

Analysis of Cytochrome C Oxidase subunit I gene in mitochondrial DNA of  
human head lice (*Pediculus humanus capitis*) in Thailand

Mr. Sakone Sunantaraporn



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)  
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

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

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University

การวิเคราะห์ความผันแปรของยีน Cytochrome C Oxidase subunit I ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ  
ของเหาศีรษะ (*Pediculus humanus capitis*) ในประเทศไทย



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์  
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2557  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การวิเคราะห์ความผันแปรของยีน Cytochrome C  
Oxidase subunit I ในไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอของเหา  
ศีรษะ (*Pediculus humanus capitis*) ในประเทศไทย

โดย

นายสกล สุนันทราภรณ์

สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์การแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ เผด็จ สิริยะเสถียร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ โสภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิง วิไล ชินธเนศ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ เผด็จ สิริยะเสถียร)

.....กรรมการ

(ดร. วิวรพรรณ สรรประเสริฐ)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ พ.อ. ดร. นายแพทย์ มจิริฐ มุ่งถิ่น)

สกล สุนันทรภรณ์ : การวิเคราะห์ความผันแปรของยีน Cytochrome C Oxidase subunit I ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอของเหาศีรษะ (*Pediculus humanus capitis*) ในประเทศไทย (Analysis of Cytochrome C Oxidase subunit I gene in mitochondrial DNA of human head lice (*Pediculus humanus capitis*) in Thailand) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร. นพ. เผด็จ สิริยะเสถียร, 131 หน้า.

การถูกรบกวนโดยเหาศีรษะ (Head lice infestation) มีสาเหตุจากเหาศีรษะสายพันธุ์ *Pediculus humanus capitis* ซึ่งทำให้เกิดโรคทางผิวหนัง (pediculosis) โดยการติดเหาศีรษะยังเป็นปัญหาสำคัญทางการสาธารณสุขทั่วโลก ปัจจุบันมีการศึกษาทางชีวโมเลกุลของเหาศีรษะที่จะใช้เป็นฐานข้อมูลทางพันธุศาสตร์ประชากรของเหามีแพร่หลายแต่ยังไม่มีข้อมูลที่จำเพาะกับประเทศไทย งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาวิเคราะห์ความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน COI ซึ่งอยู่ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิค PCR ในตัวอย่างเหาศีรษะทั้งหมด 275 ตัวอย่างที่เก็บจากภูมิภาคต่างๆของประเทศไทย พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI มีขนาด 599 bp แต่มี 4 ตัวอย่างที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI มีขนาด 603 bp เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลสากล NCBI พบว่ามีความเหมือนกับเหา *P. humanus capitis* ทุกตัวอย่าง ในขณะที่ผลการเปรียบเทียบความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงให้เห็นว่าเหาศีรษะจากภาคเหนือ มีค่าเปอร์เซ็นต์ความผันแปรภายในสปีชีส์สูงกว่าภาคอื่นๆ (0-17%) สำหรับผลการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการจากยีน COI พบว่าเหาศีรษะถูกจัดอยู่ใน 2 clade คือ clade A และ clade C ซึ่งแบ่งเป็น clade อย่างชัดเจนด้วยค่า bootstrap value 96-97% นอกจากนี้ผลการศึกษาเพื่อตรวจหาเชื้อ *Bartonella* spp. และเชื้อ *Acinetobacter* spp. ในดีเอ็นเอของเหาศีรษะด้วยเทคนิค PCR พบว่าตรวจไม่พบเชื้อ *Bartonella* spp. แต่สามารถตรวจพบเชื้อ *Acinetobacter* spp. ในตัวอย่างของเหาศีรษะทั้งหมด 10 ตัวอย่าง (3.6%) โดยเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Acinetobacter* spp. กับฐานข้อมูล NCBI สามารถระบุสปีชีส์ของเชื้อได้ 3 สปีชีส์คือ *A. baumannii*, *A. radioresistens* และ *A. schindleri* ด้วยค่า % identity 98-100% โดยผลการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการจัดเชื้อทั้ง 3 สปีชีส์อยู่ในกลุ่มเดียวกับสายพันธุ์อ้างอิง แต่เมื่อเปรียบเทียบการตรวจพบเชื้อ *Acinetobacter* spp. กับการจัดจำแนก clade ของเหาศีรษะโดยแผนภูมิวิวัฒนาการปรากฏว่า เชื้อ *Acinetobacter* spp. สามารถพบได้ทั้งใน clade A และ clade C การศึกษานี้ทำให้ทราบถึงข้อมูลในการจำแนกกลุ่มและความผันแปรของเหาศีรษะเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานทางด้านระบาดวิทยาของสายพันธุ์เหาศีรษะในประเทศไทย และการตรวจพบเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในเหาศีรษะนั้นเป็นประโยชน์ในการเฝ้าระวังการเป็นพาหะนำเชื้อโรคจากเหาศีรษะมาสู่คนได้

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ปีการศึกษา 2557

ลายมือชื่อนิสิต .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

# # 5574223730 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS: PEDICULUS HUMANUS CAPITIS / COI GENE / PHYLOGENETIC TREE / THAILAND / ACINETOBACTER SPP.

SAKONE SUNANTARAPORN: Analysis of Cytochrome C Oxidase subunit I gene in mitochondrial DNA of human head lice (*Pediculus humanus capitis*) in Thailand.  
ADVISOR: ASSOC. PROF. PADET SIRIYASATIEN, M.D., Ph.D., 131 pp.

Head lice infestation or pediculosis is caused by *Pediculus humanus capitis*, a global public health problem. Nowadays, the molecular analyses for detection of head lice are widely used in genetic population database. However, the data is not available in Thailand. Therefore, the aim of this study was to analyze the nucleotide sequences variation of COI gene which located in the mitochondrial DNA by using PCR technique. A total of 275 head lice samples were collected from various regions of Thailand. We found that the nucleotide sequences of COI gene was 599 basepairs. However, there are 4 samples showed 603 basepairs of the nucleotide sequences. The comparisons of all sequences with NCBI database were identical to *Pediculus humanus capitis*. The result of % intraspecific variation showed that head lice from northern region had variation within species more than other regions (0-17%). Phylogenetic tree base on COI gene revealed that head lice was clearly classified into two clade including clade A and C with 96-97% bootstrap value. In addition, this study investigated the *Bartonella* spp. and *Acinetobacter* spp. in head lice DNA by using PCR. The result found that *Bartonella* spp. was not detected but *Acinetobacter* spp. was detected in 10 samples (3.6%) of head lice. The nucleotide sequences of *Acinetobacter* spp. compared with NCBI database showed three species consist of *A. baumannii*, *A. radioresistens* and *A. schindleri* with the 98-100 of % identity. Phylogenetic tree demonstrated that 3 species of *Acinetobacter* were classified in the same group with reference sequences. Moreover, the relationship of *Acinetobacter* spp. and clade of head lice showed that *Acinetobacter* spp. was found both on clade A and clade C. The results of this study can be used for the classification and genetic variation of head lice and used as a basic knowledge of the epidemiology of head lice in Thailand. Moreover, the detection of pathogenic bacteria in the head lice may be useful for monitoring the head louse-borne pathogens to humans.

Field of Study: Medical Science

Student's Signature .....

Academic Year: 2014

Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีและสมบูรณ์ได้ ด้วยความกรุณา ความช่วยเหลือ และความอนุเคราะห์จากบุคคลหลายท่าน ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ รศ. ดร. นพ. เผด็จ สิริยะเสถียร ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์เป็นอย่างยิ่ง ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และแนวทางในการแก้ไขปัญหาต่างๆตลอดการทำงานวิจัย ตลอดจนช่วยตรวจทานและแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนแล้วเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ศ. ดร. พญ. วิไล ชินธเนศ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร. วิวรรณ สรรประเสริฐ และ รศ. พ.อ. ดร. นพ. มติรุทธ มุ่งถิ่น กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่มีความยินดีและกรุณาสละเวลามาดำเนินการสอบวิทยานิพนธ์นี้ และกรุณาให้คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยฉบับนี้อย่างดียิ่ง

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ระดับบัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์และประสาทความรู้ด้านวิชาการตลอดระยะเวลาในการศึกษา

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่คอยช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการจัดอุปกรณ์วิจัย ตลอดระยะเวลาในการทำวิจัยอย่างดียิ่ง ขอขอบพระคุณ ดร. ธีรกมล เพ็งสกุล คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ คุณรุ่งฟ้า บุญเสริม คุณสมเกียรติ เกียรติไพบูลย์ คุณวศิน วัฒนะบุตร คุณฐิตินันท์ พรรณจิตต์ ที่ยินดีช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างเหาศีรษะสำหรับการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนเงินทุนวิจัยสำหรับงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ ดร. อัจฉรา ภูมิ ที่คอยแนะนำเทคนิคและช่วยแก้ไขปัญหาต่างๆรวมไปถึงคำปรึกษาตลอดการทำงานวิจัย และขอบใจเพื่อนๆเพื่อนๆร่วมห้องปฏิบัติการหน่วยกีฏวิทยา ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ ในการทำวิจัยและเป็นกำลังใจตลอดมา

งานวิจัยและวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะแล้วเสร็จไม่ได้หากไม่ได้รับการสนับสนุนทางการศึกษาจากบิดา มารดา และกำลังใจสำคัญจากพี่น้องในครอบครัว คุณค่าและประโยชน์ที่เกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอขอบแต่ผู้มีพระคุณทุกท่านที่มีส่วนสำคัญต่อความสำเร็จของงานวิจัยครั้งนี้

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ.....	ฎ
สัญลักษณ์และคำย่อ.....	ณ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 คำถามของการวิจัย.....	3
1.3 วัตถุประสงค์การวิจัย.....	4
1.4 สมมติฐานของการวิจัย.....	4
1.5 กรอบแนวความคิดการวิจัย.....	5
1.6 คำสำคัญ.....	7
1.7 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	7
1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย.....	8
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	9
2.1 ชีวิตวิทยาและลักษณะทั่วไปของเหา.....	9
2.2 ชีวิตวิทยาและสัณฐานวิทยาของเหาศีรษะ.....	12
2.3 โรคเหา (Pediculosis).....	16
2.4 เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ในการศึกษาและวิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรม.....	18
2.5 เทคนิคที่ใช้ในการศึกษาอนุพันธุศาสตร์.....	21

2.6 การศึกษาอนุพันธุศาสตร์ของเหา .....	26
2.7 การเป็นพาหะนำเชื้อโรคในเหา.....	32
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	35
3.1 รูปแบบการวิจัย .....	35
3.2 กลุ่มประชากรเป้าหมาย.....	35
3.3 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย .....	37
3.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย .....	38
3.5 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย .....	38
3.6 โปรแกรมสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูล.....	39
3.7 วิธีดำเนินการวิจัย .....	39
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	53
4.1 จำนวนตัวอย่างและพื้นที่ในการเก็บตัวอย่างเหาศีรษะ .....	53
4.2 ผลการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีน COI โดยเทคนิค PCR .....	55
4.3 ผลการตรวจสอบโคลนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนยีน COI โดยเทคนิค Colony PCR .....	56
4.4 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ .....	57
4.5 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในเหาศีรษะกับฐานข้อมูล NCBI .....	59
4.6 ผลการขอขึ้นเลขทะเบียนของลำดับนิวคลีโอไทด์ .....	60
4.7 ผลการสร้างและวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ .....	60
4.8 ผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์.....	71
4.9 ผลการตรวจหาเชื้อ <i>Bartonella</i> spp. และเชื้อ <i>Acinetobacter</i> spp. ในตัวอย่างดีเอ็นเอเหาศีรษะ.....	74
4.10 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rpoB</i> ในเชื้อ <i>Acinetobacter</i> spp. ....	75
4.11 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rpoB</i> ในเชื้อ <i>Acinetobacter</i> spp. กับ ฐานข้อมูล NCBI และการระบุ species ของเชื้อ <i>Acinetobacter</i> spp. ....	77



4.12 ผลการสร้างและวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ .....	78
บทที่ 5 สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง .....	81
รายการอ้างอิง .....	86
ภาคผนวก.....	92
ภาคผนวก ก .....	93
ภาคผนวก ข .....	98
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	131



## สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	แสดงการศึกษาอนุพันธุศาสตร์ของเหาศีรษะ	32
ตารางที่ 2	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่จำเพาะกับยีน COI	42
ตารางที่ 3	แสดงขั้นตอน PCR (Thermal cycle condition) ในการเพิ่มจำนวนยีน COI	43
ตารางที่ 4	ส่วนประกอบของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนยีน COI	43
ตารางที่ 5	แสดงส่วนประกอบของสารส่วนประกอบในขั้นตอน DNA ligation	44
ตารางที่ 6	แสดง reference sequence ที่นำมาใช้วิเคราะห์และสร้าง phylogenetic tree จากตำแหน่งยีน COI เพื่อแยก Clade A, B และ	48
ตารางที่ 7	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่จำเพาะกับยีน <i>gltA</i>	49
ตารางที่ 8	ส่วนประกอบของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนยีน <i>gltA</i>	50
ตารางที่ 9	แสดงขั้นตอน PCR (Thermal cycle condition) ในการเพิ่มจำนวนยีน <i>gltA</i>	50
ตารางที่ 10	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่จำเพาะกับยีน <i>rpoB</i>	51
ตารางที่ 11	ส่วนประกอบของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนยีน <i>rpoB</i>	51
ตารางที่ 12	แสดงขั้นตอน PCR (Thermal cycle condition) ในการเพิ่มจำนวนยีน <i>rpoB</i>	52
ตารางที่ 13	ข้อมูลพื้นที่ในการเก็บตัวอย่างเหาศีรษะ (F คือ เหาเพศเมีย, E คือ ไข่เหา)	53
ตารางที่ 14	แสดงการจัดจำแนกเหาศีรษะในแต่ละจังหวัดแยกตาม clade จากยีน COI	70
ตารางที่ 15	แสดงตัวอย่างค่า % intraspecific variation ในจังหวัดเชียงราย จากการทำ sequence identity matrix (แสดงผลบางส่วน)	72
ตารางที่ 16	แสดงตัวอย่างค่า % intraspecific variation ในจังหวัดนครปฐม จากการทำ sequence identity matrix (แสดงผลบางส่วน)	73
ตารางที่ 17	แสดงผลการตรวจหาเชื้อ <i>Acinetobacter</i> spp. ด้วยเทคนิค PCR จากตัวอย่างดีเอ็นเอของเหาศีรษะที่เก็บจากภูมิภาคต่างๆในประเทศไทย	75
ตารางที่ 18	แสดงผล percentage identity เลขทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์ การระบุ species ของเชื้อ <i>Acinetobacter</i> และเลขทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลอ้างอิง	78

ตารางที่ 19 ขนาดยีน COI เลขทะเบียนยีน ค่า %identity และฐานข้อมูลอ้างอิง..... 122



สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 1 ลักษณะของปากแบบกัดแทะ (A), ลักษณะของปากแบบแทงดูด (B)..... 10

รูปที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเหาศีรษะ ..... 10

รูปที่ 3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเหาตัว..... 11

รูปที่ 4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโลน..... 11

รูปที่ 5 วงจรชีวิตของเหาศีรษะ (*P. humanus capitis*)..... 13

รูปที่ 6 ลักษณะของระยะไข่เหาศีรษะจากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (A) และจากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (B)..... 14

รูปที่ 7 ลักษณะของระยะตัวกลางวัยเหาศีรษะ..... 15

รูปที่ 8 ลักษณะของระยะตัวเต็มวัยเหาศีรษะตัวเมีย (A) และตัวผู้ (B)..... 16

รูปที่ 9 แสดงโครงสร้าง gene family ของกลุ่มยีน ribosomal DNA..... 20

รูปที่ 10 แสดงลักษณะไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอเฮลล์ยูกาไรโอตในแมลงวันผลไม้..... 21

รูปที่ 11 แสดงขั้นตอนของเทคนิค Polymerase chain reaction..... 25

รูปที่ 12 แสดงขั้นตอน chain termination DNA sequencing และแสดงผลกราฟ chromatogram จากเครื่อง automate..... 26

รูปที่ 13 สายวิวัฒนาการของเหา ..... 27

รูปที่ 14 แสดงลักษณะไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอของเหาตัว (*P. humanus coporis*) ..... 28

รูปที่ 15 แสดงลักษณะไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอของเหาศีรษะ (*P. humanus capitis*)..... 29

รูปที่ 16 แสดง Phylogenetic tree จากการศึกษาลำดับเบสของยีน COI ที่..... 30

รูปที่ 17 แสดง phylogenetic tree จากลำดับเบสของยีน Cytb และแสดงการแยกกลุ่มของ clade A เป็น A1,A2 และ A3 จากการศึกษายีนที่อยู่ในนิวเคลียส ..... 31

รูปที่ 18 แสดงพื้นที่ในการเก็บตัวอย่างเหาศีรษะ ..... 35

รูปที่ 19 ผลการตรวจสอบชิ้นส่วนยีน COI ด้วยวิธี gel electrophoresis ..... 55

รูปที่ 20 แสดงลักษณะของ colony สีขาวและ colony สีฟ้าบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar.....	56
รูปที่ 21 ผลการตรวจสอบโคลนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนยีน COI ด้วยวิธี gel electrophoresis.....	57
รูปที่ 22 แสดงผลจากขั้นตอน sequencing ในรูปกราฟ chromatogram ของยีน COI ในเหาสีระยะ.....	58
รูปที่ 23 ผลการเปรียบเทียบ multiple sequence alignment แสดงตัวอย่าง M002 และ M007 (แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วน) .....	58
รูปที่ 24 ผลการเปรียบเทียบ multiple sequence alignment แสดงตัวอย่าง KP202 และ KP304 (แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วน) .....	58
รูปที่ 25 แสดง Phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของเหาสีระยะที่เก็บจากประเทศไทย.....	62
รูปที่ 26 แสดง Phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของเหาสีระยะ.....	63
รูปที่ 27 แสดง Phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของเหาสีระยะที่เก็บจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ.....	65
รูปที่ 28 แสดง Phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของเหาสีระยะที่เก็บจากภาคกลาง.....	66
รูปที่ 29 แสดง Phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของเหาสีระยะที่เก็บจากภาคเหนือ .....	67
รูปที่ 30 แสดง Phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของเหาสีระยะที่เก็บจากภาคใต้ .....	68
รูปที่ 31 แสดง Phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของเหาสีระยะที่เก็บจากภาคตะวันตก .....	69
รูปที่ 32 แสดง Phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของเหาสีระยะที่เก็บจากภาคตะวันออก .....	70
รูปที่ 33 แสดงผล gel electrophoresis ของยีน <i>rpoB</i> ของเชื้อ <i>Acinetobacter</i> spp. ที่ตรวจพบในดีเอ็นเอเหาสีระยะ .....	74
รูปที่ 34 แสดงผล multiple sequence alignment จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rpoB</i> ของเชื้อ <i>Acinetobacter</i> spp. ที่แยกได้จากดีเอ็นเอของเหาสีระยะ .....	76

รูปที่ 35 แสดง Phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rpoB</i> ของเชื้อ <i>Acinetobacter</i> spp. ที่แยกได้จากดีเอ็นเอของเหาศีรษะ.....	79
รูปที่ 36 แสดง Phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของตัวอย่างดีเอ็นเอเหาศีรษะที่ตรวจพบเชื้อ <i>Acinetobacter</i> spp.....	80
รูปที่ 37 แผนที่ยีนของพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM <sup>®</sup> - T easy .....	97
รูปที่ 38 แสดง multiple sequence alignment รหัสตัวอย่าง B จังหวัดกาญจนบุรี.....	98
รูปที่ 39 แสดง Multiple sequence alignment รหัสตัวอย่าง H จังหวัดกาญจนบุรี.....	100
รูปที่ 40 แสดง multiple sequence alignment รหัสตัวอย่าง BA จังหวัดเชียงราย .....	101
รูปที่ 41 แสดง multiple sequence alignment รหัสตัวอย่าง RA จังหวัดเชียงราย .....	102
รูปที่ 42 แสดง multiple sequence alignment รหัสตัวอย่าง PA จังหวัดแพร่ .....	103
รูปที่ 43 แสดง multiple sequence alignment รหัสตัวอย่าง BKK กรุงเทพมหานคร .....	103
รูปที่ 44 แสดง multiple sequence alignment รหัสตัวอย่าง C จังหวัดสระบุรี .....	104
รูปที่ 45 แสดง multiple sequence alignment รหัสตัวอย่าง L จังหวัดสระบุรี.....	105
รูปที่ 46 แสดง multiple sequence alignment รหัสตัวอย่าง D จังหวัดน่าน .....	106
รูปที่ 47 แสดง multiple sequence alignment รหัสตัวอย่าง S จังหวัดน่าน .....	106
รูปที่ 48 แสดง multiple sequence alignment รหัสตัวอย่าง A จังหวัดมุกดาหาร.....	107
รูปที่ 49 แสดง multiple sequence alignment รหัสตัวอย่าง T จังหวัดนครราชสีมา.....	107
รูปที่ 50 แสดง multiple sequence alignment รหัสตัวอย่าง G จังหวัดนครราชสีมา .....	108
รูปที่ 51 แสดง multiple sequence alignment รหัสตัวอย่าง N จังหวัดนครราชสีมา .....	109
รูปที่ 52 แสดง multiple sequence alignment รหัสตัวอย่าง J จังหวัดเลย .....	110
รูปที่ 53 แสดง multiple sequence alignment รหัสตัวอย่าง M จังหวัดเลย.....	111
รูปที่ 54 แสดง multiple sequence alignment รหัสตัวอย่าง P จังหวัดพัทลุง.....	112
รูปที่ 55 แสดง multiple sequence alignment รหัสตัวอย่าง W จังหวัดพัทลุง.....	112
รูปที่ 56 แสดง multiple sequence alignment รหัสตัวอย่าง PT จังหวัดพัทลุง.....	113

รูปที่ 57 แสดง multiple sequence alignment รหัสตัวอย่าง R จังหวัดระยอง..... 114

รูปที่ 58 แสดง multiple sequence alignment รหัสตัวอย่าง K จังหวัดสงขลา..... 115

รูปที่ 59 แสดง multiple sequence alignment รหัสตัวอย่าง Q จังหวัดสงขลา ..... 116

รูปที่ 60 แสดง multiple sequence alignment รหัสตัวอย่าง V จังหวัดนครศรีธรรมราช..... 117

รูปที่ 61 แสดง multiple sequence alignment รหัสตัวอย่าง NK จังหวัดนครศรีธรรมราช ..... 118

รูปที่ 62 แสดง multiple sequence alignment รหัสตัวอย่าง KA และ KP จังหวัดนครปฐม .... 119

รูปที่ 63 แสดง multiple sequence alignment รหัสตัวอย่าง SA และ SP จังหวัดนครปฐม .... 120

รูปที่ 64 แสดงการออกแบบ Primer เพื่อใช้ในขั้นตอน PCR..... 121



## สัญลักษณ์และคำย่อ

คำย่อ	ความหมาย
$\mu\text{l}$	Microliter
$\mu\text{M}$	Micromolar
bp	Base pair
COI	Cytochrome C oxidase subunit I
dNTP	Deoxynucleotide triphosphate
ddNTP	dideoxyribonucleotide triphosphate
ddH <sub>2</sub> O	deionized distilled water
g	Gram
<i>gltA</i>	Citrate synthase
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mtDNA	mitochondrial DNA
nrDNA	nuclear DNA
PCR	Polymerase chain reaction
rpm	revolutions per minute
<i>rpoB</i>	RNA polymerase $\beta$ subunit B
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
T <sub>m</sub>	Melting temperature



## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เหา (Lice) จัดอยู่ในอันดับ (order) Phthiraptera เป็นแมลงที่เป็นปรสิตภายนอกถาวรของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Obligate ectoparasite) (1) โดยเหาจะอาศัยอยู่บนโฮสต์ที่มีความจำเพาะ (host specific) และจะอาศัยอยู่บนโฮสต์ตลอดชีวิตของมัน โดยเหาที่มีความสำคัญทางการแพทย์มีอยู่ 2 วงศ์ (family) ที่ก่อให้เกิดความรำคาญและเกิดโรคในมนุษย์คือ วงศ์ Pediculidae ประกอบด้วย เหาศีรษะ (*Pediculus humanus capitis*) เหาดำ (*P. humanus humanus* หรือ *P. humanus corporis*) และวงศ์ Pthiridae คือ โลงน (*Phthirus pubis*) การอาศัยอยู่บนโฮสต์ของเหาทั้ง 3 ชนิดนี้จะอยู่บริเวณที่แตกต่างกัน เช่น เหาศีรษะจะอาศัยอยู่ที่ศีรษะของมนุษย์โดยยึดเกาะอยู่บนเส้นผมของโฮสต์ เหาดำจะอาศัยบริเวณขนตามร่างกายและเสื้อผ้าที่มักแนบติดกับลำตัวตลอดเวลา ส่วนโลงนจะอาศัยอยู่ตามขนบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ ขนตา และขนรักแร้ (2) การรบกวนและก่อโรคของเหาทั้ง 3 ชนิดจะมีลักษณะที่คล้ายกันคือทำให้โฮสต์มีอาการระคายเคืองที่ผิวหนังเกิดอาการคันและแพ้จากน้ำลายของเหา ในปัจจุบันเหาที่ยังก่อให้เกิดการรบกวนต่อคนที่พบมากที่สุดคือพบบนศีรษะซึ่งเกิดจากเหาศีรษะ หรือ *P. humanus capitis* แหล่งที่มีการแพร่กระจายโดยการติดเหาศีรษะยังพบได้ทั่วไปในพื้นที่แถบชนบท เนื่องจากการสาธารณสุขที่ยังเข้าไปไม่ถึงทำให้สุขอนามัยของประชากรในพื้นที่อยู่อาศัยดังกล่าวยังไม่ดี ทำให้ยังมีภาระระบาดของเหาศีรษะเพิ่มมากขึ้น

เหาศีรษะ (*P. humanus capitis*) จัดเป็นปรสิตภายนอกที่อาศัยอยู่บนศีรษะของมนุษย์ โดยวงจรชีวิตของเหาศีรษะจะอยู่บนศีรษะของมนุษย์ตลอดวงจรชีวิตของมัน โดยจะดูดกินเลือดของโฮสต์เป็นอาหารซึ่งจะดูดกินเลือดได้หลายครั้งภายในหนึ่งวัน (3) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเหาศีเศะนั้นมีความคล้ายคลึงกับเหาดำ จะแตกต่างกันในเรื่องของที่อยู่อาศัย และรูปร่างลักษณะภายนอกบางประการ การจำแนกเหาทั้ง 2 ชนิดนี้ออกจากกันจึงเป็นเรื่องยาก

การถูกรบกวนโดยเหาศีรษะ (Head lice infestation) ทำให้เกิดความรำคาญและก่อให้เกิดโรคทางผิวหนัง (Pediculosis) (4) การติดเหาศีรษะยังเป็นปัญหาสำคัญทางการแพทย์สาธารณสุขทั่วโลก ซึ่งส่วนใหญ่พบว่าเกิดขึ้นในประเทศที่กำลังพัฒนา สำหรับในประเทศไทยนั้นพบในเด็กมากกว่าผู้ใหญ่โดยอายุเฉลี่ยของเด็กที่เป็นเหาอายุอยู่ระหว่าง 5-13 ปี ผู้ใหญ่ที่เป็นเหามักติดมาจากเด็กและเชื่อกันว่าผู้ใหญ่มีความต้านทานมากกว่าเด็กและรักษาความสะอาดได้ดีกว่าซึ่งเป็นสิ่งสำคัญในการยับยั้งและการเพิ่มจำนวนของเหา การแพร่กระจายของเหาศีรษะเกิดขึ้นได้หลายทางจะติดต่อกันจากคนหนึ่งไปสู่อีกคนหนึ่งได้เร็ว โดยเฉพาะสภาพแวดล้อมที่มีผู้คนอยู่อย่างแออัดหรือใกล้ชิดกันอย่างเช่นโรงเรียน

ประถมศึกษา สถานรับเลี้ยงเด็ก ซึ่งอาจเกิดจากการสัมผัสจากการใช้ของร่วมกัน การใช้หวี เสื้อผ้า ผ้าเช็ดตัวหรือผ้าปูที่นอนร่วมกัน (5, 6) เหาไม่สามารถที่จะกระโดดไปยังที่ต่างๆและไปยังสัตว์อื่นได้จึงเกิดขึ้นเมื่อมีการสัมผัสอย่างใกล้ชิดหรือใช้สิ่งของร่วมกันเท่านั้น ซึ่งการติดเหาในเด็กนั้นยังอาจมีผลทำให้เด็กขาดประสิทธิภาพในการเรียน ขาดสมาธิในการเรียน หรือบางรายอาจมีอาการคันศีรษะมาก ตอนกลางคืนจนนอนไม่หลับ หรือเด็กอาจมีความวิตกกังวล รู้สึกอายเพื่อนทำให้สูญเสียบุคลิกภาพ และอาจมีผลต่อพัฒนาการต่างๆในเด็กได้

เหาในปัจจุบันพบว่าสามารถเป็นพาหะในการนำเชื้อโรคได้หลายชนิด เช่น ในเหาดำ (body lice) พบว่าเป็นสาเหตุในการเป็นพาหะนำเชื้อโรค 3 ชนิดคือ เชื้อ *Rickettsia prowazekii* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค epidemic typhus เชื้อ *Bartonella quintana* เป็นสาเหตุของโรค trench fever และเชื้อ *Borrelia recurrentis* ที่เป็นสาเหตุสำคัญของโรค louse-borne relapsing fever แต่พบว่าเหาศีรษะยังมีความสามารถในการเป็นพาหะนำเชื้อโรค *B. quintana* (7) ซึ่งมีรายงานการตรวจพบครั้งแรกในเด็กที่อาศัยในชุมชนแออัด ประเทศเนปาล อย่างไรก็ตามปัจจุบันมีรายงานการตรวจพบเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ในเหาดำและเหาศีรษะในบุคคลไร้ที่อยู่อาศัยซึ่งเชื่อดังกล่าวมีความสำคัญทางการแพทย์ซึ่งก่อให้เกิด nosocomial infection ทำให้เกิดอาการได้หลายลักษณะเช่น อาการปอดบวม เยื่อหุ้มสมองอักเสบ หรือเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ (8)

ปัจจุบันมีงานวิจัยในต่างประเทศได้ทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมและอนุชีววิทยาของเหาศีรษะเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจำแนก (Classification) และเป็นฐานข้อมูลโดยศึกษาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในประชากรเหาในพื้นที่ต่างๆ ซึ่งในประชากรเหาในแต่ละพื้นที่หรือแต่ละประเทศอาจจะมีลำดับของนิวคลีโอไทด์ที่มีความผันแปรหรือมีความแตกต่างกันของลำดับเบสกันได้ โดยการศึกษาความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ได้มีการศึกษาจากยีนที่อยู่ภายในนิวเคลียส (Nuclear DNA) เช่น ยีน Elongation factor 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ), ยีน RNA polymerase II, ยีน Intergenic spacers และยีน 18S ribosomal RNA (18S rRNA) รวมทั้งมีการศึกษายีนที่อยู่ในไมโทคอนเดรีย (Mitochondrial DNA) เช่น ยีน Cytochrome C oxidase subunit I (COI), ยีน Cytochrome b (*Cytb*) และยีน NADH dehydrogenase 4 (ND4) (9, 10) การวิเคราะห์ยีนในเหาศีรษะในงานวิจัยส่วนใหญ่นั้นนิยมใช้ยีนที่อยู่ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอคือ ยีน COI เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง โดยยีนนี้มีความหลากหลายที่แตกต่างกันสูงในระหว่างสิ่งมีชีวิต (interspecies) และมีความหลากหลายต่ำในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน (intraspecies) จึงสามารถใช้จำแนกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ (species identification) (11, 12) และยีนดังกล่าวนี้มีความเหมาะสมในการนำมาศึกษาทางด้านวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต (Phylogenetic study) ด้วยเช่นกัน สำหรับการศึกษา ยีน COI ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอของเหาศีรษะนั้น จากงานวิจัยต่างๆเมื่อ

นำยีนนี้มาศึกษาและสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการสามารถแยกความแตกต่างของเหาศีรษะได้ 3 กลุ่ม (Clade) ตามพื้นที่ต่างๆที่ทำการศึกษาได้เช่นกัน (9, 11, 13-16)

สำหรับในประเทศไทยนั้นยังไม่มีข้อมูลทางอนุชีววิทยาและพันธุศาสตร์ของเหา ที่จะใช้เป็นฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถใช้อ้างอิงได้ โดยการศึกษาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในประเทศไทยอาจมีความแตกต่างจากงานวิจัยที่ทำการศึกษาในประเทศอื่นๆ จากการจำแนกเหาด้วยสัณฐานวิทยาที่ไม่สามารถจำแนกเหาศีรษะและเหาตัวออกจากกันอย่างชัดเจน การทราบถึงข้อมูลดังกล่าวมีความสำคัญที่สามารถที่จะใช้ในการจำแนกความแตกต่างและศึกษาระบาดวิทยาของสายพันธุ์ของเหาศีรษะในประเทศไทย อีกทั้งยังมีส่วนช่วยในการพัฒนาสารเคมีที่ใช้ในการกำจัดเหาได้อย่างมีประสิทธิภาพได้ในอนาคต ซึ่งในปัจจุบันเหามีอัตราการติดต่อสารเคมีกำจัดแมลงเพิ่มมากขึ้น โดยความผันแปรของยีนในแต่ละพื้นที่ที่แตกต่างกันทำให้ประชากรเหามีอัตราการติดต่อสารเคมีกำจัดแมลงที่แตกต่างกันมากขึ้นด้วย

การศึกษานี้ได้ทำการเปรียบเทียบและวิเคราะห์ความผันแปรและความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเหาศีรษะ (*P. humanus capitis*) ในยีนที่อยู่ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ คือ ยีน COI โดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ในพื้นที่ต่างๆของประเทศไทย รวมถึงประเมินประสิทธิภาพการจำแนกความหลากหลายของเหาศีรษะด้วยรูปแบบแผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) และใช้เป็นฐานข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของประเทศไทย และทำการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Bartonella* spp. และเชื้อ *Acinetobacter* spp. จากตัวอย่างอย่างดีเอ็นเอของเหาศีรษะด้วยเทคนิคทางอนุชีววิทยาเพื่อดูความสามารถการเป็นพาหะในการนำเชื้อแบคทีเรียและความชุกของเชื้อแบคทีเรียที่พบในเหาศีรษะที่เก็บจากภูมิภาคต่างๆของประเทศไทย

## 1.2 คำถามของการวิจัย

1.2.1 เหาศีรษะจากพื้นที่ต่างๆในประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งยีน COI หรือไม่

1.2.2 ยีน COI สามารถใช้ศึกษาวิวัฒนาการของเหาศีรษะจากพื้นที่ต่างๆในประเทศไทยได้หรือไม่

1.2.3 สามารถตรวจพบเชื้อ *Bartonella* spp. และเชื้อ *Acinetobacter* spp. ในเหาศีรษะที่เก็บจากภูมิภาคต่างๆในประเทศไทยได้หรือไม่

### 1.3 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.3.1 เพื่อเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ตำแหน่งยีน COI ในตัวอย่างเหา ศีรษะที่เก็บจากพื้นที่ต่างๆในประเทศไทย

1.3.2 เพื่อศึกษาวิวัฒนาการของเหาศีรษะจากยีน COI โดยใช้แผนภูมิวิวัฒนาการ Phylogenetic tree

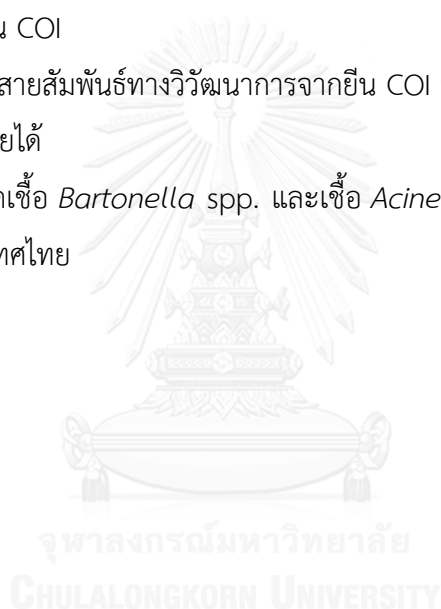
1.3.3 เพื่อตรวจหาเชื้อ *Bartonella* spp. และเชื้อ *Acinetobacter* spp. ในเหาศีรษะที่เก็บจากภูมิภาคต่างๆในประเทศไทย

### 1.4 สมมติฐานของการวิจัย

1.4.1 เหาศีรษะจากพื้นที่ต่างๆในประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมของลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน COI

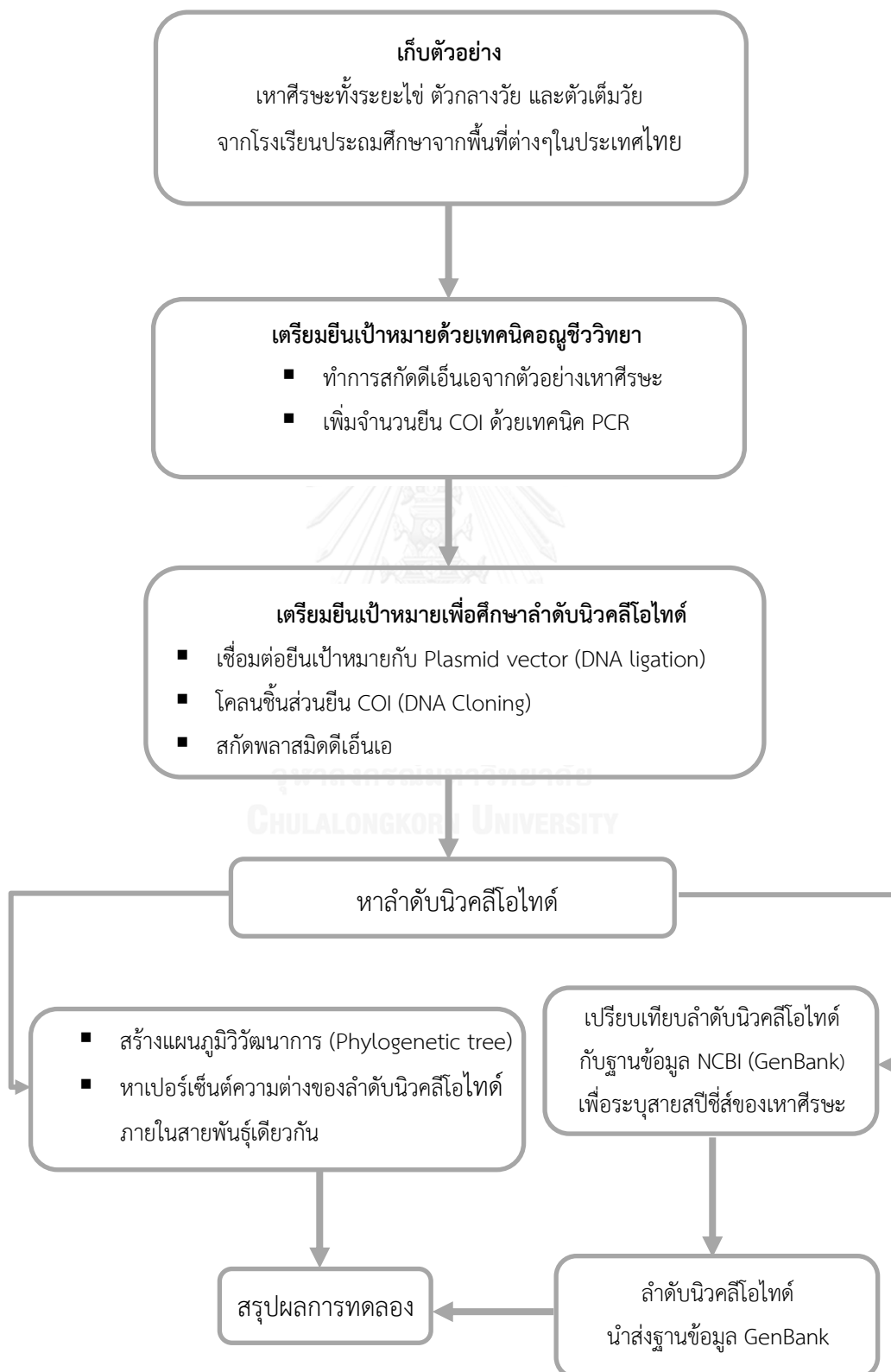
1.4.2 แผนภูมิสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากยีน COI สามารถจำแนกเหาศีรษะที่เก็บจากพื้นที่ต่างๆของประเทศไทยได้

1.4.3 มีการติดเชื้อ *Bartonella* spp. และเชื้อ *Acinetobacter* spp. ในเหาศีรษะที่เก็บจากภูมิภาคต่างๆในประเทศไทย

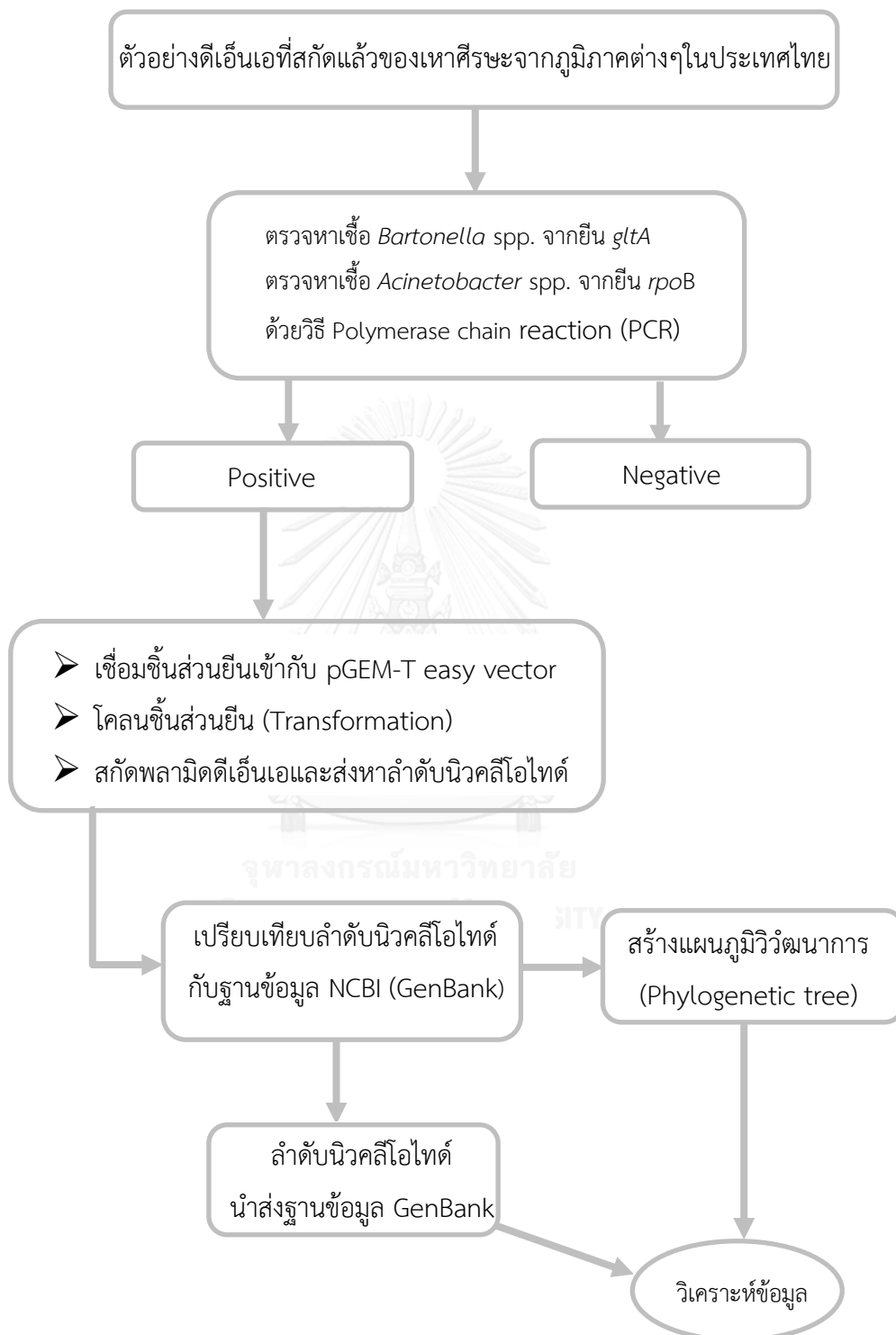


## 1.5 กรอบแนวความคิดการวิจัย

### ส่วนที่ 1 การศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมและวิวัฒนาการของเหาศีรษะ



ส่วนที่ 2 การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดีเอ็นเอเหาศีรษะ



## 1.6 คำสำคัญ

*Pediculus humanus capitis*

COI gene

Phylogenetic tree

Thailand

*Acinetobacter* spp.

