circumsporozoite antigen in anopheline mosquitoes collected in southern Thailand. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 54: 114-121.
- Rich, S. M. and F. J. Ayala. 2006. Evolutionary origins of human malaria parasites, pp. 125-146. In K.R. Dronamraju and P. Arese, eds. **Malaria: Genetic and Evolutionary Aspects**. Springer, New York.
- Sallum, M. A., E. L. Peyton and R.C. Wilkerson. 2005. Six new species of the *Anopheles leucosphyrus* group, reinterpretation of *An. elegans* and vector implications. **Medical and Veterinary Entomology** 19: 158-199.

Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. **Molecular Cloning A Laboratory Manual.**

V.1,2, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.**

2nd ed. Cold Spring Harbour Press, New York. p553.

Sarma, D.K., A. Prakash, S.M. O'Loughlin, D.R. Bhattacharyya, P.K. Mohapatra, K.

Bhattacharjee, K. Das, S. Singh, N.P. Sarma, G.U. Ahmed, C. Walton and J. Mahanta.

2012. Genetic population structure of the malaria vector *Anopheles baimaii* in north-east India using mitochondrial DNA. **Malaria Journal** 11:1-76.

Sealey, P. G. and M. Southern. 1990. Gel electrophoresis of DNA. pp. 51-98. In D. D. Rickl and

B. D. Hames (eds.). **Nucleic Acid: A Practical Approach.** 2^d ed. Oxford University Press, Oxford.

Singh, O. P., N. Nanda, V. Dev, P. Bali, M. Sohali, A. Mehrunnisa, T. Adak and A.P. Dash. 2010.

Molecular evidence of misidentification of *Anopheles minimus* as *Anopheles fluviatilis* in Assam (India). **Acta Tropica** 113: 241-244.

Sun, H., W. Hong-Tao, K. Woo-Saeng, K. Yeon-Ju, I. Jun-Gyo and Y. Deok-Chun. 2011. A

simple and rapid technique for the authentication of the ginseng cultivar, Yunpoong, using an SNP marker in a large sample of ginseng leaves. **Gene** 487: 75-79.

Tananchai, C., R. Tisgratog, W. Juntarajumnong, J.P. Grieco, S. Manguin, A. Prabaripai and T.

Chareonviriyaphap. 2012. Species diversity and biting activity of *Anopheles dirus* and *Anopheles baimaii* (Diptera: Culicidae) in a malaria prone area of western Thailand.

Parasites and Vectors 5: 211.

- Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research** 22: 4673-4680.
- Tuppen, H. A. L., E. L. Blakely, D.M. Turnbull and R.W. Taylor. 2010. Mitochondrial DNA mutations and human disease. **Biochimica et Biophysica Acta** 1797: 113-128.
- Ugozzoli, L and R. B. Wallace. 1991. Allele specific polymerase chain reaction. **Methods: A companion to Medthods in Enzymology** 2: 42-48.
- Van Bortel, W., H. D. Trung, N. D. Manh, P. Roelants, P. Verle and M. Coosemans. 1999. Identification of two species within the *Anopheles minimus* complex in northern Veitnam and their behavioural divergences. *Tropical Medicine and International Health* 4: 257-265.
- _____, H. D. Trung, P. Roelants, R. E. Harbach, T. Backeljau and M. Coosemans. 2000. Molecular identification of *Anopheles minimus* s.l. beyond distinguishing the members of the species complex. *Insect Molecular Biology* 9: 335-340.
- _____, R. E. Harbach, H. D. Trung, P. Roelants, T. Backeljau and M. Coosemans. 2001. Conformation of *Anopheles varuna* in Vietnam, previously misidentified and mistargeted as the malaria vector *Anopheles minimus*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 65(6): 729-732.
- Walton, C., J. M. Handley, C. Kuvangkadilok, F. H. Collins, R. E. Harbach, V. Baimai and R. K. Bullin. 1999a. Identification of five species of the *Anopheles dirus* complex from Thailand, of the allele specific polymerase chain reaction. **Medical and Veterinary Entomology** 13: 24-32.