## 1.7 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

1.7.1 *Pediculus humanus capitis* หรือเหาศีรษะเป็นปรสิตภายนอกของคน ไม่มีปีก วงจรชีวิตเป็นแบบไม่สมบูรณ์ (incomplete metamorphosis) ประกอบด้วยระยะไข่ เมื่อเหาศีรษะตัวเมียออกไข่จะปล่อยกาวเหนียวให้ไข่เหายึดติดกับเส้นผม ระยะตัวกลางวัยซึ่งเป็นระยะที่การเจริญของระบบสืบพันธุ์ยังไม่สมบูรณ์ มีการลอกคราบ 3 ครั้งเพื่อเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัย และระยะตัวเต็มวัยเป็นระยะที่สามารถแยกเพศของเหาได้ชัดเจนเป็นระยะที่สามารถติดต่อไปสู่อีกคนได้ โดยตลอดทั้งวงจรชีวิตของเหาศีรษะนั้นจะอาศัยอยู่บนหนังศีรษะตลอดทั้งวงจรชีวิตของมันและดูดเลือดของโฮสต์เป็นอาหาร ในบางคนอาจมีการแพ้เกิดขึ้นจากน้ำลายของเหาเรียกว่า pediculosis นอกจากพบในคนแล้วยังสามารถที่จะพบเหาในลิงชิมแปนซีได้ด้วย

1.7.2 *Pediculus humanus corporis* หรือเหาลำตัวมีลักษณะเหมือนกับเหาศีรษะมาก แต่จะอาศัยอยู่บนขนตามร่างกายหรือเสื้อผ้าที่สวมใส่ มีวิวัฒนาการมาจากเหาศีรษะที่อพยพลงมาอาศัยอยู่ตามเสื้อผ้าตั้งแต่มีพัฒนาการของเครื่องนุ่งห่ม ปกติจะยึดเกาะกับใยผ้าขณะดูดเลือด เหาดังกล่าวเป็นพาหะของโรค epidemic typhus, trench fever และ relapsing fever

1.7.3 *Phthirus pubis* หรือโลน จัดอยู่ในวงศ์ Pthiridae ลักษณะลำตัวอ้วนป้อม มักติดต่อสู่กันทางเพศสัมพันธ์และจะพบบริเวณขนอวัยวะเพศโดยเฉพาะในผู้ป่วยเพศชาย นอกจากนี้อาจพบในส่วนอื่น เช่น ขนตา ขนรักแร้ ซึ่งอาจเกิดจากการใช้ผ้าเช็ดตัวร่วมกับผู้ป่วย ไข่ของโลนจะมีขนาดที่เล็กกว่าเหาศีรษะ

1.7.4 Mitochondrial DNA คือ สารพันธุกรรมนอกนิวเคลียส จีโนมในไมโทคอนเดรียมีอยู่ประมาณ 5-10 copies สามารถถอดรหัสให้ยีนทั้งหมด 37 ยีน เป็นยีนที่ถอดรหัสให้ transfer RNA จำนวน 22 ยีน ถอดรหัสให้ ribosomal RNA จำนวน 2 ยีน และถอดรหัสให้โปรตีนจำนวน 13 ยีน ขบวนการถ่ายแบบของจีโนมไมโท-คอนเดรียที่เกิดขึ้นใน matrix นั้นไม่มีกระบวนการ repairing system ทำให้เกิดความผิดพลาดในการถ่ายแบบสารพันธุกรรมของยีนในไมโทคอนเดรียในอัตราที่สูง

กว่าในยีนที่อยู่ในนิวเคลียสซึ่งมีกระบวนการ repairing system จึงพบว่าอัตราของการกลายพันธุ์ของยีนในไมโทคอนเดรียที่สูงกว่ายีนในนิวเคลียสถึง 10-20 เท่า

1.7.5 COI gene เป็นยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนซึ่งทำงานเป็นเอนไซม์ที่แทรกอยู่บนเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรียอยู่บริเวณ complex IV ในกระบวนการ Electron Transport Chain ของกระบวนการ oxidative phosphorylation โดยในเหา ศีรษะและเหาดำนั้นพบว่าประกอบด้วยยีน cytochrome C oxidase จำนวน 3 subunit คือยีน COI, COII, COIII โดยแต่ละยีนบรรจุอยู่บนวงโครโมโซมคนละวงโครโมโซมย่อยต่างกัน ซึ่งยีน COI ของเหาถูกบรรจุอยู่บนวงโครโมโซมย่อย 1 วงทั้งในเหาดำและเหาศีรษะและมีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ประมาณ 1,572 คู่เบส เหมือนกัน

1.7.6 Clade คือ กลุ่มที่กำเนิดมาจากบรรพบุรุษร่วมกัน

1.7.7 Out group คือ สิ่งมีชีวิตที่นำมาเปรียบเทียบกับต้นกำเนิดมาจากบรรพบุรุษเดียวกันแต่เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีวิวัฒนาการแยกออกจากสิ่งมีชีวิตตัวอย่างที่ทำการศึกษา

1.7.8 Phylogenetic tree คือ แผนภูมิวิวัฒนาการ หรือ แผนภูมิวงศ์วานวิวัฒนาการ เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตโดยแบ่งสิ่งมีชีวิตออกเป็นกลุ่มต่างๆจากลักษณะทางสรีรวิทยา สัณฐานวิทยา กายวิภาคศาสตร์ ซึ่งในปัจจุบันได้มีการนำข้อมูลทางชีวโมเลกุล เช่น การศึกษาความคล้ายคลึงของลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอหรือโปรตีนที่นำมาทำการวิเคราะห์โดยใช้แผนภูมิวิวัฒนาการ

1.7.9 Bootstrap test คือการทดสอบความเชื่อมั่นทางสถิติของกลุ่มสิ่งมีชีวิตในแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการโดยใช้วิธีการสุ่มข้อมูลซ้ำ (resampling) จากข้อมูลเริ่มต้นหลายๆครั้ง ซึ่งจะทำการสุ่มซ้ำ 100 ครั้ง ถึง 1,000 ครั้ง แล้วคิดเป็นเปอร์เซ็นต์

## 1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

1.8.1 ทำให้ทราบข้อมูลทางพันธุกรรมและความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน COI ของเหาในพื้นที่ต่างๆในประเทศไทย และจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์นี้สามารถนำไปใช้เป็นฐานข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ใน GenBank และใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานทางด้านระบาดวิทยาของสายพันธุ์เหาศีรษะที่จำเพาะในพื้นที่ประเทศไทย

1.8.2 การทราบถึงข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันอาจมีส่วนช่วยในการพัฒนาสารเคมีที่ใช้ในการกำจัดเหาได้อย่างมีประสิทธิภาพได้ในอนาคต

1.8.3 ทำให้ทราบถึงความชุกของเชื้อ *Bartonella* spp. และเชื้อ *Acinetobacter* spp. ในเหาศีรษะที่เก็บจากภูมิภาคต่างๆในประเทศไทย



## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ชีววิทยาและลักษณะทั่วไปของเหา

##### 2.1.1 การจัดจำแนกหมวดหมู่ตามหลักวิทยาศาสตร์ของเหา

เหา (Lice) เป็นแมลงปรสิตขนาดเล็กซึ่งจัดอยู่ใน

อาณาจักร (Kingdom): Animalia

ไฟลัม (Phylum): Arthropoda

ชั้น (Class): Insecta

อันดับ (Order): Phthiraptera

อันดับย่อย (Suborder): Amblycera

: Ischnocera

: Rhynchophtirina

: Anoplura

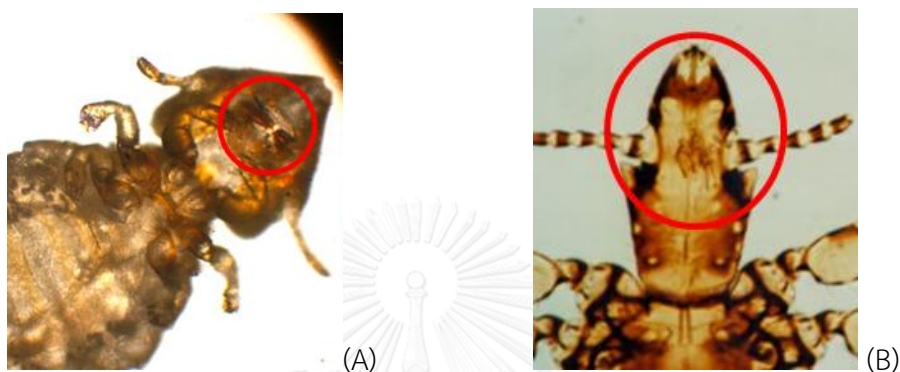
วงศ์ (Family): Pediculidae, Pthiridea

เหาสามารถแบ่งได้ 4 อันดับย่อย (Suborder) โดยมีลักษณะของปากที่แตกต่างกัน โดยที่เหาในกลุ่ม 3 อันดับย่อย คือ Amblycera, Ischnocera, Rhynchophtirina นี้จะมีลักษณะของปากแบบกัดแทะ (Chewing mouthpart) เรียกว่า เหากัด โดยจะกินพวกเส้นขนหรือเศษผิวหนังเป็นอาหารและมีเพียงบางส่วนเท่านั้นที่กินเลือดเป็นอาหารและมีโฮสต์ส่วนใหญ่เป็นสัตว์ปีกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ส่วนอันดับย่อย Anoplura มีลักษณะของปากเหาแบบเจาะดูด (Piercing sucking mouthpart) เรียกว่า เหาคูด จะกินเลือดเป็นอาหารและมีโฮสต์เป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเท่านั้น

เหาในอันดับย่อย Anoplura นี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 15 วงศ์ (family) โดยวงศ์ Pediculidae และวงศ์ Pthiridae เป็นกลุ่มของเหาที่มีความสำคัญทางการแพทย์และก่อให้เกิดความรำคาญและเกิดโรคในมนุษย์โดยที่วงศ์ Pediculidae ประกอบด้วยเหาศีรษะ (*P. humanus capitis*) และเหาดำ (*P. humanus corporis*) และวงศ์ Pthiridae คือ โลน (*Phthirus pubis*) (10)

เหา (*P. humanus*) เป็นแมลงปรสิตขนาดเล็กไม่มีปีกและเป็นปรสิตภายนอกที่ต้องอาศัยอยู่บนร่างกายของโฮสต์ ซึ่งมักพบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและนก โดยเหาได้มีการบันทึกและจำแนกไว้แล้วมากกว่า 3,000 ชนิด โดยเหาในมนุษย์แบ่งเป็น 3 ชนิดหลักๆ ตามบริเวณที่อยู่อาศัยบนร่างกายมนุษย์ คือ เหาศีรษะ (*P. humanus capitis*) อาศัยอยู่บนศีรษะและหนังศีรษะของมนุษย์ เหาลำตัว

(*P. humanus corporis*) อาศัยอยู่ตามขนตามร่างกายหรือบนเสื้อผ้าที่สวมใส่ และโลน (pubis louse) จะพบอาศัยอยู่ตามขนที่อวัยวะสืบพันธุ์ ได้มีการศึกษาด้านพันธุศาสตร์ประชากรของเหาบนศีรษะและเหาตามลำตัวเนื่องจากเหาทั้งสองชนิดมีลักษณะรูปที่เหมือนกันมาก โดยศึกษา Microsatellite DNA ของเหาทั้งสองกลุ่ม พบว่าเหาทั้งสองชนิดมีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างกัน โดยเหาบนศีรษะกับเหาบนร่างกายได้แยกสายวิวัฒนาการออกจากกันเมื่อ 30,000 ถึง 100,000 ปี ก่อนในช่วงที่มนุษย์เริ่มมีการพัฒนาการด้านการสวมใส่เสื้อผ้า(15)



รูปที่ 1 ลักษณะของปากแบบกัดแทะ (A), ลักษณะของปากแบบแทงดูด (B)

(ที่มา: <http://www.pet-informed-veterinary-advice-online.com/lice-pictures.html>)

## 2.1.2 เหามีความสำคัญทางการแพทย์

### 2.1.2.1 *Pediculus humanus capitis* (เหาศีรษะ/ head lice)

เหาศีรษะเป็นปรสิตภายนอกของคน ไม่มีปีกจึงบินไม่ได้ ขาสั้นไม่สามารถใช้ในการกระโดดได้ คุดเลือดเป็นอาหาร พบได้เป็นกลุ่มและอยู่ได้ทุกส่วนของศีรษะ โดยมีกรงเล็บใช้สำหรับเกาะที่เส้นผม จากการรายงานที่พบในคนแล้วยังสามารถพบในลิงชิมแพนซีได้ เหาศีรษะจะแตกต่างจากเหาตัวคือการวางไข่ที่เส้นผมในขณะที่เหาตัวจะชอบวางไข่ที่เสื้อผ้า ในบางคนอาจมีการแพ้ ผื่นคันเกิดขึ้นจากน้ำลายของเหาเรียกว่า pediculosis (4)



รูปที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเหาศีรษะ (ที่มา: <http://www.cdc.gov/parasites/lice/>)

### 2.1.2.2 *Pediculus humanus corporis* (เหาตัว/ body lice)

เหาตัวเป็นเหาดูดเลือดเช่นเดียวกับเหาศีรษะแต่จะอาศัยอยู่ที่ขนบริเวณร่างกายหรือตามเสื้อผ้าที่สวมใส่ วิวัฒนาการมาจากเหาศีรษะที่อพยพมาอาศัยอยู่ตามเสื้อผ้าตั้งแต่มนุษย์มีการใช้เครื่องนุ่งห่ม ลักษณะลำตัวแบน หนวดสั้น รูปร่างเหมือนและคล้ายกับเหาศีรษะมาก เคลื่อนที่ได้รวดเร็วและชอบหลบอยู่ตามใยผ้าหรือขนหน้าอก การติดต่อแพร่กระจายจากคนที่ไม่สนใจสุขอนามัย ไม่เปลี่ยนเสื้อผ้า เหาตัวสามารถเป็นพาหะของโรค epidemic typhus, trench fever และ relapsing fever (4)



รูปที่ 3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเหาตัว (ที่มา:<http://www.cdc.gov/parasites/lice/>)

### 2.1.2.3 *Pthirus pubis* (โลน/ crab louse, pubic louse)

ในทางกีฏวิทยาจัดโลนอยู่ในกลุ่มเดียวกับเหา โดยโลนเป็นแมลงปรสิตที่ติดต่อสู่กันทางอวัยวะสืบพันธุ์ โดยจากการมีเพศสัมพันธ์หรือการใช้สิ่งของร่วมกัน ซึ่งอาจพบโลนได้ในส่วนอื่นเช่น ขนตา ขนใบบนหน้า ขนหน้าอก ขนคิ้วหรือขนรักแร้ พบว่าเป็นแมลงดูดเลือดที่พบได้ในคนและกอริลา ลักษณะของโลนที่แตกต่างไปจากเหาคือขาคู่หน้าจะอ่อนแอกว่า ยาวเรียวยาว ขาคู่อื่นและกรงเล็บสั้นๆ ลำตัวแบนท้องสั้นมากและกว้าง เมื่อถูกโลนกัดบริเวณที่ถูกกัดจะมีอาการคัน อาจพบจุดสีน้ำเงิน (maculae ceruleae) ตามผิวหนังบริเวณท้องหรืออวัยวะสืบพันธุ์ (4)



รูปที่ 4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโลน (ที่มา:<http://www.cdc.gov/parasites/lice/>)

เมื่อดูจากภายนอกแล้วอาจไม่สามารถที่จะจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเหาทั้ง 2 ชนิดคือเหาตัว (*P. humanus corporis*) และเหาศีรษะ (*P. humanus capitis*) ซึ่งมีความแตกต่างกันน้อยมาก อาจต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญทางกีฏวิทยาเพื่อจำแนกสัณฐานวิทยาของเหาทั้ง 2 ชนิดออกจากกัน โดยจากลักษณะของเหาตัวที่ต่างจากเหาศีรษะนั้นคือสีของตัวเหามีสีที่อ่อนกว่า หนวดที่มีความยาวและแคบกว่า และตำแหน่งที่อยู่อาศัยและที่วางไข่ที่แตกต่างกันคือเหาตัวจะอาศัยอยู่บนลำตัวของคนตามขนบริเวณหน้าอกและลำตัวและเสื้อผ้าที่สวมใส่ ซึ่งต่างจากเหาศีรษะที่ต้องอาศัยอยู่เส้นผมบนศีรษะเท่านั้นและวางไข่ยึดติดกับเส้นผม การออกไข่ของเหาศีรษะจะน้อยกว่าเหาตัวและไข่มีขนาดเล็กกว่า อัตราการอยู่รอดเหาศีรษะนั้นจะสูงกว่าเมื่อเทียบกับเหาตัว [9] แต่เมื่อมาศึกษาทางพันธุศาสตร์โดยศึกษาวิวัฒนาการโดยสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการจากยีนไมโทคอนเดรียแล้ว เหาตัวจะจัดอยู่ใน clade A ต่างจากเหาศีรษะที่สามารถแยกได้เป็น 3 clade คือ clade A, B และ C เพราะฉะนั้นการศึกษายีนไมโทคอนเดรียอาจสามารถช่วยจำแนกความแตกต่างของเหาทั้งสองชนิดได้เช่นกัน (17, 18)

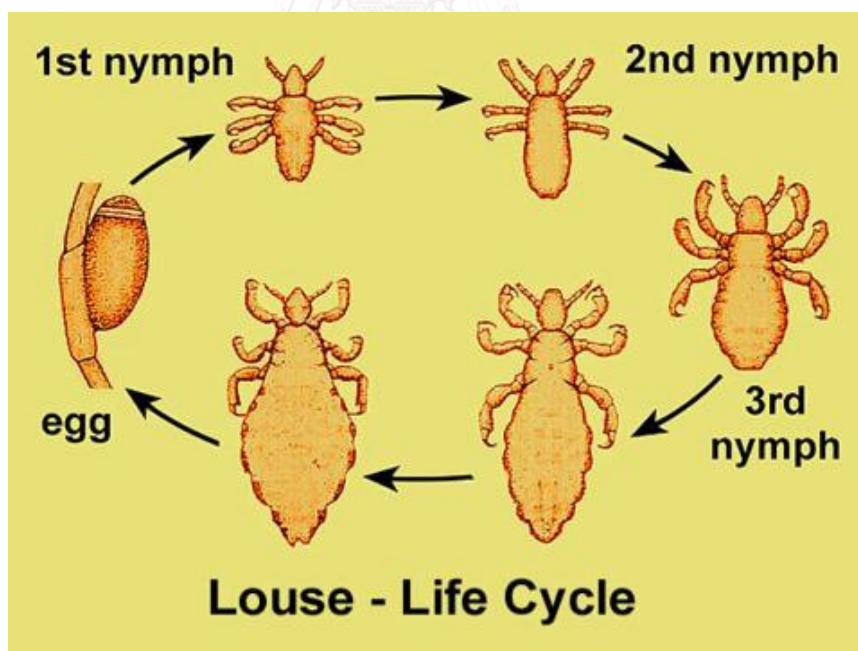
จากการศึกษาด้วยยีนที่อยู่ไมโทคอนเดรียจะพบว่าเหาตัวและเหาศีรษะบางส่วนยังจัดอยู่ใน clade A เช่นกัน ซึ่งมีงานวิจัยที่ได้ศึกษาเพื่อแยกเหาตัวและเหาศีรษะที่จัดอยู่ใน clade A โดยจากงานวิจัยของ Drail R และคณะในปี 2013 ได้ศึกษาตัวอย่างเหาจำนวน 142 ตัวอย่าง จาก 13 ประเทศโดยผู้วิจัยได้ศึกษายีนไมโทคอนเดรียคือ ยีน *Cytb* เพื่อแยก clade A, B และ C จากนั้นได้อาตัวอย่างเหาจาก clade A มาแยกชนิดของเหาตัวและเหาศีรษะด้วยเทคนิค Multiplex real-time PCR โดยใช้ยีน *Phum\_PHUM540460* ซึ่งเป็น housekeeping gene พบว่าสามารถแยกเหาทั้ง 2 ชนิดได้อย่างชัดเจน โดยมีค่า sensitivity และ specificity เท่ากับ 100% ซึ่งยีนดังกล่าวนี้พบว่ามีความสามารถที่จะใช้เป็น genetic marker ในการศึกษาแยกชนิดของเหาทั้ง 2 species ได้เป็นอย่างดี (19)

## 2.2 ชีววิทยาและสัณฐานวิทยาของเหาศีรษะ

เหาศีรษะ (*P. humanus capitis*) เป็นปรสิตจำเพาะที่อาศัยอยู่บนศีรษะของมนุษย์ตลอดวงจรชีวิตของมัน โดยวงจรชีวิตของเหาศีรษะเป็นแบบไม่สมบูรณ์ (Incomplete metamorphosis หรือ hemimetabolus) ในวงจรชีวิตประกอบด้วย 3 ระยะ คือ ระยะไข่ (egg หรือ nit) ตัวกลางวัย (nymph) และตัวเต็มวัย (adult)

### 2.2.1 วงจรชีวิตของเหาศีรษะ

เหาศีรษะมีการเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงรูปร่างแบบค่อยเป็นค่อยไป (Gradual metamorphosis) เมื่อเหาตัวผู้และตัวเมียผสมพันธุ์กันแล้ว เหาตัวเมียจะวางไข่ยึดติดกับเส้นผมหรือขนโดยใช้กาวเหนียวๆ (cement) ซึ่งเป็นสารจำพวกโปรตีนคล้ายเคอราตินบนเส้นผม กาวนี้จะแห้งแข็งหุ้มไข่เอาไว้ และจะมีรูเปิด (operculum) ที่ปลายเปลือกหุ้มไข่ เหาตัวเต็มวัยตัวเมียจะวางไข่วันละประมาณ 6-9 ฟอง หรือประมาณ 200-300 ฟอง ตลอดช่วงชีวิตของเหาตัวเมีย การวางไข่ของเหาขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของอากาศ โดยในสภาพอากาศเย็น เหาจะวางไข่ห่างจากหนังศีรษะประมาณ 1 เซนติเมตร แต่ในสภาพอากาศที่อบอุ่น เหาตัวเมียจะวางไข่ในตำแหน่ง 1.5 เซนติเมตรห่างออกมาจากหนังศีรษะ หลังจากวางไข่ประมาณ 7 วัน ตัวอ่อนระยะ nymph จะฟักออกมาจากไข่และจะมีการลอกคราบทั้งหมด 3 ครั้ง โดยจะลอกคราบครั้งแรกภายใน 2 วันหลังจากฟักออกจากไข่ รวมแล้วใช้เวลาประมาณ 16-18 วัน แล้วจะเจริญเป็นตัวเต็มวัย เหาศีรษะมีอายุประมาณ 30 วัน หากเหาชนิดนี้อยู่นอกตัวมนุษย์จะมีชีวิตอยู่ได้เพียง 1-2 วัน

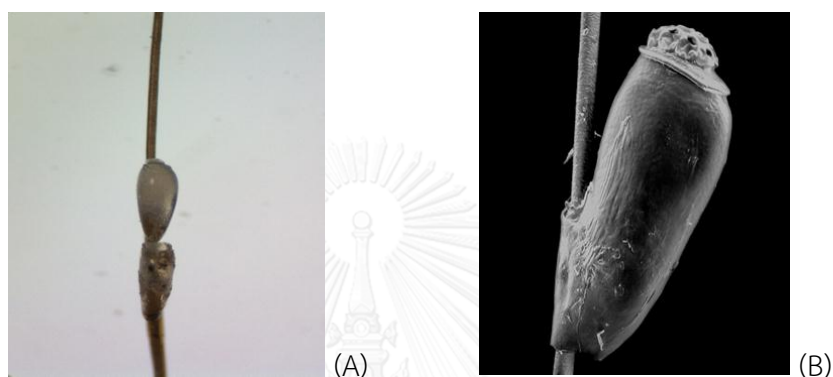


รูปที่ 5 วงจรชีวิตของเหาศีรษะ (*P. humanus capitis*)

(ที่มา: [http://cal.vet.upenn.edu/projects/merial/introduction/intro\\_3.htm](http://cal.vet.upenn.edu/projects/merial/introduction/intro_3.htm))

### 2.2.2 ระยะเวลาไข่ (egg หรือ nit)

ระยะเวลาไข่เมื่อเหาตัวเมียผสมพันธุ์แล้วจะวางไข่ไว้ที่บริเวณเส้นผมประมาณ 8-10 ฟอง ต่อวัน โดยในวงจรชีวิตของเหาตัวเมียจะออกไปประมาณ 50-300 ฟอง สีของไข่เหาค่อนข้างเป็นสีเทาขาว หรือสีน้ำตาลอ่อน ผิวเป็นมันวาว แต่ละใบจะมีตัวอ่อน 1 ตัว ไข่จะฟักในช่วงอุณหภูมิประมาณ 29-32 °C และมักจะพบบริเวณโคนเส้นผม ไข่เหามีขนาดประมาณ 0.8 มิลลิเมตร เหาตัวเมียจะปล่อยสารประเภทโปรตีนคล้ายกับเคอร์ราตินทำให้ไข่ยึดติดกับเส้นผมได้



รูปที่ 6 ลักษณะของระยะเวลาไข่เหาที่ระบุจากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (A) และจากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (B)

(ที่มา: [http://www.cdc.gov/parasites/lice/head/gen\\_info/faqs.html](http://www.cdc.gov/parasites/lice/head/gen_info/faqs.html))

### 2.2.3 ระยะเวลาตัวกลางวัย (nymph)

เมื่อไข่จะฟักเป็นระยะตัวกลางวัยนั้น ตัวกลางวัยจะดัน operculum ให้เปิดออก แล้วฉีกส่วน vitelline membrane และดันตัวออกมา ตัวกลางวัยเป็นระยะที่การเจริญของระบบสืบพันธุ์แบบไม่สมบูรณ์ ไม่สามารถแยกเพศผู้และเพศเมีย มีขนาดประมาณ 1 มิลลิเมตร สำหรับระยะตัวกลางวัยประกอบด้วย 3 ระยะ ทั้ง 3 ระยะจะใช้เวลาประมาณ 8-9 วัน แต่ถ้าออกจากผิวหนังในตอนกลางคืนช่วงระยะเวลาของระยะตัวกลางวัยก็จะยาวขึ้นประมาณ 16-19 วัน โดยที่ระยะตัวกลางวัยระยะที่ 1 และ 2 จะค่อนข้างอยู่นิ่งไม่มีการเคลื่อนไหว ส่วนระยะตัวกลางวัยระยะที่ 3 เริ่มมีการเคลื่อนไหวได้แล้วและสามารถติดต่อไปยังบุคคลอื่นได้ ระยะตัวกลางวัยนั้นจะต้องมีการลอกคราบทั้งหมด 3 ครั้งจึงจะเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัย และพฤติกรรมของระยะตัวกลางวัยจะเหมือนกับระยะตัวเต็มวัยคือสามารถดูดกินเลือดจากโฮสต์เป็นอาหาร



รูปที่ 7 ลักษณะของระยะตัวกลางวัยเหาศีรษะ

#### 2.2.4 ระยะตัวเต็มวัย (adult)

เมื่อเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัย (adult) ตัวเต็มวัยเหาศีรษะมีขนาดความยาวประมาณ 1-3 มิลลิเมตร โดยเหาศีรษะตัวผู้มีขนาดประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าเหาตัวเมียที่มีขนาดประมาณ 3-4 มิลลิเมตร (3) ลักษณะสัณฐานของตัวเต็มวัยมีลำตัวแบน มีรูปร่างยาวรี ด้านหลังและด้านท้องแบนเข้าหากัน (Dorso - ventrally flatten) ตัวเหาถูกแบ่งเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้อง ส่วนหัวมีลักษณะเรียวยาวเล็กแคบกว่าส่วนอก ปล้องอกไม่แยกจากกัน ท้องมี 7 ปล้องเห็นได้ชัดเจน โดย 6 ปล้องแรกจะมีรูหายใจปล้องละ 1 คู่ และปล้องสุดท้ายจะมีรูทวาร ผิวหนังส่วนท้องมีความยืดหยุ่นเพื่อรองรับเลือดที่ดูดกินเข้ามา ส่วนท้องมักจะพองออกอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเหามีการดูดกินเลือดเข้ามาอย่างเต็มที่ มีหนวด 1 คู่ แต่ละเส้นมี 5 ปล้องยื่นออกจากหัว ตาประกอบมี 1 คู่ มีขา 3 คู่ ที่มีลักษณะสั้น ปลายขามีกรงเล็บ (claw) 1 อัน จึงสามารถใช้ขาเกี่ยวเส้นผมได้ดี เหาศีรษะมีสีเทาขาว (grayish white) เทาหรือน้ำตาลอ่อน แต่ส่วนมากสีจะแปรผันไปตามสภาพแวดล้อมหรือหลังจากกินเลือดสีจะเป็นสีแดง ในการเคลื่อนที่เหาศีรษะจะเคลื่อนที่ได้ช้าโดยสามารถเคลื่อนที่ได้ 23 เซนติเมตรต่อนาที และเนื่องจากมีขาที่สั้นและไม่มีปีกจึงไม่สามารถที่จะกระโดดหรือบินได้ เหาศีรษะนั้นสามารถอาศัยอยู่นอกโฮสต์ได้ประมาณ 3 วัน ส่วนไข่ของเหาศีรษะนั้นสามารถอยู่นอกโฮสต์ได้นานถึง 10 วัน (20)

ความแตกต่างของเหาศีรษะระหว่างตัวผู้และตัวเมียอาจอาศัยความแตกต่างบริเวณส่วนปลายท้องคือส่วนของ gonopod ซึ่งเหาตัวผู้จะมี aedeagus หรืออวัยวะเพศที่ส่วนปลายของท้อง และขาคู่หน้าสุดจะมีขนาดใหญ่เพื่อใช้ในการเกาะเพศเมียระหว่างการจับคู่ผสมพันธุ์ ส่วนเหาตัวเมียส่วนปลายของท้องจะมี gonopod 2 อันลักษณะปลายแยกเป็นแฉกรูปตัว W เรียกว่า bilobe และมีรูเปิดของอวัยวะเพศอยู่ตรงกลาง



รูปที่ 8 ลักษณะของระยะตัวเต็มวัยเหาศีรษะตัวเมีย (A) และตัวผู้ (B)

### 2.3 โรคเหา (Pediculosis)

เหาศีรษะมีการกระจายประชากรไปทั่วโลก ซึ่งส่วนใหญ่เกิดในเด็กอายุ 3 - 11 ปี และพบโรคเหาในเด็กเพศหญิงมากกว่าเพศชาย โรคเหาพบมากในหลายประเทศ เช่น อิสราเอล ออสเตรเลีย เดนมาร์ก สวีเดน สหราชอาณาจักร ฝรั่งเศส และไทย ซึ่งต่อมอนามัยโลก (WHO) ได้รายงานถึงการติดโรคเหาว่ามีกระบาดไปทั่วทั้งโลก โดยมีร้อยละการติดเหาอยู่ที่ประมาณ 10-25% แต่จากการสำรวจพบว่าในกลุ่มชาวแอฟริกัน-อเมริกัน พบโรคเหาน้อยกว่ากลุ่มคนเชื้อชาติอื่น อย่างไรก็ตามโรคเหาไม่ขึ้นกับสุขภาพของร่างกาย เหาเป็นปรสิตที่อยู่กับมนุษย์มาเป็นเวลานาน จึงมีวิวัฒนาการร่วมมาเรื่อยๆ พร้อมกับมนุษย์ และกระจายประชากรออกไปพร้อมกับการกระจายตัวของมนุษย์ไปทั่วโลก

เหาสามารถอยู่อาศัยได้ทั่วศีรษะของโฮสต์ แต่จะพบการวางไข่มากที่บริเวณใกล้ต้นคอและศีรษะหลังหู เหาตัวเต็มวัยสามารถกระจายติดต่อข้ามโฮสต์ได้ผ่านการสัมผัส หรืออยู่ใกล้กันระหว่างโฮสต์ รวมไปถึงการใช้สิ่งของร่วมกัน เช่น หวี ผ้าเช็ดตัว เสื้อผ้า เตียงนอน เหาสามารถใช้ปลายขาที่มีลักษณะเป็นตะขอในการเคลื่อนที่บนเส้นผมได้อย่างรวดเร็ว ทำให้การติดต่อระหว่างคนสู่คนแพร่กระจายอย่างรวดเร็ว (6)

โรคเหาเกิดจากการที่มีเหาอยู่บนศีรษะเป็นจำนวนมาก ส่วนมากจะเกิดขึ้นกับเด็กผู้หญิงเนื่องจากผมยาวกว่าเด็กผู้ชาย เมื่อเป็นโรคเหาเราสามารถสังเกตเห็นได้จากตัวเหาหรือไข่เหาที่ติดอยู่บนโคนเส้นผม น้ำลายของเหาจะทำให้เกิดการระคายเคืองผิวหนังได้ เนื่องจากมีสาร Anti-coagulant ทำให้เกิดตุ่มแดงคันบริเวณที่ถูกกัดหลังจากการดูดเลือดใหม่ ๆ มักจะเกิดขึ้นในช่วงเวลากลางวัน เพราะเหามักจะดูดเลือดในช่วงนี้ อาการคันจะพบได้บริเวณหลังใบหูและศีรษะส่วนล่างใกล้



บริเวณคอ และเด็กจะเกาจนหนังศีรษะถลอก อักเสบเป็นแผล อาจทำให้มีการติดเชื้อแบคทีเรียได้ รวมไปถึงการวางไข่ของเหาจะมีการหลั่งสาร cement จำพวกโปรตีนเกาะแน่นกับเส้นผมเพื่อหุ้มไข่เอาไว้ ทำให้เส้นผมเกิดความหยาบกร้านและไม่ดีต่อสุขภาพหนังศีรษะ นอกจากนี้ยังทำให้เด็กเสียสมาธิในการเรียนนอกจากอาการคันหนังศีรษะ อับอายเพื่อน เด็กผู้หญิงที่เป็นโรคเหาสามารถแพร่การติดเชื้อให้แก่เด็กคนอื่นๆ ภายในชั้นเรียนเดียวกันได้ภายใน 24 ชั่วโมง

การวินิจฉัยโรคจะต้องพิจารณาว่าจุดขาวที่สังเกตเห็นบนหัวเกิดจากรังแคหรือไข่เหา ไข่เหาจะมีลักษณะเป็นสีเหลืองออกขาวขุ่นเล็กน้อยและมักอยู่ใกล้โคนเส้นผม แพทย์วินิจฉัยการติดเชื้อได้จาก อาการคัน ร่วมกับการตรวจพบตัวเหาหรือไข่เหา ซึ่งมีหลายเทคนิควิธี ตั้งแต่การหาด้วยตาเปล่า การใช้แว่นขยายช่วยส่องตรวจ การใช้หวีซี่เล็กๆ ที่เรียกว่าหวีเสนียด หวีผมหรือเส้นขนขณะเปียก จะช่วยทำให้พบตัวเหาหรือไข่เหาได้ง่ายขึ้น การติดเชื้อเหาหัวหากมีปริมาณมากแล้วไม่ได้รับการรักษาจะทำให้ผมพันกันกลายเป็นก้อน มีสะเก็ดหนองและเกิดกลิ่นเหม็น เรียกว่า Plica polonica เกิดภาวะโลหิตจาง (anemia) จากการดูดกินเลือดของเหา และถ้าหากเกิดอาการคันจนเกามากจนผิวหนังถลอก อาจทำให้แผลติดเชื้อแบคทีเรีย อักเสบและเป็นหนองได้ นอกจากนี้การดูดเลือดของเหายังเป็นพาหะนำโรคหลายชนิด เช่น epidemic typhus, trench fever และ relapsing fever (21)

การป้องกันโรคเหาสามารถทำได้โดยการสระผมให้สะอาดเป็นประจำอย่างน้อยสัปดาห์ละ 2 ครั้งและไม่คลุกคลีหรือใช้สิ่งของร่วมกับผู้ป่วย นอกจากนี้ครูหรือผู้ปกครองควรตรวจหาให้เด็กอย่างน้อยสัปดาห์ละ 1 ครั้ง และแนะนำให้เพื่อนและสมาชิกในครอบครัวกำจัดเหาพร้อมกันด้วยวิธีที่ถูกต้อง ซึ่งเป็นการป้องกันการแพร่ระบาดของโรคเหาได้ หากสมาชิกในครอบครัวเป็นเหาควรนำเครื่องใช้ของผู้ติดเชื้อไปล้างทำความสะอาด ส่วนเครื่องนุ่งห่มควรนำไปตากแดดหรือซักให้สะอาด การสระผมและใช้หวีเสนียดสางเหาและไข่ออก ถ้าทำเช่นนี้ทุกวันประมาณ 2 - 3 สัปดาห์ จะช่วยให้เหาหมดไปได้โดยไม่ต้องใช้ยากำจัด การใช้หวีเสนียดควรใช้หวีซึ่งมีซี่ของหวีถี่มากใช้สางผม ทำให้ทั้งตัวเหาและไข่เหาหลุดติดกับหวีออกมา นอกจากนี้วิธีโกนผมออกให้หมดเป็นการรักษาที่ได้ผลดี เพราะเหาไม่มีที่ยึดเกาะ ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก และไม่สิ้นเปลือง สำหรับวิธีการรักษาแบบพื้นบ้านโดยทั่วไปมีการใช้สมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเหา ได้แก่ ใบน้อยหน่า ใบสะเดา ผลมะตูม ผลมะกรูด เป็นต้น วิธีใช้โดยการตำแล้วคั้นกับน้ำหรือน้ำมัน ชโลมผมให้ทั่วศีรษะ ทิ้งไว้ 3-4 ชั่วโมง จึงสระผม ในการกำจัดเหาจำเป็นต้องทำซ้ำเพราะไข่เหาอาจยังไม่ถูกกำจัดได้โดยทันที

สมุนไพรหลายชนิดที่ใช้สามารถฆ่าตัวเหาได้ แต่ไข่อาจจะถูกกำจัดไม่หมดจึงควรใช้ซ้ำและแนะนำให้รักษาความสะอาดโดยการสระผมบ่อยๆ นอกจากนี้สามารถใช้อยากำจัดเหาซึ่งมีอยู่หลายรูปแบบทั้งแบบครีม โลชั่นหรือในรูปแบบเจล สำหรับยาที่ออกฤทธิ์ในการกำจัดเหาที่ดีจะเป็นสูตรที่มีส่วนผสมของ malathion หรือยาที่อยู่ในกลุ่ม pyrethroids ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ เช่น permethrin แต่ควรที่จะใช้เมื่อพบตัวของเหาและเมื่อใช้ยาไปแล้วควรที่จะดูแลการรักษาประมาณ 6-

10 วัน หากยังพบตัวเหาอยู่ให้ทำการรักษาซ้ำอีก การใช้สารเคมีควรใช้อย่างระมัดระวัง และปฏิบัติตามคำแนะนำในฉลาก

ปัจจุบันมีงานวิจัยได้มีการนำสารสกัดธรรมชาติ (essential oil) เช่น tea tree oil ซึ่งสกัดได้จากพืชพื้นเมืองชื่อว่า *Melaleuca alternifolia* ที่อยู่ในประเทศออสเตรเลีย ซึ่ง tea tree oil มีรายงานว่ามีความสมบัติออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายอย่าง เช่น anti-microbial, anti-inflammatory, anti-cancer และ insecticidal activity เมื่อนำมาทดสอบการกำจัดเหาพบว่าสามารถฆ่าตัวเหาได้ภายใน 20 นาทีและในระยะไข่นั้นสามารถทำให้ไข่ของเหาไม่สามารถฟักออกมาเป็นตัวได้ภายในระยะเวลา 4 วัน แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากพืชสามารถนำมาใช้แทนสารสังเคราะห์ที่ใช้อยู่ในปัจจุบันได้เช่นกัน (3)

## 2.4 เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ในการศึกษาและวิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรม

การนำดีเอ็นเอมาใช้เป็นเครื่องหมาย (DNA marker) สามารถศึกษาได้ทั้งส่วนที่เป็นยีน (coding sequence) และส่วนที่ไม่ใช่ยีน (non-coding sequence) นอกจากนี้ยังสามารถใช้เพื่อศึกษาการจัดเรียงของดีเอ็นเอแล้วยังสามารถใช้ตรวจสอบความหลากหลาย (polymorphism) ทางพันธุกรรมและศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตได้ โดยบริเวณของยีนที่อยู่บนดีเอ็นเอ นั้นสามารถศึกษาได้ทั้งยีนที่อยู่บนดีเอ็นเอในนิวเคลียสและยีนที่อยู่บนดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย

### 2.4.1 ยีนที่อยู่บนดีเอ็นเอในนิวเคลียส (Nuclear DNA gene)

ในส่วนของจีโนมที่อยู่ในนิวเคลียสมีการถอดรหัสของดีเอ็นเอไปเป็นอาร์เอ็นเอเพื่อที่จะแปลรหัสเป็นโปรตีนต้องอาศัยยีนบนดีเอ็นเอต้นแบบคือ mRNA gene, tRNA gene และ rRNA gene ซึ่งแต่ละยีนจะสร้างโมเลกุลที่จำเป็น 3 ชนิดด้วยกัน คือ messenger RNA (mRNA) ทำหน้าที่เป็นตัวกลางนำข้อมูลจากดีเอ็นเอเพื่อแปลรหัสเป็นโปรตีน transfer RNA (tRNA) ทำหน้าที่นำกรดอะมิโนไปยังบริเวณที่มีการสังเคราะห์โปรตีน และ ribosomal RNA (rRNA) ทำหน้าที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์โปรตีน ตามลำดับ

ยีนในกลุ่มของ rDNA นั้นจัดอยู่ในกลุ่มที่อยู่ในตำแหน่งที่แน่นอนบนโครโมโซม โดยยีนมีลักษณะเป็นครอบครัว (gene family) จำนวนมากและเป็นยีนที่มีจำนวนชุดซ้ำสูงมากและเรียงซ้ำต่อกันอยู่ในทิศทางเดียวกันตลอด (tandem repeat) เนื่องจากมีความต้องการผลิตจากยีนดังกล่าวในปริมาณที่สูงมากประมาณ 5-10 ล้านโมเลกุลต่อเซลล์ ยีน rRNA ในสิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่จะอยู่ที่ตำแหน่ง nuclear organizer region (NOR) บนโครโมโซมที่จำเพาะซึ่งมีปริมาณหลายร้อยถึงหลายพันชุด แต่ละชุดประกอบด้วยยีนที่ถอดรหัสเป็น 18S, 5.8S และ 28S rRNA ซึ่งจะยังคงเป็นชุดเดิมตลอด โดยแต่ละชุดจะมีส่วนของดีเอ็นเอแทรกอยู่คือ inter transcribed spacer 1

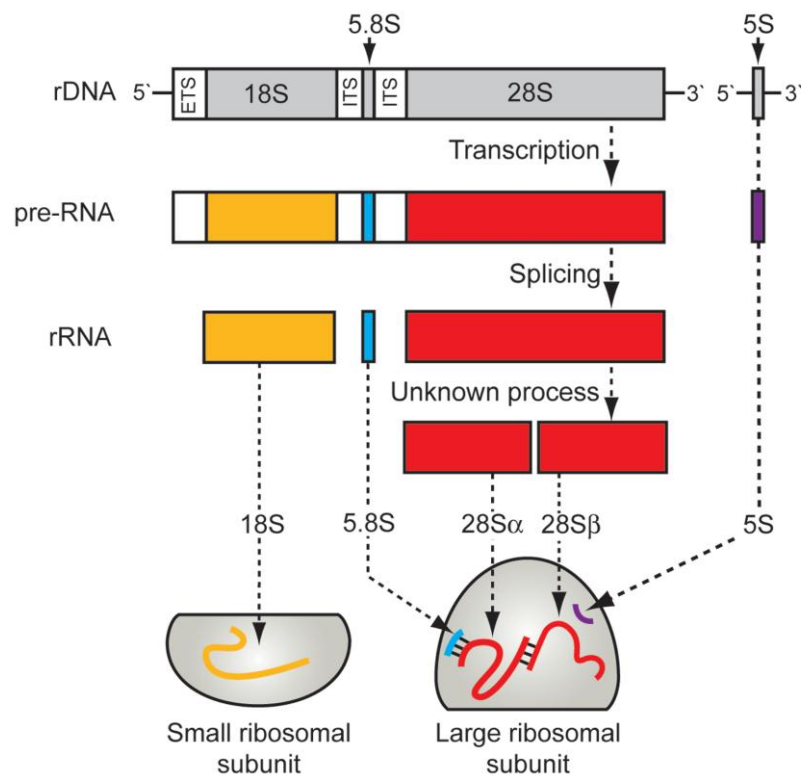
(ITS1) เป็นดีเอ็นเอซึ่งแทรกอยู่ระหว่าง 18S กับ 5.8S และ inter transcribed spacer 2 (ITS2) แทรกอยู่ระหว่าง 5.8S กับ 28S ซึ่งไม่มีความสำคัญในการทำหน้าที่ (รูปที่ 1) แต่ลำดับเบสในบริเวณนี้มีความหลากหลายสูง โดยพบว่าส่วนของยีนกลุ่ม rRNA ซึ่งเป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved genes) มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงทั้งในลำดับเบสและความยาว เมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันหรือภายในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน โดยนิยมนำมาใช้ศึกษาวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตและการจำแนกสิ่งมีชีวิตด้วยเช่นกัน

#### 2.4.2 ยีนที่อยู่บนดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย (Mitochondrial DNA gene)

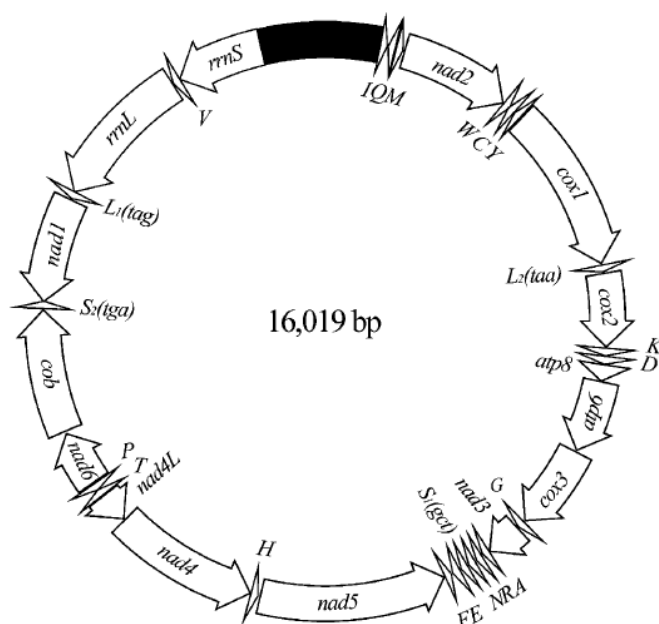
การศึกษาในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอพบว่าในเซลล์ยูคาริโอตโดยปกติ โครโมโซมของไมโทคอนเดรียมีลักษณะเป็นวงสายคู่ (double-stranded circular chromosome) มีความยาวประมาณ 16 กิโลเบส (รูปที่ 10) ประกอบด้วยยีนจำนวน 37 ยีน แยกเป็นส่วนของยีนที่ควบคุมการถอดรหัสเป็น ribosomal RNA จำนวน 2 ยีน ยีนที่ควบคุมการถอดรหัสเป็น tRNA ในการควบคุมการถอดรหัสของโปรตีนในไมโทคอนเดรีย 22 ยีน และยีนทำหน้าที่ในการสร้างโปรตีนในกระบวนการ Oxidative phosphorylation จำนวน 13 ยีน โดยโปรตีนที่ได้จากการถอดรหัสทั้ง 13 ชนิดนี้เป็นโปรตีนหน่วยย่อยของเอนไซม์เชิงซ้อนที่ใช้ในกระบวนการ oxidative phosphorylation ประกอบด้วยเอนไซม์ 5 ชนิด คือ NADH-ubiquinone oxidoreductase, Succinate-ubiquinone oxidoreductase, Ubiquinol-cytochrome C oxidoreductase, Cytochrome oxidase และ ATP synthase สำหรับยีนที่ถอดรหัสเป็นโปรตีนหน่วยย่อยของเอนไซม์เชิงซ้อน NADH-ubiquinone oxidoreductase ประกอบด้วย 7 ยีน คือ ยีน ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 และ ND6 ยีนที่ถอดรหัสเป็นโปรตีนหน่วยย่อยของเอนไซม์เชิงซ้อน Ubiquinol-cytochrome C oxidoreductase มีเพียงยีนเดียว คือ ยีน *cytb* ยีนที่ถอดรหัสเป็นโปรตีนหน่วยย่อยของเอนไซม์เชิงซ้อน Cytochrome oxidase ประกอบด้วย 3 ยีน คือ ยีน COI, COII และ COIII และยีนที่ถอดรหัสเป็นโปรตีนหน่วยย่อยของเอนไซม์เชิงซ้อน ATP synthase คือ ยีน ATP6 และ ATP8

การถ่ายทอดดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียจะถ่ายทอดผ่านทางมารดา เนื่องจากเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียจะมี cytoplasm ซึ่งมี organelle ต่างๆอยู่ ซึ่งเป็นข้อดีในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร โดยจีโนมในไมโทคอนเดรียมีลักษณะเป็น haploid จึงเรียกรูปแบบของดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียว่า haplotype โดยในเซลล์ของสัตว์จะมีรูปแบบของดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียที่เหมือนกันโดยอาจเรียกว่า homoplasmy แต่บางครั้งอาจพบได้ว่าไมโทคอนเดรียถ่ายทอดผ่านเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ได้ด้วยแม้ว่าจะมีโอกาสที่จะเกิดขึ้นได้น้อยมาก ทั้งนี้จะทำให้ลูกมีลักษณะของไมโทคอนเดรียที่มีดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน เรียกว่า heteroplasmy ซึ่งการศึกษาโดยใช้ยีนในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอเป็น

เครื่องหมายดีเอ็นเอที่พบว่ามีข้อดีคือ ยีนในไมโทคอนเดรียมีอัตราการความผันแปรสูงมากกว่ายีนในนิวเคลียสประมาณ 10 เท่า โดยพบว่าบริเวณที่ไม่ได้เป็นส่วนของยีนซึ่งรวมไปถึงบริเวณ control region หรือ displacement (D) loop มีอัตราการกลายพันธุ์สูงในสิ่งมีชีวิตหลายๆชนิดโดยมีผลมาจากผลผลิตที่ได้จากกระบวนการ oxidative phosphorylation และกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอ และการตรวจสอบความผิดพลาดของสายดีเอ็นเอที่มีการสังเคราะห์ลำดับเบสผิดที่ไม่ดีเท่าในนิวเคลียส โดยอัตราการกลายพันธุ์ที่สูงในไมโทคอนเดรียทำให้เกิดความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ (polymorphism) จึงเหมาะในการนำมาศึกษาวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตและการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตได้ดีเช่นกัน (22)



**รูปที่ 9** แสดงโครงสร้าง gene family ของกลุ่มยีน ribosomal DNA  
(ที่มา: [http://www.quazoo.com/q/Eukaryotic\\_Large\\_Ribosomal\\_Subunit](http://www.quazoo.com/q/Eukaryotic_Large_Ribosomal_Subunit))



รูปที่ 10 แสดงลักษณะไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอเซลล์ยูคาริโอตในแมลงวันผลไม้ (*Drosophila yaguba*) ลักษณะเป็นวงกลมเดี่ยวสายคู่ มีขนาดประมาณ 16 kb (23)

## 2.5 เทคนิคที่ใช้ในการศึกษาอนุพันธุศาสตร์

### 2.5.1 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction หรือ PCR) ค้นพบโดย Kary B. Mullis ในปี ค.ศ. 1983 ซึ่งเทคนิคนี้สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของดีเอ็นเออย่างมีความจำเพาะ ง่าย รวดเร็วภายในหลอดทดลอง โดยอาศัยการเลียนแบบกระบวนการธรรมชาติที่เซลล์ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอก่อนการแบ่งเซลล์ ซึ่งจะเริ่มจากดีเอ็นเอเป้าหมายเพียงชิ้นเดียวหรือเซลล์เพียงเซลล์เดียว โดยเทคนิคนี้สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้เป็นล้านๆชิ้นในหลอดทดลองในเวลาไม่นาน สำหรับปัจจัยสำคัญในการทำ PCR โดยเราต้องทราบลำดับเบสของยีนที่ปลายทั้ง 2 ข้างที่ต้องการเพิ่มจำนวนเพื่อที่จะสร้างสาย Primer หรือนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆขนาดประมาณ 18-30 bp จำนวน 2 เส้นที่จำเพาะกับเส้นยีนเป้าหมายที่เราต้องการเพิ่มจำนวน นอกจากนี้ปฏิกิริยา PCR จำเป็นที่ต้องใช้เอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งมีความทนต่อความร้อนสำหรับเป็นตัวช่วยในกระบวนการสร้างสายดีเอ็นเอใหม่ โดย DNA polymerase ที่นิยมใช้ได้จากแบคทีเรียจากน้ำพุร้อนมีชื่อว่า *Thermus aquaticus* (*Taq* polymerase) ซึ่งเอนไซม์นี้จะต้องอาศัย  $Mg^{2+}$  เป็น cofactor และนอกจากนี้แล้วปฏิกิริยา PCR ยังต้องการนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิดคือ dATP, dCTP, dGTP, dTTP เป็นสารตั้งต้นและมี buffer เป็นตัวควบคุมให้ระบบปฏิกิริยาอยู่ในสภาวะที่เหมาะสม

สำหรับปฏิกิริยา PCR นั้นจะเกิดขึ้นเป็นรอบ (cycle) โดยเราจะนำดีเอ็นเอต้นแบบและองค์ประกอบทั้งหมดใส่ในหลอดทดลองและนำหลอดทดลองดังกล่าวนี้ใส่ลงในเครื่องอัตโนมัติ (thermocycler) ที่สามารถปรับอุณหภูมิและเวลาตามที่เรากำลังต้องการ ซึ่งแต่ละรอบของปฏิกิริยา PCR มีดังต่อไปนี้

2.5.1.1 Denaturation ขั้นตอนนี้เป็นกระบวนการแยกสายของดีเอ็นเอสายคู่โดยการทำลายโครงสร้างของดีเอ็นเอด้วยความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 95°C เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอสายต้นแบบที่ primer จะสามารถเข้ามาเกาะได้ในขั้นตอนต่อไป

2.5.1.2 Annealing เป็นขั้นตอนที่สาย primer เข้ามาเกาะกับสายดีเอ็นเอต้นแบบทั้ง 2 เส้น โดยในขั้นตอนนี้จะลดอุณหภูมิลงมาเหลือประมาณ 50-60 °C (อาจมากหรือน้อยกว่านี้ขึ้นอยู่กับความยาวและองค์ประกอบของเส้น primer) และอาจเกิดการกลับมาจับคู่กันใหม่ (reannealing) ของดีเอ็นเอต้นแบบ แต่เนื่องจาก primer มีขนาดเล็กกว่าเส้นดีเอ็นเอต้นแบบและมีปริมาณที่มากกว่าและเป็นคู่สม (complementary) จึงมีโอกาสที่จะเกิดการจับคู่กับดีเอ็นเอต้นแบบได้ก่อน

2.5.1.3 Extension เป็นขั้นตอนในการต่อสายนิวคลีโอไทด์โดยเริ่มจากนิวคลีโอไทด์ตัวสุดท้ายที่อยู่ด้านปลาย 3' ของเส้น primer ทั้งสองข้าง โดยจะใช้อุณหภูมิประมาณ 72°C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ *Taq* polymerase โดยจะทำการสร้างสายใหม่จากทิศทาง 5' ไป 3'

เมื่อครบปฏิกิริยา PCR แล้วจะวนกลับไปเริ่มต้นใหม่จากขั้นตอนแรกโดยจะทำซ้ำประมาณ 30-40 รอบ เราจะได้ชิ้นส่วนของยีนเป้าหมายที่สนใจ ในปัจจุบันเครื่อง thermocycler ได้มีการพัฒนาให้เพิ่มลดอุณหภูมิได้เร็วขึ้น ซึ่งสามารถเสร็จปฏิกิริยา PCR ได้ในเวลาไม่เกิน 2 ชั่วโมง โดยปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ในแต่ละรอบของ PCR จะเพิ่มแบบ  $2^n$  โดยเมื่อ n คือจำนวนของรอบของการทำปฏิกิริยา PCR

## 2.5.2 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค Sequencing

เทคนิคในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในสายดีเอ็นเอมีการศึกษาและพัฒนาขึ้นหลากหลายวิธี ซึ่งในปัจจุบันพบว่าวิธีที่นิยมมากที่สุดคือวิธีที่พัฒนาขึ้นโดย Frederick sanger และคณะในปี ค.ศ. 1977 โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้จะอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ที่มันสามารถเติมนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในรูปของ deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP) ทีละตัวใน ดีเอ็นเอสายใหม่ที่สร้างขึ้นซึ่งจะมีลำดับเบสที่เข้ากับสายดีเอ็นเอต้นแบบ โดยจะเกิดการต่อสายไปเรื่อยๆ แต่ถ้ามีการเติม dideoxyribonucleotide triphosphate (ddNTP) จะทำ

ให้ DNA polymerase ไม่สามารถที่จะเติมนิวคลีโอไทด์ตัวต่อไปในการสร้างสายใหม่ได้ เนื่องจากขาดหมู่ OH ที่ตำแหน่ง 3' ในโมเลกุลของน้ำตาลดีออกซีไรโบสซึ่งมีความจำเป็นในการสร้างพันธะ phosphodiester กับ dNTP ตัวถัดไปซึ่งเราเรียกการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ ddNTP ว่ากระบวนการ dideoxy chain termination DNA sequencing

สำหรับกระบวนการเรียกว่า กระบวนการ dideoxy chain termination DNA sequencing จะประกอบด้วย 4 ปฏิกริยา (เบสที่แตกต่างกันคือ A, T, C, G) ซึ่งจะทำการปฏิกริยาแยกกัน 4 หลอด โดยที่ทุกหลอดจะมีองค์ประกอบเหมือนกันคือ ดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยว, primer, DNA polymerase และ dNTP 4 ชนิด (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) และส่วนของ ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) ที่ถูกติดฉลาก เมื่อขั้นตอนสังเคราะห์เส้นดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้น โดยจะมีการเติมนิวคลีโอไทด์ที่ด้านปลาย 3' ของ primer จนเมื่อถึงตำแหน่งที่เอนไซม์ DNA polymerase เอนิวคลีโอไทด์ที่เป็น ddNTP เข้าแบบสุ่ม ขั้นตอนในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอก็จะหยุดลงจากนั้นจะนำสายดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบด้วยการแยกด้วยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis ตามด้วยการทำ autoradiography ซึ่งจะเห็นแถบสีดำเมื่อด้วยฟิล์ม X-ray (ในกรณีที่ ddNTP ติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี) โดยจะอ่านลำดับเบสซึ่งเริ่มจากด้านล่างของแผ่น ซึ่งตรงกับด้าน 5' ของสายดีเอ็นเอไปเรื่อยๆในทิศทางด้าน 3' ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคโดยการนำสาร fluorescence มาเป็นตัวติดตามแทนสารกัมมันตภาพรังสี ซึ่งสารกัมมันตภาพรังสีเป็นอันตรายต่อผู้วิเคราะห์ผล การทำปฏิกริยาโดยใช้สาร fluorescence นี้สามารถทำได้ภายในหลอดทดลองเดี่ยว (เบสทั้ง 4 ชนิด) ซึ่งเบสทั้งสี่ตัวจะมีการติดฉลากสี fluorescence ที่แตกต่างกัน จากนั้นสามารถนำไปตรวจสอบโดยการแยกด้วยวิธี capillary electrophoresis หรือวิธี polyacrylamide gel electrophoresis ซึ่งจะมีเครื่องที่ใช้ในการอ่านผลโดยการวัดจากสีของ fluorescence ของเบสแต่ละตัวที่เกิดขึ้น วิธีดังกล่าวเราเรียกว่า automate DNA sequencing ซึ่งเป็นวิธีที่รวดเร็วและใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยลงและปลอดภัยกว่าวิธีเดิมที่ใช้สารกัมมันตภาพรังสี (รูปที่ 12)

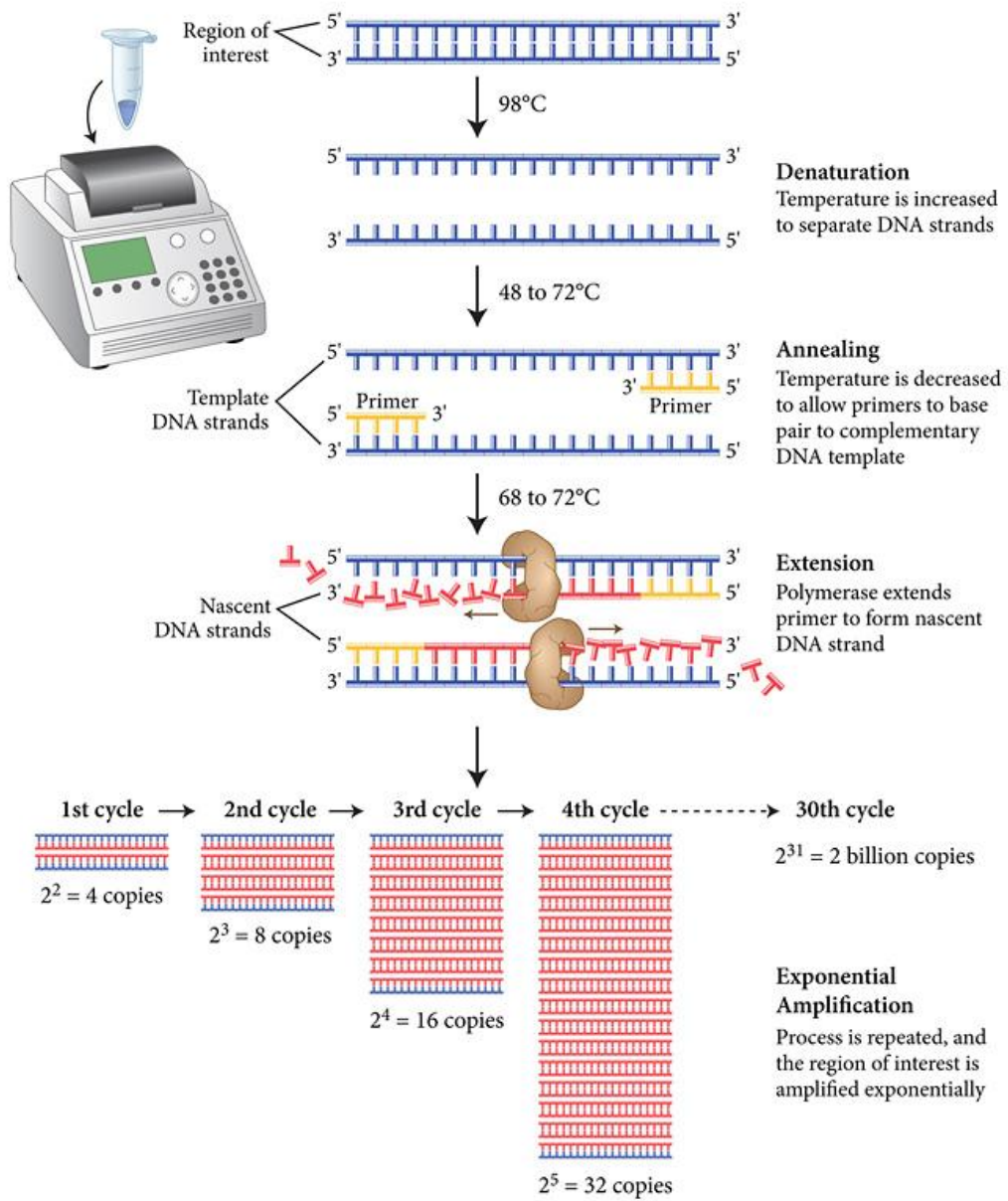
### 2.5.3 การศึกษาวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตด้วยแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree)

การวิเคราะห์วิวัฒนาการด้วยการสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) เป็นการศึกษาประวัติหรือวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต สามารถที่จะสร้างโดยอาศัยข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์หรือลำดับของโปรตีน (amino acid) จากยีนชนิดต่างๆของสิ่งมีชีวิต ลักษณะของ phylogenetic tree มีลักษณะคล้ายต้นไม้ซึ่งประกอบด้วยกิ่งก้านหรือแขนง (branch) โดยที่ก้านอาจแตกออกเป็นแบบสองทาง (bifurcation) หรือหลายทาง (multifurcation) ตำแหน่งที่ก้านแตกเป็นกิ่งย่อยเรียกว่า โหนด (node) โดยที่ปลายสุดของกิ่งจะเป็นลำดับเบสหรือลำดับของโปรตีนของสาย

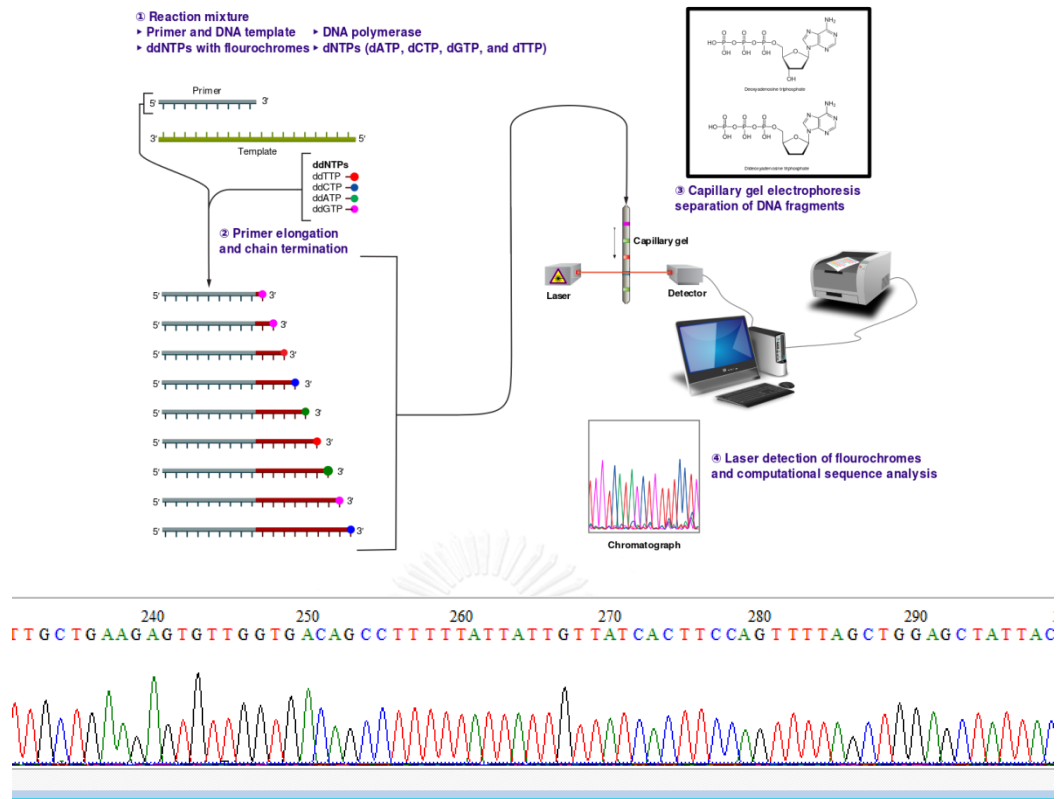
พันธุ์หรือ species ของสิ่งมีชีวิตที่เรียกว่าแทกซอน (taxon) ซึ่งกลุ่มของแทกซอนที่กำเนิดมาจากบรรพบุรุษเดียวกันหรือร่วมกันจะเรียกว่า เคลด (clade) ในการสร้าง phylogenetic tree อาจจะมี clade เพียง clade เดียวซึ่งเรียกว่า monophyletic tree หรือมี clade หลาย clade จะเรียกว่า polyphyletic tree ใน phylogenetic tree อาจมีจุดกำเนิดร่วมหรือมีราก (rooted tree) ซึ่งเป็นส่วนยอดที่เป็นตำแหน่งรวมของแทกซอนทั้งหมดสามารถบอกได้ว่าจุดไหนเป็นบรรพบุรุษและจุดไหนเป็นลูกหลานที่สืบทอดกันมา และรูปแบบที่ไม่มีราก (unrooted tree) ไม่สามารถระบุได้ว่าจุดไหนเป็นบรรพบุรุษและจุดไหนเป็นลูกหลานที่สืบทอดกันมาไม่สามารถบอกถึงความใกล้ชิดกันหรือความสัมพันธ์กัน เพราะไม่ทราบว่าจุดเริ่มต้นวิวัฒนาการอยู่ที่ตำแหน่งใด สำหรับรูปแบบของ phylogenetic tree มี 2 แบบคือ phylogram ซึ่งเป็น tree ที่มีความยาวของกิ่งไม่เท่ากันจะแสดงถึงระยะเวลาในการเกิดวิวัฒนาการที่แตกต่างกัน แบบที่ 2 เรียกว่า cladogram ซึ่งจะบอกเพียงลำดับของ taxon แต่ไม่แสดงระยะเวลาที่เกิดวิวัฒนาการ (24)

การสร้าง phylogenetic tree นั้นนอกจากจะใช้เพื่อศึกษาวิวัฒนาการและความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตแล้วยังประโยชน์ด้านอื่นๆ เช่น การศึกษาด้านระบาดวิทยาการควบคุมโรคติดเชื้อ การใช้เพื่อช่วยในการศึกษาคุณสมบัติของ species ที่ยังไม่มีการศึกษา เพื่อค้นหาสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเพื่อใช้เป็นยา และการศึกษาเพื่อนำไปสู่ความรู้ความหลากหลายของโครงสร้างเพื่อใช้เป็นแหล่งศึกษาโครงสร้างและหน้าที่และการออกแบบยารักษา เป็นต้น





รูปที่ 11 แสดงขั้นตอนของเทคนิค Polymerase chain reaction  
(ที่มา: <https://www.neb.com/products/pcr-polymerases-and-amplification-technologies>)



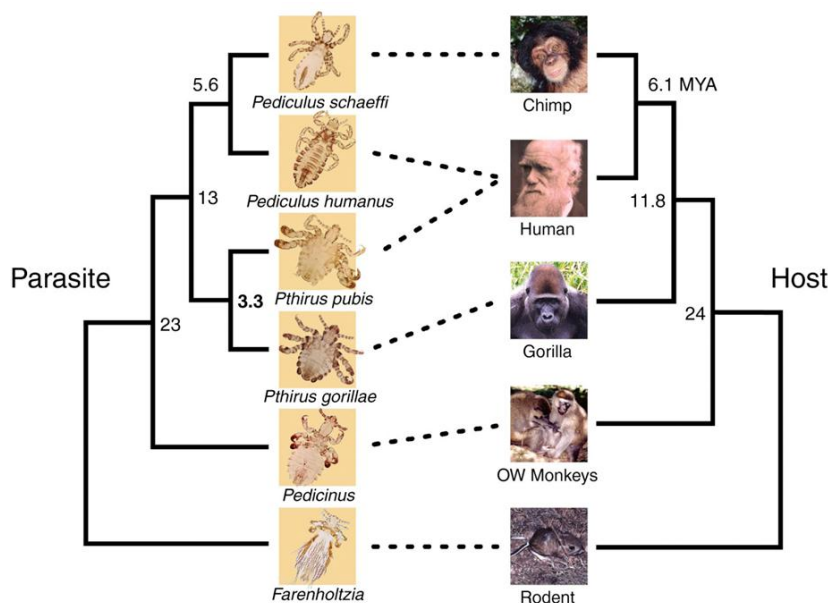
รูปที่ 12 แสดงขั้นตอน chain termination DNA sequencing และแสดงผลกราฟ chromatogram จากเครื่อง automate (ที่มา: [automatehttp://en.wikipedia.org/wiki/Sanger\\_sequencing](http://en.wikipedia.org/wiki/Sanger_sequencing))

## 2.6 การศึกษาอนุพันธุศาสตร์ของเหา

เหาศีรษะ (*P. humanus capitis* De Geer) เป็นเหาที่พบในมนุษย์เท่านั้น มีความใกล้ชิดทางวิวัฒนาการกับ *P. schaeffi* ซึ่งเป็นเหาในลิงชิมแปนซีซึ่งได้มีการแยกวิวัฒนาการจากกันแล้วประมาณ 5.6 ล้านปีมาแล้ว โดยในเหาแต่ละชนิดจะมีโฮสต์ที่จำเพาะแตกต่างกัน ซึ่งในมนุษย์ในวงศ์ Pediculidae มี 2 สกุล คือ เหาศีรษะและเหาตัว โดยที่เหาศีรษะจะแตกต่างจากเหาตัว คือวางไข่ที่เส้นผมบนศีรษะในขณะที่เหาตัวจะชอบวางไข่ตามเสื้อผ้า รูปร่างภายนอกมีลักษณะที่คล้ายกันแต่ยังไม่สามารถจำแนกแยกชนิดของเหาทั้ง 2 ชนิดนี้ได้อย่างชัดเจน จากการศึกษาพันธุศาสตร์พบว่าเหาทั้ง 2 ชนิดแยกวิวัฒนาการจากกันประมาณ 107,000 ปีมาแล้ว เมื่อมนุษย์ให้ความสำคัญกับการใช้เสื้อผ้าและเครื่องนุ่งห่ม

จากการศึกษาลำดับจีโนมของเหาตัว (human body louse) สามารถที่จะยืนยันได้ว่าเหาตัวและเหาศีรษะมีจีโนมขนาดเล็กกว่าแมลงชนิดอื่น เช่น ใน *Drosophila melanogaster* มีขนาดจีโนมขนาด 175 Mb และในยุง *Anopheles gambiae* ที่มีขนาดจีโนม 260 Mb โดยในเหาตัวเมียมีจีโนมขนาด 108 Mb และเหาตัวผู้มีจีโนมขนาด 109 Mb (25) เหา มีจีโนมที่เป็นดิฟฟอยท์เซลล์ โดยมี

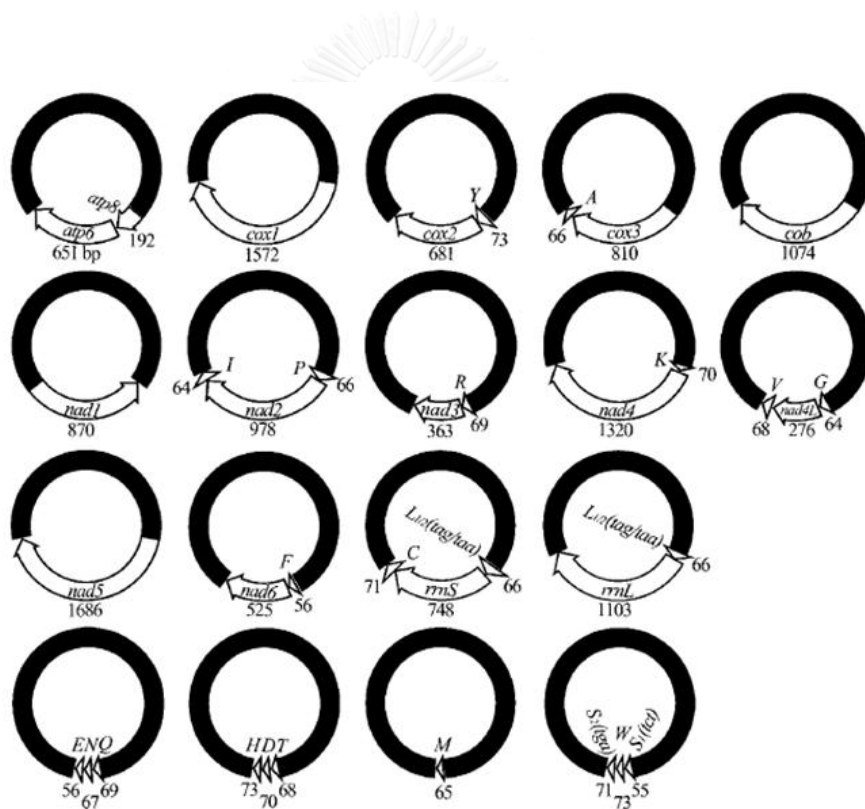
โครโมโซมทั้งหมด 6 คู่ ประกอบด้วย metacentric chromosome จำนวน 5 คู่ และ telocentric chromosome จำนวน 1 คู่ (26) อัตราเฉลี่ยของเบสกวานีนต่อเบสไซโตซีน (GC-content) ของจีโนมเท่ากับ 28% โดยการสร้างปกติจะเป็น AT rich และมี Transposable element เป็นส่วนประกอบเพียง 1% ของจีโนมทั้งหมด ซึ่งน้อยกว่าลำดับจีโนมของแมลงชนิดอื่น (10)



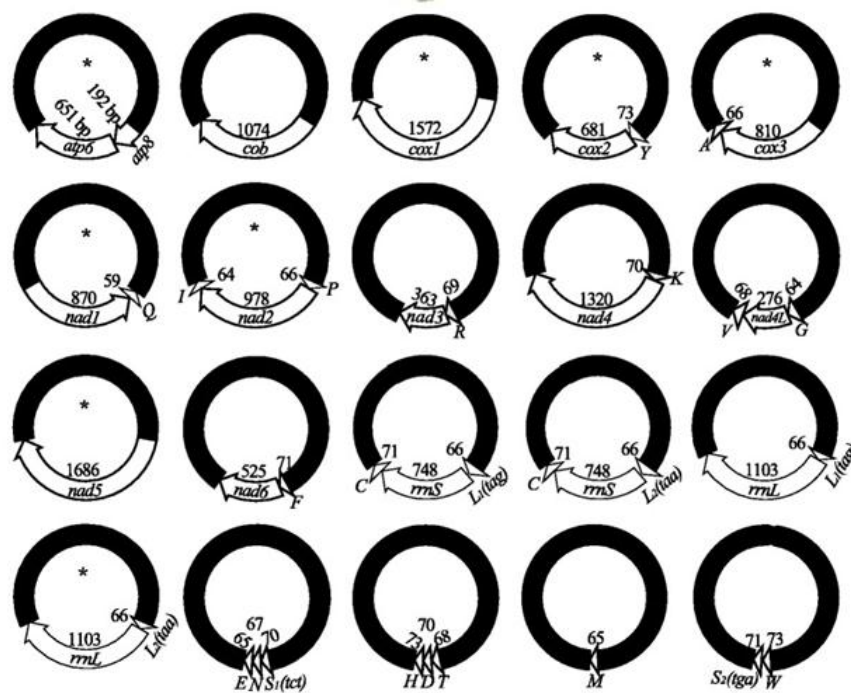
รูปที่ 13 สายวิวัฒนาการของเหา (27)

การศึกษาด้านพันธุศาสตร์และชีววิทยาวิวัฒนาการในเหานั้นมีการศึกษาจากยีนที่อยู่ในนิวเคลียส เช่น ยีน Elongation factor 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ), ยีน RNA polymerase II (RP2), ยีน Intergenic spacers และยีน 18S ribosomal RNA (18S rRNA) และยีนที่อยู่ในไมโทคอนเดรีย เช่น ยีน Cytochrome C oxidase subunit I (COI), ยีน Cytochrome b (Cytb) และยีน NADH dehydrogenase 4 (ND4) ในขณะที่เริ่มแรกการศึกษาในไมโทคอนเดรียได้ศึกษาจากเหาดำ (body lice) จากงานวิจัยของ Shao R et al., 2009 พบว่าไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอของเหาดำนั้นประกอบด้วย 37 ยีน อยู่บน 18 วงโครโมโซมย่อย (minicircular chromosome) ในแมทริกซ์ของไมโทคอนเดรีย โดยในแต่ละวงโครโมโซมย่อยมีขนาด 3-4 กิโลเบส และประกอบด้วย 1-3 ยีนในแต่ละวงโครโมโซมย่อย ในโครโมโซมของไมโทคอนเดรียอาจเกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วน (recombination) กันได้ระหว่างการสังเคราะห์สายใหม่ (23, 28, 29) ทำให้เกิดความแปรผันของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอของเหามากกว่าในสิ่งมีชีวิตอื่นที่ไม่มีการแยกสายโครโมโซม การแยกชิ้นส่วนโครโมโซมทำให้ยีนบางยีนมีขนาดยาวขึ้น 2-8 เท่า ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ายีนในไมโทคอนเดรียไม่มีความเสถียรและยีนในไมโทคอนเดรียมีความแตกต่างกันในแต่ละสิ่งมีชีวิต (30)

จากรายงานวิจัยของ Shao และคณะในปี 2012 ได้ทำการศึกษาไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอของเหาศีรษะ สามารถระบุได้ว่าไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอของเหาศีรษะประกอบด้วยยีนจำนวน 37 ยีน ประกอบด้วยวงโครโมโซมย่อย (minicircular chromosome) จำนวน 20 วง โดยทั้ง 37 ยีนจะอยู่บน 20 วงโครโมโซมย่อยในแมทริกซ์ของไมโทคอนเดรีย โดยแต่ละวงโครโมโซมย่อยของเหาศีรษะมีขนาดประมาณ 1.5-3.0 กิโลเบส ซึ่งการกระจายของยีนทั้งหมดนี้ในวงโครโมโซมของเหาศีรษะจะเหมือนกับในเหาตัว โดยในหนึ่งวงโครโมโซมจะประกอบด้วย 1-3 ยีน มีทั้งส่วนที่เป็น coding region และ non-coding region และมีขนาดของยีนที่แตกต่างกันในแต่ละวงโครโมโซมตั้งแต่ 65 คู่เบส จนถึง 1,686 คู่เบส (23)