- Walton, C., R.G. Sharpe, S. J. Pritchard, N.J. Thelwell and R.K. Butlin. 1999b. Molecular identification of mosquito species. *Biological Journal of the Linnean Society* 68: 241-256.
- Walton, C., J. M. Handley, W. Tun-Lin, F.H. Collins, R.E. Harbach, V. Baimai and R.K. Butlin. 2000. Population structure and population history of *Anopheles dirus* mosquitoes in Southeast Asia. *Molecular Biology and Evolution* 17(6): 692-974.
- Wilkins, E. E., I. H. Paul and M. Q. Bénédict. 2006. IMP PCR primer detect single nucleotide polymorphisms for *Anopheles gambiae* species identification, Mopti and Savanna rDNA Types, and resistance to dieldrin in *Anopheles arabiensis*. **Malaria Journal** 5: 125.
- World Health Organization. 2008. **World malaria report 2008**. WHO Press, Switzerland.
- _____. 2009. **World malaria report 2009**. WHO Press, Switzerland.
- _____. 2011. **World malaria report 2011**. WHO Press, Switzerland.
- Xu, J. N. and F. Y. Qu. 1997. Ribosomal DNA difference between species A and D of the *Anopheles dirus* complex of mosquitoes from China. *Medical and Veterinary Entomology* 11: 134-138.
- Yoko, S. and S.I. Chigusa. 1991. Mitochondrial DNA in *Drosophila*: the genetics and evolution. pp. 117-137. In M. Kimura and N. Takahata (eds.). **New aspects of the genetics of Molecular evolution**. Japan scientific societies press, Japan.





ตารางผนวกที่ ก1 ผลการจำแนกชนิดและแหล่งที่มาของตัวอย่างยุงก้นปล่อง

หมายเลข	ละติจูด, ลองจิจูด	สถานที่	รหัส	การระบุชนิด	
				ฐานฐานวิทยา	เครื่องหมายดีเอ็นเอ
1	18 ° 80 'N 98 ° 95'E	ห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยา ม. เชียงใหม่	0902-1	<i>An. cracens</i>	<i>An. cracens</i>
2	18 ° 80 'N 98 ° 95'E	ห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยา ม. เชียงใหม่	0902-2	<i>An. cracens</i>	<i>An. cracens</i>
3	18 ° 80 'N 98 ° 95'E	ห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยา ม. เชียงใหม่	0902-3	<i>An. cracens</i>	<i>An. cracens</i>
4	18 ° 80 'N 98 ° 95'E	ห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยา ม. เชียงใหม่	0902-4	<i>An. cracens</i>	<i>An. cracens</i>
5	18 ° 80 'N 98 ° 95'E	ห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยา ม. เชียงใหม่	0902-5	<i>An. cracens</i>	<i>An. cracens</i>
6	18 ° 80 'N 98 ° 95'E	ห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยา ม. เชียงใหม่	0902-6	<i>An. cracens</i>	<i>An. cracens</i>
7	18 ° 80 'N 98 ° 95'E	ห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยา ม. เชียงใหม่	0902-7	<i>An. cracens</i>	<i>An. cracens</i>
8	18 ° 80 'N 98 ° 95'E	ห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยา ม. เชียงใหม่	0902-8	<i>An. cracens</i>	<i>An. cracens</i>
9	18 ° 80 'N 98 ° 95'E	ห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยา ม. เชียงใหม่	0902-9	<i>An. cracens</i>	<i>An. cracens</i>
10	18 ° 80 'N 98 ° 95'E	ห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยา ม. เชียงใหม่	0902-10	<i>An. cracens</i>	<i>An. cracens</i>

ตารางผนวกที่ ก1 (ต่อ)

หมายเลข	ละติจูด, ลองจิจูด	สถานที่	รหัส	การระบุชนิด	
				ฐานฐานวิทยา	เครื่องหมายดีเอ็นเอ
11	18 ° 80 'N 98 ° 95'E	ห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยา ม. เชียงใหม่	0902-11	<i>An. cracens</i>	<i>An. cracens</i>
12	18 ° 80 'N 98 ° 95'E	ห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยา ม. เชียงใหม่	0902-12	<i>An. cracens</i>	<i>An. cracens</i>
13	18 ° 80 'N 98 ° 95'E	ห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยา ม. เชียงใหม่	0902-13	<i>An. cracens</i>	<i>An. cracens</i>
14	18 ° 80 'N 98 ° 95'E	ห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยา ม. เชียงใหม่	0902-14	<i>An. cracens</i>	<i>An. cracens</i>
15	18 ° 80 'N 98 ° 95'E	ห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยา ม. เชียงใหม่	0902-15	<i>An. cracens</i>	<i>An. cracens</i>
16	18 ° 80 'N 98 ° 95'E	ห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยา ม. เชียงใหม่	0902-16	<i>An. cracens</i>	<i>An. cracens</i>
17	18 ° 80 'N 98 ° 95'E	ห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยา ม. เชียงใหม่	0902-17	<i>An. cracens</i>	<i>An. cracens</i>
18	18 ° 80 'N 98 ° 95'E	ห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยา ม. เชียงใหม่	0902-18	<i>An. cracens</i>	<i>An. cracens</i>
19	18 ° 80 'N 98 ° 95'E	ห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยา ม. เชียงใหม่	0902-19	<i>An. cracens</i>	<i>An. cracens</i>
20	18 ° 80 'N 98 ° 95'E	ห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยา ม. เชียงใหม่	0902-20	<i>An. cracens</i>	<i>An. cracens</i>

ตารางผนวกที่ ก1 (ต่อ)

หมายเลข	ละติจูด, ลองจิจูด	สถานที่	รหัส	การระบุชนิด	
				ฐานวิทยานว	เครื่องหมายดีเอ็นเอ
21	14°17'N, 99°11'E	ตำบลท่าเสา อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี	0919-1	<i>An. dirus</i>	<i>An. cracens</i>
22	07°03'N 99°93'E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-1	<i>An. scanloni</i>	<i>An. scanloni</i>
23	07°03'N 99°93'E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-2	<i>An. scanloni</i>	<i>An. scanloni</i>
24	07°03'N 99°93'E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-3	<i>An. scanloni</i>	<i>An. scanloni</i>
25	07°03'N 99°93'E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-4	<i>An. scanloni</i>	<i>An. scanloni</i>
26	07°03'N 99°93'E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-5	<i>An. scanloni</i>	<i>An. scanloni</i>
27	07°03'N 99°93'E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-6	<i>An. baibaii</i>	<i>An. scanloni</i>
28	07°03'N 99°93'E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-7	<i>An. baimaii</i>	<i>An. scanloni</i>
29	07°03'N 99°93'E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-8	<i>An. baimaii</i>	<i>An. scanloni</i>
30	07°03'N 99°93'E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-9	<i>An. scanloni</i>	<i>An. scanloni</i>

ตารางผนวกที่ ก1 (ต่อ)

หมายเลข	ละติจูด, ลองจิจูด	สถานที่	รหัส	การระบุชนิด	
				สัณฐานวิทยา	เครื่องหมายดีเอ็นเอ
31	07°03' N 99°03'E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-10	<i>An. baimaii</i>	<i>An. scanloni</i>
32	07°03' N 99°03'E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-11	<i>An. scanloni</i>	<i>An. scanloni</i>
33	07°03' N 99°03'E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-12	<i>An. baimaii</i>	<i>An. scanloni</i>
34	07°03' N 99°03'E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-13	<i>An. scanloni</i>	<i>An. scanloni</i>
35	07°03' N 99°03'E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-14	<i>An. scanloni</i>	<i>An. scanloni</i>
36	07°03' N 99°03'E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-15	<i>An. baimaii</i>	<i>An. scanloni</i>
37	07°03' N 99°03'E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-16	<i>An. baimaii</i>	<i>An. scanloni</i>
38	07°03' N 99°03'E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-17	<i>An. scanloni</i>	<i>An. scanloni</i>
39	07°03' N 99°03'E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-18	<i>An. scanloni</i>	<i>An. scanloni</i>
40	07°03' N 99°03'E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-19	<i>An. baimaii</i>	<i>An. scanloni</i>