รูปที่ 14 แสดงลักษณะไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอของเหาตัว (*P. humanus coporis*) ประกอบด้วย minicircular chromosome จำนวน 18 วงโครโมโซมย่อย (23)



รูปที่ 15 แสดงลักษณะไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอของเหาศีรษะ (*P. humanus capitis*)

ประกอบด้วย minicircular chromosome จำนวน 20 วงโครโมโซมย่อย (23)

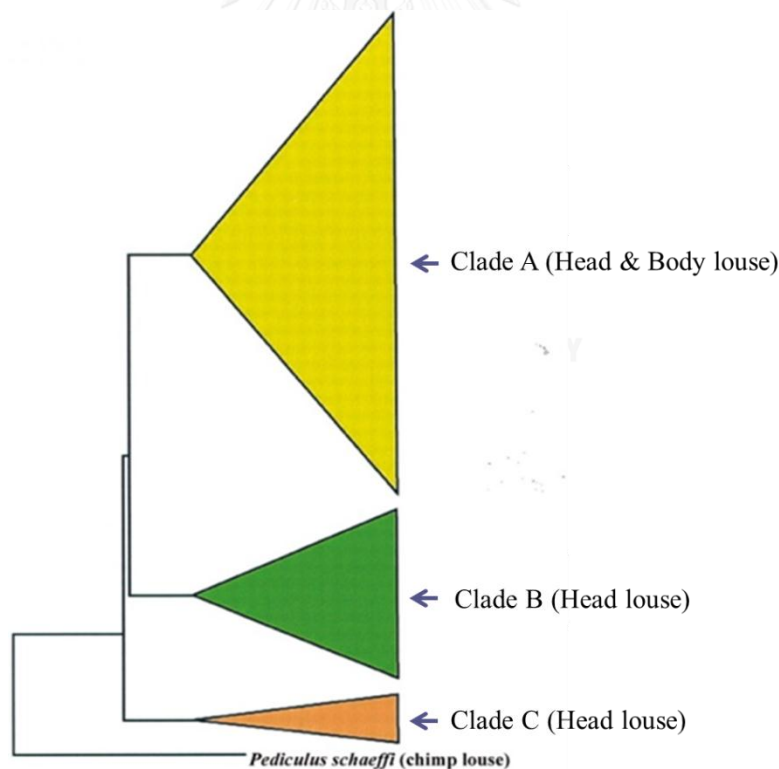
ยีนที่อยู่ในไมโทคอนเดรียทั้งยีน COI ยีน Cytb และยีน ND4 เมื่อนำมาศึกษาด้วยการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการยีนทั้ง 3 สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ clade A ซึ่งสามารถพบได้บริเวณทั่วไป (worldwide) โดยในกลุ่มของ Clade A นั้นประกอบด้วยกลุ่มของเหาตัวและเหาศีรษะและ clade B สามารถพบได้ในแถบอเมริกาเหนือ อเมริกากลาง ยุโรป และออสเตรเลีย พบเป็นกลุ่มของศีรษะ ส่วน clade C พบได้ในเนปาล เอธิโอเปีย และเซเนกัล (ดังแสดงในรูปที่ 16) ซึ่งพบว่าเหาศีรษะจัดอยู่กลุ่มนี้เช่นกัน (4, 15, 31-35)

### 2.6.1 ยีน Cytochrome C Oxidase subunit I (COI)

ยีน Cytochrome C Oxidase subunit I เป็นยีนในของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ (mtDNA) ที่ประกอบด้วย 3 subunit คือ mtCOI, mtCOII, mtCOIII ยีน COI เป็นยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนซึ่งเป็นเอนไซม์ แทรกอยู่บนเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย อยู่บริเวณ complex IV ในกระบวนการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอน (Electron transport chain) ของกระบวนการ oxidative phosphorylation ทำหน้าที่รับอิเล็กตรอนจาก complex ต่าง ๆ และเปลี่ยนโมเลกุลออกซิเจนให้กลายเป็นโมเลกุลน้ำ โดยกระบวนการนี้จะมีการปั๊มโปรตอนจากแมทริกซ์ไปยังช่องว่างระหว่างเยื่อหุ้มชั้นในและชั้นนอก ทำให้เกิดความต่างศักย์ของโปรตอน โปรตอนจะถูกขนส่งกลับเข้าสู่

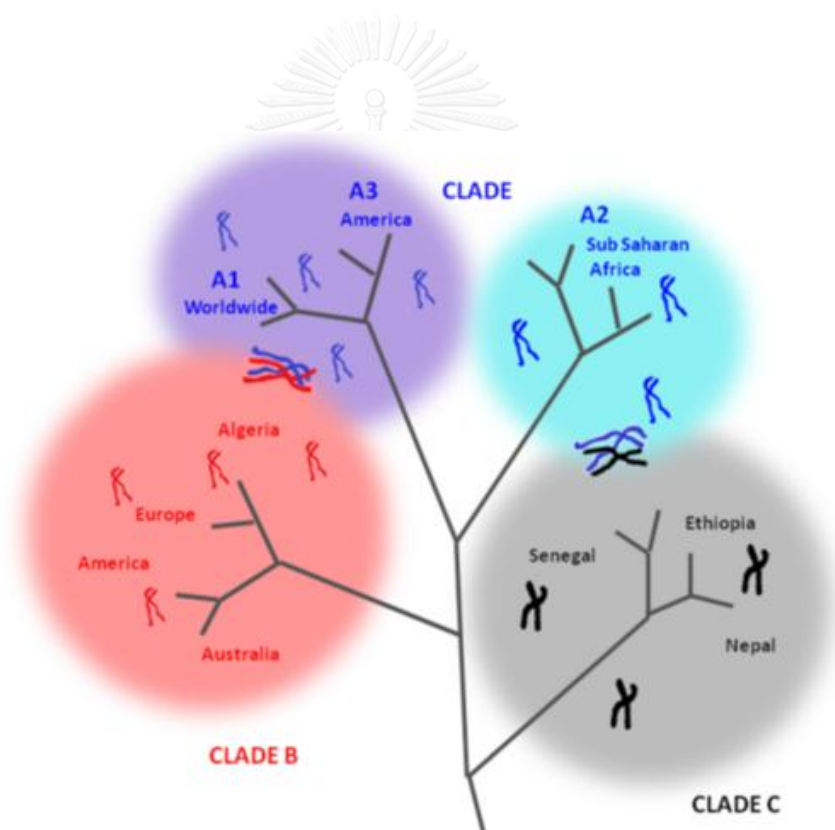
แมทริกซ์และจะเกิดการสังเคราะห์ ATP (Adenosine triphosphate) โดยเอนไซม์ ATP synthase (22, 28)

จากการศึกษายีนไมโทคอนเดรียของเหาพบว่าประกอบด้วย ยีน cytochrome C oxidase จำนวน 3 subunit คือ ยีน COI, COII, COIII โดยแต่ละยีนบรรจุอยู่บนวงโครโมโซมคนละวงโครโมโซมย่อยกัน ซึ่งยีน COI ของเหาถูกบรรจุอยู่บนวงโครโมโซมย่อย 1 วงทั้งในเหาตัวและเหาศีรษะและมีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ประมาณ 1,572 คู่เบส (36) จากงานวิจัยต่างๆได้นำลำดับนิวโอไทด์ของยีน COI มาศึกษาวิวัฒนาการด้วยการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการจากยีนดังกล่าวสามารถแบ่งกลุ่มของเหาได้เป็น 3 กลุ่มตามพื้นที่ต่างๆ (geographic distributions) คือ clade A, B และ C โดยจากยีน COI นี้เป็นยีนที่สามารถใช้ในการศึกษาอัตราการกลายพันธุ์และวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตได้ดี (27) เนื่องจากยีนไมโทคอนเดรียนี้มีอัตราการกลายพันธุ์สูง รวมไปถึงยีน COI เป็นยีนที่มีผู้ศึกษาเป็นจำนวนมากและมีลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ GenBank จากหลาย ๆ งานวิจัยในต่างประเทศ สามารถใช้เปรียบเทียบและตรวจสอบผลการทดสอบได้ทำให้ผลการทดลองที่ได้ออกมามีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น



รูปที่ 16 แสดง Phylogenetic tree จากการศึกษาลำดับเบสของยีน COI ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ในไมโทคอนเดรียโดยสามารถแยกกลุ่มของเหาได้เป็น 3 clade คือ clade A, B และ C (15)

จากรายงานการวิจัยต่างๆที่มีการศึกษายีนในนิวเคลียส พบว่าเมื่อใช้ยีน 18S rRNA, ยีน EF-1 $\alpha$  และยีน intergenic spacer สามารถใช้ยีนดังกล่าวนี้แบ่งแยกหาศรัษะใน clade A ที่เป็นกลุ่มที่พบได้โดยทั่วไป (worldwide) จากการศึกษาด้วยยีนในไมโทคอนเดรียได้เป็น subgroup (subclades) ได้จำนวนทั้งหมด 3 subgroup คือ Eurasian subgroup A1 (worldwide) และ Sub-Saharan subgroup A2 ส่วน subgroup ที่ 3 นั้นเกิดจากการศึกษาความหลากหลาย (polymorphism) ในส่วนของยีน intergenic spacer ด้วยเทคนิค multiple spacer typing (MST) ซึ่งเป็นเทคนิคในการศึกษา genotype พบว่าเป็นกลุ่มที่มีความจำเพาะที่พบในหา American ซึ่งเรียกว่า America subgroup A3 (17) (ดังแสดงในรูปที่ 17)



รูปที่ 17 แสดง phylogenetic tree จากลำดับเบสของยีน Cytb และแสดงการแยกกลุ่มของ clade A เป็น A1,A2 และ A3 จากการศึกษา ยีนที่อยู่ในนิวเคลียส (17)

ตารางที่ 1 แสดงการศึกษาอนุพันธุศาสตร์ของเหาศีรษะ

ชนิดของดีเอ็นเอ	ยีน	ขนาด (bp)	Author (ref.)
ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ (mtDNA)	Cytochrome oxidase subunit I (COI)  Cytochrome <i>b</i> (Cytb)  NADH dehydrogenase 4 (ND4)	524	Leo et al.,2002
		610	Kittler et al.,2003
		524	Yong et al.,2003
		854	Reed et al.,2004
		383	Raoult et al.,2008
		827	Light et al.,2008
		440	Kittler et al.,2003
		671	Reed et al.,2004
		356	Raoult et al.,2008
		316	Li et al., 2010
579	Kittler et al.,2003		
นิวเคลียสดีเอ็นเอ (nrDNA)	Elongation factor 1 $\alpha$ (EF-1 $\alpha$ )  RNA polymerase II (RPII)  18S rRNA  Microsatellites  Intergenic spacers	485	Kittler et al.,2003
		348	Yong et al.,2003
		601	Kittler et al.,2003
		1474-1493	Yong et al.,2003
		1195	Leo et al., 2005
		130-180	Leo et al.,2005
		133-155	Li et al., 2010
		323-328	
165-185			
156-189			

## 2.7 การเป็นพาหะนำเชื้อโรคในเหา

จากรายงานวิจัยในต่างประเทศพบว่าเหาสามารถเป็นพาหะในการนำเชื้อโรคได้หลายชนิด อาทิเช่น เหาดำ (body lice) พบว่าเป็นสาเหตุในการเป็นพาหะนำเชื้อโรค 3 ชนิดคือ เชื้อ *Rickettsia prowazekii* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค epidemic typhus เชื้อ *Bartonella quintana* เป็นสาเหตุของโรค trench fever และเชื้อ *Borrelia recurrentis* ที่เป็นสาเหตุสำคัญของโรค louse-borne relapsing fever (37) แต่พบว่าเหาศีรษะยังมีความสามารถในการเป็นพาหะนำเชื้อโรค *B. quintana* ซึ่งมีรายงานการตรวจพบครั้งแรกในเด็กที่อาศัยในชุมชนแออัดจากประเทศเนปาล (38) และสามารถตรวจพบในไข่เหาที่เก็บจากบุคคลไร้บ้านในประเทศฝรั่งเศส (39, 40)



### 2.7.1 เชื้อ *Bartonella* spp.

เชื้อ *Bartonella* spp. เป็นแบคทีเรียประเภท facultative intracellular มีลักษณะเป็น gram-negative รูปร่างเป็นแท่งขนาดประมาณ 1-1.7  $\mu\text{m}$  จัดอยู่ในกลุ่มของ  $\alpha$ -proteobacteria (41) เป็นเชื้อที่เจริญยากบนอาหารเลี้ยงดื่ยต้องเลี้ยงด้วยอาหารชนิดพิเศษโดยอัตราการเจริญประมาณ 12-14 วัน โดยพบว่าเชื้อ *Bartonella* spp. ที่สำคัญโดยมีเหาเป็นพาหะคือ *B. quintana* ซึ่งเชื่อกันว่ามีพาหะนำโรคคือเหาตัวที่อาศัยอยู่ตัวเสี้ยวผ้าประกอบกับความไม่สะอาดของเครื่องแต่งกาย โดยพบในบุคคลไร้บ้านโดยติดต่อไปส่งบุคคลต่างๆที่อยู่ร่วมกับ สำหรับการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ ติดได้ทางอุจจาระของเหาที่มีเชื้อที่ถ่ายทิ้งผ่านเข้าทางบาดแผลที่ผิวหนัง หรือจากการที่ถูกเหาคูดเลือดกัด (8) เมื่อติดเชื้อ *B. quintana* จากสาเหตุดังกล่าวแล้วจะทำให้เกิดทางคลินิกได้หลายแบบ เช่น trench fever โดยผู้ป่วยจะมีอาการไข้ประมาณ 1-3 วันประกอบด้วยมีอาการปวดศีรษะ, Chronic bacteremia โดยพบเชื้อแบคทีเรียเกาะอยู่รอบๆเม็ดเลือดแดงซึ่งมีรายงานที่สามารถอยู่กระแสเลือดได้นานถึง 8 ปีโดยที่ผู้ป่วยไม่แสดงอาการแต่เมื่อตรวจหาเชื้อพบว่าสามารถเลี้ยงเชื้อจากเลือดได้เช่นกัน, อาการ endocarditis หรือเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบโดยมีการทำลายส่วนของลิ้นเปิดปิดหัวใจ, ลักษณะอาการ bacillary angiomatosis มีลักษณะของเป็นตุ่มหรือผื่นแดงที่ผิวหนัง อาจมีอาการลุกลามไปอวัยวะอื่นๆได้เช่น ตับ ม้าม ไชกระดูก และต่อมน้ำเหลือง และอาการ lymphadenopathy ซึ่งมีอาการเกี่ยวกับต่อมน้ำเหลืองอักเสบ (7, 42)

อย่างไรก็ตามปัจจุบันมีรายงานการตรวจพบเชื้อ *Acinetobacter* spp. ได้ในแมลง เช่น ม้วนเพชรฆวน (tsetse flies), ไร้น้อยทราย (sand fly), ยุง, หมัด และเห็บ (43) ในหลายงานวิจัยมีรายงานว่าสามารถตรวจเจอเชื้อ *A. baumannii* ในเหาตัวและเหาศีรษะ (44) ซึ่งเชื่อกันว่ามีความสำคัญทางการแพทย์ซึ่งก่อให้เกิด nosocomial infection ทำให้เกิดอาการได้หลายลักษณะเช่น อาการปอดบวม เยื่อหุ้มสมองอักเสบ หรือเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ

### 2.7.2 *Acinetobacter* spp.

เชื้อในกลุ่ม *Acinetobacter* spp. เป็นเชื้อแบคทีเรียลักษณะ gram negative รูปร่างแท่ง เป็นสกุลหนึ่งในวงศ์ Moraxellaceae ซึ่งประกอบด้วยแบคทีเรียในสกุล *Moraxella*, *Acinetobacter* และ *Psychrobacter* โดยสามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อม เช่น ในน้ำ ดิน พืชผัก หรือแม้กระทั่งบนผิวหนังของผู้ป่วยหรือบุคคลที่มีสุขภาพดี (45, 46) โดยพบว่า *Acinetobacter* spp. ที่มีความสำคัญมากทางการแพทย์คือเชื้อ *A. baumannii* เป็นเชื้อก่อโรคในโรงพยาบาลที่พบได้บ่อยขึ้น และมักเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด และเป็นสาเหตุของโรคปอดบวม (pneumonia) การติดเชื้อมีในกระแสเลือด ระบบปัสสาวะ ติดเชื้อที่บาดแผล และพบบ่อย

ที่สุดในหอผู้ป่วยหนัก (Intensive Care Unit, ICU) นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบเชื้อนี้มากขึ้นในหลายๆ ประเทศ โดยส่วนใหญ่เป็นการติดเชื้อในโรงพยาบาล แม้ว่าจะมีรายงานการติดเชื้อ *Acinetobacter* จากชุมชนแต่ก็ไม่มากนักเมื่อเทียบกับการติดเชื้อในโรงพยาบาล (47)

ความสำคัญของเชื้อ *Acinetobacter* spp. คือ เชื้อดังกล่าวนี้มักจะติดต่อยาปฏิชีวนะพร้อมๆ กันหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งการติดต่อยาในกลุ่ม carbapenems โดยเชื้อที่ติดต่อกับ Carbapenems มักจะติดต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดในเวลาเดียวกัน ทำให้มีความยากลำบากในการเลือกใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาภาวะติดเชื้อ การศึกษาระดับโมเลกุล ทำให้การจัดแบ่งสปีชีส์โดยใช้เทคนิค DNA-DNA hybridization แต่วิธีการดังกล่าวทำได้ยากในห้องปฏิบัติการทั่วไป จากการศึกษาเปรียบเทียบดีเอ็นเอ ของ *Acinetobacter* spp. เพื่อแบ่งแยกสปีชีส์โดยถือว่าเชื้อที่มีการจัดเรียงตัวและลำดับของนิวคลีโอไทด์เหมือนกันตั้งแต่ร้อยละ 70 ขึ้นไป และมีค่าของความแตกต่างของอุณหภูมิการแยกสายดีเอ็นเอน้อยกว่า 5 °C ถือว่าเป็นสปีชีส์เดียวกัน โดยเรียกว่า genomic species หรือ DNA group โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 25 genomic species (47)

สำหรับเชื้อ *A. baumannii* เป็นที่ทราบกันดีว่าก่อให้เกิดการติดเชื้อภายในโรงพยาบาล (hospital-acquired infections) จากรายงานวิจัยต่างๆ ได้มีการสำรวจความชุกและปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อดังกล่าวนี้ โดยเฉพาะผู้ป่วยวัยชราและวัยเด็กที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลเป็นเวลานานๆ มักจะมีการติดเชื้อ สำหรับประเทศไทยนั้นมีการศึกษาจากงานวิจัยของ Punpanich และคณะ (48) ได้ศึกษาอัตราการติดเชื้อและปัจจัยเสี่ยงการติดเชื้อ *A. baumannii* ในกระแสเลือดจากเด็กที่เข้ารับการรักษาในสถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติช่วงอายุตั้งแต่แรกเกิดถึงอายุ 18 ปี พบการติดเชื้อ 26.1% โดยปัจจัยเสี่ยงจากการติดเชื้อมาจากการติดต่อยากลุ่ม carbapenems เด็กที่มีภูมิคุ้มกันต่ำจากการเป็นมะเร็งและได้รับเคมีบำบัด การติดเชื้อจากเครื่องช่วยหายใจหรือสายสนท้อปัสสาวะ และการศึกษาของ Aimsaad และคณะ (49) ได้ทำการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อ *A. baumannii* ในคนไข้โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้าโดยผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่ติดเชื้อนี้อายุมากกว่า 60 ขึ้นไป มีการติดเชื้อมากถึง 90% (72 คนจากผู้ป่วยที่ศึกษา 80 คน) สำหรับการตรวจเจอเชื้อ *A. baumannii* ในเหาศีรษะได้ยังไม่มียาว่ามีเด็กที่เป็นเหาศีรษะแล้วมีการติดเชื้อเชื้อกลุ่ม *Acinetobacter* spp. แต่เหาศีรษะอาจมีความสำคัญในการเป็นแหล่งกักเก็บเชื้อโรคซึ่งอาจมีการพัฒนาไปเป็นพาหะในการนำเชื้อโรคมาสู่คนได้

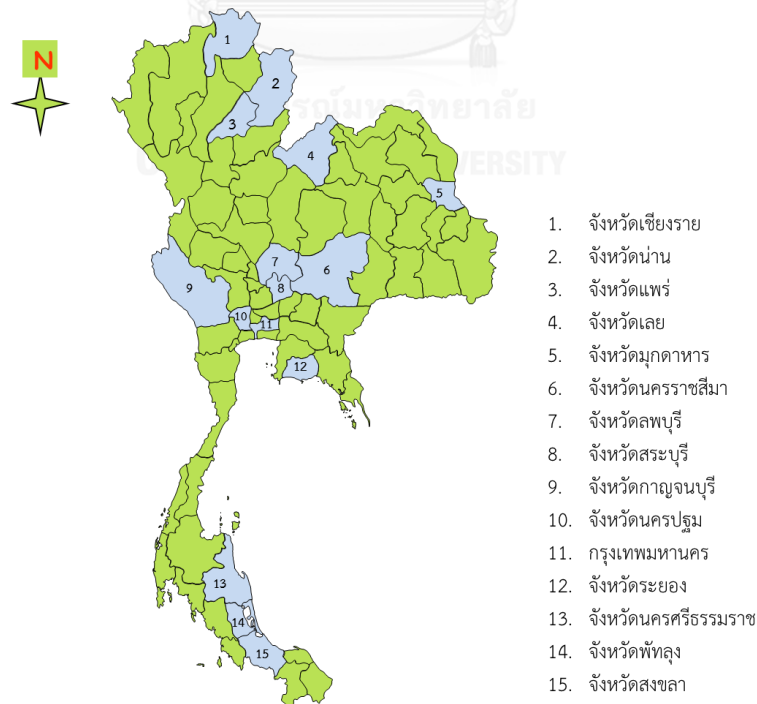
### บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 รูปแบบการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเชิงพรรณนา (Descriptive study) โดยงานวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจริยธรรมในมนุษย์และอนุมัติโดยคณะกรรมการจริยธรรมจาก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Faculty of Medicine, Chulalongkorn University Ethics Committee) หมายเลข IRB 184/57

#### 3.2 กลุ่มประชากรเป้าหมาย

ทำการสำรวจการเป็นเหตุศีรษะจากเด็กนักเรียนหญิง ช่วงอายุระหว่าง 7-12 ปีตั้งแต่ชั้นประถมศึกษาปีที่ 1 ถึงชั้นประถมศึกษาปีที่ 6 จากโรงเรียนประถมศึกษาในภูมิภาคต่างๆของประเทศไทย คือ ภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดน่าน แพร่ และเชียงราย ภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดนครปฐม สระบุรี ลพบุรี และกรุงเทพมหานคร ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา เลย และมุกดาหาร ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดพัทลุง สงขลา และนครศรีธรรมราช ภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดระยอง และภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี (ดังแสดงในรูปที่ 18)



รูปที่ 18 แสดงพื้นที่ในการเก็บตัวอย่างเหตุศีรษะ

### 3.2.1 การคำนวณขนาดตัวอย่าง

ในการคำนวณขนาดตัวอย่างเพื่อศึกษาความผันแปรของยีน COI ในประเทศไทยนั้น ได้อาศัยข้อมูลการศึกษาความชุกของการติดเชื้อในในประเทศไทยที่รายงานในฐานข้อมูลเป็นข้อมูลเปรียบเทียบโดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 41% (50)

ขนาดของประชากรตัวอย่างที่ศึกษา (Sample size)

การคำนวณขนาดตัวอย่างจากสูตร

$$n = \frac{Z^2 \alpha_{/2} P (1-P)}{e^2}$$

$$n = \frac{(1.96)^2 \times (0.41) \times (0.59)}{(0.1)^2}$$

$$n = 93 \text{ ตัวอย่าง}$$

โดยจะทำการเก็บตัวอย่างเหาศีรษะอย่างน้อย 93 ตัวอย่าง

เนื่องจากขนาดของตัวอย่างที่คำนวณได้นั้นมีจำนวนตัวอย่างน้อยซึ่งอาจทำให้ได้ข้อมูลไม่เพียงพอในการศึกษา โดยผู้วิจัยจะทำการเก็บตัวอย่างจำนวนทั้งหมด 275 ตัวอย่าง ซึ่งสามารถใช้เป็นตัวแทนในการศึกษาความผันแปรของยีน COI ของเหาศีรษะในประเทศไทยได้

$n$  = ขนาดตัวอย่าง

$\alpha$  = ค่าความผิดพลาดในการสรุปผลอ้างอิงจากตัวอย่างสู่ประชากร

$Z$  = confidence coefficient ได้จากระดับความเชื่อมั่นที่กำหนด ( $1-\alpha$ )

กำหนดค่าความเชื่อมั่นที่ 95% หรือ  $\alpha = 0.05$  ( $Z_{\alpha/2} = 1.96$ )

$P$  = ค่าสัดส่วนจากการศึกษาที่ผ่านมา

$e$  = ค่าความคลาดเคลื่อนสูงสุดที่ยอมรับได้ระหว่างสัดส่วนในประชากร

กำหนดให้  $e = 0.1$  (ยอมรับให้เกิดความคลาดเคลื่อนได้ 10 %)

### 3.3 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

- 3.3.1 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR) รุ่น Veriti บริษัท GenPlus<sup>®</sup> ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.3.2 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR) รุ่น Master Cyclern PROS บริษัท eppendorf<sup>®</sup> ประเทศเยอรมนี
- 3.3.3 ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ 4 °C รุ่น LG บริษัท LG<sup>®</sup> ประเทศไทย
- 3.3.4 ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ -20 °C รุ่น Whirlpool บริษัท Sanyo<sup>®</sup> ประเทศไทย
- 3.3.5 ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ -80 °C รุ่น Forma 900 series บริษัท Thermo scientific<sup>®</sup> ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.3.6 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ Incubator shaker รุ่น Innova<sup>®</sup> 43 บริษัท eppendorf<sup>®</sup> ประเทศเยอรมนี
- 3.3.7 เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Centrifuge 5430 R บริษัท eppendorf<sup>®</sup> ประเทศเยอรมนี
- 3.3.8 เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Centrifuge 5417 R บริษัท eppendorf<sup>®</sup> ประเทศเยอรมนี
- 3.3.9 เครื่องไมโครเวฟ, รุ่น LG บริษัท LG ประเทศจีน
- 3.3.10 เครื่องเขย่าผสมสาร Vortex รุ่น FINEVORTEX (FinePCR) ประเทศเกาหลี
- 3.3.11 เครื่อง Dry bath Incubator บริษัท Cleaver Scientific<sup>®</sup> ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.3.12 เครื่อง gel electrophoresis รุ่น Biorad sub-cell<sup>®</sup> RT บริษัท Bio-Rad<sup>®</sup> ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.3.13 เครื่องถ่ายภาพ gel documentation รุ่น Gel Doc<sup>™</sup> XR บริษัท Bio-Rad<sup>®</sup> ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.3.14 เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม spectrophotometer รุ่น Nanodrop 2000c บริษัท Thermo scientific<sup>®</sup> ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.3.15 เครื่องซั่งน้ำหนักทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น Sartorius ประเทศเยอรมนี
- 3.3.16 เครื่อง Autoclave (ตู้ึ่งฆ่าเชื้อ) รุ่น HIRAYAMA HA-3D ประเทศญี่ปุ่น
- 3.3.17 เครื่อง Autoclave (ตู้ึ่งฆ่าเชื้อ) รุ่น HVE-50 ประเทศญี่ปุ่น
- 3.3.18 ตู้ปรับอุณหภูมิสำหรับเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย บริษัท Memmert
- 3.3.19 ตู้สำหรับเตรียมสาร PCR (PCR cabinet) รุ่น PCR-01 ประเทศไทย
- 3.3.20 ไมโครปิเปตขนาด 0.1-10, 2-20, 20-200 และ 100-1000  $\mu$ l บริษัท eppendorf<sup>®</sup> ประเทศเยอรมนี

### 3.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

- 3.4.1 หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml บริษัท ExtraGene, Inc<sup>®</sup>
- 3.4.2 หลอด PCR ขนาด 0.2 ml บริษัท ExtraGene, Inc<sup>®</sup>
- 3.4.3 ปิเปตทิป ขนาด 0.1-10, 200 และ 1000  $\mu$ l
- 3.4.4 หลอด centrifuge ขนาด 15 และ 50 ml
- 3.4.5 ปากคีบ (forceps)
- 3.4.6 ถังมือยาง
- 3.4.7 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)
- 3.4.8 Loop เขี่ยเชื้อและ spreader
- 3.4.9 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 3.4.10 ขวดแก้วสำหรับเตรียมสารเคมี ขนาด 100, 500 และ 1000 ml
- 3.4.11 กล้องโคมสำหรับใส่น้ำแข็ง
- 3.4.12 นาฬิกาจับเวลา
- 3.4.13 กระจกตาชั่งสำหรับทำความสะอาด
- 3.4.14 หยอดหยด (dropper)
- 3.4.15 พาราฟิล์ม (parafilm)

### 3.5 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

- 3.5.1 ชุดสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อสำเร็จรูป (Invisorb<sup>®</sup> Spin Tissue Mini Kit บริษัท STRASTEC Molecular GmbH ประเทศเยอรมนี)
- 3.5.2 ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (Invisorb<sup>®</sup> Spin Plasmid Mini Two บริษัท STRASTEC Molecular GmbH ประเทศเยอรมนี)
- 3.5.3 ชุดโคลนสำหรับ PCR product บริษัท Promega ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.5.4 ชุดสารเคมีในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR บริษัท Bioline ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.5.5 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Luria-bertani (LB medium)
- 3.5.6 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหาร SOB และ SOC medium
- 3.5.7 สารเคมีสำหรับเตรียม competent cell (*E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$ )
- 3.5.8 สารเคมีสำหรับเตรียม gel electrophoresis
- 3.5.9 Ethanol ความเข้มข้น 70% และ 95%

หมายเหตุ: รายละเอียดและวิธีการเตรียมสารเคมีแสดงในภาคผนวก

### 3.6 โปรแกรมสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูล

- 3.6.1 โปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor Program Version 7.1.9 เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการรวบรวมข้อมูลและวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence alignment) และอ่านกราฟ chromatogram จากผล sequencing และสามารถวิเคราะห์ความเหมือนและความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยแสดงค่าออกเป็นค่า sequence identity matrix
- 3.6.2 โปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6 (MEGA 6.0) เป็นโปรแกรมที่ใช้วิเคราะห์และสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)
- 3.6.3 โปรแกรม nucleotide blast (BLASTN) เป็นโปรแกรมออนไลน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ความเหมือนและความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งจะเทียบกับลำดับนิวโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล genbank
- 3.6.6 โปรแกรม Bankit เป็นโปรแกรมออนไลน์ที่ใช้สำหรับส่งลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อขอเลขทะเบียน (accession number) เพื่อเผยแพร่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank

### 3.7 วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.7.1 การเก็บตัวอย่างเหาศีรษะ

3.7.1.1 ติดต่อโรงเรียนประถมศึกษาเพื่อขอความร่วมมือในการเก็บตัวอย่างเหาศีรษะ จากนั้นแจกหนังสือยินยอมเข้าร่วมโครงการให้เด็กนักเรียนหญิงทุกคน หลังจากได้รับอนุญาตแล้วจึงแจกแบบสอบถามให้นักเรียนกรอกข้อมูลหรือใช้วิธีสัมภาษณ์ในกรณีที่นักเรียนไม่สะดวกในการกรอกข้อมูลได้ เมื่อได้แบบสอบถามที่กรอกเสร็จแล้วนักเรียนหญิงแต่ละคนจะได้รับการตรวจหาศีรษะจากการดูด้วยตาเปล่าว่ามีตัวเหาศีรษะหรือมีไข่เหาอยู่บนเส้นผมหรือไม่ โดยการใช้มือแหวกเส้นผมทุกๆ 3-4 เซนติเมตรทั่วทั้งศีรษะ ถ้าพบตัวเหาจะใช้หวีเสียดหัวผมทั้งศีรษะเพื่อแยกตัวเหาออกมา

3.7.1.2 เก็บตัวอย่างเหาศีรษะอย่างน้อยโรงเรียนละ 20 ตัวอย่าง ภูมิภาคละ 2 จังหวัด โดยใช้ forceps คีบตัวเหา เก็บเหาศีรษะทั้งระยะตัวเต็มวัย ตัวกลางวัย และไข่เหาใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml ประมาณ 5-10 ตัว ในกรณีที่ เป็นไข่เหาที่ติดอยู่กับเส้นผมจะใช้กรรไกรตัดเส้นผมที่มีไข่เหาติดอยู่ เก็บไข่เหาประมาณ 5-10 ฟอง จากนั้นทำการบันทึกรหัส ชั้นเรียน อายุ ในแต่ละโรงเรียน

3.7.1.3 เก็บตัวอย่างเหาศีรษะใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml ที่มีสารละลาย 70% ethanol เพื่อรักษาสภาพของเหาศีรษะก่อนนำส่งห้องปฏิบัติการหน่วยกีฏวิทยา ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 3.7.2 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

ตัวอย่างเหาศีรษะเก็บรักษาสภาพใน 70 % ethanol ก่อนนำไปสกัดดีเอ็นเอให้ทำการแยกตัวอย่างใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml โดยเลือกเหาศีรษะตัวอย่างละ 1 ตัว ในกรณีที่ตัวอย่างเป็นไข่เหาให้เลือกไข่จำนวน 3 ฟองนำมาสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นใส่สาร 1X PBS (phosphate-buffered saline) เพื่อล้างเอา 70% ethanol ออก

#### 3.7.2.1 การสกัดดีเอ็นเอเหาศีรษะโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปจาก Invisorb® Spin Tissue Mini Kit (Invitek GmbH, ประเทศเยอรมนี)

1. หลังจากล้าง 70% ethanol ออกโดยใช้ 1X PBS แล้ว ใส่ Lysis buffer G ปริมาตร 200 µl และ proteinase K ปริมาตร 20 µl จากนั้นใช้ไม้บดตัวอย่างเหาจนละเอียด นำไปผสมให้เข้ากันด้วยการเขย่าบนเครื่อง Vortex จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 52°C ประมาณ 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาบ่มแล้ว 2 ชั่วโมง ให้นำตัวอย่างมาปั่นตกตะกอนประมาณ 2 นาที ความเร็ว 11,000 rpm
2. ย้ายส่วนใส (supernatant) ใส่ในหลอด microcentrifuge ใหม่ จากนั้นใส่สารละลาย Binding buffer A ปริมาตร 200 µl (ผสมให้เข้ากันเบาๆ)
3. ย้ายใส่ในหลอดที่มีชุดตัวกรอง (spin filter) บ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 นาที จากนั้นปั่นตกด้วยความเร็ว 11,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที นำส่วนใสที่ปั่นตกทิ้ง
4. ใส่สารละลาย Wash buffer ปริมาตร 550 µl ปั่นล้างด้วยความเร็ว 11,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที นำส่วนใสที่ปั่นตกทิ้ง (ทำซ้ำในขั้นตอนการปั่นล้างด้วยสารละลาย Wash buffer อีก 1 ครั้ง)
5. ปั่นด้วยความเร็ว 11,000 rpm เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อเอา Ethanol ออก
6. ย้ายชุดตัวกรองไปใส่ในหลอด microcentrifuge จากนั้นใส่ elution buffer ปริมาตร 40 µl (ทำการ prewarm elution buffer ที่อุณหภูมิ 52°C ก่อนนำมาใช้) บ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 นาที จากนั้นปั่นด้วยความเร็ว 11,000 rpm นำชุดตัวกรองทิ้ง จากนั้นเก็บตัวอย่างสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 °C ก่อนนำดีเอ็นเอไปใช้ในขั้นตอนต่อไป



### 3.7.2.2 การตรวจสอบคุณภาพความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

นำสารละลายดีเอ็นเอของเหาศีรษะที่สกัดได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Nanodrop1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) โดยเครื่องจะวัดที่ความยาวคลื่น 260 nm (ความยาวคลื่นที่ดีเอ็นเอสามารถดูดกลืนแสงได้มากที่สุด) และความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (}\mu\text{g/ml)} = A_{260} \times 50 \times \text{dilution factor}$$

ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm นำมาเปรียบเทียบกันเพื่อประเมินความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ สำหรับค่าอัตราส่วน ( $A_{260}/A_{280}$  ratio) ต้องอยู่ในช่วงระหว่าง 1.80-2.00 เมื่อวัดค่าดูดแสงแล้วถ้าอัตราส่วน ( $A_{260}/A_{280}$  ratio) มีค่าน้อยกว่า 1.80 แสดงว่าตัวอย่างสารละลายดีเอ็นเอมีโปรตีนและฟีนอลปะปนอยู่ในสารละลายดีเอ็นเอ แต่ถ้ามีค่ามากกว่า 2.00 แสดงว่ามีการปนของอาร์เอ็นเอในสารละลายดีเอ็นเอ

### 3.7.3 การเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมาย (COI) ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ Polymerase Chain Reaction (PCR)

#### 3.7.3.1 การออกแบบ Primer เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน COI

ในการศึกษานี้ได้ศึกษายีน COI ในไมโตคอนเดรียของเหาศีรษะโดยออกแบบ primer แบบ Degenerate primer โดยหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) เลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI หลายๆนิวคลีโอไทด์จากนั้นวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม ClustalX version 1.8.1 ทำการ alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดเพื่อเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละเส้น จากนั้นออกแบบหาบริเวณที่มีความเหมือนมากที่สุดสร้าง forward และ reverse primer ขนาดประมาณ 18-30 เบส (แสดงในภาคผนวก ข) ทำการคำนวณหาค่า  $T_m$  (Melting temperature) จากเส้น primer ที่ออกแบบได้จากสูตร  $T_m = 2(A+T)+4(G+C)$  ซึ่งค่า  $T_m$  ของ primer ทั้ง 2 เส้น ควรอยู่ระหว่าง 55-65 °C และมีค่าใกล้เคียงกันไม่ควรต่างกันเกิน 5 °C จากนั้นใช้โดยโปรแกรม Oligocal เพื่อตรวจหา self-complementary และการเกิด Hairpin ทำการตรวจสอบความจำเพาะของเส้น primer ที่ออกแบบกับโปรแกรม primer-blast เพื่อทดสอบว่า primer ที่ออกแบบนั้นมีความจำเพาะสามารถจับกับยีน COI ของเหาศีรษะได้หรือไม่ และมีขนาดของยีนเท่าไร เมื่อได้ลำดับเบสของ primer แล้วจึงทำการส่งลำดับเบสของ primer ไปที่บริษัท 1st BASE DNA sequencing

services ประเทศมาเลเซีย โดยมีบริษัท Ward Medic Ltd. เป็นตัวกลางในการจัดส่ง เพื่อทำการสังเคราะห์ primer เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนยีนในขั้นตอนการทำ PCR ต่อไป

**ตารางที่ 2** แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่จำเพาะกับยีน COI

Primer	Sequences (5' – 3')	Size (bp)
COI-F	GGTACTGGCTGGACTRTTTATCC	599
COI-R	CTAAARACTTTYACTCCCGTTGG	

หมายเหตุ: R แทนเบส A/G, Y แทนเบส C/T

### 3.7.3.2 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่ PCR

เป็นขั้นตอนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในส่วนของบริเวณยีนที่เราสนใจให้มีจำนวนมากพอที่จะไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้โดยใช้ primer ที่ได้ทำการออกแบบที่มีความจำเพาะและใช้สารละลายสัดส่วนที่พอเหมาะ (ตารางที่ 4) และปฏิกิริยาของวิธี PCR ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (ตารางที่ 3) โดยเริ่มจากขั้นตอน initial denaturation เพื่อเป็นการแยกสายดีเอ็นเอเส้นคู่ออกจากกันเพื่อเป็นการกระตุ้นในการเข้าสู่ขั้นตอนการทำ PCR อย่างสมบูรณ์ โดยใช้อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเป็นขั้นตอน denaturation เป็นการแยกสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจากสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 1 นาที ต่อด้วยขั้นตอน annealing ซึ่งใช้อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงและจะทำให้ primer ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆ (ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 18-30 เบส) ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน จากนั้นคือขั้นตอน extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 5' ของ primer ที่เป็นต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส (DNA polymerase) ซึ่งใช้อุณหภูมิที่ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที ซึ่งทั้ง 3 ขั้นตอนนี้จะทำซ้ำกันจำนวน 35 รอบ และสุดท้ายคือขั้นตอน final extension จะใช้อุณหภูมิที่ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที เมื่อเสร็จเรียบร้อยแล้วนำไปตรวจสอบดู PCR product โดยวิธี gel electrophoresis

### 3.7.3.3 การตรวจสอบ PCR product โดยวิธี gel electrophoresis

เตรียมแผ่นเจลสำหรับใช้ในการรันดีเอ็นเอโดยใช้วุ้น Agarose ความเข้มข้น 1.5 % ละลายด้วย 1X TAE Buffer ตามปริมาตรของถาดวุ้นจากนั้นนำไปอบในตู้อบไมโครเวฟเป็นเวลา 3 นาที ที่กำลัง 600 วัตต์ เขย่าเรื่อย ๆ เพื่อให้ผงวุ้นละลายจนใส เทสารละลายวุ้นใส่ในถาดแม่แบบที่มีซี่ฟันสำหรับการรัน gel electrophoresis นำวุ้นที่แข็งตัวแล้วใส่ในอ่างเครื่องรันเจลที่มี