ตารางผนวกที่ ก1 (ต่อ)

หมายเลข	ละติจูด, ลองจิจูด	สถานที่	รหัส	การระบุชนิด	
				ฐานวิทยาน	เครื่องหมายดีเอ็นเอ
41	07°03' N 99°03' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-20	<i>An. baimaii</i>	<i>An. scanloni</i>
42	07°03' N 99°03' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-21	<i>An. scanloni</i>	<i>An. scanloni</i>
43	07°03' N 99°03' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-22	<i>An. scanloni</i>	<i>An. scanloni</i>
44	07°03' N 99°03' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-23	<i>An. baimaii</i>	<i>An. scanloni</i>
45	07°03' N 99°03' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-24	<i>An. baimaii</i>	<i>An. scanloni</i>
46	07°03' N 99°03' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-25	<i>An. baimaii</i>	<i>An. scanloni</i>
47	07°03' N 99°03' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-26	<i>An. scanloni</i>	<i>An. scanloni</i>
48	07°03' N 99°03' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-27	<i>An. baimaii</i>	<i>An. scanloni</i>
49	07°03' N 99°03' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-28	<i>An. scanloni</i>	<i>An. scanloni</i>
50	07°03' N 99°03' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-29	<i>An. scanloni</i>	<i>An. scanloni</i>

ตารางผนวกที่ ก1 (ต่อ)

หมายเลข	ละติจูด, ลองจิจูด	สถานที่	รหัส	การระบุชนิด	
				ฐานวิทยาน	เครื่องหมายดีเอ็นเอ
51	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-30	<i>An. scanloni</i>	<i>An. scanloni</i>
52	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-31	<i>An. scanloni</i>	<i>An. scanloni</i>
53	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-32	<i>An. scanloni</i>	<i>An. scanloni</i>
54	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-33	<i>An. scanloni</i>	<i>An. scanloni</i>
55	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-34	<i>An. baimaii</i>	<i>An. scanloni</i>
56	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-35	<i>An. baimaii</i>	<i>An. scanloni</i>
57	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-36	<i>An. baimaii</i>	<i>An. scanloni</i>
58	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-37	<i>An. baimaii</i>	<i>An. scanloni</i>
59	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-38	<i>An. scanloni</i>	<i>An. scanloni</i>
60	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-39	<i>An. baimaii</i>	<i>An. scanloni</i>

ตารางผนวกที่ ก1 (ต่อ)

หมายเลข	ละติจูด, ลองจิจูด	สถานที่	รหัส	การระบุชนิด	
				ฐานวิทยาน	เครื่องหมายดีเอ็นเอ
61	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-40	<i>An. scanloni</i>	<i>An. scanloni</i>
62	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-41	<i>An. scanloni</i>	<i>An. scanloni</i>
63	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-42	<i>An. scanloni</i>	<i>An. scanloni</i>
64	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-43	<i>An. scanloni</i>	<i>An. scanloni</i>
65	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-44	<i>An. baimaii</i>	<i>An. scanloni</i>
66	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-45	<i>An. scanloni</i>	<i>An. scanloni</i>
67	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-46	<i>An. baimaii</i>	<i>An. scanloni</i>
68	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-47	<i>An. scanloni</i>	<i>An. scanloni</i>
69	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-48	<i>An. baimaii</i>	<i>An. scanloni</i>
70	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-49	<i>An. scanloni</i>	<i>An. scanloni</i>

ตารางผนวกที่ ก1 (ต่อ)

หมายเลข	ละติจูด, ลองจิจูด	สถานที่	รหัส	การระบุชนิด	
				ฐานวิทยาน	เครื่องหมายดีเอ็นเอ
71	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-50	<i>An. baimaii</i>	<i>An. scanloni</i>
72	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-51	<i>An. baimaii</i>	<i>An. scanloni</i>
73	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-52	<i>An. scanloni</i>	<i>An. scanloni</i>
74	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-53	<i>An. scanloni</i>	<i>An. scanloni</i>
75	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-54	<i>An. baimaii</i>	<i>An. scanloni</i>
76	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-55	<i>An. baimaii</i>	<i>An. scanloni</i>
77	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-56	<i>An. baimaii</i>	<i>An. scanloni</i>
78	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-57	<i>An. baimaii</i>	<i>An. scanloni</i>
79	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-58	<i>An. baimaii</i>	<i>An. scanloni</i>
80	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-59	<i>An. baimaii</i>	<i>An. scanloni</i>

ตารางผนวกที่ ก1 (ต่อ)

หมายเลข	ละติจูด, ลองจิจูด	สถานที่	รหัส	การระบุชนิด	
				ฐานวิทยาน	เครื่องหมายดีเอ็นเอ
81	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-60	<i>An. scanloni</i>	<i>An. scanloni</i>
82	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-61	<i>An. scanloni</i>	<i>An. scanloni</i>
83	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-62	<i>An. scanloni</i>	<i>An. scanloni</i>
84	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-63	<i>An. scanloni</i>	<i>An. scanloni</i>
85	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-64	<i>An. scanloni</i>	<i>An. scanloni</i>
86	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-65	<i>An. scanloni</i>	<i>An. scanloni</i>
87	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-66	<i>An. baimaii</i>	<i>An. scanloni</i>
88	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-67	<i>An. scanloni</i>	<i>An. scanloni</i>
89	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-68	<i>An. baimaii</i>	<i>An. scanloni</i>
90	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-69	<i>An. baimaii</i>	<i>An. scanloni</i>

ตารางผนวกที่ ก1 (ต่อ)

หมายเลข	ละติจูด, ลองจิจูด	สถานที่	รหัส	การระบุชนิด	
				ฐานวิทยาน	เครื่องหมายดีเอ็นเอ
91	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-70	<i>An. baimaii</i>	<i>An. scanloni</i>
92	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-71	<i>An. scanloni</i>	<i>An. scanloni</i>
93	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-72	<i>An. baimaii</i>	<i>An. scanloni</i>
94	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-73	<i>An. baimaii</i>	<i>An. scanloni</i>
95	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-74	<i>An. scanloni</i>	<i>An. scanloni</i>
96	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-75	<i>An. scanloni</i>	<i>An. scanloni</i>
97	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-76	<i>An. scanloni</i>	<i>An. scanloni</i>
98	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-77	<i>An. scanloni</i>	<i>An. scanloni</i>
99	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-78	<i>An. baimaii</i>	<i>An. scanloni</i>
100	07°03' N 99°93' E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-79	<i>An. baimaii</i>	<i>An. scanloni</i>

ตารางผนวกที่ ก1 (ต่อ)

หมายเลข	ละติจูด, ลองจิจูด	สถานที่	รหัส	การระบุชนิด	
				ฐานฐานวิทยา	เครื่องหมายดีเอ็นเอ
101	07°03' N 99°93'E	ตำบลปาล์มพัฒนา อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล	1018-80	<i>An. baimaii</i>	<i>An. scanloni</i>
102	10°04' N 98°80'E	ตำบลละอุ่นเหนือ อำเภอละอุ่น จังหวัดระนอง	1217-1	<i>An. baimaii</i>	<i>An. nemophilous</i>
103	14°17' N, 99°11'E	ตำบลท่าเสา อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี	1219-1	<i>An. dirus</i>	<i>An. nemophilous</i>
104	14°17' N, 99°11'E	ตำบลท่าเสา อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี	1219-2	<i>An. dirus</i>	<i>An. nemophilous</i>
105	14°17' N, 99°11'E	ตำบลท่าเสา อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี	1219-3	<i>An. dirus</i>	<i>An. nemophilous</i>

หมายเหตุ 0902-() หมายถึง ยุงก้นปล่อง *An. cracens* จาก อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ () คือ ลำดับตัวอย่าง

0919-() หมายถึง ยุงก้นปล่อง *An. cracens* จาก อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี () คือ ลำดับตัวอย่าง

1018-() หมายถึง ยุงก้นปล่อง *An. scanloni* จาก อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล () คือ ลำดับตัวอย่าง

1217-() หมายถึง ยุงก้นปล่อง *An. nemophilous* จาก อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล () คือ ลำดับตัวอย่าง