1X TAE Buffer อยู่แล้ว จากนั้นนำ PCR product ที่ผสมกับ 6X loading buffer หยอดลงในช่อง  
 ว่ายจนครบทุกตัวอย่าง หลังจากนั้นจึงใส่ negative control, positive control และ DNA marker  
 ขนาด 100 bp ลงในช่องว่ายที่เหลือตามลำดับ โดยการวิธี gel electrophoresis นี้รันเจลด้วยไฟฟ้า  
 ความต่างศักย์ 100 โวลต์เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นนำเจลที่ได้ไปแช่ในสารละลาย ethidium  
 bromide เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นประมาณ 2-3 ครั้ง นำเจลที่ได้เข้าเครื่องถ่ายภาพเจล  
 ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต (gel documentation) ปรับภาพให้เหมาะสมแล้วบันทึกภาพเจล ซึ่งคาดว่า  
 PCR product จะมีขนาดประมาณ 600 bp เมื่อเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker)  
 ขนาด 100 bp

**ตารางที่ 3** แสดงขั้นตอน PCR (Thermal cycle condition) ในการเพิ่มจำนวนยีน COI

ขั้นตอน PCR	อุณหภูมิ(°C)	เวลา(นาที)	จำนวนรอบ(cycle)
1. Initial denaturation	95	3	1
2. PCR step			
- Denaturation	95	1	} 35
- Annealing	50	1	
- extension	72	1.30	
3. Final extension	72	7	1

**ตารางที่ 4** ส่วนประกอบของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนยีน COI

สารส่วนประกอบ	ปริมาตรสาร(μl)
10X PCR Buffer	2.5
50 mM MgCl <sub>2</sub>	1.25
2 mM dNTPs	2.5
Primer COI-F (10 μM)	0.4
Primer COI-R (10 μM)	0.4
Taq polymerase (5U/μl)	0.2
DNA template (50-100 ng/μl)	2.0
ddH <sub>2</sub> O	15.75
รวม	25

### 3.7.4 ขั้นตอนการเชื่อมต่อดีเอ็นเอเป้าหมายกับดีเอ็นเอพาหะ (DNA ligation)

เมื่อเพิ่มจำนวนยีนที่เราสนใจด้วยวิธี PCR แล้วจะนำยีนที่สนใจมาเชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะ (vector) ชนิด plasmid เรียกว่าขั้นตอน DNA ligation โดยใช้ pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega<sup>®</sup> ประเทศสหรัฐอเมริกา) เป็น vector มีลักษณะเป็นพลาสมิดเวกเตอร์เส้นตรง (linearized vector) ซึ่งมีปลายเป็นเบส T (Thymine) ติดที่ปลาย 3'OH ของทั้ง 2 ข้าง เรียกว่า T-overhang (ระบบ TA Cloning) จากในขั้นตอน PCR เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาเอนไซม์ *Tag* polymerase จะมีการเติมเบส A (adenine) บริเวณด้านปลาย 3' เพราะฉะนั้นเมื่อทำการ ligation โดยเอนไซม์ ligase ส่วนปลายของ vector ที่มีเบส T จะสามารถเชื่อมต่อกับเบส A ของ PCR product ได้ ซึ่งจะเรียกว่า ดีเอ็นเอลูกผสม (recombinant DNA)

ในขั้นตอนการทำ ligation ใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูปจากบริษัท Promega ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยาแสดงดังตารางที่ 3.4 เมื่อผสมเรียบร้อยแล้วจึงตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมง หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ประมาณ 12-16 ชั่วโมง ซึ่งจะสามารถเพิ่มปริมาณของ transformed cell ให้มีจำนวนมากยิ่งขึ้น

ตารางที่ 5 แสดงส่วนประกอบของสารส่วนประกอบในขั้นตอน DNA ligation

สารส่วนประกอบ	ปริมาณ (μl)
2x Rapid ligation buffer	5
pGEM <sup>®</sup> T easy vector (50 ng/μl)	1
T4 ligase enzyme (5 U/μl)	1
PCR product (50 ng/μl)	2
Deionized water	1
รวม	10

### 3.7.5 ขั้นตอน Transformation ในการนำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมถ่ายโอนเข้าสู่ competent cell โดยวิธีกระตุ้นด้วยความร้อน (heat shock)

นำแบคทีเรีย competent cell (*Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α) มาแช่ในน้ำแข็งรอให้ละลาย จากนั้นค่อยๆ ตูต competent cell ปริมาตร 100 μl ใส่ลงในหลอด microcentrifuge ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมอยู่แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมเกาะที่ permeable site บริเวณผนังเซลล์ของ competent cell หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอลูกผสมถ่ายโอนเข้าสู่ competent cell โดยกระตุ้นด้วยความร้อน (heat shock) ที่อุณหภูมิ

42 °C นานเป็นเวลา 45 วินาที แล้วรีบนำกลับไปแช่ในน้ำแข็งทันทีโดยทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที เมื่อครบเวลาแล้วให้เติมอาหารเหลว SOC medium หลอดละ 200 µl จากนั้นนำไปปั่นแบบเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C นานประมาณ 1 ชั่วโมง เมื่อใกล้ถึงเวลาให้นำ LB agar ที่มียา Ampicillin 100 µg/ml มาใส่ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside (X-gal) ปริมาตร 50 µl และ Isopropyl β-D-1 thiogalactopyranoside (IPTG) ปริมาตร 50 µl โดยผสมให้เข้ากันแล้วดูดสารใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว spread ให้ทั่วจานแห้งแล้วนำเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เมื่อครบเวลาบ่มเชื้อ 1 ชั่วโมงแล้วจึงนำเชื้อที่เลี้ยงได้มาดูดจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดแล้ว spread ให้ทั่ว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ประมาณ 16-18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูลักษณะ colony สีฟ้า-สีขาวเพื่อคัดเลือก colony สีขาวเพื่อใช้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป

### 3.7.6 ขั้นตอนการคัดเลือกโคลนที่มีชิ้นส่วนยีน COI โดยวิธี Colony PCR

พลาสมิดชนิด pGEM<sup>®</sup>-T Easy vector มียีนที่ให้ลักษณะที่ต้านต่อยา Ampicillin ดังนั้นเซลล์ของแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดนี้จะสามารถเจริญบนอาหารชนิดแข็ง LB agar ที่มียา Ampicillin ได้ จึงสามารถคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมออกจากเซลล์แบคทีเรียชนิดอื่นที่อาจปนเปื้อนได้ และคุณสมบัติของพลาสมิดมียีน *lacZ* ซึ่งมีหน้าที่ในการสร้างเอนไซม์ β-galactosidase ที่สามารถย่อยสาร X-gal ซึ่งจะทำให้โคโลนีแบคทีเรียมีสีฟ้า เมื่อส่วนของยีนที่เราศึกษาคือยีน COI สามารถแทรกเข้าไปในส่วนของยีน *lacZ* บริเวณ clone insert ส่วนของยีน *lacZ* นั้นจึงแยกออกจากกัน ยีน *lacZ* จึงไม่สามารถทำงานได้ทำให้ไม่มีการสร้างเอนไซม์ β-galactosidase มาย่อย X-gal ได้ โคโลนีของแบคทีเรียที่ได้จะมีสีขาว ด้วยเทคนิคนี้จึงสามารถตรวจสอบแยกโคโลนีของแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดที่มียีน COI ออกจากเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดที่ไม่มียีน COI ได้

ทำการเลือกโคโลนีที่มีสีขาวในแต่ละตัวอย่าง เนื่องจากอาจจะมีชิ้นส่วนของยีนที่เราสนใจ โดยเลือกหลายๆ colony ประมาณ 5-10 colony ต่อ 1 plate มาตรวจสอบโคลนด้วยวิธี Colony PCR โดยเตรียมส่วนประกอบในขั้นตอน PCR ซึ่งสารที่ใช้ในปฏิกิริยาและสภาวะ PCR ที่เหมาะสมใช้เหมือนในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนยีน COI ที่กล่าวมาข้างต้น จากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันจิ้ม colony ที่เลือกไว้ใส่ในหลอด PCR ที่มี master mix ของ PCR อยู่ ผสมให้เข้ากันแล้วขีดลงบน plate ต้นแบบ (master plate) จากนั้นเมื่อทำ PCR เสร็จแล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธี gel electrophoresis ที่ความเข้มข้น 1.5 % เพื่อดูว่ามีชิ้นส่วนของยีนที่เราสนใจหรือไม่ แล้วเลือกแถบของดีเอ็นเอที่เข้มและชัดที่สุด ส่วน master plate นั้นนำไปบ่มที่ 37 °C เพื่อรอนำ colony ที่ให้ผลโคลนที่ Positive จากวิธี colony PCR ไปเตรียมเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อไป

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว LB-broth ใส่หลอดขนาด 15 ml ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 5 ml และใส่ยา Ampicillin 100 µg/ml ปริมาตร 5 µl และนำไม้จิ้มฟันจิ้มเชื้อจาก master plate ที่ให้ผลโคลนที่มีชิ้นส่วนยีน COI ลงใน LB-broth ที่เตรียมไว้ โดย LB-broth ที่มีไม้จิ้มฟันอยู่นำไปบ่มที่ 37°C โดยเขย่าความเร็วรอบ 200 rpm ประมาณ 12-16 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงนำไปใช้ในขั้นตอนการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

### 3.7.7 ขั้นตอนการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปของบริษัท Invisorb® Spin Plasmid Mini Two (Invitek GmbH, ประเทศเยอรมนี)

1. ก่อนการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ นำเชื้อแบคทีเรียที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอที่เราเลี้ยงไว้ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบ 11,000 rpm เวลาประมาณ 3 นาที เทส่วนที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง (ปั่นตกตะกอนเชื้อแบคทีเรียประมาณ 3 ครั้ง)

2. เมื่อได้ส่วนของตะกอนแล้วให้ใส่สาร Solution A ปริมาตร 250 µl เขย่าโดยใช้ Vortex เพื่อทำการละลายตะกอนให้เป็นเนื้อเดียวกัน

3. ใส่สาร Solution B ปริมาตร 250 µl ผสมขึ้นลงเบาๆ ประมาณ 4-6 ครั้ง

4. ใส่สาร Solution C ปริมาตร 250 µl ผสมขึ้นลงเบาๆ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที

5. ย้ายส่วนใสใส่ลงในชุดตัวกรอง (Spin filter) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 rpm เวลา 1 นาที เมื่อครบเวลาจึงเทส่วนใสทิ้ง

6. ทำการล้างตะกอนของพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใส่สารละลาย Wash solution ปริมาตร 750 µl จากนั้นปั่นล้างตะกอนด้วยความเร็ว 11,000 rpm เวลา 1 นาที เมื่อครบเวลาจึงเทส่วนใสทิ้ง

7. ปั่นด้วยความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที เพื่อแยกเอา ethanol ที่ยังมีอยู่ออก

8. ย้ายชุดตัวกรองใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml จากนั้นใส่สารละลาย elution solution หรืออาจใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์ ปริมาตร 50 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 นาที เมื่อครบเวลาปั่นด้วยความเร็ว 11,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

เมื่อได้พลาสมิดดีเอ็นเอแล้วนำไปวัดความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Spectrophotometer ทำเช่นเดียวกับขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอของเห็ดรา จากนั้นแบ่งสารละลายที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอปริมาตร 30 µl เพื่อส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing)

### 3.7.8 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing) ของเหาศีรษะ

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในการทดลองนี้ใช้บริการตรวจวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์จากบริษัท 1st BASE DNA sequencing services ประเทศมาเลเซีย โดยมีบริษัท Ward Medic Ltd. เป็นบริษัทกลางในการจัดส่ง โดยแต่ละตัวอย่างจะทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ตัวอย่างละ 2 ชุด โดยตัวอย่างที่ส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต้องมีความเข้มข้นของพลาสมิด ดีเอ็นเออย่างน้อยคือ 100-150 µg/µl และมีปริมาตรอย่างน้อย 10 µl

### 3.7.9 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน COI ในเหาศีรษะ

นำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่างจากบริษัท 1<sup>st</sup> BASE DNA sequencing services ประเทศมาเลเซีย โดยแสดงในรูปกราฟ chromatogram จากโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor Program Version 7.1.9 จากนั้นตัดเอาเฉพาะส่วนของยีนที่เรา ต้องการคือยีน COI ออกจากพลาสมิดเวคเตอร์แล้วบันทึกในรูปแบบ Fasta format ไว้ในโปรแกรม notepad

#### 3.7.9.1 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI กับฐานข้อมูล NCBI

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน COI ในเหาศีรษะมาวิเคราะห์ค่าความ เหมือนหรือความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม nucleotide blast (BLASTN) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ซึ่งจะนำลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน COI ไป เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของเหาศีรษะจากฐานข้อมูลใน NCBI (GenBank) โดย จะแสดงค่าออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ความเหมือนและความคล้ายคลึง (percentage identities)

#### 3.7.9.2 การคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ความต่างภายในสายพันธุ์เดียวกัน

หาเปอร์เซ็นต์ (%) ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์ เดียวกัน (intraspecific variations) ในแต่ละตัวอย่างโดยทำการเปรียบเทียบทั้งภายในเหาจากพื้นที่ เดียวกันและต่างพื้นที่กันด้วยโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor Program Version 7.1.9 โดยเลือก sequence identity matrix ซึ่งจะได้ค่า % identity โดยจากค่า % identity ซึ่ง คือค่า % ความเหมือนของการเทียบของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยค่าความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์หา ได้จาก

$$\% \text{ ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์} = 100 - \% \text{ ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์}$$

### 3.7.9.3 การสร้างและวิเคราะห์แผนภูมिवิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

สร้างแผนภูมिवิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6 (MEGA 6) (24) โดยใช้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของเหาศีรษะ โดยใช้ Neighbor-joining method และกำหนดแบบจำลองของการแทนที่ลำดับ นิวคลีโอไทด์แบบ Kimura-2-parameter model เพื่อพิจารณาการแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์และตรวจความน่าเชื่อถือทางสถิติโดยใช้ Bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ และใช้ *Pediculus schaeffi* accession no. AY695999 เป็น out group

จากการศึกษาด้วยยีน COI ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ในไมโทคอนเดรียโดยยีนดังกล่าวสามารถแบ่งกลุ่มของเหาได้เป็น 3 กลุ่มด้วยการสร้าง Phylogenetic tree ซึ่งในงานวิจัยนี้จะใช้ reference sequence ที่ทราบ clade เป็นตัวเปรียบเทียบแยกกลุ่ม Clade A, B และ C เพื่อสร้างแผนภูมिवิวัฒนาการของเหาศีรษะ (แสดงในตารางที่ 3.5)

**ตารางที่ 6** แสดง reference sequence ที่นำมาใช้วิเคราะห์และสร้าง phylogenetic tree จากตำแหน่งยีน COI เพื่อแยก Clade A, B และ

Head lice species	Accession no.	Location	Clade
<i>P. humanus capitis</i>	AY695982	Papua New Guinea	A
<i>P. humanus capitis</i>	AY695978	Philippines	A
<i>P. humanus capitis</i>	AY590005	New Zealand	A
<i>P. humanus capitis</i>	AY590023	Israel	A
<i>P. humanus capitis</i>	AY695942	USA	B
<i>P. humanus capitis</i>	AY316750	United Kingdom	B
<i>P. humanus capitis</i>	AY316751	Germany	B
<i>P. humanus capitis</i>	AY695947	Honduras	B
<i>P. humanus capitis</i>	AY695948	Honduras	B
<i>P. humanus capitis</i>	AY239288	Portugal	B
<i>P. humanus capitis</i>	AY590029	Australia	B
<i>P. humanus capitis</i>	AY316752	Ethiopia	C
<i>P. humanus capitis</i>	AY590039	Nepal	C
<i>P. humanus capitis</i>	AY590040	Nepal	C
<i>P. humanus capitis</i>	AY590041	Nepal	C



### 3.7.9.4 การขอขึ้นทะเบียนและการเผยแพร่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งยีน COI ของเหาศีรษะทุกตัวอย่างที่ได้จะนำไปยื่นขอเลขทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์ (accession number) โดยใช้โปรแกรมแบบออนไลน์ BankIt เพื่อเผยแพร่และเพิ่มข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน COI ของเหาศีรษะที่จำเพาะในประเทศไทยลงในฐานข้อมูล NCBI (GenBank)

### 3.7.10 การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในเหาศีรษะ

#### 3.7.10.1 การตรวจหาเชื้อ *Bartonella* spp. ในเหาศีรษะ

การตรวจหาเชื้อ *Bartonella* sp. โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากเหาศีรษะจากวิธีข้างต้น ทำการเพิ่มจำนวนยีน *gltA* ซึ่งเป็น housekeeping gene โดยใช้ primer ที่อ้างอิงจากการศึกษาของ Norman และคณะ (41) โดยปฏิกิริยาของวิธี PCR ภายใต้อุณหภูมิที่เหมาะสม (แสดงในตารางที่ 9)

ตารางที่ 7 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่จำเพาะกับยีน *gltA*

Primer	Sequences (5' – 3')	Size (bp)	reference
BhCS( <i>gltA</i> )781-F	GGGGACCAGCTCATGGTGG	379	Norman et al., 1995
BhCS( <i>gltA</i> )1137-R	AATGCAAAAAGAACAGTAAACA		

เมื่อทำการเพิ่มจำนวนยีน *gltA* ด้วยวิธี PCR เสร็จแล้ว นำไปตรวจสอบ PCR product โดยวิธี gel electrophoresis โดยใช้วุ้น Agarose ความเข้มข้น 1.5 % รันเจลด้วยไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นนำเจลที่ได้ไปแช่ในสารละลาย ethidium bromide เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นประมาณ 3 ครั้ง นำเจลเข้าเครื่องถ่ายภาพเจลด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต (gel documentation) ปรับภาพให้เหมาะสมแล้วบันทึกภาพเจล ซึ่งคาดว่า PCR product จะมีขนาดประมาณ 379 bp เมื่อเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp (DNA marker)

ตารางที่ 8 ส่วนประกอบของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนยีน *gltA*

สารส่วนประกอบ	ปริมาตรสาร(μl)
10X PCR Buffer	2.5
50 mM MgCl <sub>2</sub>	1.25
2 mM dNTPs	2.5
Primer BhCS( <i>gltA</i> )781-F (10 μM)	0.4
Primer BhCS( <i>gltA</i> )1137-R (10 μM)	0.4
<i>Taq</i> polymerase (5U/μl)	0.2
DNA template (50-100 ng/μl)	5.0
ddH <sub>2</sub> O	12.75
รวม	25

ตารางที่ 9 แสดงขั้นตอน PCR (Thermal cycle condition) ในการเพิ่มจำนวนยีน *gltA*

ขั้นตอน PCR	อุณหภูมิ(°C)	เวลา(นาที)	จำนวนรอบ(cycle)
1. Initial denaturation	95	3	1
2. PCR step			
- Denaturation	95	30 วินาที	} 35
- Annealing	60	30 วินาที	
- extension	72	1	
3. Final extension	72	7	1

### 3.7.10 การตรวจหาเชื้อ *Acinetobacter* spp. ในเหาศีรษะ

ตรวจหาเชื้อ *Acinetobacter* spp. โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากเหาศีรษะโดยวิธี PCR ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม โดยการเพิ่มจำนวนยีน *rpoB* ซึ่งเป็น housekeeping gene โดยใช้ primer ที่อ้างอิงจากการศึกษาของ Kempf และคณะ (47) (แสดงในตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่จำเพาะกับยีน *rpoB*

Primer	Sequences (5' – 3')	Size (bp)	reference
rpoB-F	TAC TCA TAT ACC GAA AAG AAA CGG	239	Kempf et al., 2012
rpoB-R	GGY TTA CCA AGR CTA TAC TCA AC		

ตารางที่ 11 ส่วนประกอบของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนยีน *rpoB*

สารส่วนประกอบ	ปริมาตรสาร(μl)
10X PCR Buffer	2.5
50 mM MgCl <sub>2</sub>	1.25
2 mM dNTPs	2.5
Primer rpoB-F (10 μM)	0.4
Primer rpoB-R (10 μM)	0.4
<i>Taq</i> polymerase (5U/μl)	0.2
DNA template (50-100 ng/μl)	5.0
ddH <sub>2</sub> O	12.75
รวม	25

ตารางที่ 12 แสดงขั้นตอน PCR (Thermal cycle condition) ในการเพิ่มจำนวนยีน *rpoB*

ขั้นตอน PCR	อุณหภูมิ(°C)	เวลา(นาที)	จำนวนรอบ(cycle)
1. Initial denaturation	95	3	1
2. PCR step			
- Denaturation	95	30 วินาที	} 35
- Annealing	62	30 วินาที	
- extension	72	1	
3. Final extension	72	7	1

สำหรับขั้นตอนการตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธี gel electrophoresis การทำ DNA ligation, Transformation และการตรวจสอบโคลนของยีน *gltA* ของเชื้อ *Bartonella* spp และยีน *rpoB* ของเชื้อ *Acinetobacter* spp. ทำเหมือนกับในขั้นตอนการโคลนยีน COI ในเหาสิริชะ

### 3.7.11 การส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในงานวิจัยนี้ใช้บริการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากบริษัท AIT biotech ประเทศสิงคโปร์ ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละตัวอย่างวิเคราะห์โดยแสดงในรูปกราฟ chromatogram จากโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor Program Version 7.1.9 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะนำไปยื่นขอเลขทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์ (accession number) โดยใช้โปรแกรมแบบออนไลน์ BankIt เพื่อเผยแพร่และเพิ่มข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ลงในฐานข้อมูล NCBI (GenBank)

### 3.7.12 การสร้าง Phylogenetic tree เพื่อยืนยันสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย

สร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 6 โดยใช้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน *gltA* เพื่อยืนยันและจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *Bartonella* spp. โดยเทียบกับ reference sequence ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ และใช้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน *rpoB* เพื่อยืนยันและจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *Acinetobacter* spp. โดยเทียบกับ reference sequence

**บทที่ 4**  
**ผลการทดลอง**

**4.1 จำนวนตัวอย่างและพื้นที่ในการเก็บตัวอย่างเหาศีรษะ**

งานวิจัยนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างเหาศีรษะจากศีรษะของเด็กนักเรียนหญิงช่วงอายุระหว่าง 7-12 ปี ตั้งแต่ชั้นประถมศึกษาปีที่ 1 ถึงชั้นประถมศึกษาปีที่ 6 จากโรงเรียนประถมศึกษาในภูมิภาคต่างๆของประเทศไทย คือ ภาคเหนือจำนวน 34 ตัวอย่าง ภาคกลางจำนวน 44 ตัวอย่าง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือจำนวน 55 ตัวอย่าง ภาคใต้จำนวน 79 ตัวอย่าง ภาคตะวันออกจำนวน 12 ตัวอย่างและภาคตะวันตกจำนวน 51 ตัวอย่าง รวมตัวอย่างทั้งหมด 275 ตัวอย่าง (ตารางที่ 13)

**ตารางที่ 13** ข้อมูลพื้นที่ในการเก็บตัวอย่างเหาศีรษะ (F คือ เหาเพศเมีย, E คือ ไข่เหา)

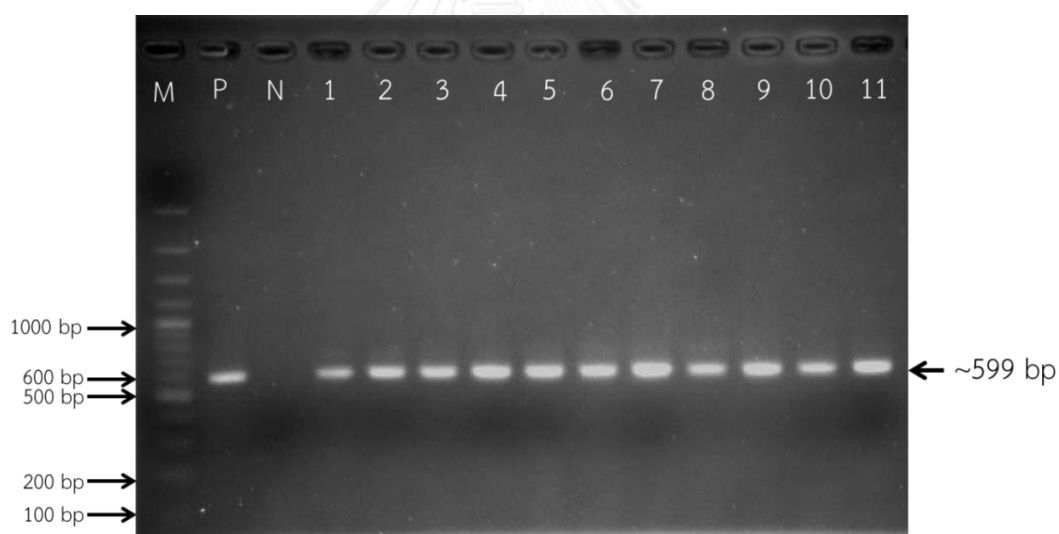
ภูมิภาค	จังหวัด	รหัสตัวอย่าง	จำนวน (เพศของเหา)
ภาคเหนือ	น่าน	S001,S003 D001,D002,D003,D004,D005,D006,D007	9 (F)
	แพร่	PA01,PA02,PA03,PA04	4 (F)
	เชียงราย	BA1,BA2,BA3,BA6,BA7,BA8,BA10,BA12,BA13,BA14,BA15 RA1,RA2,RA3,RA4,RA5,RA6,RA7,RA8,RA9,RA10	21 (F)
ภาคกลาง	ลพบุรี	L001,L002,L003,L004,L005,L006,L007,L008,L009,L010	10 (F)
	สระบุรี	C001,C002,C003,C004,C005,C006,C007,C008,C009	9 (F)
	กรุงเทพฯ	BKK1,BKK2,BKK3,BKK4	4 (F)
	นครปฐม	KA101,KA102,KP101,KP102,KP202,KP304,KP502,KP601, KP602,KP603 SA201,SA202,SA203,SP204,SP205,SP208,SP301,SP302, SP303,SP405,SP407	21(F)
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	นครราชสีมา	T001,T002,T003, N001,N002,N003,N004,N005,N006, G001,G002,G003,G004,G005,G006,G007,G008,G009, G010,G011,G012,G013,G014,G015,G016,G017	26 (F)
	มุกดาหาร	A001,A002,A004,A005,A006	5 (E)
	เลย	J001,J002,J003,J004,J005,J006,J007,J008,J009,J010, J011,M001,M002,M003,M004,M005,M006,M007,M008, M009,M010,M011,M012,M013	24 (F)

ภูมิภาค	จังหวัด	รหัสตัวอย่าง	จำนวน (เพศของเหา)
ภาคใต้	สงขลา	Q001,Q002,Q006,Q007,Q008,Q013,Q014,Q016,Q017, Q018,Q019,Q020 K003,K004,K005,K006,K008,K009,K010,K011,K013,K015,K016, K018	24 (F)
	นครศรีธรรมราช	NK1,NK2,NK4,NK5,NK10,NK11,NK12,NK14,NK15,NK16, NK17,NK18,NK19 V003,V004,V005,V006,V007,V008,V009,V011,V012,V013,V014, V015,V016,V017,V018,V019,V020	30 (F)
	พัทลุง	W001,W002,W004,W005,W006 P001,P002,P003 PT2,PT3,PT4,PT5,PT6,PT7,PT8,PT9,PT10,PT11,PT12, PT13,PT14,PT15,PT16,PT17,PT20,	25 (F)
ภาคตะวันตก	กาญจนบุรี	B002,B003,B005,B006,B007,B010,B011,B012,B013,B014,B015, B016,B017,B018,B019,B021,B022,B023,B024,B025,B026,B027, B028,B029,B031,B032,B033,B034,B035 H001,H002,H005,H006,H007,H008,H009,H010,H011, H012,H013,H014,H015,H016,H017,H018,H019,H020, H021,H022,H023,H024	51 (F)
ภาคตะวันออก	ระยอง	R001,R002,R003,R004,R005,R006,R007,R008, R009,R010,R011,R012,	12 (F)

ตารางที่ 13 (ต่อ) (F คือ เหาเพศเมีย, E คือ ไช้เหา)

#### 4.2 ผลการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีน COI โดยเทคนิค PCR

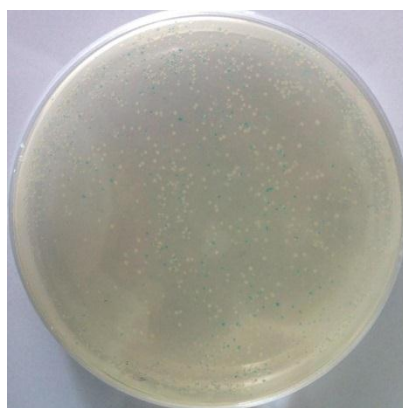
การศึกษาความผันแปรของยีน COI ในภูมิภาคต่างๆของประเทศไทย จากตัวอย่างเหาซีระหะทั้งหมด 275 ตัวอย่างที่เก็บจากโรงเรียนประถมศึกษา ซึ่งทำการสกัด DNA จากชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป โดยวัดปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer ซึ่งมีความเข้มข้นของดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 50-100 ng/ $\mu$ l จากนั้นจึงนำดีเอ็นเอที่ได้มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน COI ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer ที่ได้ออกแบบขึ้นคือ primer CO-F (5' GGTACTGGCTGGACTRTTATCC 3') และ CO-R (5'CTAAARACTTTYACTCCCGTTGG 3') ภายใต้ปฏิกิริยา PCR ที่สภาวะเหมาะสมตามที่ได้อธิบายในบทที่ 3 วิธีการทดลอง หลังจากนั้นทำการตรวจสอบขนาดของ PCR product โดยการทำให้ 1.5 % agarose gel electrophoresis โดยให้เคลื่อนที่ภายใต้ความศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำแผ่นเจลที่ได้แล้วไปย้อมด้วย ethidium bromide ก่อนนำไปส่องภายใต้แสง UV จะเห็น PCR product ที่มีขนาดประมาณ 599 bp โดยเปรียบเทียบขนาดของยีนกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp (รูปที่ 19)



**รูปที่ 19** ผลการตรวจสอบชิ้นส่วนยีน COI ด้วยวิธี gel electrophoresis (1.5 % agarose gel) ภายใต้ความศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง, Lane M คือ ดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 bp, Lane P คือ Positive control (พลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนยีน COI ของเหาซีระหะ), Lane N คือ Negative control (ใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์แทนดีเอ็นเอต้นแบบ), Lane 1-11 คือ PCR product ของยีน COI ในตัวอย่างเหาซีระหะรหัสตัวอย่าง J001-J011 จากจังหวัดเลย (แสดงผลบางส่วน)

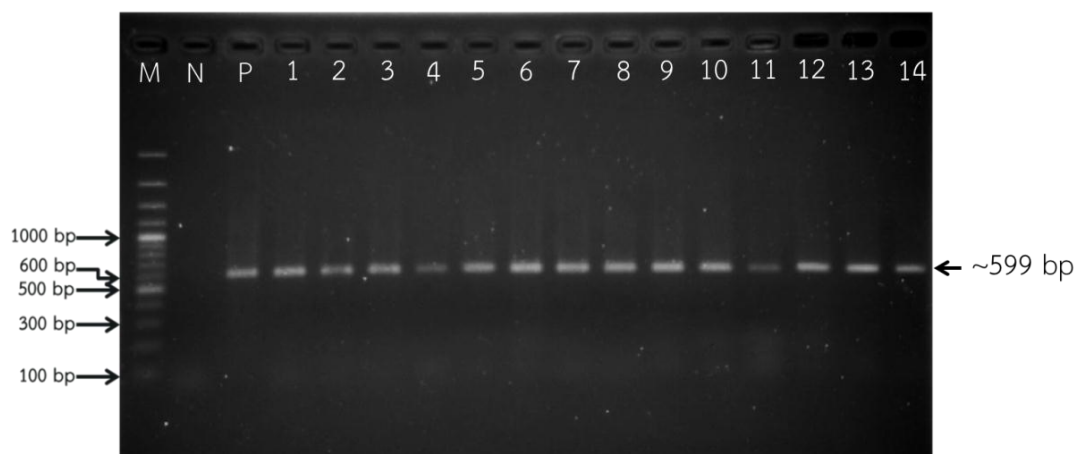
#### 4.3 ผลการตรวจสอบโคลนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนยีน COI โดยเทคนิค Colony PCR

เมื่อทำการเพิ่มจำนวนยีนด้วยเทคนิค PCR แล้วจะได้ PCR product ของยีน COI ที่มีขนาดประมาณ 599 bp เมื่อทำการเชื่อมต่อยีน COI เข้ากับ pGEM-T<sup>®</sup> easy vector ที่มีลักษณะบริเวณส่วนปลายเป็นเบส T (thymine) ติดที่ปลายของทั้ง 2 ข้าง และจากในขั้นตอน PCR เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาเอนไซม์ *Taq* polymerase จะมีการเติมเบส A (adenine) บริเวณด้านปลาย 3' เพราะฉะนั้นเมื่อทำการ ligation เอนไซม์ DNA ligase จะทำการเชื่อมต่อยีน COI เข้ากับเบส T ที่ติดอยู่กับเบส A ของ PCR product เกิดเป็นพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน COI อยู่ (ขั้นตอนในการทดลองและสารเคมีที่ใช้อธิบายในบทที่ 3 วิธีการทดลอง) จากนั้นทำการถ่ายโอนพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าสู่ competent cell (*E. coli* DH5 $\alpha$ ) ด้วยการกระตุ้นด้วยความร้อน (heat shock) จากนั้นนำมาตรวจสอบโคลนด้วยการเลือก colony ของแบคทีเรียที่มีสีขาวซึ่งคาดว่าจะมี insert gene (ยีน COI) กล่าวคือพลาสมิดเวกเตอร์ชนิด pGEM<sup>®</sup>-T easy vector มีคุณสมบัติของพลาสมิดที่มียีน *lacZ* ซึ่งมีหน้าที่ในการสร้างเอนไซม์  $\beta$ -galactosidase ที่สามารถย่อยสาร X-gal ซึ่งจะทำให้ colony แบคทีเรียมีสีฟ้าแต่เมื่อมียีนที่เราศึกษาคือยีน COI แทรกเข้าไปในส่วนของยีน *lacZ* บริเวณ clone insert ยีน *lacZ* จึงไม่สามารถทำงานได้ทำให้ไม่มีการสร้างเอนไซม์  $\beta$ -galactosidase มาย่อย substrate (X-gal) colony ของแบคทีเรียที่ได้จะมีสีขาว (รูปที่ 20) เราจึงเลือก colony สีขาวมาทดสอบด้วยเทคนิค colony PCR โดยเตรียมสารในปฏิกิริยาและสภาวะที่เหมาะสมเหมือนการเพิ่มจำนวนยีน COI แต่ในการทำด้วยเทคนิค colony PCR นั้นจะใช้ colony ของแบคทีเรียแทนดีเอ็นเอต้นแบบ หลังจากนั้นนำไปตรวจสอบด้วย 1.5 % agarose gel electrophoresis ตามด้วยย้อมด้วย ethidium bromide ก่อนนำไปส่องภายใต้แสง UV จะเห็นโคลนที่มีขนาดประมาณ 599 bp โดยเปรียบเทียบขนาดของยีนกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 (รูปที่ 21)



รูปที่ 20 แสดงลักษณะของ colony สีขาวและ colony สีฟ้าบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar





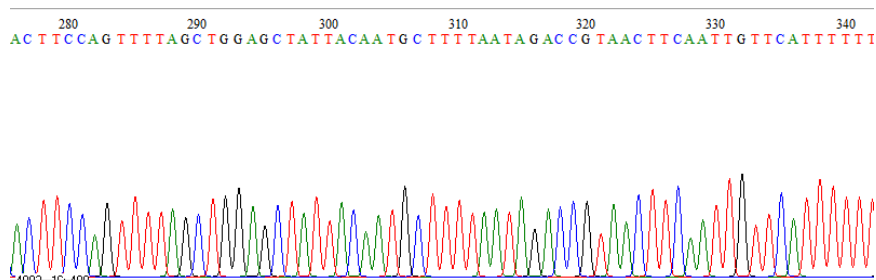
**รูปที่ 21** ผลการตรวจสอบโคลนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนยีน COI ด้วยวิธี gel electrophoresis (1.5 % agarose gel) ภายใต้ความศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง, Lane M คือดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 bp, Lane P คือ Positive control (พลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนยีน COI ของเหาศัตรู), Lane N คือ Negative control (ใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์แทนดีเอ็นเอต้นแบบ), Lane 1-14 คือ ตัวอย่างโคลนที่พลาสมิดดีเอ็นเอมีชิ้นส่วนของยีน COI (แสดงผลบางส่วน)

#### 4.4 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

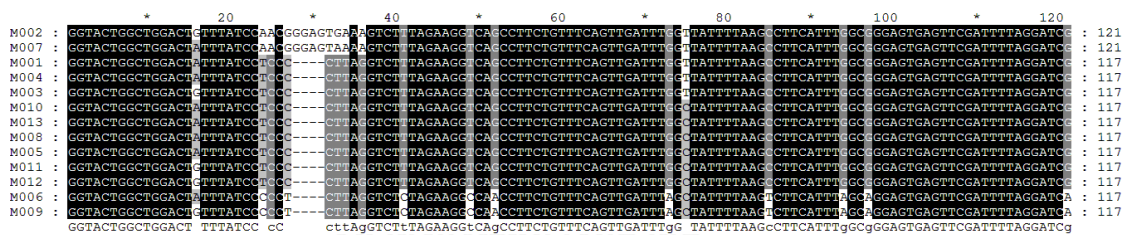
ผลจากการตรวจโคลนที่มีชิ้นส่วนยีน COI ของเหาศัตรูด้วยเทคนิค colony PCR นำ colony ที่มีชิ้นส่วนยีน COI มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากนั้นนำไปสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยวัดปริมาณความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอ็นเอโดยตัวอย่างที่ส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต้องมีความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอ็นเออย่างน้อยคือ 100-150  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  และมีปริมาตรอย่างน้อย 10  $\mu\text{l}$  ก่อนนำส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท AIT biotech ประเทศสิงคโปร์ โดยใช้ primer T7 (5'GTAATACGACTCACTATAGGGC3') และส่งเพื่อยืนยันความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวอย่างละ 2 โคลน เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากการทำ sequencing มาแล้วจะแสดงในรูปของกราฟ chromatogram (รูปที่ 22) จากนั้นทำการวิเคราะห์เส้นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ เนื่องจากตัวอย่างที่ส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นพลาสมิดดีเอ็นเอซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะมีบางส่วนของพลาสมิดเวกเตอร์ติดบริเวณหัวและท้ายของเส้น insert gene (ยีน COI) อยู่ เราจึงทำการตัดส่วนของเวกเตอร์ออกโดยวิเคราะห์จากโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor Program Version 7.1.9 จากนั้นเก็บข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ลงในโปรแกรม notepad

เมื่อวิเคราะห์ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตัดแต่งแล้วพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในเหาศัตรูมีความยาวขนาด 599 bp ทุกตัวอย่าง ยกเว้นตัวอย่างจากจังหวัดเลย รหัสตัวอย่าง M002 และ M007 และจังหวัดนครปฐม รหัสตัวอย่าง KP202 และ KP304 พบว่ามีขนาด 603 bp ซึ่งเมื่อนำมา

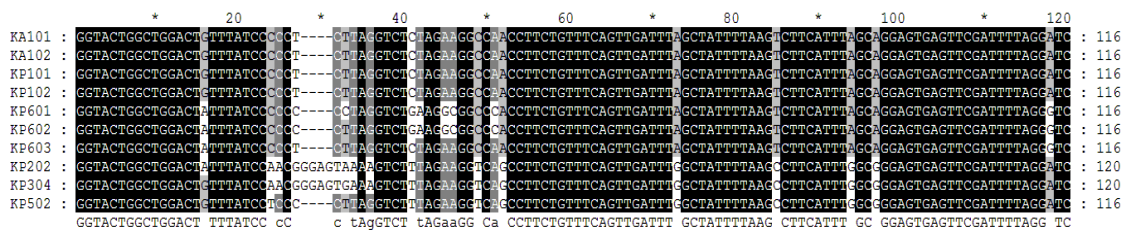
วิเคราะห์เปรียบเทียบโดยการทำให้ multiple sequence alignment พบว่าการ insertion ของเบส GGAG ในลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณช่วงต้น เมื่อเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าทุกตัวอย่างมีความเหมือนกับเหสาสายพันธุ์ *P. humanus capitis* (accession no. KC685849) ทั้ง 4 ตัวอย่าง (รูปที่ 23 และ 24) ส่วนความยาวลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ที่ตัดแต่งแล้วได้ทำการเปรียบเทียบโดยการทำให้ multiple sequence alignment ในแต่ละจังหวัดแสดงในภาคผนวก ข



รูปที่ 22 แสดงผลจากขั้นตอน sequencing ในรูปกราฟ chromatogram ของยีน COI ในเหศีระ



รูปที่ 23 ผลการเปรียบเทียบ multiple sequence alignment แสดงตัวอย่าง M002 และ M007 (แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วน)



รูปที่ 24 ผลการเปรียบเทียบ multiple sequence alignment แสดงตัวอย่าง KP202 และ KP304 (แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วน)

#### 4.5 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในเหาศีรษะกับฐานข้อมูล NCBI

จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของเหาศีรษะที่ได้ทำการตัดแต่งเรียบร้อยแล้วจะนำมาเปรียบเทียบความเหมือนหรือความคล้ายคลึงกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน COI ของเหาศีรษะที่มีการเก็บสะสมอยู่ในฐานข้อมูล NCBI (GenBank) โดยใช้โปรแกรมออนไลน์ nucleotide blast (BLASTN) โดยจะแสดงค่าออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ความเหมือนและความคล้ายคลึง (percentage identity)

พบว่าตัวอย่างเหาศีรษะจากภาคเหนือมีค่า percentage identity เฉลี่ยเท่ากับ 98.6 % โดยที่ตัวอย่างจากจังหวัดน่านมีค่า % identity 97-100% (เฉลี่ย 98.4%) โดยที่ตัวอย่างในจังหวัดน่านเหมือนกับ *P. humanus capitis* (acc no. KC685851, EU493392 และ KC685849) ด้วยค่า % identity 99%, 99-100% และ 97% ตามลำดับ ส่วนจังหวัดแพร่มีค่า % identity เท่ากับ 99% ทุกตัวอย่างโดยเหมือนกับ *P. humanus capitis* (acc no. KC867686) และตัวอย่างจากจังหวัดเชียงรายมีค่า % identity 91-100% (เฉลี่ย 98.3%) โดยที่ตัวอย่างจากเชียงรายเหมือนกับ *P. humanus capitis* (acc no. EU493442, EU493392, KC685851, KC685849 และ KC867686) ด้วยค่า % identity 99%, 91-100%, 99%, 97-98% และ 99% ตามลำดับ