1219-() หมายถึง ยุงก้นปล่อง *An. nemophilous* จาก อำเภออำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี () คือ ลำดับตัวอย่าง



การออกแบบไพรเมอร์

การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR สิ่งสำคัญที่ต้องพิจารณา คือ ต้องมีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มากพอสำหรับการเลือกออกแบบคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม เนื่องจากไพรเมอร์ที่ออกแบบต้องสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ด้วยปฏิกิริยา PCR และให้ขนาด PCR product ตามที่ต้องการ หากทำการออกแบบไพรเมอร์ได้ไม่ถูกต้องและเหมาะสม จะทำให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ด้วยปฏิกิริยา PCR และได้ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะ (non-specific band) หรือมีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอมากกว่า 1 แถบ

หลักเกณฑ์สำคัญในการพิจารณาสำหรับการออกแบบไพรเมอร์ คือ

1. ไพรเมอร์ ควรมีความยาวประมาณ 17-24 นิวคลีโอไทด์ และมีองค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์ G และ C ประมาณ 40-60% ถ้าไพรเมอร์มีขนาดสั้นเกินไป อาจเกิดการจับคู่กับชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ใช่บริเวณเป้าหมาย และให้ขนาด PCR product ไม่ได้ขนาดตามต้องการ
2. ไพรเมอร์ควรมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นนิวคลีโอไทด์คู่สมกับบริเวณปลาย 3' ของดีเอ็นเอเป้าหมายในแต่ละสายของดีเอ็นเอต้นแบบ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ควรมีความจำเพาะซึ่งไม่พบที่บริเวณอื่นของสายดีเอ็นเอต้นแบบ คือสามารถจับและทำให้เกิด stable duplex ที่ตำแหน่งจำเพาะของดีเอ็นเอเป้าหมายในสถานะที่เหมาะสม
3. ไพรเมอร์ควรมีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณปลาย 3' ของคู่ไพรเมอร์ที่ไม่เกิดเบสคู่สมกัน เพื่อป้องกันการเกิด primer-dimer ซึ่งจะทำได้ผลิต PCR ไม่ได้ขนาดตามที่ต้องการ
4. ไพรเมอร์ควรมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีลักษณะของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณปลายทั้ง 2 ข้าง เป็นคู่สมกัน (palindrome sequence) เพื่อป้องกันการเกิดโครงสร้างทุติยภูมิของไพรเมอร์ทำให้ไพรเมอร์ไม่สามารถจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายได้
5. ความเข้มข้นสุดท้ายที่เหมาะสมของไพรเมอร์ควรอยู่ในช่วง 0.1-1 μM เพราะถ้ามีไพรเมอร์มากเกินไป จะเป็นการเพิ่มโอกาสในการเกิด mispriming และ primer-dimer มากขึ้น

6. ไพรมเมอร์ควรมี ค่า T_m 50-70% เพื่อให้เหมาะสมกับอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอนการรวมตัว (Annealing Temperature) และควรออกแบบให้คู่ไพรมเมอร์ มีค่า T_m เท่ากันหรือใกล้เคียงกัน การหาค่า T_m โดยปกติสามารถคำนวณได้จากสูตร

$$T_m = ((4x (G+C) + (2x (A+T)))^{\circ}C$$

โดยที่ (G+C) เป็นจำนวนของนิวคลีโอไทด์ G และ C ส่วน (A+T) เป็นจำนวนของนิวคลีโอไทด์ A และ T (ศกถาวรณ, 2547; สุรินทร์, 2552)



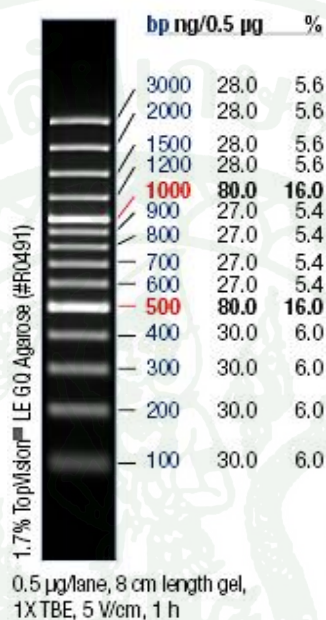
การแยกขนาดของดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

อิเล็กโทรโฟรีซิสเป็นเทคนิคที่ใช้แยกขนาดโมเลกุลของสารที่มีประจุออกจากกันในสนามไฟฟ้าในเจลอะกาโรส แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ โดยอาศัยหลักการว่าโมเลกุลของเอธิเดียมโบรไมด์จะเข้าไปแทรกอยู่ในดีเอ็นเอเกลียวคู่และเมื่อนำไปตรวจสอบผลภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต จะเกิดการเรืองแสงโดยความเข้มของแสงจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณดีเอ็นเอเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบปริมาณแล้ว สามารถบอกปริมาณดีเอ็นเอได้ในระดับนาโนกรัม การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีนี้ยังสามารถบอกคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้ว่ามีการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอหรือไม่และดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดโมเลกุลเท่าใดมีการแตกหักของโมเลกุลมากน้อยเพียงใด (ภาควิชาพันธุศาสตร์, 2542) ซึ่งมีวิธีการดังนี้

1. เตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งผงอะกาโรส 1.5 กรัม เติมน้ำบัฟเฟอร์ 0.5X TAE ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
2. หลอมอะกาโรสโดยใช้ไมโครเวฟและเขย่าเป็นครั้งคราวให้ผงอะกาโรสละลายจนหมด
3. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส แล้วเทลงในถาดเตรียมเจลที่วางซี่หวี (comb) เพื่อให้เกิดช่องสำหรับเติมตัวอย่าง รอนจนเจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที
4. ดึงซี่หวีออก นำเจลวางลงในตำแหน่งที่กำหนดของเครื่องสำหรับทำอิเล็กโทรโฟรีซิส เติมน้ำ 0.5X TAE ให้ท่วมเจล
5. ผสมสารละลายดีเอ็นเอ 3 ไมโครลิตรผสมกับ 6X loading dye 1 ไมโครลิตร แล้วหยอดลงในช่องเจลที่เตรียมไว้
6. ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าคงที่ 50 โวลต์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

7. ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์นาน 10 นาที แล้วล้างเอธิเดียมโบรไมด์ส่วนเกินบนเจลด้วยน้ำประมาณ 5-10 นาที

8. นำแผ่นเจลไปตรวจสอบผลภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต แล้วทำการบันทึกภาพ



ภาพผนวกที่ ค1 แถบดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษา GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas LIFE SCIENCES, USA)



การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

1. 0.5X buffer (1000 ml)

50XTAE buffer	10 ml
ddH ₂ O	990 ml

2. 1.5% agarose

Agarose	1.5 g
0.5XTAE	100 ml

3. 6x Loading dye (10 ml)

0.25% Bromphenal blue
0.25% Xylene cyanol
30% glycerol in water

ตัวอย่างการเตรียม 6X loading dye 10 มิลลิลิตร มีส่วนประกอบดังนี้

bromphenal blue	25 mg
Xylene cyanol	25 mg
30 % glycerol in water	3.3 ml
ddH ₂ O	6.7 ml

เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4. Ethidium bromide (10 mg/100 ml)

Ethidium bromide	10 mg
ddH ₂ O	100 ml

5. สารเคมีในการทำผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์ด้วยเอนไซม์ Exonuclease I และ Fast APTM

Thermosensitive alkaline phosphatase (Fermentas LIFE SCIENCES, USA)

Exonuclease (20 U/ μ l)	2.5 μ l
Thermosensitive alkaline phosphatase (1 U/ μ l)	5 μ l
Total volume	7.5 μ l
PCR product	25 μ l

นำส่วนประกอบในปฏิกิริยาผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ที่อุณหภูมิสูง 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	นางสาวอุมรินทร์ บุญเกื้อ
เกิดวันที่	8 มิถุนายน 2528
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา
ประวัติการศึกษา	ค.บ. (วิทยาศาสตร์ทั่วไป) มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
ตำแหน่งปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัย และพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์