สำหรับตัวอย่างเหาศีรษะจากภาคกลางมีค่า % identity เฉลี่ยเท่ากับ 97.6 % โดยที่ตัวอย่างจากจังหวัดลพบุรีมีค่า % identity 95-100% (เฉลี่ย 98.7%) โดยที่รหัสตัวอย่างทั้งหมดจากจังหวัดลพบุรีเหมือนกับ *P. humanus capitis* (acc no. KC685851) ขณะที่ตัวอย่างจากจังหวัดสระบุรีและกรุงเทพมหานครมีค่า % identity เท่ากับ 97% ทุกตัวอย่างซึ่งมีความเหมือนกับ *P. humanus capitis* (acc no. KC685849) ส่วนตัวอย่างจากจังหวัดนครปฐมมีค่า % identity 97-99% (เฉลี่ย 97.9%) โดยเหมือนกับ *P. humanus capitis* (acc no. KC685851, KC685849, EU493442 และ KC867686) ด้วยค่า % identity 99%, 97-98%, 99% และ 99% ตามลำดับ

ตัวอย่างจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีค่า % identity เฉลี่ยเท่ากับ 98.4% โดยที่ตัวอย่างจากจังหวัดนครราชสีมามีค่า % identity 97-99% (เฉลี่ย 98.8%) โดยที่ทุกรหัสตัวอย่างเหมือนกับ *P. humanus capitis* (acc no. KC685851) ด้วยค่า % identity 99% ยกเว้นรหัสตัวอย่าง G001 และ G007 ที่ตรงกับ *P. humanus capitis* (acc no. KC685849) ด้วยค่า % identity 97% ในขณะที่ตัวอย่างจากจังหวัดมุกดาหารมีค่า % identity 97-99% (เฉลี่ย 98.6%) โดยตัวอย่างจากจังหวัดดังกล่าวเหมือนกับ *P. humanus capitis* (acc no. KC685849 และ KC685851) ด้วยค่า % identity 97% และ 99% ตามลำดับ ขณะที่ตัวอย่างจากจังหวัดเลยพบว่ามีค่า % identity 97-99% (เฉลี่ย 97.8%) มีความเหมือนกับ *P. humanus capitis* (acc no. KC685849 และ KC685851) ด้วยค่า % identity 97-98% และ 99% ตามลำดับ

ตัวอย่างจากภาคใต้พบว่ามีค่าเฉลี่ยของ % identity เฉลี่ยเท่ากับ 97.6% โดยที่ตัวอย่างจากจังหวัดพัทลุงมีค่า % identity 95-100% (เฉลี่ย 97.9%) มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ *P. humanus capitis* (acc no. KC685849, KC685851 และ EU493392) ด้วยค่า % identity 97%, 99% และ 97-99% ตามลำดับ ในขณะที่ตัวอย่างจากจังหวัดสงขลามีค่า % identity 96-99% (เฉลี่ย 97.4%) เหมือนกับ *P. humanus capitis* (acc no. KC685849 และ KC685851) ด้วยค่า % identity 96-97% และ 96-99% ตามลำดับ ส่วนตัวอย่างในจังหวัดนครศรีธรรมราชมีค่า % identity 95-100% (เฉลี่ย 97.9%) โดยมีความเหมือนตรงกับ *P. humanus capitis* (acc no. KC685849 และ KC685851) ด้วยค่า % identity 95-97% และ 99-100% ตามลำดับ

สำหรับตัวอย่างจากภาคตะวันตกมีค่าเฉลี่ยของ % identity เฉลี่ยเท่ากับ 98.8% จากตัวอย่างจังหวัดกาญจนบุรีมีค่า % identity 97-99% โดยมีเหมือนกับ *P. humanus capitis* (acc no. KC685849 และ KC685851) ด้วยค่า % identity 97% และ 99% ตามลำดับ และภาคตะวันออกมีค่าเฉลี่ยของ % identity เฉลี่ยเท่ากับ 98.8% จากตัวอย่างของจังหวัดระยองซึ่งมีค่า % identity 97-99% ซึ่งตัวอย่างทั้งหมดเหมือนกับ *P. humanus capitis* (acc no. KC685851) ด้วยค่า % identity 99% และ 99% และมีหนึ่งตัวอย่างคือรหัสตัวอย่าง R012 เหมือนกับ *P. humanus capitis* (acc no. KC685849) ด้วยค่า % identity 97 % (รายละเอียดในแต่ละตัวอย่างของแต่ละพื้นที่ซึ่งเปรียบเทียบความเหมือนกับฐานข้อมูล NCBI (GenBank) (แสดงในตารางที่ 19)

#### 4.6 ผลการขอขึ้นเลขทะเบียนของลำดับนิวคลีโอไทด์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในเหาศีรษะที่ได้จะทำการเตรียมข้อมูลเพื่อส่งลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อยื่นขอเลขทะเบียน (accession number) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละตัวอย่างโดยเข้าใช้แบบออนไลน์จากโปรแกรมออนไลน์ BankIt เพื่อเพิ่มข้อมูลและเผยแพร่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI จากตัวอย่างเหาศีรษะในประเทศไทยลงไปในฐานข้อมูล NCBI (GenBank) โดยงานวิจัยนี้ได้ทำการส่งตัวอย่างจำนวน 275 โคลนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของประชากรเหาศีรษะที่ได้ทำการศึกษาสำหรับผลการการยื่นขอเลขทะเบียน (accession number) คือ KP143232-KP143506 โดยเลขทะเบียนในแต่ละตัวอย่างโคลนแสดงในตารางที่ 19

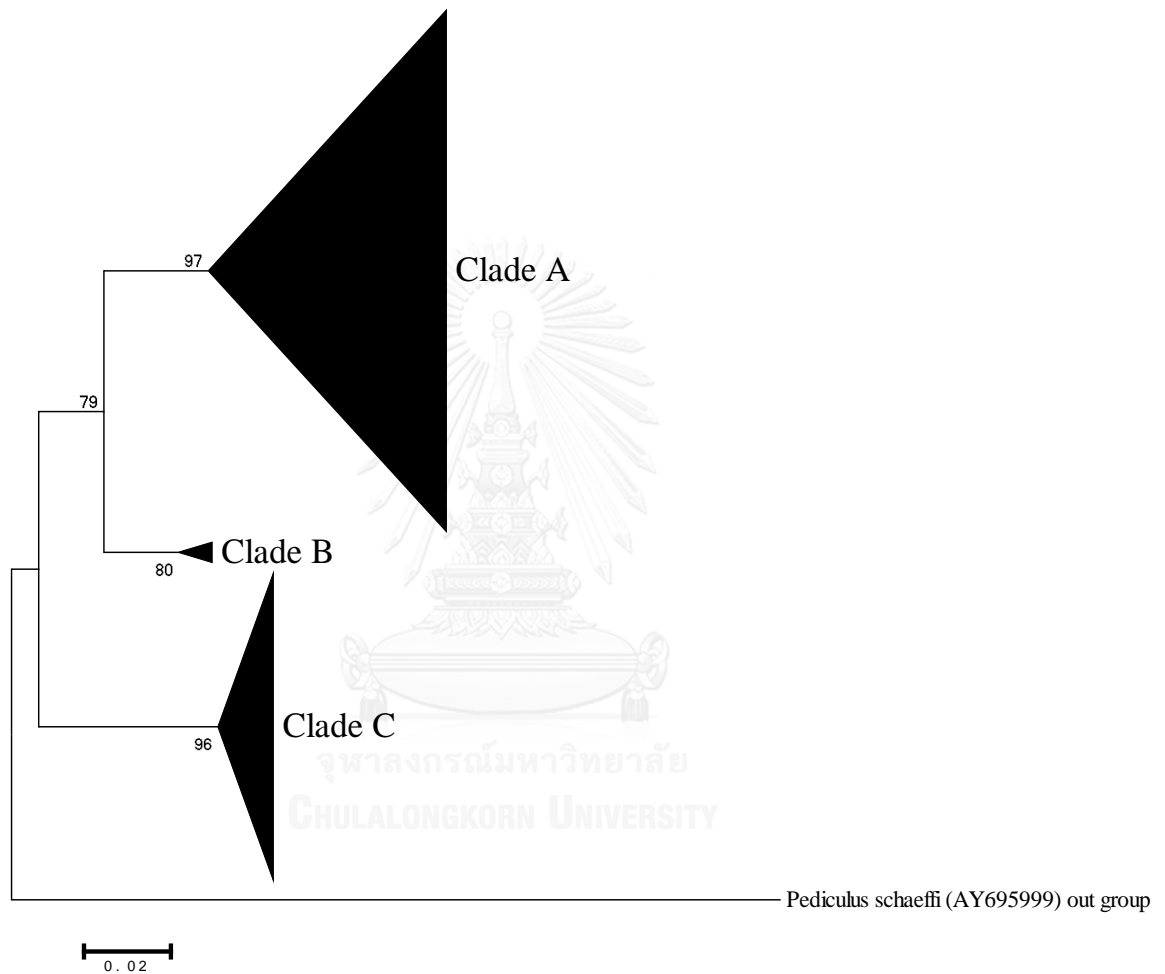
#### 4.7 ผลการสร้างและวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ

จากรายงานวิจัยต่างๆพบว่ายีนที่อยู่ในไมโทคอนเดรีย เช่น ยีน COI เมื่อนำมาสร้างเป็นแผนภูมิวิวัฒนาการแล้วนั้นสามารถแบ่งกลุ่มของเหาได้เป็น 3 clade คือ clade A, B และ C งานวิจัยนี้ได้ทำการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในตัวอย่างเหาศีรษะที่

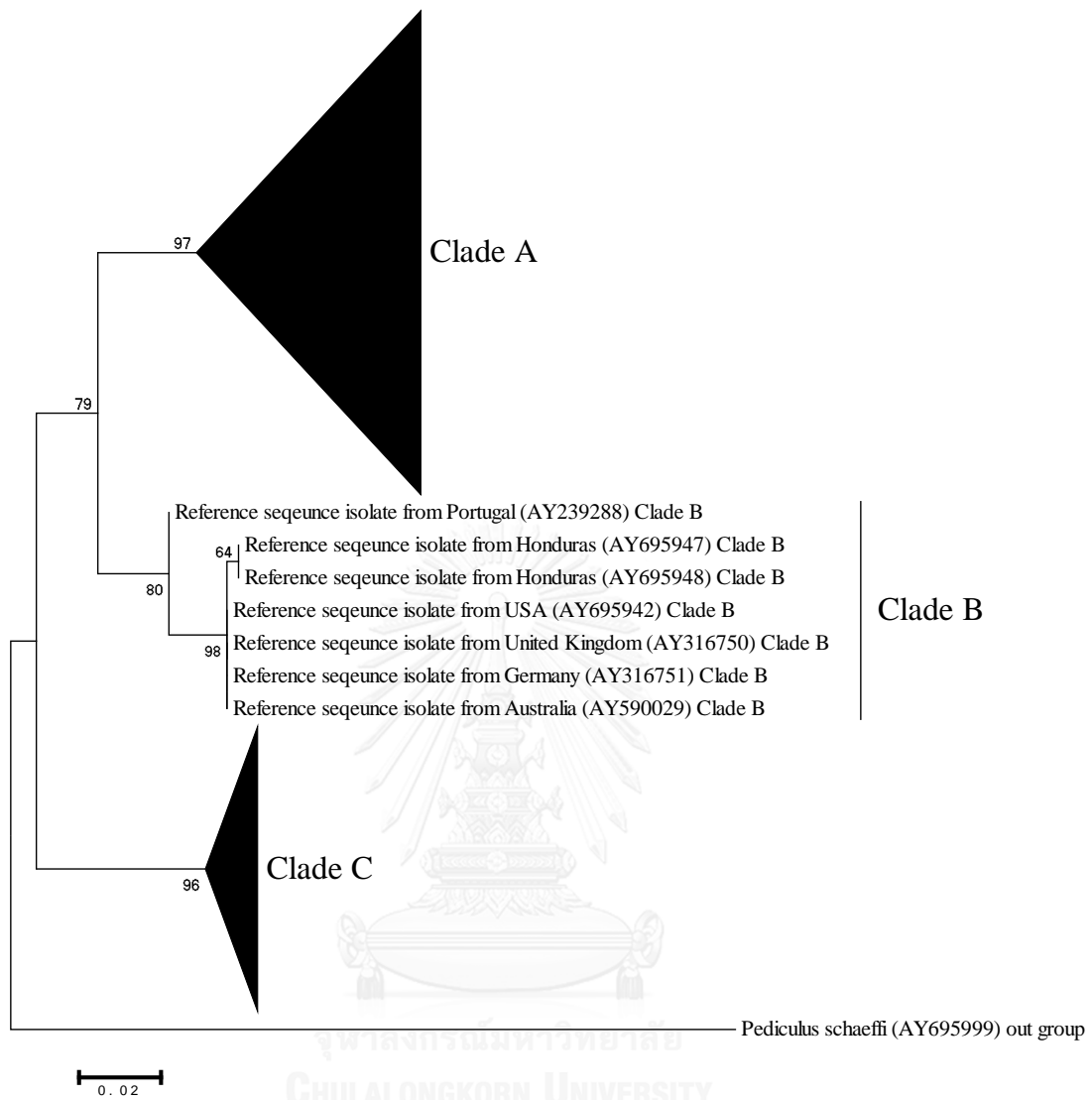
เก็บจากภูมิภาคต่างๆในประเทศไทยโดยทำการทดสอบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI (reference sequence) ที่ทราบ clade จากต่างประเทศที่มีรายงานในฐานข้อมูล NCBI โดยใช้โปรแกรม MEGA version 6 โดยวิธี Neighbor-joining method (NJ) และกำหนดแบบจำลองของการแทนที่ลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Kimura-2-parameter model เพื่อพิจารณาการแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide substitution) และตรวจความน่าเชื่อถือทางสถิติโดยใช้ bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ (24) และใช้ *Pediculus schaeffi* (เหาในลิงชิมแปนซี) accession no. AY695999 เป็น out group

ผลการวิเคราะห์และสร้างแผนภูมิต้นไม้พบว่า cladogram ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI จากตัวอย่างและเปรียบเทียบกับ reference sequence ที่ทราบ clade สามารถแยก clade ได้เป็น 3 clade อย่างชัดเจนโดยที่ clade A และ clade C แยกเป็น monophyly อย่างสมบูรณ์ด้วยค่า bootstrap test 97 และ 96% ตามลำดับ ในขณะที่ clade A และ clade B จัดเป็น monophyly ด้วยการที่อยู่ใน node เดียวกันด้วยค่า bootstrap test 79% (รูปที่ 25) จากการวิเคราะห์ cladogram ดังกล่าวนี้นี้ตัวอย่างที่ศึกษาในงานวิจัยทั้งหมดพบว่าถูกจัดอยู่ใน 2 clade คือ clade A และ clade C ซึ่งแบ่งเป็น clade อย่างชัดเจน โดยไม่พบตัวอย่างเหาศีรษะถูกจัดอยู่ใน clade B โดยมีเพียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ reference sequence เท่านั้นที่ถูกจัดอยู่ใน clade B (รูปที่ 26)





**รูปที่ 25** แสดง Phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของเหาที่ระยะที่เก็บจากประเทศไทย จากการใช้ Neighbor-joining method แบบ Kimura-2-parameter model โดยกำหนดค่า bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ



รูปที่ 26 แสดง Phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของเหาศีรษะจากการใช้ Neighbor-joining method แบบ Kimura-2-parameter model โดยกำหนดค่า bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ

จากการพิจารณาความสัมพันธ์แผนภูมิต้นไม้ของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยแยกตามภูมิภาคต่างๆ จาก cladogram ในรูปที่ 27 พบว่าตัวอย่างเหาศีรษะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือถูกแยกเป็น 2 clade ด้วยค่า bootstrap test 99% อย่างสมบูรณ์ โดยในแต่ละ clade มีการแยกเป็นกิ่งย่อย เช่น ในตัวอย่างรหัส M002 และ M007 จากจังหวัดเลยและตัวอย่างรหัส G005 และ G008 จากจังหวัดนครราชสีมาที่แยกเป็น paraphyly ด้วยค่า bootstrap test 99% และ 67% ตามลำดับ ทั้งนี้ยังพบว่าเหาศีรษะที่มาจากต่างจังหวัดกันถูกรวมเป็น clade อย่างสมบูรณ์ด้วยค่า bootstrap test 50-100%

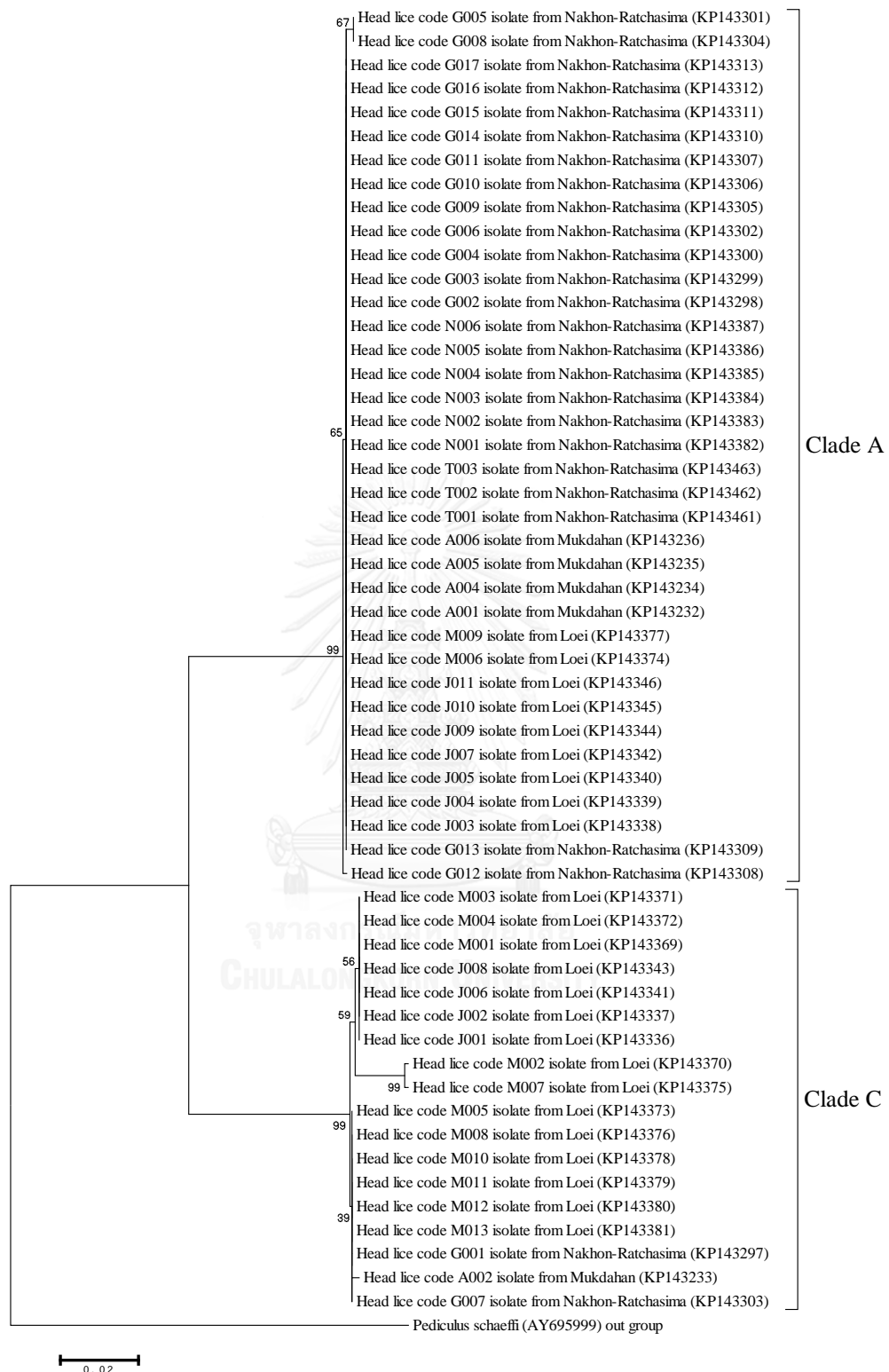
จาก cladogram ในรูปที่ 28 พบว่าตัวอย่างเหาศีรษะในภาคกลางถูกแยกเป็น 2 clade ด้วยค่า bootstrap test สูงถึง 100% โดยในแต่ละ clade มีการแยกเป็นกิ่งย่อย เช่น ในตัวอย่างรหัส KP601 และ KP602 และตัวอย่างรหัส KP202 และ KP304 จากจังหวัดนครปฐมที่แยกเป็น paraphyly ด้วยค่า bootstrap test 99% และ 100% ตามลำดับ ทั้งนี้ยังพบว่าเหาศีรษะที่มาจากต่างจังหวัดกันถูกรวมเป็น clade อย่างสมบูรณ์ด้วยค่า bootstrap test 57-100%

ความสัมพันธ์แผนภูมิต้นไม้ของลำดับนิวคลีโอไทด์จาก cladogram ในรูปที่ 29 พบว่าตัวอย่างเหาศีรษะในภาคเหนือถูกแยกเป็น 2 clade ด้วยค่า bootstrap test 99-100% อย่างสมบูรณ์ โดยในแต่ละ clade มีการแยกเป็นกิ่งย่อย เช่น ในตัวอย่างรหัส D006, D006 และ D007 จากจังหวัดน่านที่แยกเป็น paraphyly ด้วยค่า bootstrap test 65% และรหัสตัวอย่าง BA14 จากจังหวัดเชียงรายที่มีความสัมพันธ์แยกออกเป็นกิ่งเดี่ยวแต่ยังรวมอยู่ใน node เดียวกับตัวอย่างอื่นด้วยค่า bootstrap test 62% นอกจากนี้ยังพบว่าเหาศีรษะที่มาจากต่างจังหวัดกันถูกรวมเป็น clade อย่างสมบูรณ์ด้วยค่า bootstrap test 62-100%

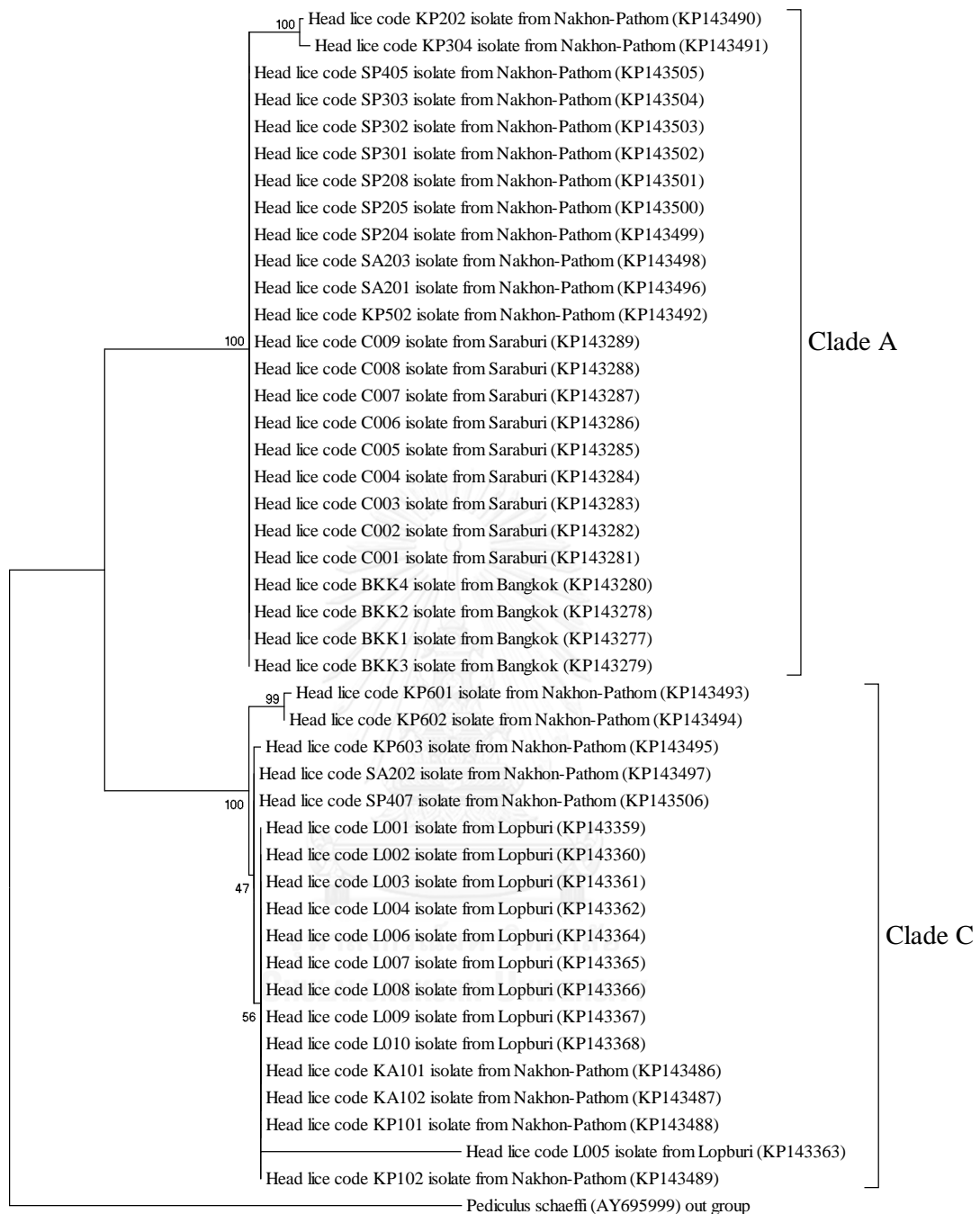
จาก cladogram ในรูปที่ 30 พบว่าตัวอย่างเหาศีรษะในภาคใต้ถูกแยกเป็น 2 clade ด้วยค่า bootstrap test 96% และ 99% อย่างสมบูรณ์ โดยในแต่ละ clade มีการแยกเป็นกิ่งย่อยเป็น paraphyly เช่น ในตัวอย่างรหัส W001, W004 และ W006 จากจังหวัดพัทลุงด้วยค่า bootstrap test 86% รหัสตัวอย่าง NK4 และ NK14 จากจังหวัดนครศรีธรรมราชด้วยค่า bootstrap test 100% และรหัสตัวอย่าง Q016, Q018 และตัวอย่าง Q013 และ Q014 จากจังหวัดเชียงรายด้วยค่า bootstrap test 99% และ 100% ตามลำดับ ซึ่งยังพบว่าเหาศีรษะที่มาจากต่างจังหวัดกันถูกรวมเป็น clade อย่างสมบูรณ์ด้วยค่า bootstrap test 63-99%

จากการพิจารณาความสัมพันธ์จาก cladogram ในรูปที่ 31 พบว่าตัวอย่างเหาศีรษะในภาคตะวันตกถูกแยกเป็น 2 clade ด้วยค่า bootstrap test สูงถึง 100% อย่างสมบูรณ์ โดยมีบางตัวอย่างจัดเป็น paraphyly แต่อยู่ใน clade เดียวกันด้วยค่า bootstrap test 64-100% ในขณะที่ cladogram ในรูปที่ 32 พบว่าตัวอย่างเหาศีรษะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือถูกแยกเป็น 2 clade โดยมีลักษณะเป็น monophyly ด้วยค่า bootstrap test สูงถึง 99% โดยมี 1 ตัวอย่างแยกออกมาจาก clade ที่ศึกษา

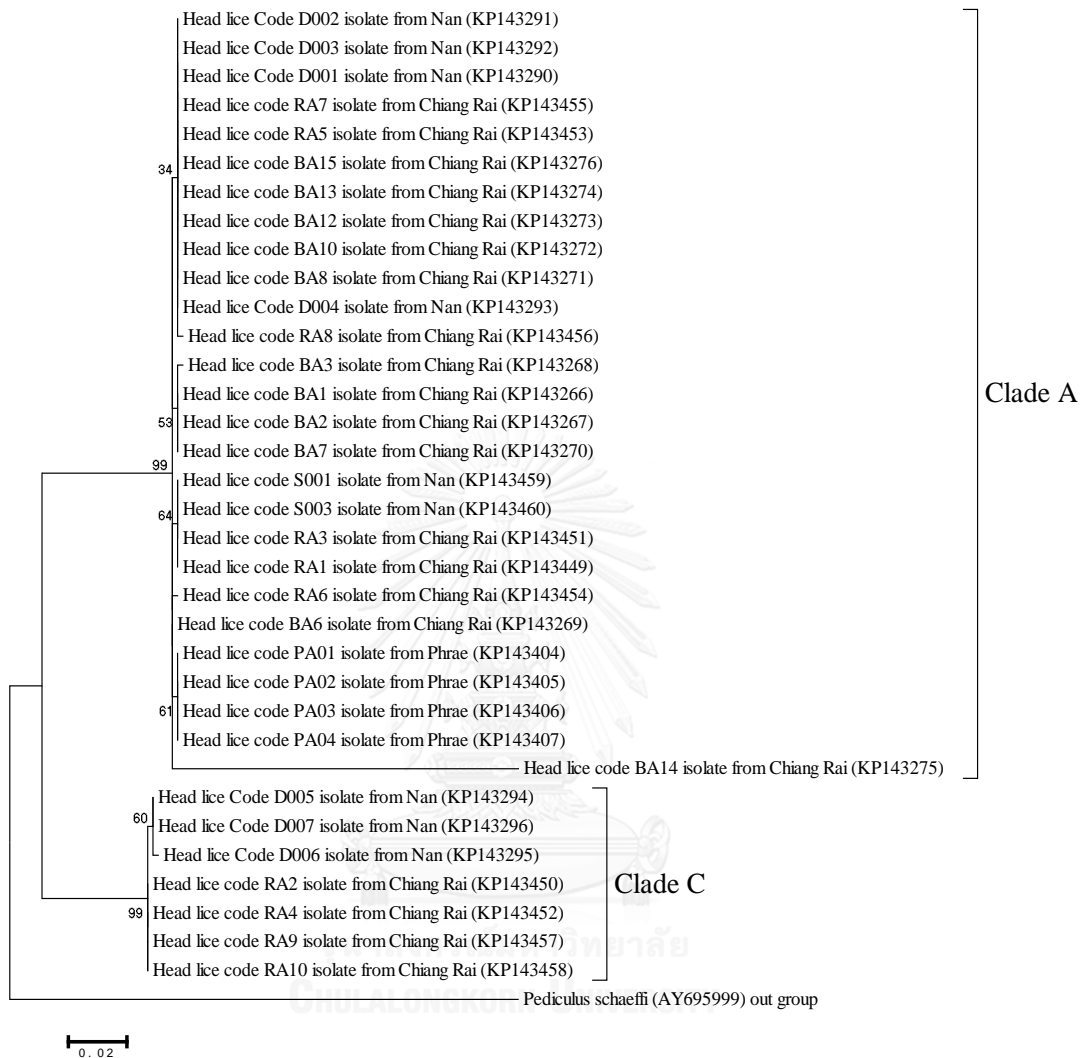




รูปที่ 27 แสดง Phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของเหาศีรษะที่เก็บจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จากการใช้ Neighbor-joining method แบบ Kimura-2-parameter model โดยกำหนดค่า bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ



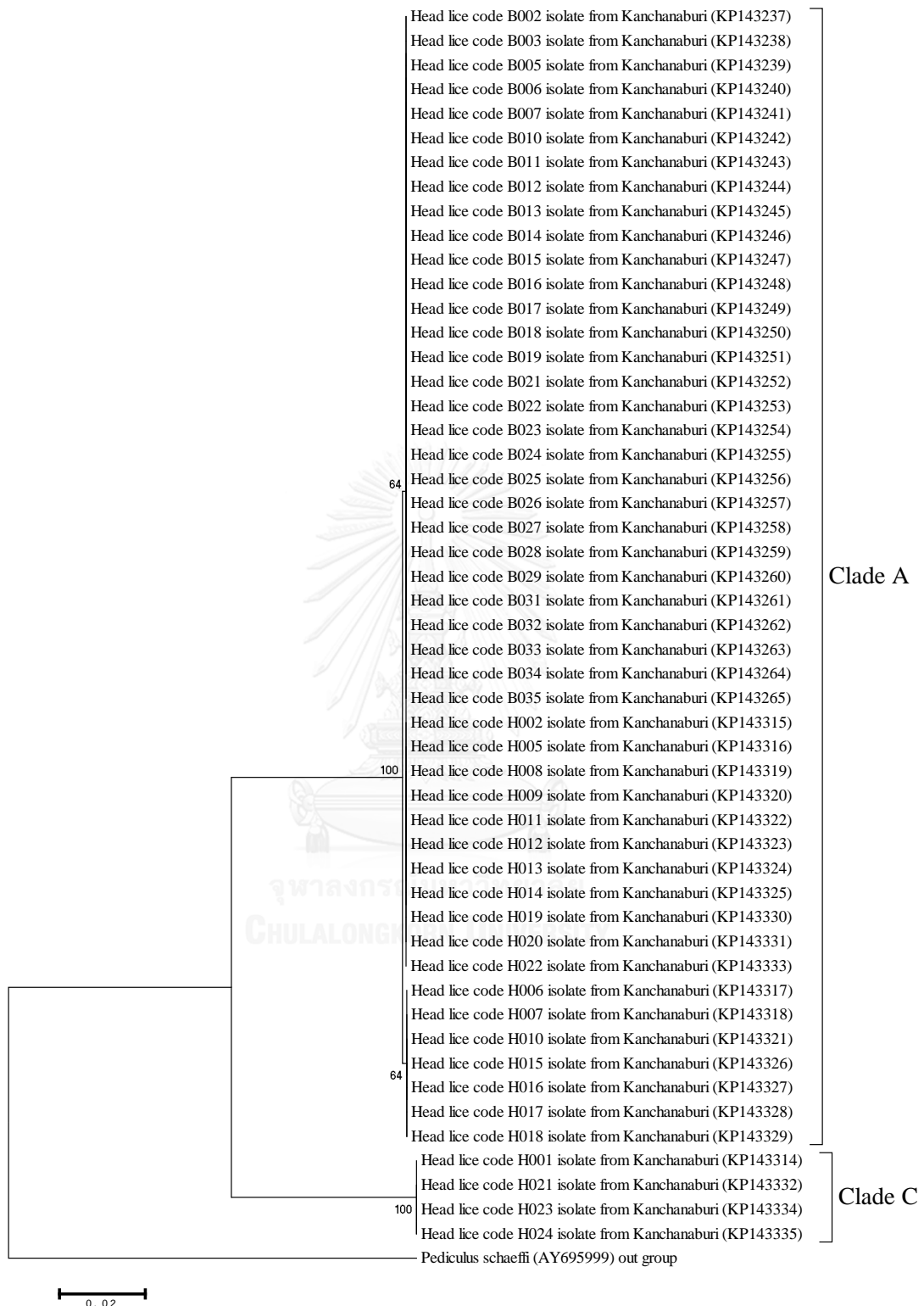
รูปที่ 28 แสดง Phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของเหาศีรษะที่เก็บจากภาคกลางโดยใช้ Neighbor-joining method แบบ Kimura-2-parameter model โดยกำหนดค่า bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ



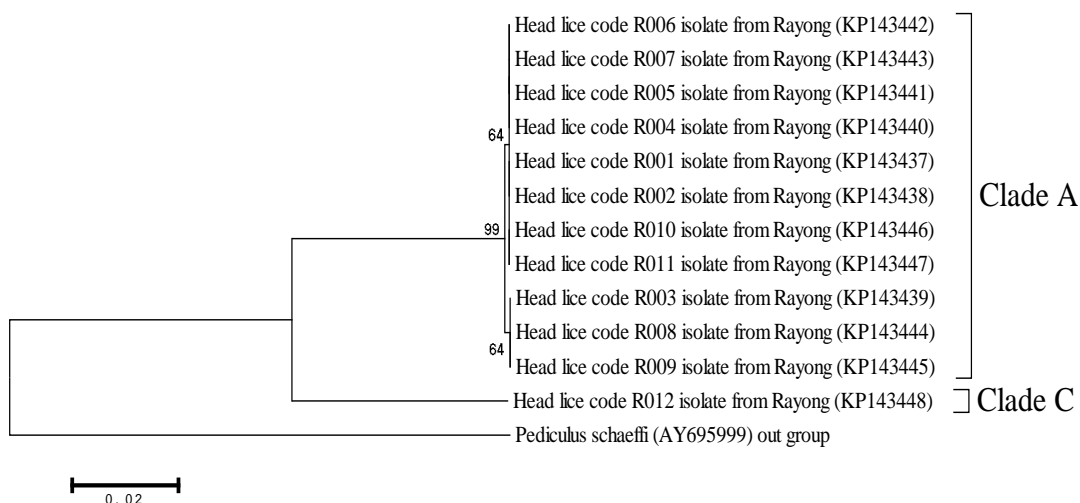
รูปที่ 29 แสดง Phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของเหาศีรษะที่เก็บจากภาคเหนือ จากการใช้ Neighbor-joining method แบบ Kimura-2-parameter model โดยกำหนดค่า bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ



รูปที่ 30 แสดง Phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของเหาศีรษะที่เก็บจากภาคใต้ ใช้ Neighbor-joining method แบบ Kimura-2-parameter model โดยกำหนดค่า bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ



รูปที่ 31 แสดง Phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของเหาศีรษะที่เก็บจากภาคตะวันตก ใช้ Neighbor-joining method แบบ Kimura-2-parameter model โดยกำหนดค่า bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ



รูปที่ 32 แสดง Phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของเหาศีรษะที่เก็บจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ใช้ Neighbor-joining method แบบ Kimura-2-parameter model โดยกำหนดค่า bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ

จังหวัด	จำนวนตัวอย่าง	Clade	
		A	C
น่าน	9	6	3
แพร่	4	4	0
เชียงราย	21	17	4
ลพบุรี	10	0	10
สระบุรี	9	9	0
กรุงเทพมหานคร	4	4	0
นครปฐม	21	12	9
นครราชสีมา	26	24	2
มุกดาหาร	5	4	1
เลย	24	9	15
สงขลา	24	15	9
นครศรีธรรมราช	30	15	15
พัทลุง	25	16	9
กาญจนบุรี	51	47	4
ระยอง	12	11	1
รวม	275	193	82

ตารางที่ 14 แสดงการจัดจำแนกเหาศีรษะในแต่ละจังหวัดแยกตาม clade จากยีน COI

จากตารางที่ 14 ผลการศึกษาจากแผนภูมิวิวัฒนาการและจัดจำแนกเหาศีรษะจากยีน COI แยกตามจังหวัดต่างๆ โดยพบว่าเหาศีรษะจากจังหวัดต่างๆทั้งหมด 275 ตัวอย่าง ส่วนใหญ่จัดอยู่ใน clade A จำนวนทั้งหมด 193 ตัวอย่าง และจัดอยู่ clade C จำนวน 82 ตัวอย่างโดยไม่พบเหาจากจังหวัดต่างๆที่จัดอยู่ใน clade B

#### 4.8 ผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์

การวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์ (intraspecific variation) โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละตัวอย่างมาทำการเปรียบเทียบ (alignment) ด้วยโปรแกรม clustal W ที่มีอยู่ในโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor Program Version 7.1.9 จากนั้นทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์ (intraspecific variation) โดยเลือกโหมด sequence identity matrix ที่มีอยู่ในโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor Program Version 7.1.9 (แสดงตัวอย่างผลการคำนวณบางส่วนที่ตารางที่ 15 และตารางที่ 16)

ผลการคำนวณเปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์เมื่อแยกตามภูมิภาคต่างๆในประเทศไทย พบว่าเปอร์เซ็นต์ intraspecific variation ของตัวอย่างในภาคเหนือ เท่ากับ 0-17% โดยที่ตัวอย่างในจังหวัดเชียงรายและจังหวัดน่านค่าเปอร์เซ็นต์ intraspecific variation เท่ากับ 0-16.9% และ 0-8% ตามลำดับ ขณะที่จังหวัดแพร่ไม่มีความแตกต่างกันภายในสายพันธุ์ (intraspecific variation เท่ากับ 0%) สำหรับเปอร์เซ็นต์ intraspecific variation ของตัวอย่างในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบว่าเปอร์เซ็นต์ intraspecific variation เท่ากับ 0-9.7% โดยที่ตัวอย่างในจังหวัดนครราชสีมา จังหวัดมุกดาหารและจังหวัดเลย เปอร์เซ็นต์ intraspecific variation เท่ากับ 0-7.8%, 0-7.8% และ 0-9.6% ตามลำดับ

ในขณะที่ตัวอย่างจากภาคกลาง พบว่าเปอร์เซ็นต์ intraspecific variation เท่ากับ 0-14.2% โดยที่ตัวอย่างจากจังหวัดสระบุรี จังหวัดลพบุรี และจังหวัดนครปฐม เปอร์เซ็นต์ intraspecific variation เท่ากับ 0-0.6%, 0-5.3% และ 0-10.3% ตามลำดับ ซึ่งพบว่าตัวอย่างจากกรุงเทพมหานครไม่มีความแตกต่างกันภายในสายพันธุ์ (intraspecific variation เท่ากับ 0%)

สำหรับตัวอย่างจากภาคใต้ พบว่าเปอร์เซ็นต์ intraspecific variation เท่ากับ 0-13.3% โดยที่ตัวอย่างจากจังหวัดพัทลุง จังหวัดสงขลา และจังหวัดนครศรีธรรมราช เปอร์เซ็นต์ intraspecific variation เท่ากับ 0-7.8%, 0-11.4% และ 0-11.1% ตามลำดับ ในขณะที่ตัวอย่างจากภาคตะวันตก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีเพียงภาคละหนึ่งจังหวัดคือจังหวัดกาญจนบุรีและจังหวัดระยองโดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ intraspecific variation เท่ากับ 0-7.8% และ 0-7.6% ตามลำดับ

Code	BA1	BA2	BA3	BA6	BA7	BA8	BA10	BA12	BA13	BA14	BA15	RA1	RA2	RA3	RA4	RA5	RA6	RA7	RA8	RA9	RA10	
BA1	-																					
BA2	0	-																				
BA3	0.2	0.2	-																			
BA6	0.2	0.2	0.4	-																		
BA7	0	0	0.2	0.2	-																	
BA8	0.4	0.4	0.2	0.2	0.4	-																
BA10	0.4	0.4	0.2	0.2	0.4	0	-															
BA12	0.4	0.4	0.2	0.2	0.4	0	0	-														
BA15	0.4	0.4	0.2	0.2	0.4	0	0	0	-													
BA14	10.2	10.2	0.9	0.9	10.2	9.8	9.8	9.8	9.8	-												
BA15	0.4	0.4	0.2	0.2	0.4	0	0	0	0	9.8	-											
RA1	0.4	0.4	0.6	0.2	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	10.2	0.4	-										
RA2	7.6	7.6	7.8	7.5	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	16.9	7.6	7.6	-									
RA3	0.4	0.4	0.6	0.2	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	10.2	0.4	0	7.6	-								
RA4	7.6	7.6	7.8	7.5	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	16.9	7.6	7.6	0	7.6	-							
RA5	0.4	0.4	0.2	0.2	0.4	0	0	0	0	9.8	0	0.4	7.6	7.6	7.6	-						
RA6	0.4	0.4	0.6	0.2	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	10.2	0.4	0.4	7.3	0.4	7.3	0.4	-					
RA7	0.4	0.4	0.2	0.2	0.4	0	0	0	0	9.8	0	0.4	7.6	0.4	7.6	0	0.4	-				
RA8	0.6	0.6	0.4	0.4	0.6	0.2	0.2	0.2	0.2	10	0.2	0.6	7.5	0.6	7.5	0.2	0.6	0.2	-			
RA9	7.6	7.6	7.8	7.5	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	16.9	7.6	7.6	0	7.6	0	7.6	7.3	7.6	7.5	-		
RA10	7.6	7.6	7.8	7.5	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	16.9	7.6	7.6	0	7.6	0	7.6	7.3	7.6	7.5	0	-	

ตารางที่ 15 แสดงตัวอย่างค่า % intraspecific variation ในจังหวัดเชียงราย จากการทำ sequence identity matrix (แสดงผลบางส่วน)



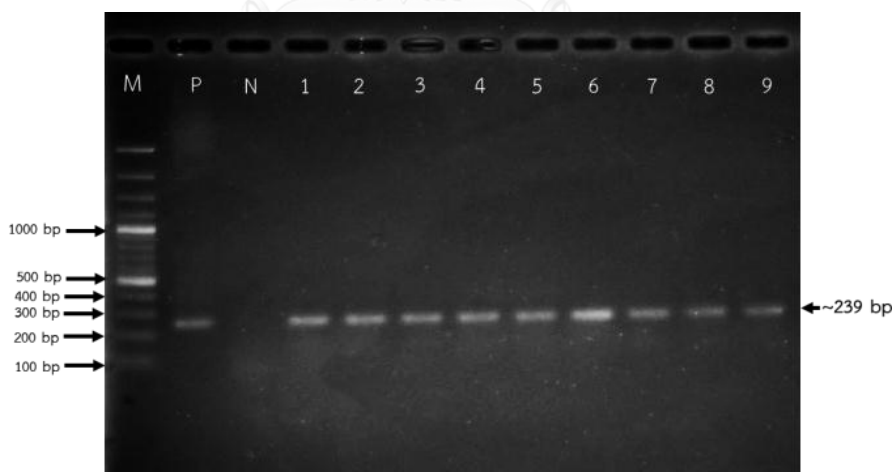
Code	SA201	SA202	SA203	SP204	SP205	SP208	SP301	SP302	SP303	SP405	SP407	KA101	KA102	KP101	KP102	KP202	KP304	KP502	KP601	KP602	KP603	
SA201	-																					
SA202	7.5	-																				
SA203	0	7.5	-																			
SP204	0	7.5	0	-																		
SP205	0	7.5	0	0	-																	
SP208	0	7.5	0	0	0	-																
SP301	0	7.5	0	0	0	0	-															
SP302	0	7.5	0	0	0	0	0	-														
SP303	0	7.5	0	0	0	0	0	0	-													
SP405	0	7.5	0	0	0	0	0	0	0	-												
SP407	7.5	0	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	-											
KA101	7.6	0.2	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	0.2	-										
KA102	7.6	0.2	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	0.2	0	-									
KP101	7.6	0.2	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	0.2	0	0	-								
KP102	7.6	0.2	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	0.2	0	0	0	-							
KP202	2.2	9.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	9.4	9.4	9.4	9.4	-						
KP304	2.4	9.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	9.4	9.6	9.6	9.6	9.6	9.6	-					
KP502	0	7.5	0	0	0	0	0	0	0	0	7.5	7.6	7.6	7.6	7.6	2.2	2.4	-				
KP601	9.3	2.8	9.3	9.3	9.3	9.3	9.3	9.3	9.3	9.3	9.3	2.9	2.9	2.9	2.9	10.6	11	9.3	-			
KP602	8.9	2.2	8.9	8.9	8.9	8.9	8.9	8.9	8.9	8.9	2.2	2.4	2.4	2.4	2.4	10.8	11	8.9	1.3	-		
KP603	7.6	0.2	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	0.2	0.4	0.4	0.4	0.4	9.4	9.6	7.6	2.6	2	-	

ตารางที่ 16 แสดงตัวอย่างค่า % intraspecific variation ในจังหวัดนครปฐม จากการทำ sequence identity matrix (แสดงผลบางส่วน)

#### 4.9 ผลการตรวจหาเชื้อ *Bartonella* spp. และเชื้อ *Acinetobacter* spp. ในตัวอย่างดีเอ็นเอเหาศีรษะ

ตัวอย่างดีเอ็นเอของเหาศีรษะทั้งหมด 275 ตัวอย่างได้นำมาตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย โดยเทคนิค PCR สำหรับเชื้อ *Bartonella* spp. ใช้คู่ primer BhCS (gltA) 781-F (5' GGGGACCAGCTCATGGTGG 3') และ BhCS (gltA) 1137-R (5'AATGCAAAAAGAAGTAAACA 3') อ้างอิงจากการศึกษาของ Norman และคณะ โดยขนาดของ PCR product จะมีขนาด 379 bp และตรวจหาเชื้อ *Acinetobacter* spp. โดยใช้ primer rpoB-F (5'TACTCATATACCGAAAAGAAACGG3') และ rpoB-R (5'GGYTTACCAAGRCTATACTCAAC 3') อ้างอิงจากการศึกษาของ Kempf และคณะ (47) หลังจากนั้นทำการตรวจสอบขนาดของ PCR product โดยการทำให้ 1.5 % agarose gel electrophoresis โดยให้เคลื่อนที่ภายใต้ความศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำแผ่นเจลที่ได้แล้วไปย้อมด้วย ethidium bromide ก่อนนำไปส่องภายใต้แสง UV

ผลการตรวจหาเชื้อด้วยวิธี PCR พบว่าไม่สามารถตรวจพบเชื้อ *Bartonella* spp. ในตัวอย่างดีเอ็นเอของเหาศีรษะแต่สามารถตรวจพบเชื้อ *Acinetobacter* spp. ในตัวอย่างเหาศีรษะทั้งหมด 10 ตัวอย่างและจากการตรวจสอบการโดยวิธี gel electrophoresis จะเห็น PCR product ของยีน *rpoB* ของเชื้อ *Acinetobacter* spp. ที่มีขนาดประมาณ 239 bp โดยเปรียบเทียบขนาดของยีน *rpoB* กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp (รูปที่ 33)



**รูปที่ 33** แสดงผล gel electrophoresis ของยีน *rpoB* ของเชื้อ *Acinetobacter* spp. ที่ตรวจพบในดีเอ็นเอเหาศีรษะภายใต้ความศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง Lane M คือ ดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 bp, Lane P คือ Positive control Lane N คือ Negative control (ใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์แทนดีเอ็นเอต้นแบบ), Lane 1-9 คือ PCR product ของยีน *rpoB* ของเชื้อ *Acinetobacter* spp. ในตัวอย่างดีเอ็นเอเหาศีรษะ (แสดงผลบางส่วน)

จากตารางที่ 17 แสดงผลการตรวจพบเชื้อ *Acinetobacter* spp. ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer ที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งยีน *rpoB* ซึ่งเป็น housekeeping gene ในเชื้อ *Acinetobacter* spp. พบว่าจากตัวอย่างดีเอ็นเอของเหตัสรีระทั้งหมด 275 ตัวอย่างที่ได้ทำการสกัดดีเอ็นเอแล้วจากภูมิภาคต่างๆของประเทศไทยให้ผล PCR positive ต่อตำแหน่งยีน *rpoB* ของเชื้อ *Acinetobacter* spp. ทั้งหมด 10 ตัวอย่าง (คิดเป็น 3.6%) โดยที่ภาคเหนือจากตัวอย่างทั้งหมด 34 ตัวอย่างให้ผล PCR positive ทั้งหมด 3 ตัวอย่าง (คิดเป็น 8.8%) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตัวอย่างทั้งหมด 55 ตัวอย่าง ให้ผล PCR positive ทั้งหมด 2 ตัวอย่าง (คิดเป็น 3.6%) ในขณะที่ภาคกลางตัวอย่างทั้งหมด 44 ตัวอย่างแต่ตรวจไม่พบเชื้อ *Acinetobacter* spp. ด้วยวิธี PCR ในตัวอย่างทั้งหมด ส่วนภาคใต้ตัวอย่างทั้งหมด 79 ตัวอย่าง ให้ผล PCR positive ทั้งหมด 3 ตัวอย่าง (คิดเป็น 3.7%) โดยที่ภาคตะวันตกตัวอย่างทั้งหมด 51 ตัวอย่างให้ผล PCR positive เพียง 1 ตัวอย่าง (คิดเป็น 1.9%) และภาคตะวันออกมีตัวอย่างทั้งหมด 12 ตัวอย่างให้ผล PCR positive 1 ตัวอย่าง (คิดเป็น 8.3%)

**ตารางที่ 17** แสดงผลการตรวจหาเชื้อ *Acinetobacter* spp. ด้วยเทคนิค PCR จากตัวอย่างดีเอ็นเอของเหตัสรีระที่เก็บจากภูมิภาคต่างๆในประเทศไทย

ภูมิภาค	จำนวนตัวอย่าง เหา	PCR positive	% การติดเชื้อ	
			ภูมิภาค	ประเทศ
ภาคเหนือ	34	3	8.8	1.09
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	55	2	3.6	0.72
ภาคกลาง	44	0	0.0	0.00
ภาคใต้	79	3	3.7	1.09
ภาคตะวันตก	51	1	1.9	0.36
ภาคตะวันออก	12	1	8.3	0.36
รวม	275	10	-	3.6

#### 4.10 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoB* ในเชื้อ *Acinetobacter* spp.

ผลจากการตรวจโคลนที่มีชิ้นส่วนยีน *rpoB* ของเชื้อ *Acinetobacter* spp. ด้วยเทคนิค colony PCR จากนั้นนำไปสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอก่อนนำส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท AIT biotech ประเทศสิงคโปร์ เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากการทำ sequencing จากนั้นทำการวิเคราะห์เส้นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ด้วยการปรับปรุงเส้นลำดับนิวคลีโอไทด์ เนื่องจากตัวอย่างที่ส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นพลาสมิดดีเอ็นเอ ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะมีบางส่วนของพลาสมิดเวกเตอร์ติดบริเวณหัวและท้ายของเส้น insert gene เราจึงทำการตัดส่วนของเวกเตอร์ออกโดยวิเคราะห์จาก

โปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor Program Version 7.1.9 จากนั้นเก็บข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ลงในโปรแกรม notepad จากผลการวิเคราะห์และปรับปรุงเส้นลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วพบว่าเส้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoB* ในเชื้อ *Acinetobacter* spp. มีความยาว 239 bp ทุกตัวอย่าง โดยแสดงการทำ multiple sequence alignment ทั้ง 10 ตัวอย่างในรูปที่ 34

```

*      20      *      40      *      60      *      80      *      100     *      120
AcG13 : TACTCATATACCGAAAAGAAACGGATCCGTAAGAATTTGGTAAATTCGCCCAAGATGGAGGACCCGTACTTATTCGATTCAAGTCGATTCGTACAGACATTCCTTCAAGATGG : 119
AcPT10 : TACTCATATACCGAAAAGAAACGGATCCGTAAGAATTTGGTAAATTCGCCCAAGATGGAGGACCCGTACTTATTCGATTCAAGTCGATTCGTACAGACATTCCTTCAAGATGG : 119
AcG14 : TACTCATATACCGAAAAGAAACGGATCCGTAAGAATTTGGTAAATTCGCCCAAGATGGAGGACCCGTACTTATTCGATTCAAGTCGATTCGTACAGACATTCCTTCAAGATGG : 119
AcD6 : TACTCATATACCGAAAAGAAACGGATCCGTAAGAATTTGGTAAATTCGCCCAAGATGGAGGACCCGTACTTATTCGATTCAAGTCGATTCGTACAGACATTCCTTCAAGATGG : 119
AcW5 : TACTCATATACCGAAAAGAAACGGATCCGTAAGAATTTGGTAAATTCGCCCAAGATGGAGGACCCGTACTTATTCGATTCAAGTCGATTCGTACAGACATTCCTTCAAGATGG : 119
AcB5 : TACTCATATACCGAAAAGAAACGGATCCGTAAGAATTTGGTAAATTCGCCCAAGATGGAGGACCCGTACTTATTCGATTCAAGTCGATTCGTACAGACATTCCTTCAAGATGG : 119
AcNK16 : TACTCATATACCGAAAAGAAACGGATCCGTAAGAATTTGGTAAATTCGCCCAAGATGGAGGACCCGTACTTATTCGATTCAAGTCGATTCGTACAGACATTCCTTCAAGATGG : 119
AcR1 : TACTCATATACCGAAAAGAAACGGATCCGTAAGAATTTGGTAAATTCGCCCAAGATGGAGGACCCGTACTTATTCGATTCAAGTCGATTCGTACAGACATTCCTTCAAGATGG : 119
AcPA3 : TACTCATATACCGAAAAGAAACGGATCCGTAAGAATTTGGTAAATTCGCCCAAGATGGAGGACCCGTACTTATTCGATTCAAGTCGATTCGTACAGACATTCCTTCAAGATGG : 119
AcS3 : TACTCATATACCGAAAAGAAACGGATCCGTAAGAATTTGGTAAATTCGCCCAAGATGGAGGACCCGTACTTATTCGATTCAAGTCGATTCGTACAGACATTCCTTCAAGATGG : 119
TACTCATATACCGAAAAGAAACGGATCCGTAAGAATTTGGTAAATTCGCCCAAGATGGAGGACCCGTACTTATTCGATTCAAGTCGATTCGTACAGACATTCCTTCAAGATGG

0      *      140     *      160     *      180     *      200     *      220     *
AcG13 : CAAATCCCAAAAAACCCGGAAGATATCGGTCCTCCAAGCCGCAATTCGTTTCAGTTTTTCCTATGAAAAGTTATTCGGCAATGCTGCTTTAGAATTTGTTGAGTATAGCTTGGTATAGC : 238
AcPT10 : CAAATCCCAAAAAACCCGGAAGATATCGGTCCTCCAAGCCGCAATTCGTTTCAGTTTTTCCTATGAAAAGTTATTCGGCAATGCTGCTTTAGAATTTGTTGAGTATAGCTTGGTATAGC : 238
AcG14 : CAAATCCCAAAAAACCCGGAAGATATCGGTCCTCCAAGCCGCAATTCGTTTCAGTTTTTCCTATGAAAAGTTATTCGGCAATGCTGCTTTAGAATTTGTTGAGTATAGCTTGGTATAGC : 238
AcD6 : CAAATCCCAAAAAACCCGGAAGATATCGGTCCTCCAAGCCGCAATTCGTTTCAGTTTTTCCTATGAAAAGTTATTCGGCAATGCTGCTTTAGAATTTGTTGAGTATAGCTTGGTATAGC : 238
AcW5 : CAAATCCCAAAAAACCCGGAAGATATCGGTCCTCCAAGCCGCAATTCGTTTCAGTTTTTCCTATGAAAAGTTATTCGGCAATGCTGCTTTAGAATTTGTTGAGTATAGCTTGGTATAGC : 238
AcB5 : CAAATCCCAAAAAACCCGGAAGATATCGGTCCTCCAAGCCGCAATTCGTTTCAGTTTTTCCTATGAAAAGTTATTCGGCAATGCTGCTTTAGAATTTGTTGAGTATAGCTTGGTATAGC : 238
AcNK16 : CAAATCCCAAAAAACCCGGAAGATATCGGTCCTCCAAGCCGCAATTCGTTTCAGTTTTTCCTATGAAAAGTTATTCGGCAATGCTGCTTTAGAATTTGTTGAGTATAGCTTGGTATAGC : 238
AcR1 : CAAATCCCAAAAAACCCGGAAGATATCGGTCCTCCAAGCCGCAATTCGTTTCAGTTTTTCCTATGAAAAGTTATTCGGCAATGCTGCTTTAGAATTTGTTGAGTATAGCTTGGTATAGC : 238
AcPA3 : CAAATCCCAAAAAACCCGGAAGATATCGGTCCTCCAAGCCGCAATTCGTTTCAGTTTTTCCTATGAAAAGTTATTCGGCAATGCTGCTTTAGAATTTGTTGAGTATAGCTTGGTATAGC : 238
AcS3 : CAAATCCCAAAAAACCCGGAAGATATCGGTCCTCCAAGCCGCAATTCGTTTCAGTTTTTCCTATGAAAAGTTATTCGGCAATGCTGCTTTAGAATTTGTTGAGTATAGCTTGGTATAGC : 238
CAAACCAAAAAACCCGGAAGATATCGGTCCTCCAAGCCGCAATTCGTTTCAGTTTTTCCTATGAAAAGTTATTCGGCAATGCTGCTTTAGAATTTGTTGAGTATAGCTTGGTATAGC

AcG13 : : 239
AcPT10 : : 239
AcG14 : : 239
AcD6 : : 239
AcW5 : : 239
AcB5 : : 239
AcNK16 : : 239
AcR1 : : 239
AcPA3 : : 239
AcS3 : : 239
c

```

รูปที่ 34 แสดงผล multiple sequence alignment จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoB* ของเชื้อ *Acinetobacter* spp. ที่แยกได้จากติเอ็นเอของเหาศีรษะ รหัสตัวอย่าง AcG13 คือ *A. baumannii*, รหัสตัวอย่าง AcPT10 คือ *A. baumannii*, รหัสตัวอย่าง AcG14 คือ *A. baumannii*, รหัสตัวอย่าง AcD6 คือ *A. baumannii*, รหัสตัวอย่าง AcB5 คือ *A. radioresistens*, รหัสตัวอย่าง AcW5 คือ *A. radioresistens*, รหัสตัวอย่าง AcR1 คือ *A. radioresistens*, รหัสตัวอย่าง AcNK16 คือ *A. radioresistens*, รหัสตัวอย่าง AcPA3 คือ *A. schindleri*, รหัสตัวอย่าง AcS3 คือ *A. schindleri*

#### 4.11 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoB* ในเชื้อ *Acinetobacter* spp. กับฐานข้อมูล NCBI และการระบุ species ของเชื้อ *Acinetobacter* spp.

จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoB* ของ *Acinetobacter* spp. ที่ได้ทำการตัดแต่งเรียบร้อยแล้วจะนำมาเปรียบเทียบความเหมือนหรือความคล้ายคลึงกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoB* ของ *Acinetobacter* spp. อื่นๆที่มีการเก็บสะสมอยู่ในฐานข้อมูล NCBI (GenBank) โดยใช้โปรแกรมออนไลน์ nucleotide blast (BLASTN) โดยจะแสดงค่าออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ความเหมือนและความคล้ายคลึง (percentage identity) พบว่าตัวอย่างรหัส AcD6, AcG13, AcG14 และ AcPT10 มีค่า % identity เท่ากับ 100% ตรงกับเชื้อ *A. baumannii* (acc no. AP014649) โดยที่ตัวอย่างรหัส AcNK16 และ AcR1 มีค่า % identity 99% เหมือนกับเชื้อ *A. radioresistens* (acc no. DQ207489) ในขณะที่ตัวอย่างรหัส AcPA3 และ AcS3 มีค่า % identity 98% เหมือนกับเชื้อ *A. radioresistens* (acc no. DQ207489) และตัวอย่างรหัส AcW5 และ AcB5 มีค่า % identity 99% เหมือนกับเชื้อ *A. schindleri* (acc no. DQ207490)

ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoB* ของ *Acinetobacter* spp. โดยในการศึกษานี้สามารถแยกเชื้อ *Acinetobacter* ได้เป็น 3 species คือ *A. baumannii*, *A. radioresistens* และ *A. schindleri* โดยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะทำการเตรียมข้อมูลเพื่อส่งยื่นขอเลขทะเบียน (accession number) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละตัวอย่างโดยเข้าใช้แบบออนไลน์จากโปรแกรมออนไลน์ BankIt เพื่อเพิ่มข้อมูลและเผยแพร่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoB* ในเชื้อ *Acinetobacter* จากตัวอย่างดีเอ็นเอของมหาศรีษะในประเทศไทยลงไปในฐานข้อมูล NCBI (GenBank) สำหรับผลการยื่นขอเลขทะเบียน (accession number) คือ KP161045-KP161054 โดยเลขทะเบียนในแต่ละตัวอย่างแสดงในตารางที่ 18

ตารางที่ 18 แสดงผล percentage identity เลขทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์ การระบุ species ของเชื้อ *Acinetobacter* และเลขทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลอ้างอิง

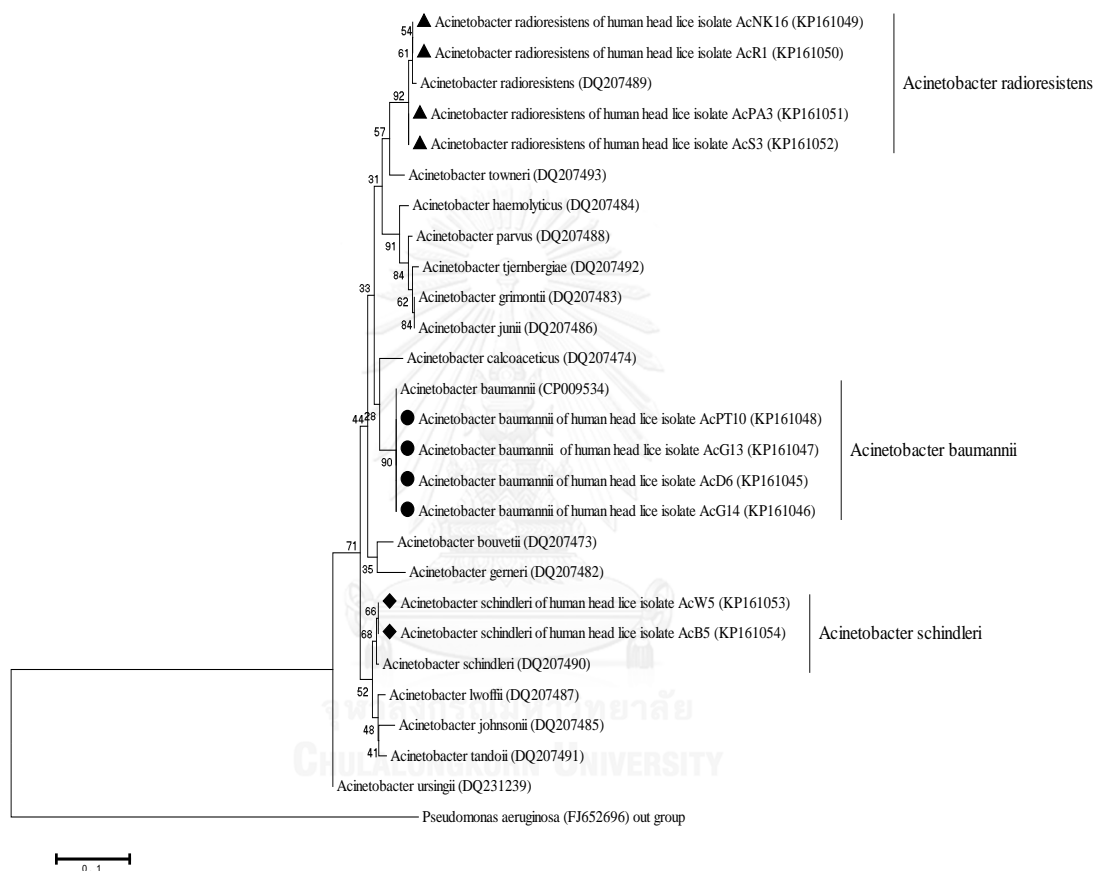
รหัสตัวอย่าง	จังหวัด	Acc no.	% identity	Species	ฐานข้อมูลอ้างอิง
AcD6	น่าน	KP161045	100	<i>A. baumannii</i>	AP014649
AcG14	นครราชสีมา	KP161046	100	<i>A. baumannii</i>	AP014649
AcG13	นครราชสีมา	KP161047	100	<i>A. baumannii</i>	AP014649
AcPT10	พัทลุง	KP161048	100	<i>A. baumannii</i>	AP014649
AcNK16	นครศรีธรรมราช	KP161049	99	<i>A. radioresistens</i>	DQ207489
AcR1	ระยอง	KP161050	99	<i>A. radioresistens</i>	DQ207489
AcPA3	แพร่	KP161051	98	<i>A. radioresistens</i>	DQ207489
AcS3	น่าน	KP161052	98	<i>A. radioresistens</i>	DQ207489
AcW5	พัทลุง	KP161053	99	<i>A. schindleri</i>	DQ207490
AcB5	กาญจนบุรี	KP161054	99	<i>A. schindleri</i>	DQ207490

#### 4.12 ผลการสร้างและวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ

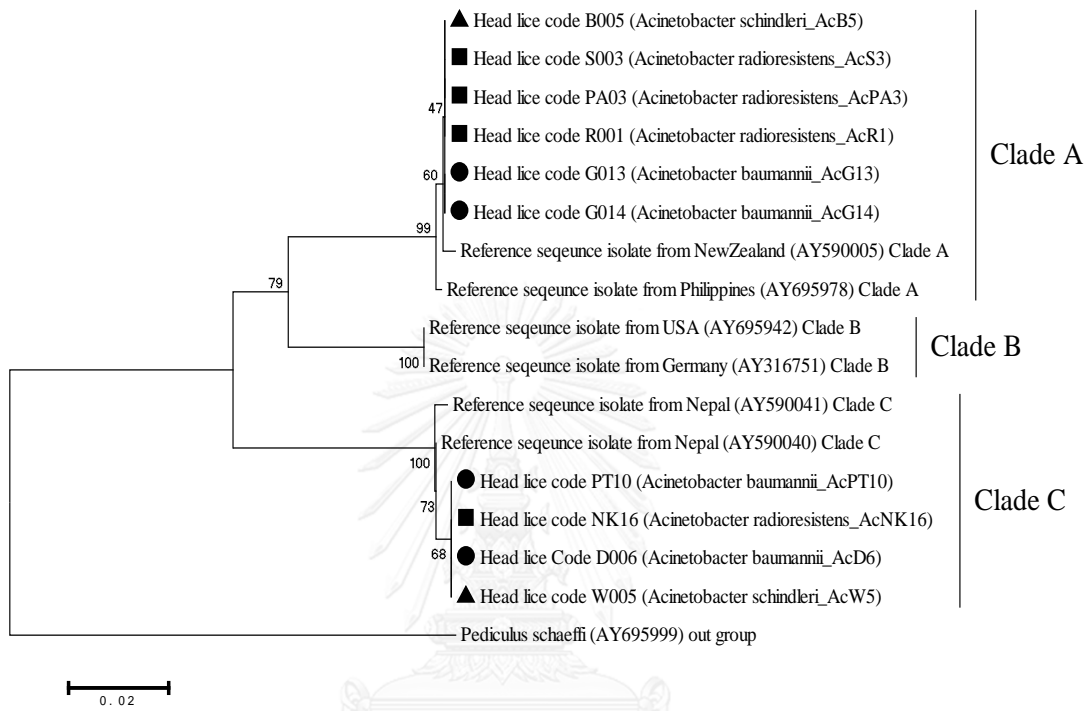
ทำการสร้างแผนภูมิต้นไม้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoB* ของ *Acinetobacter* spp. ในตัวอย่างดีเอ็นเอของเหาศีรษะที่เก็บจากภูมิภาคต่างๆในประเทศไทยโดยทำการทดสอบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoB* ของ *Acinetobacter* สายพันธุ์อื่นๆ (reference sequence) ที่มีรายงานในฐานข้อมูล NCBI โดยใช้โปรแกรม MEGA version 6 โดยวิธี Neighbor-joining method (NJ) และกำหนดแบบจำลองของการแทนที่ลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Kimura-2-parameter model เพื่อพิจารณาการแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide substitution) และตรวจความน่าเชื่อถือทางสถิติโดยใช้ bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ (24) และใช้ *Pseudomonas aeruginosa* accession no. FJ652696 เป็น out group

จากผลการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้พบว่า cladogram ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoB* จากตัวอย่างและเปรียบเทียบกับ reference sequence ตัวอย่างรหัส AcD6, AcG13, AcG14 และ AcPT10 มีความสัมพันธ์คล้ายคลึงกับ *A. baumannii* (acc no. CP009534) ในขณะที่ตัวอย่างรหัส AcNK16, AcR1, AcPA3 และ AcS3 มีความสัมพันธ์คล้ายคลึงกับ *A. radioresistens* (acc no. DQ207489) และตัวอย่างรหัส AcW5 และ AcB5 มีความสัมพันธ์คล้ายคลึงกับ *A. schindleri* (acc no. DQ207490) (รูปที่ 35)

จาก cladogram ในรูปที่ 36 แสดงความสัมพันธ์ของการตรวจพบเชื้อ *Acinetobacter* spp. ในตัวอย่างเหาศีรษะ จากตัวอย่างทั้งหมด 10 ตัวอย่างที่พบเชื้อ *Acinetobacter* เปรียบเทียบกับการแยกกลุ่ม clade A,B และ C โดยใช้ยีน COI ในการศึกษาและเปรียบเทียบกับ reference sequence ที่ทราบ clade พบว่าตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ *Acinetobacter* พบได้ทั้งใน clade A และ C โดยจัดอยู่ใน clade A จำนวน 6 ตัวอย่าง และจัดอยู่ใน clade C จำนวน 4 ตัวอย่าง



รูปที่ 35 แสดง Phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoB* ของเชื้อ *Acinetobacter* spp. ที่แยกได้จากติเ็นเอของเหาศีรษะโดยใช้ Neighbor-joining method แบบ Kimura-2-parameter model โดยกำหนดค่า bootstrap test จำนวน 1,000 รอบโดยใช้ *Pseudomonas aeruginosa* เป็น out group



รูปที่ 36 แสดง Phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของตัวอย่างดีเอ็นเอเหาศีรษะที่ตรวจพบเชื้อ *Acinetobacter* spp. จากการใช้ Neighbor-joining method แบบ Kimura-2-parameter model โดยกำหนดค่า bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ



## บทที่ 5

### สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การถูกรบกวนโดยเหาศีรษะ (Head lice infestation) มีสาเหตุจากเหาศีรษะ *Pediculus humanus capitis* ทำให้เกิดความรำคาญและก่อให้เกิดโรคทางผิวหนัง (pediculosis) โดยที่การติดเหาศีรษะยังเป็นปัญหาสำคัญทางการสาธารณสุขทั่วโลกโดยเฉพาะในประเทศไทยที่ยังพบว่าเด็กส่วนใหญ่ในโรงเรียนประถมศึกษาทั่วทุกภูมิภาคยังพบกับปัญหาดังกล่าวอยู่สำหรับในประเทศไทยนั้นยังไม่มีข้อมูลการศึกษาทางชีวโมเลกุลเหาศีรษะที่จะใช้เป็นฐานข้อมูลทางพันธุศาสตร์ที่สามารถใช้อ้างอิงได้ โดยการศึกษาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในประเทศไทยอาจมีความแตกต่างจากงานวิจัยที่ทำการศึกษาในประเทศอื่นๆ อีกทั้งปัจจุบันการกำจัดเหาศีรษะด้วยสารเคมีสังเคราะห์ทำให้เหามีการดื้อต่อสารเคมีกำจัดแมลงเพิ่มมากขึ้น

การศึกษาเพื่อจัดจำแนกเหา (Classification) โดยอาศัยเทคนิควิธีทางอนุชีววิทยาสามารถศึกษาได้จากจากยีนที่อยู่ทั้งในนิวเคลียสและยีนในไมโทคอนเดรีย สำหรับการศึกษทางด้านพันธุศาสตร์ของเหาศีรษะมีงานวิจัยทำการศึกษามากมายในต่างประเทศแต่ยังไม่พบรายงานการศึกษาในประเทศไทย งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบและวิเคราะห์ความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน COI ซึ่งอยู่ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR จากตัวอย่างเหาศีรษะทั้งหมด 275 ตัวอย่างที่เก็บจากภูมิภาคต่างๆของประเทศไทย ซึ่งในแต่ละตัวอย่างเหาศีรษะได้เลือกเหาศีรษะระยะตัวเต็มวัยเพศเมียตัวอย่างละ 1 ตัว ซึ่งยกเว้นตัวอย่างที่มาจากจังหวัดมุกดาหารที่ตัวอย่างเหาศีรษะเป็นระยะไข่ เนื่องจากการศึกษานี้เป็นการศึกษายีน COI ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ในไมโทคอนเดรียโดยมีคุณสมบัติในการถ่ายทอดดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียผ่านทางมารดา (maternal inheritance) โดยเมื่อเกิดการ mutation หรือเกิดความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์จะส่งถ่ายจากแม่ไปสู่ลูก เหมาะในการศึกษาวิวัฒนาการหรือพันธุศาสตร์ประชากร (genetic population)

จากตัวอย่างทั้งหมดนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูปก่อนนำไปวัดคุณภาพของปริมาณความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอโดยดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความเข้มข้นระหว่าง 50-100 ng/ $\mu$ l ซึ่งมีความเข้มข้นเพียงพอที่จะสามารถนำไปเพิ่มจำนวนยีน COI ด้วยเทคนิค PCR ด้วยการใส่ primer ที่ออกแบบขึ้นสำหรับงานวิจัยนี้ที่จำเพาะกับบริเวณยีน COI คือ primer CO-F (5' GGTACTGGCTGGACTRTTTATCC 3') และ primer CO-R (5'CTAAARACTTYYACTCCCGTTGG 3') พบว่าเมื่อตรวจสอบขนาด PCR product ด้วยวิธี electrophoresis พบแถบยีน COI ขนาดประมาณ 599 bp ที่ชัดเจนเมื่อเทียบกับ DNA marker ขนาด 100 bp โดยไม่เกิด primer dimer หรือ nonspecific band แสดงว่า primer ที่ได้ออกแบบขึ้นมานั้นมีความจำเพาะในการเพิ่มจำนวนยีน COI ของเหาศีรษะได้เป็นอย่างดี

สำหรับผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าวนี้เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor Program Version 7.1.9 โดยลำดับนิวคลีโอไทด์จะมีส่วนของ vector ติดอยู่ทั้งสองข้างเมื่อตัดส่วนของ vector ออกจะพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งยีน COI ที่ถูกตัดแต่งแล้วมีความยาวเท่ากับ 599 bp ทุกตัวอย่าง โดยมีขนาดของยีนที่ใกล้เคียงและสอดคล้องกับงานวิจัยอื่น ๆ ที่เคยมีการศึกษาในยีน COI (16, 32) ยกเว้นตัวอย่างจากจังหวัดเลยรหัสตัวอย่าง M002, M007 และตัวอย่างจากนครปฐมรหัสตัวอย่าง KP202 และ KP304 ที่มีขนาดความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 603 bp ซึ่งเกิดจากการ insertion ของเบส GGAG ในช่วงต้นของลำดับนิวคลีโอไทด์และจากผลของแผนภูมิวิวัฒนาการจากตัวอย่างทั้ง 4 ที่เกิดการ insertion ของเบสในช่วงต้นๆของลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าตัวอย่างจากจังหวัดเลย (M002 และ M007) จัดอยู่ใน clade C ในขณะที่ตัวอย่างจากจังหวัดนครปฐม (KP202 และ KP304) จัดอยู่ใน clade A ซึ่งการเกิด insertion ของเบส GGAG นั้นถึงแม้ว่าจะมีการ insertion ในตำแหน่งที่เหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ แต่พบว่าไม่มีผลต่อการจัดจำแนกกลุ่มของเหาศีรษะ และการพบ insertion ของเบสดังกล่าวยังไม่มียางานในการศึกษาจากยีน COI จากรายงานวิจัยต่างประเทศ

เมื่อทำการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน COI กับข้อมูลของยีน COI ของเหาศีรษะที่มีการเก็บสะสมไว้ในฐานข้อมูล NCBI (GenBank) พบว่าตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของเหาศีรษะในภาคเหนือมีค่า % identity เฉลี่ยเท่ากับ 98.6 % โดยที่ตัวอย่างจากภาคกลางมีค่า % identity เฉลี่ยเท่ากับ 97.6 % ตัวอย่างจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีค่า % identity เฉลี่ยเท่ากับ 98.4% ขณะที่ตัวอย่างจากภาคใต้พบว่ามีค่าเฉลี่ยของ % identity เฉลี่ยเท่ากับ 97.6% ตัวอย่างจากภาคตะวันตกมีค่าเฉลี่ยของ % identity เฉลี่ยเท่ากับ 98.8% และภาคตะวันออกมีค่าเฉลี่ยของ % identity เฉลี่ยเท่ากับ 98.8% เมื่อพิจารณาจากค่า % identity ของยีน COI แล้วพบว่าตัวอย่างทั้งหมด 275 ตัวอย่างมีความเหมือนกับเหา *P. humanus capitis* ที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูล NCBI โดยที่ยีน COI ดังกล่าวนี้สามารถใช้ระบุสายพันธุ์ของเหาได้อย่างชัดเจน

ยีนที่อยู่ในไมโทคอนเดรียในเหาศีรษะทั้งยีน COI, ยีน *Cytb* และยีน ND4 เมื่อนำมาศึกษาด้วยการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการยีนทั้ง 3 สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ clade A ซึ่งสามารถพบได้บริเวณทั่วไป (worldwide) โดยในกลุ่มของ clade A นั้นประกอบด้วยกลุ่มของเหาตัวและเหาศีรษะ และ clade B สามารถพบได้ในแถบอเมริกาเหนือ อเมริกากลาง ยุโรป และออสเตรเลีย พบเป็นกลุ่มของศีรษะ ส่วน clade C พบได้ในเนปาล เอเชีย และเซเนกัล (32, 35) ซึ่งพบว่าเหาศีรษะจัดอยู่กลุ่มนี้ จากการวิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการพบว่ามีประสิทธิภาพในการจำแนกความแตกต่างของเหา โดยอาศัยความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณยีน COI เมื่อทำการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการโดยเทียบกับ reference sequence ของ clade A, B และ C พบว่าสามารถแยก clade ได้เป็น 3 clade อย่างชัดเจนโดยสามารถแยกเป็น monophyly อย่างสมบูรณ์ด้วยค่า bootstrap test 97

และ 96% ตามลำดับ ในขณะที่ clade A และ clade B จัดเป็น monophyly ด้วยการที่อยู่ใน node เดียวกันด้วยค่า bootstrap test 79% อย่างไรก็ตามตัวอย่างที่ศึกษาทั้งหมด 275 ตัวอย่าง พบว่าถูกจัดอยู่ใน 2 clade คือ clade A และ clade C ซึ่งแบ่งเป็น clade อย่างชัดเจน และจากผล แผนภูมิวิวัฒนาการซึ่งตัวอย่างเหาศีรษะส่วนใหญ่ถูกจัดอยู่ใน clade A ซึ่งเป็น clade พบได้ทั้งในเหาดำและเหาศีรษะ (32, 35) ในการศึกษาครั้งนี้เราได้ออกแบบ primer ที่จำเพาะกับยีน COI ของเหาศีรษะสายพันธุ์ *P. humanus capitis* และจากผลของการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI กับฐานข้อมูล GenBank ที่มีค่า % identity เฉลี่ยเท่ากับ 98% สามารถระบุได้ว่าเหาที่เราศึกษาเป็นเหาศีรษะสายพันธุ์ *P. humanus capitis* ทั้งหมด

จากงานวิจัยของ Fane และคณะ (13) ได้ทำการศึกษาวิวัฒนาการของเหาศีรษะในอเมริกา โดยศึกษาจากยีน COI เมื่อสร้างแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการแล้วสามารถแยกกลุ่มของเหาอยู่ใน clade A และ clade B โดยกล่าวว่า การจัดแยกเหาศีรษะอยู่ใน clade B แสดงให้เห็นถึงการแยกกันของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยภูมิศาสตร์ (geographic distribution) โดย clade B ที่พบเป็น clade ที่สันนิษฐานได้ว่าอาจเกิดจากการเคลื่อนย้ายของประชากรเหาจากกลุ่มของบุคคลที่เป็นเหา เช่นเดียวกับในการศึกษาที่เหาศีรษะจัดอยู่ใน 2 clade คือ clade A และ C โดยที่ clade C เป็น clade ที่จำเพาะที่พบได้ในประเทศเนปาล (35) เอลิโอเปีย (51) และเซเนกัล (37) โดยเป็นสายพันธุ์ที่พบในเอเชียและเมื่อวิเคราะห์จำแนกเหาศีรษะตามภูมิภาคต่างๆด้วยแผนภูมิวิวัฒนาการพบว่าทุกภาคสามารถแยกเหาได้เป็น 2 กลุ่มประชากรซึ่งสอดคล้องกับการแยกเหาศีรษะข้างต้นที่แยกเหาศีรษะได้ 2 clade เมื่อเทียบกับ reference sequence ที่ทราบ clade การศึกษาความผันแปรที่จะสามารถแยกกลุ่มของเหาได้ดียิ่งขึ้นควรศึกษาโดยใช้ genetic marker ตัวอื่นๆ อย่างเช่น ยีน *Cytb* หรือยีน ND4 ที่เป็นยีนในไมโทคอนเดรีย หรือยีนที่อยู่ในนิวเคลียส เช่น ยีน EF-1 $\alpha$ , ยีน RNA polymerase II, ยีน Intergenic spacers หรือยีน 18S rRNA เพื่อยืนยันความถูกต้องให้ชัดเจนขึ้น

จากผลการคำนวณเปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์เมื่อแยกตามภูมิภาคต่างๆในประเทศไทย พบว่าเหาศีรษะจากภาคเหนือมีค่าความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ (% intraspecific variation 0-17%) ภายในสปีชีส์สูงกว่าภาคอื่นๆ ในขณะที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีค่าความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสปีชีส์น้อยที่สุด (% intraspecific variation 0-7.6%) แสดงว่าในประชากรเหาจากภูมิภาคต่างๆมีความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในประชากรเดียวกัน แต่เมื่อเทียบความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในจังหวัดเดียวกันหรือภายในโรงเรียนเดียวกันพบว่าส่วนใหญ่ไม่มีความแตกต่างภายในสปีชีส์เดียวกัน จากค่า % intraspecific variation ที่พบในแต่ละภูมิภาคที่มีค่าไม่สูงมากนักอาจเกิดจากจำนวนตัวอย่างที่เก็บในแต่ละพื้นที่มีจำนวนที่ไม่เท่ากันทำให้เมื่อคำนวณค่า % intraspecific variation แล้วทำให้มี % intraspecific variation ที่ได้ไม่ต่างกัน

มาก ดังนั้นควรศึกษาเพิ่มเติมโดยอาจทำการเก็บตัวอย่างในแต่ละพื้นที่ที่ศึกษาให้มีจำนวนที่เท่ากัน เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบในแต่ละพื้นที่เพื่อให้ผลที่ชัดเจนขึ้น

ในการศึกษานี้ได้ทำการตรวจหาเชื้อ *Bartonella* spp. และเชื้อ *Acinetobacter* spp. ในตัวอย่างดีเอ็นเอเหาศีรษะทั้งหมด 275 โดยเทคนิค PCR สำหรับการตรวจหาเชื้อ *Bartonella* spp. ใช้คู่ primer BhCS (gltA) 781-F (5' GGGGACCAGCTCATGGTGG 3') และ BhCS (gltA) 1137-R (5' AATGCAAAAAGAACAGTAAACA 3') ที่จำเพาะกับยีน *gltA* (citrate synthase) โดยอ้างอิงจากการศึกษาของ Norman และคณะ(41) และตรวจหาเชื้อ *Acinetobacter* spp. โดยใช้ primer *rpoB*-F (5' TACTCATATACCGAAAAGAAACGG3') และ *rpoB*-R (5' GGYTTACCAAGRCTATACTCAAC 3') ที่จำเพาะกับยีน *rpoB* ซึ่งอ้างอิงจากการศึกษาของ Kempf และคณะ(47) ที่ทำการตรวจหาเชื้อ *Acinetobacter* spp. ในตัวอย่างดีเอ็นเอเหาศีรษะ จากผลการทดลองพบว่าไม่สามารถตรวจพบเชื้อ *Bartonella* spp. แต่สามารถตรวจพบเชื้อ *Acinetobacter* spp. ในตัวอย่างดีเอ็นเอเหาศีรษะจำนวน 10 ตัวอย่าง สำหรับการตรวจพบเชื้อ *Acinetobacter* spp. ในตัวอย่างดีเอ็นเอเหาศีรษะนั้นจากผลการทำ PCR ให้ขนาดของ PCR product ประมาณ 239 bp ซึ่งตรงกับรายงานการศึกษาของ Kempf และคณะ(47) ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าวเมื่อเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล NCBI สามารถระบุสปีชีส์ของเชื้อ *Acinetobacter* ได้ 3 สปีชีส์คือ *A. baumannii* โดยมีค่า % identity เท่ากับ 100% เชื้อ *A. radioresistens* ซึ่งมีค่า % identity 98-99% และเชื้อ *A. schindleri* มีค่า % identity 99% ซึ่งงานวิจัยของ Bouvresse และคณะ (8) กับงานวิจัยการศึกษาของ Kempf และคณะ (47) ซึ่งตรวจพบเชื้อ *A. baumannii*, *A. radioresistens* และ *A. rhizosphaerae* ในตัวอย่างดีเอ็นเอเหาศีรษะ

จากรายงานวิจัยในต่างประเทศที่ตรวจหาเชื้อ *Bartonella* พบว่าเหาตัวเป็นพาหะของเชื้อ *B. quintana* (7) ก่อนจะมีการตรวจเจอเชื้อในเหาศีรษะ โดยตรวจเจอครั้งแรกในเหาศีรษะที่เก็บจากเด็กที่อาศัยในชุมชนแออัดในประเทศเนปาล (38) ในหลายงานวิจัยสามารถตรวจพบเชื้อ *B. quintana* ในคนที่มีทั้งเหาตัวและเหาศีรษะทั้ง 2 ชนิดได้เช่นกัน โดยจากการศึกษานี้ที่ไม่สามารถตรวจพบนั้นอาจเกิดจากความชุกของการพบเชื้อ *B. quintana* ยังมีไม่มากและยังไม่มีมีการตรวจพบเชื้อสปีชีส์นี้ในเหาหรือสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นในประเทศไทย แต่มีรายงานวิจัยการตรวจเจอเชื้อสปีชีส์อื่นในประเทศไทยคือ *B. thailandensis* จากตัวอย่างเลือดของสัตว์ฟันแทะ (52)

สำหรับเชื้อ *Acinetobacter* spp. สามารถแยกได้จากเหาตัวจากคนไร้บ้านในประเทศฝรั่งเศส (44) โดยระบุเป็น *A. baumannii* จากการศึกษาพบว่าตรวจเจอเชื้อ *Acinetobacter* ได้ 3 สปีชีส์คือ *A. baumannii* ที่เป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญคือก่อให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) ส่วนเชื้อ *A. radioresistens* และเชื้อ *A. schindleri* พบว่ามีความสามารถเป็นเชื้อก่อโรค แต่กลไกการก่อโรคยังไม่ชัดเจน ซึ่งเชื้อทั้ง 3 สปีชีส์พบว่าสามารถพบได้ในธรรมชาติ เช่น ในน้ำ ดิน

พืชผัก (45) หรือแม่กระทั่งบนผิวผู้ป่วยและอาสาสมัครที่มีสุขภาพดียังพบอีกว่าเหาตัวที่มีเชื้อ *A. baumannii* เมื่อดูดเลือดคนแล้วสามารถทำให้คนติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ได้ จากงานวิจัยของ Houhamdi และคณะ (46) ได้ทำการทดลองเบื้องต้นในการ infected เชื้อ *A. baumannii* ในเหาตัวพบว่าการขบเอาเชื้อ *A. baumannii* ออกมากับอุจจาระของเหาหลังจาก infected เชื้อแล้วหนึ่งวัน ในขณะที่เชื้อ *A. baumannii* (53, 54) มีรายงานว่ามีความสามารถที่จะมีชีวิตอยู่รอดได้นานในบริเวณที่แห้งๆ (55) ดังนั้นอุจจาระของเหาที่มีเชื้อสามารถถ่ายทอดเชื้อไปสู่ host (คน) ได้ผ่านจากบริเวณแผลที่เหากัดหรือมีการถลอกของผิวหนัง (47) ในประเทศไทยพบว่ามีรายงานวิจัยของ Punpanich และคณะในปี 2012 (48) ได้ศึกษาอัตราการติดเชื้อและปัจจัยเสี่ยงการติดเชื้อ *A. baumannii* ที่ทำให้เกิด nosocomial infection จากเด็กที่เข้ารับการรักษาสถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติช่วงอายุตั้งแต่แรกเกิดถึงอายุ 18 ปี พบการติดเชื้อ 26.1% โดยปัจจัยเสี่ยงจากการติดเชื้อมาจากการติดต่อยากลุ่ม carbapenems เด็กที่มีภูมิคุ้มกันต่ำจากการเป็นมะเร็งและได้รับเคมีบำบัด การติดเชื้อจากเครื่องช่วยหายใจหรือสายสนท่อบัสสาวะ อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานวิจัยการติดเชื้อ *A. baumannii* จากเหาที่นำเชื้อมาสู่คน

จากผลแผนภูมิวิวัฒนาการเพื่อจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ *Acinetobacter* spp. ที่ตรวจพบเปรียบเทียบกับ reference sequence พบว่าตัวอย่างที่ระบุเป็นเชื้อ *A. baumannii*, เชื้อ *A. radioresistens* และเชื้อ *A. schindleri* ถูกแยกอยู่ในกลุ่มเดียวกับ reference sequence ซึ่งมีความสัมพันธ์คล้ายคลึงกับสปีชีส์ที่ระบุ แสดงว่า *rpoB* สามารถใช้ในการระบุจำแนกสปีชีส์ได้เป็นอย่างดี เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อ *Acinetobacter* spp. ที่ตรวจพบกับการจัดจำแนก clade ของเหาศีรษะโดยแผนภูมิวิวัฒนาการปรากฏว่าเชื้อ *Acinetobacter* spp. สามารถพบได้ทั้งใน clade A และ clade C โดยการติดเชื้อ *Acinetobacter* spp. ที่พบนั้นไม่ได้จำเพาะกับ clade ที่ใช้จำแนกเหาศีรษะ

### ข้อเสนอแนะ

การศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบว่ายีน COI ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ในไมโทคอนเดรียสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และศึกษาถึงความแปรผันในประชากรได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตามควรทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อจัดจำแนกเหาศีรษะได้ละเอียดยิ่งขึ้น เช่น ยีน 18S rRNA, ยีน EF-1 $\alpha$  และยีน intergenic spacer ที่สามารถใช้อย่างกว้างขวางนี้แบ่งแยกเหาศีรษะใน clade A ได้เป็น 3 subgroup คือ eurasian subgroup A1 (worldwide) และ sub-saharan subgroup A2 และ america subgroup A3 และในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียเนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในเหามีปริมาณน้อยควรพัฒนาวิธีการในการตรวจเพื่อความไวและจำเพาะมากขึ้น เช่น เทคนิค real-time PCR เพิ่มโอกาสในการตรวจเจอเชื้อแบคทีเรียมากขึ้น

## รายการอ้างอิง

1. Weiss RA. Apes, lice and prehistory. *Journal of biology*. 2009;8(2):20.
2. Busvine JR. The head and body races of *Pediculus humanus* L. *Parasitology*. 1948;39(1-2):1-16.
3. Di Campli E, Di Bartolomeo S, Delli Pizzi P, Di Giulio M, Grande R, Nostro A, et al. Activity of tea tree oil and nerolidol alone or in combination against *Pediculus capitis* (head lice) and its eggs. *Parasitology research*. 2012;111(5):1985-92.
4. Madke B, Khopkar U. *Pediculosis capitis*: an update. *Indian journal of dermatology, venereology and leprology*. 2012;78(4):429-38.
5. Janniger CK, Kuflik AS. *Pediculosis capitis*. *Cutis*. 1993;51(6):407-8.
6. Leung AK, Fong JH, Pinto-Rojas A. *Pediculosis capitis*. *Journal of pediatric health care : official publication of National Association of Pediatric Nurse Associates & Practitioners*. 2005;19(6):369-73.
7. Foucault C, Brouqui P, Raoult D. *Bartonella quintana* characteristics and clinical management. *Emerging infectious diseases*. 2006;12(2):217-23.
8. Bouvresse S, Socolovshi C, Berdjane Z, Durand R, Izri A, Raoult D, et al. No evidence of *Bartonella quintana* but detection of *Acinetobacter baumannii* in head lice from elementary schoolchildren in Paris. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. 2011;34(6):475-7.
9. Leo NP, Campbell, N.J., Yang, X., Mumcuoglu, K and Barker, S.C.,. Evidence from mitochondrial DNA that head lice and body lice of humans (Phthiraptera: Pediculidae) are conspecific. *Journal of Medical Entomology* 2002;39(4):662-6.
10. Veracx AaR, D. Biology and genetics of human head and body lice. *Trends Parasitol*. 2012;28(12):563-71.
11. Boutellis A, Veracx, A., Abrahao, J and Raoult, D. Amazonian head lice-specific genotypes are putatively pre-Columbian. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2013;88(6):1180-4.
12. Preativatanyou K, Sirisup, N., Payungporn , S., Poovorawan, Y., Thavara, U., Tawatsin, A., Sungpradit, S and Siriyasatien, P. Mitochondrial DNA-based identification

of some forensically important blowflies in Thailand. *Forensic Science International*. 2010;10;202(1-3):97-101.

13. Ascunce MS, Fane, J., Kassu, G., Toloza, A.C., Picollo, M.I., Gonzalez, O.A and Reed, D.L. Mitochondrial diversity in human head louse populations across the Americas. *American Journal of Physical Anthropology*. 2013;152(1):118-29.

14. Light JE, Troups, M.A., Reed, D.L., . What's in a name: the taxonomic status of human head and body lice. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2008;47(3):1203-16.

15. Raoult D, Reed, D.L., Dittmar, K., Kirchman, J.J., Rolain, J.M., Guillen, S., Light, J.E. Molecular identification of lice from pre-Columbian mummies. *Journal of Infectious Diseases*. 2008;197(4):535-43.

16. Yong Z, Fournier, P.E., Rydkina, E and Raoult D. The geographical segregation of human lice preceded that of *Pediculus humanus capitis* and *Pediculus humanus humanus*. *Comptes Rendus Biologies*. 2003;326(6):565-74.

17. Boutellis A, Abi-Rached L, Raoult D. The origin and distribution of human lice in the world. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2014;23:209-17.

18. Bonilla DL, Durden, L.A., Eremeeva, M.E and Dasch, G.A.,. The biology and taxonomy of head and body lice-implications for louse-borne disease prevention. *PLoS Pathogens*. 2007;9(11).

19. Drali R, Boutellis A, Raoult D, Rolain JM, Brouqui P. Distinguishing body lice from head lice by multiplex real-time PCR analysis of the Phum\_PHUM540560 gene. *PLoS One*. 2013;8(2):e58088.

20. Ko CJaE, D.M. Pediculosis. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2004;50(1):1-12.

21. Feldmeier H. Pediculosis capitis: new insights into epidemiology, diagnosis and treatment. *European Journal of Clinical Microbiology* 2012;31(9):2105-10.

22. Boore JL. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*. 1999;27:1767-80.

23. Shao R, Zhu, X.Q., Barker, S.C and Herd, K. Evolution of extensively fragmented mitochondrial genomes in the lice of humans. *Genome Biology and Evolution*. 2012;4(11):1088-101.
24. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*. 2013;30(12):2725-9.
25. Johnston JS. Body lice and head lice (Anoplura:Pediculidae) have the smallest genomes of any hemimetabolous insect reported to date. *Journal of Medical Entomology* 2007;44:1009–12.
26. Hindle EaP, G. Mitotic divisions following meiosis in *Pediculus corporis* males. *Nature*. 1942;149:668.
27. Reed DL, Light, J.E., Allen, J.M., Kirchman, J.J. Pair of lice lost or parasites regained: the evolutionary history of anthropoid primate lice. *BMC Biology*. 2007;5:7.
28. Kirkness EF. Genome sequences of the human body louse and its primary endosymbiont provide insights into the permanent parasitic lifestyle. *Proc Natl Acad Sci*. 2010;107:121168-73.
29. Shao R. The single mitochondrial chromosome typical of animals has evolved into 18 minichromosomes in the human body louse, *Pediculus humanus*. *Genome Research*. 2009;19:904–12.
30. Shao RaB, S.C. Chimeric mitochondrial minichromosomes of the human body louse, *Pediculus humanus*: evidence for homologous and non-homologous recombination. *Gene*. 2011;473(1):36-43.
31. Kittler R, Kayser, M and Stoneking, M. Molecular evolution of *Pediculus humanus* and the origin of clothing. *Current Biology*. 2003;13 (16):1414-7.
32. Light JE, Allen, J.M., Long, L.M., Carter, T.E., Barrow, L., Suren, G., Raoult, D., Reed, D.L. Geographic distributions and origins of human head lice (*Pediculus humanus capitis*) based on mitochondrial data. *Journal of Parasitology*. 2008;94(6):1275-81.



33. Light JEaR, D.L. Multigene analysis of phylogenetic relationships and divergence times of primate sucking lice (Phthiraptera: Anoplura). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2009;50(2):376-90.
34. Veracx A, Boutellis, A., Merhej, V., Diatta, G and Raoult, D. Evidence for an African cluster of human head and body lice with variable colors and interbreeding of lice between continents. *PLoS One*. 2012;7(5):37804.
35. Reed DL, Smith, V.S., Hammond, S.L., Rogers, A.R., Clayton, D.H. Genetic analysis of lice supports direct contact between modern and archaic humans. *PLoS Biology*. 2004;2(11)::340.
36. Herd K, Barker, S.C and Shao, R. High-level of Heteroplasmy in the Mitochondrial Cox1-Minichromosome of the Human Body Louse, *Pediculus humanus*, and the Human Head Louse, *Pediculus capitis*. . *The open Genomic Journal*. 2012;5:14-7.
37. Boutellis A, Veracx A, Angelakis E, Diatta G, Mediannikov O, Trape JF, et al. *Bartonella quintana* in head lice from Senegal. *Vector borne and zoonotic diseases*. 2012;12(7):564-7.
38. Sasaki T, Poudel SK, Isawa H, Hayashi T, Seki N, Tomita T, et al. First molecular evidence of *Bartonella quintana* in *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae), collected from Nepalese children. *Journal of Medical Entomology* 2006;43(1):110-2.
39. Angelakis E, Rolain JM, Raoult D, Brouqui P. *Bartonella quintana* in head louse nits. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2011;62(2):244-6.
40. Bonilla DL, Kabeya H, Henn J, Kramer VL, Kosoy MY. *Bartonella quintana* in body lice and head lice from homeless persons, San Francisco, California, USA. *Emerging infectious diseases*. 2009;15(6):912-5.
41. Norman AF, Regnery R, Jameson P, Greene C, Krause DC. Differentiation of *Bartonella*-like isolates at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene. *Journal of clinical microbiology*. 1995;33(7):1797-803.

42. Sangare AK, Boutellis A, Drali R, Socolovschi C, Barker SC, Diatta G, et al. Detection of *Bartonella quintana* in African body and head lice. *Am J Trop Med Hyg*. 2014;91(2):294-301.
43. Kumsa B, Socolovschi C, Parola P, Rolain JM, Raoult D. Molecular detection of *Acinetobacter* species in lice and keds of domestic animals in Oromia Regional State, Ethiopia. *PLoS One*. 2012;7(12):e52377.
44. La Scola B, Raoult D. *Acinetobacter baumannii* in human body louse. *Emerging infectious diseases*. 2004;10(9):1671-3.
45. Berlau J, Aucken HM, Houang E, Pitt TL. Isolation of *Acinetobacter* spp. including *A. baumannii* from vegetables: implications for hospital-acquired infections. *The Journal of hospital infection*. 1999;42(3):201-4.
46. Seifert H, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Pelzer N, Tjernberg I, Vaneechoutte M. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *Journal of clinical microbiology*. 1997;35(11):2819-25.
47. Kempf M, Abdissa A, Diatta G, Trape JF, Angelakis E, Mediannikov O, et al. Detection of *Acinetobacter baumannii* in human head and body lice from Ethiopia and identification of new genotypes. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2012;16(9):e680-3.
48. Punpanich W, Nithitamsakun N, Treeratweeraphong V, Suntarattiwong P. Risk factors for carbapenem non-susceptibility and mortality in *Acinetobacter baumannii* bacteremia in children. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2012;16(11):e811-5.
49. Aimsaad L, Diraphat P, Utrarachkij F, Thunyaharn S, Samakoses R, Siripanichgon K. Epidemiological characteristics of *Acinetobacter baumannii* infections at Phramongkutklao Hospital. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet*. 2009;92 Suppl 7:S164-72.
50. Rassami WaS, M., . Epidemiology of *Pediculosis capitis* among schoolchildren in the eastern area of Bangkok, Thailand. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2012;2(11):901-4.

51. Angelakis E, Diatta G, Abdissa A, Trape JF, Mediannikov O, Richet H, et al. Altitude-dependent *Bartonella quintana* genotype C in head lice, Ethiopia. *Emerging infectious diseases*. 2011;17(12):2357-9.
52. Saisongkorh W, Wootta W, Sawanpanyalert P, Raoult D, Rolain JM. "Candidatus *Bartonella thailandensis*": a new genotype of *Bartonella* identified from rodents. *Veterinary microbiology*. 2009;139(1-2):197-201.
53. La Scola B, Fournier PE, Brouqui P, Raoult D. Detection and culture of *Bartonella quintana*, *Serratia marcescens*, and *Acinetobacter* spp. from decontaminated human body lice. *Journal of clinical microbiology*. 2001;39(5):1707-9.
54. Houhamdi L, Fournier PE, Fang R, Lepidi H, Raoult D. An experimental model of human body louse infection with *Rickettsia prowazekii*. *J Infect Dis*. 2002;186(11):1639-46.
55. Jawad A, Seifert H, Snelling AM, Heritage J, Hawkey PM. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. *Journal of clinical microbiology*. 1998;36(7):1938-41.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก  
การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. ชุดสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อสำเร็จรูป (Invisorb<sup>®</sup> Spin Tissue Mini Kit, ประเทศเยอรมนี)

Lysis buffer G  
Binding buffer A  
Proteinase K  
Wash buffer  
Elution buffer

2. ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (Invisorb<sup>®</sup> Spin Plasmid Mini Two, ประเทศเยอรมนี)

Solution A  
Solution B  
Solution C  
Wash solution  
Elution solution

3. ชุดโคลนสำหรับ PCR product (DNA ligation)

2X Rapid ligation buffer  
pGEM<sup>®</sup> - T easy vector  
T4 DNA ligase  
Deionized water

4. ชุดสารเคมีในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR

10X NH<sub>4</sub> buffer  
50mM MgCl<sub>2</sub>  
10mM dNTPs  
Taq DNA polymerase (5U/μl)

5. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Luria-bertani (LB agar) ปริมาตร 1 ลิตร

Bacto-tryptone	10.0	g
Yeast extracts	5.0	g
1M NaCl	10.0	g
Agar	10.0	g

**วิธีเตรียม** ชั่งสารทั้งหมดใส่ในขวดขนาด 1 L จากนั้นละลายด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาณให้ได้ปริมาณ 1 ลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลานำมาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้อุ่น จากนั้นใส่ยา ampicillin ความเข้มข้น 100 mg/μl ปริมาตร 1 ml ผสมให้เข้ากัน จากนั้นจึงเทลงจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

\*\*\*สำหรับอาหารเลี้ยงชนิดเหลว (LB broth) เตรียมอาหารด้วยวิธีเดียวกันแต่ไม่ต้องใส่ agar เมื่อจะใช้ค่อยเติมยา ampicillin ลงไป เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เช่นเดียวกัน

#### 6. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย SOB ปริมาตร 100 ml และ SOC solution

Bacto-tryptone	5.0	g
Yeast extracts	1.25	g
1M NaCl	0.125	g

**วิธีเตรียม SOB** ละลายสารทั้งหมดด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 90 ml ก่อนจากนั้นใส่สารละลาย KCl ปริมาตร 625 μl แล้วจึงปรับปริมาณให้ได้ 100 ml นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นจากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

**วิธีเตรียม SOC** เตรียมจากเติมสารละลาย 2M glucose, 1M MgCl<sub>2</sub>, 1M MgSO<sub>4</sub> ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ SOB ในอัตราส่วน 970: 10: 10: 10 (ปริมาณรวม 1,000 μl)

#### 7. การเตรียมสารละลาย 1M KCl ปริมาตร 10 ml

KCl (potassium chloride)	0.7455	g
--------------------------	--------	---

**วิธีเตรียม** ละลายสารเคมีด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาณให้ได้ 10 ml เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

#### 8. การเตรียมสารละลาย 2M MgCl<sub>2</sub>/MgSO<sub>4</sub> ปริมาตร 10 ml

1M MgCl <sub>2</sub> + 6H <sub>2</sub> O	2.033	g
1M MgSO <sub>4</sub> + 7H <sub>2</sub> O	2.465	g

**วิธีเตรียม** ละลายสารเคมีด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 10 ml จากนั้นกรองด้วย micro filter ขนาด 0.22 μm เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

#### 9. การเตรียมสารละลาย 2M glucose ปริมาตร 10 ml

Glucose (D- glucose)	3.6	g
----------------------	-----	---

**วิธีเตรียม** ละลายสารเคมีด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 10 ml จากนั้นกรองด้วย micro filter ขนาด 0.22  $\mu\text{m}$  เก็บไว้ที่อุณหภูมิ  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

#### 10. การเตรียมยา ampicillin 100 mg/ $\mu\text{l}$ (stock solution)

**วิธีเตรียม** ชั่งยา ampicillin 1 กรัมใส่น้ำกลั่นปริมาตร 10 ml ละลายให้เข้ากันจากนั้นกรองด้วย microfilter ขนาด 0.22  $\mu\text{m}$  แบ่งใส่หลอด microcentrifuge เก็บไว้ที่อุณหภูมิ  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

#### 11. การเตรียมสารละลาย 10X TAE buffer ปริมาตร 1 L

Tris base	48.44	g
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	7.44	g
Sodium acetate trihydrate	27.22	g
Glacial acetic acid	17.0	ml

**วิธีเตรียม** ละลายสารเคมี Tris base, Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O และ Sodium acetate trihydrate ให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH ให้ได้ 7.8 ด้วย glacial acetic acid จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1 L ด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121  $^{\circ}\text{C}$  ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 20 นาที ก่อนใช้

\*\*\*เมื่อจะนำมาใช้ให้นำ 10X TAE beffer มาเจือจางความเข้มข้น โดยนำ 10X TAE beffer ปริมาตร 100 ml ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 900 ml ซึ่งจะได้สารละลาย 1X TAE buffer เพื่อนำไปใช้งานต่อไป

#### 12. การเตรียม 6X loading buffer

Bromphenol blue	0.025	g
Sucrose	4.0	g

**วิธีเตรียม** ละลายสารเคมีด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 10 ml เก็บไว้ที่อุณหภูมิ  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$

#### 13. การเตรียมสารละลาย 20 mg/ml X-gal

5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside 0.2 g

**วิธีเตรียม** เตรียม stock solution โดยละลาย X-gal ในสารละลาย dimethylformamide (DMF) ให้ได้ปริมาตร 10 ml จากนั้นแบ่งใส่หลอด microcentrifuge ห่อด้วยฟลอยด์เก็บที่อุณหภูมิ  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

#### 14. การเตรียมสารละลาย 1M IPTG

Isopropyl  $\beta$ -D-1 thiogalactopyranoside 2.38 g

**วิธีเตรียม** เตรียม stock solution 1M IPTG โดยละลายสารเคมีด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาณเป็น 10 ml กรองด้วย microfilter ขนาด 0.22  $\mu$ m แบ่งใส่หลอด microcentrifuge ห่อด้วยฟลอยด์เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

#### 15. การเตรียมสารเคมี Medium A เพื่อใช้ในขั้นตอนเตรียม competent cell

MgSO<sub>4</sub> 1.23 g

Glucose 1.00 g

**วิธีเตรียม** ละลายสารเคมีทั้งหมดด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (LB broth) ปรับปริมาตรให้ได้ 50 ml กรองด้วย microfilter ขนาด 0.22  $\mu$ m จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

#### 16. การเตรียมสารเคมี Medium B เพื่อใช้ในขั้นตอนเตรียม competent cell

MgSO<sub>4</sub> 0.295 g

Polyethylene glycol (PEG) 1.2 g

Glycerol 3.6 ml

**วิธีเตรียม** ละลายสารเคมี MgSO<sub>4</sub> และ PEG ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (LB broth) ประมาณ 5 ml จากนั้นเติม glycerol ปริมาตร 3.6 ml ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรเป็น 10 ml ด้วยการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (LB broth) กรองด้วย microfilter ขนาด 0.22  $\mu$ m จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

#### 17. การเตรียม competent cell เพื่อใช้ในขั้นตอน DNA cloning

1. เตรียมเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  โดยการนำ stock เชื้อแบคทีเรียที่เก็บใน glycerol มา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่ไม่ใส่ยา ampicillin เพื่อให้ได้ single colony บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C ประมาณ 16-18 ชั่วโมง

2. เลือก single colony มาเลี้ยงในอาหารชนิดเหลว LB broth ที่ไม่ใส่ยา ampicillin บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C แบบเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 rpm ประมาณ 16-18 ชั่วโมง

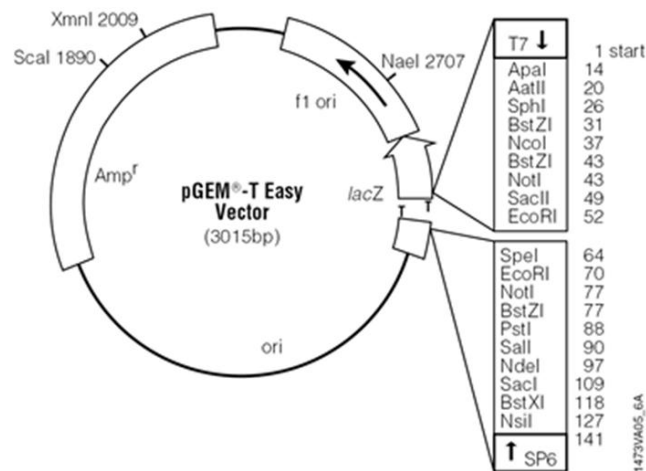
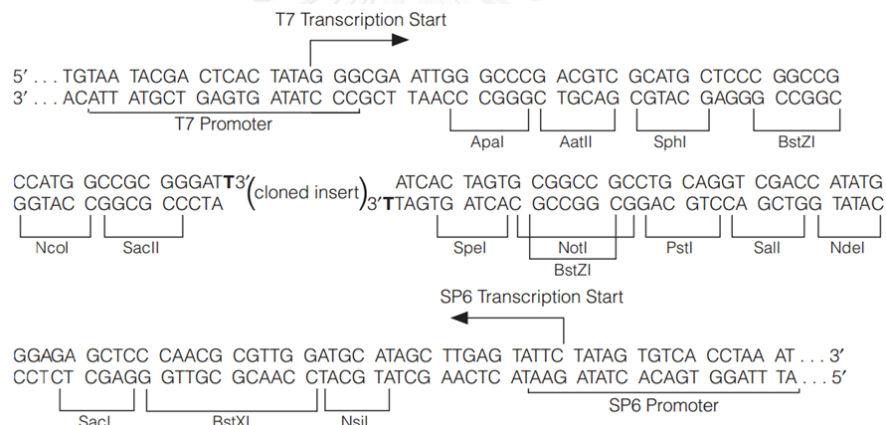
3. นำ medium A มาแบ่งใส่หลอดปริมาตร 20 ml จากนั้นใส่เชื้อแบคทีเรียปริมาณ 200  $\mu$ l นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C แบบเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 rpm นำมาวัด OD ที่ A<sub>600</sub> ให้ได้ค่าประมาณ 0.4-0.6 (ประมาณ 2 ชั่วโมง 30 นาที)



4. เมื่อครบเวลาแล้วให้นำหลอดเชื้อมาแช่ในน้ำแข็ง ประมาณ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 g ด้วยอุณหภูมิ 4 °C ประมาณ 10 นาที
5. เมื่อครบเวลานำหลอดที่ปั่นตกตะกอนเชื้อแล้วแช่ในน้ำแข็ง จากนั้นให้ทิ้งส่วนของ supernatant จากนั้นให้ใส่ medium A ปริมาตร 200 µl เพื่อทำการละลายตะกอนโดยใช้ pipette ดูดขึ้นลงเบาๆ
6. ดูด medium B ปริมาตร 1 ml ใส่ลงไป ใช้ pipette ดูดขึ้นลงเบาๆเพื่อผสมให้เข้ากัน จากนั้นนั้นแบ่งใส่หลอด microcentrifuge หลอดละ 100 µl นำไป fix ด้วยไนโตรเจนเหลวอย่างรวดเร็ว เก็บรักษา competent cell ที่อุณหภูมิ -80 °C

**หมายเหตุ:** ตั้งแต่ขั้นตอนที่ 4 เป็นต้นไปให้ทำในอุณหภูมิที่เย็น น้ำยาที่ใช้ต้องแช่เย็น และทำอย่างรวดเร็ว

### 18. pGEM<sup>®</sup> - T easy Vector System I, Promega<sup>®</sup>



รูปที่ 37 แผนที่ยีนของพลาสมิดเวคเตอร์ pGEM<sup>®</sup> - T easy







```

*      20      *      40      *      60      *      80      *      100      *      1
BA2-4 : GGTAC GGC TGGAC GTTA CCCC C TAG GTC TC A GA AAG GC ACC TC G TTC AG TTG ATTA CTAT TTA A TC TC AT TTA G CAG GAG TGA GAT TTA G GTC AG : 118
BA7-35 : GGTAC GGC TGGAC GTTA CCCC C TAG GTC TC A GA AAG GC ACC TC G TTC AG TTG ATTA CTAT TTA A TC TC AT TTA G CAG GAG TGA GAT TTA G GTC AG : 118
BA1-3 : GGTAC GGC TGGAC GTTA CCCC C TAG GTC TC A GA AAG GC ACC TC G TTC AG TTG ATTA CTAT TTA A TC TC AT TTA G CAG GAG TGA GAT TTA G GTC AG : 118
BA3-13 : GGTAC GGC TGGAC GTTA CCCC C TAG GTC TC A GA AAG GC ACC TC G TTC AG TTG ATTA CTAT TTA A TC TC AT TTA G CAG GAG TGA GAT TTA G GTC AG : 118
BA6-15 : GGTAC GGC TGGAC GTTA CCCC C TAG GTC TC A GA AAG GC ACC TC G TTC AG TTG ATTA CTAT TTA A TC TC AT TTA G CAG GAG TGA GAT TTA G GTC AG : 118
BA15-46 : GGTAC GGC TGGAC GTTA CCCC C TAG GTC TC A GA AAG GC ACC TC G TTC AG TTG ATTA CTAT TTA A TC TC AT TTA G CAG GAG TGA GAT TTA G GTC AG : 118
BA10-21 : GGTAC GGC TGGAC GTTA CCCC C TAG GTC TC A GA AAG GC ACC TC G TTC AG TTG ATTA CTAT TTA A TC TC AT TTA G CAG GAG TGA GAT TTA G GTC AG : 118
BA13-60 : GGTAC GGC TGGAC GTTA CCCC C TAG GTC TC A GA AAG GC ACC TC G TTC AG TTG ATTA CTAT TTA A TC TC AT TTA G CAG GAG TGA GAT TTA G GTC AG : 118
BA08-28 : GGTAC GGC TGGAC GTTA CCCC C TAG GTC TC A GA AAG GC ACC TC G TTC AG TTG ATTA CTAT TTA A TC TC AT TTA G CAG GAG TGA GAT TTA G GTC AG : 118
BA12-51 : GGTAC GGC TGGAC GTTA CCCC C TAG GTC TC A GA AAG GC ACC TC G TTC AG TTG ATTA CTAT TTA A TC TC AT TTA G CAG GAG TGA GAT TTA G GTC AG : 118
BA14-39 : GGTAC GGC TGGAC GTTA CCCC C TAG GTC TC A GA AAG GC ACC TC G TTC AG TTG ATTA CTAT TTA A TC TC AT TTA G CAG GAG TGA GAT TTA G GTC AG : 118
GCTACTGGCTGACT TTTATCCCCtCtTagGTCTCtAgaAgGcCaACcTcTctGtTTCagTTGATTTAGCTATTTTAgCTcTTCATTTAgCAGGAGTGA GATTTTAg TCAG

*      20      *      40      *      60      *      80      *      100      *      120      *      140      *      160      *      180      *      200      *      220      *
BA2-4 : TAAATTTTATTA GAAC TATT TAACATATGGCCTCAATATTTGGCTTA TTCGACTGCCTTATTTTGGCTGG GGTGT GG AACA CCTTTTATTTAG GTACTTCCAT : 236
BA7-35 : TAAATTTTATTA GAAC TATT TAACATATGGCCTCAATATTTGGCTTA TTCGACTGCCTTATTTTGGCTGG GGTGT GG AACA CCTTTTATTTAG GTACTTCCAT : 236
BA1-3 : TAAATTTTATTA GAAC TATT TAACATATGGCCTCAATATTTGGCTTA TTCGACTGCCTTATTTTGGCTGG GGTGT GG AACA CCTTTTATTTAG GTACTTCCAT : 236
BA3-13 : TAAATTTTATTA GAAC TATT TAACATATGGCCTCAATATTTGGCTTA TTCGACTGCCTTATTTTGGCTGG GGTGT GG AACA CCTTTTATTTAG GTACTTCCAT : 236
BA6-15 : TAAATTTTATTA GAAC TATT TAACATATGGCCTCAATATTTGGCTTA TTCGACTGCCTTATTTTGGCTGG GGTGT GG AACA CCTTTTATTTAG GTACTTCCAT : 236
BA15-46 : TAAATTTTATTA GAAC TATT TAACATATGGCCTCAATATTTGGCTTA TTCGACTGCCTTATTTTGGCTGG GGTGT GG AACA CCTTTTATTTAG GTACTTCCAT : 236
BA10-21 : TAAATTTTATTA GAAC TATT TAACATATGGCCTCAATATTTGGCTTA TTCGACTGCCTTATTTTGGCTGG GGTGT GG AACA CCTTTTATTTAG GTACTTCCAT : 236
BA13-60 : TAAATTTTATTA GAAC TATT TAACATATGGCCTCAATATTTGGCTTA TTCGACTGCCTTATTTTGGCTGG GGTGT GG AACA CCTTTTATTTAG GTACTTCCAT : 236
BA08-28 : TAAATTTTATTA GAAC TATT TAACATATGGCCTCAATATTTGGCTTA TTCGACTGCCTTATTTTGGCTGG GGTGT GG AACA CCTTTTATTTAG GTACTTCCAT : 236
BA12-51 : TAAATTTTATTA GAAC TATT TAACATATGGCCTCAATATTTGGCTTA TTCGACTGCCTTATTTTGGCTGG GGTGT GG AACA CCTTTTATTTAG GTACTTCCAT : 236
BA14-39 : TAAATTTTATTA GAAC TATT TAACATATGGCCTCAATATTTGGCTTA TTCGACTGCCTTATTTTGGCTGG GGTGT GG AACA CCTTTTATTTAG GTACTTCCAT : 236
TAAATTTTATTA GAAC TATT TAACATATGGCCTCAATATTTGGCTTA TTCGACTGCCTTATTTTGGCTGG GGTGT GG AACA CCTTTTATTTAG GTACTTCCAT

*      240      *      260      *      280      *      300      *      320      *      340      *
BA2-4 : TTAGCTGGAGCTATTACAATGCTCTTAATA ACCGTAATTTCAATTGCTCAATTTTGGAPCCTTAGGGGGTGGTAT CTGTTTTATACCAACA TTAATTTGATTTTGGACAT : 354
BA7-35 : TTAGCTGGAGCTATTACAATGCTCTTAATA ACCGTAATTTCAATTGCTCAATTTTGGAPCCTTAGGGGGTGGTAT CTGTTTTATACCAACA TTAATTTGATTTTGGACAT : 354
BA1-3 : TTAGCTGGAGCTATTACAATGCTCTTAATA ACCGTAATTTCAATTGCTCAATTTTGGAPCCTTAGGGGGTGGTAT CTGTTTTATACCAACA TTAATTTGATTTTGGACAT : 354
BA3-13 : TTAGCTGGAGCTATTACAATGCTCTTAATA ACCGTAATTTCAATTGCTCAATTTTGGAPCCTTAGGGGGTGGTAT CTGTTTTATACCAACA TTAATTTGATTTTGGACAT : 354
BA6-15 : TTAGCTGGAGCTATTACAATGCTCTTAATA ACCGTAATTTCAATTGCTCAATTTTGGAPCCTTAGGGGGTGGTAT CTGTTTTATACCAACA TTAATTTGATTTTGGACAT : 354
BA15-46 : TTAGCTGGAGCTATTACAATGCTCTTAATA ACCGTAATTTCAATTGCTCAATTTTGGAPCCTTAGGGGGTGGTAT CTGTTTTATACCAACA TTAATTTGATTTTGGACAT : 354
BA10-21 : TTAGCTGGAGCTATTACAATGCTCTTAATA ACCGTAATTTCAATTGCTCAATTTTGGAPCCTTAGGGGGTGGTAT CTGTTTTATACCAACA TTAATTTGATTTTGGACAT : 354
BA13-60 : TTAGCTGGAGCTATTACAATGCTCTTAATA ACCGTAATTTCAATTGCTCAATTTTGGAPCCTTAGGGGGTGGTAT CTGTTTTATACCAACA TTAATTTGATTTTGGACAT : 354
BA08-28 : TTAGCTGGAGCTATTACAATGCTCTTAATA ACCGTAATTTCAATTGCTCAATTTTGGAPCCTTAGGGGGTGGTAT CTGTTTTATACCAACA TTAATTTGATTTTGGACAT : 354
BA12-51 : TTAGCTGGAGCTATTACAATGCTCTTAATA ACCGTAATTTCAATTGCTCAATTTTGGAPCCTTAGGGGGTGGTAT CTGTTTTATACCAACA TTAATTTGATTTTGGACAT : 354
BA14-39 : TTAGCTGGAGCTATTACAATGCTCTTAATA ACCGTAATTTCAATTGCTCAATTTTGGAPCCTTAGGGGGTGGTAT CTGTTTTATACCAACA TTAATTTGATTTTGGACAT : 354
TTAGCTGGAGCTATTACAATGCTCTTAATA ACCGTAATTTCAATTGCTCAATTTTGGAPCCTTAGGGGGTGGTAT CTGTTTTATACCAACA TTAATTTGATTTTGGACAT

*      360      *      380      *      400      *      420      *      440      *      460      *
BA2-4 : CCTGAAGTTTATATTC TATCTTCTCTGCA TTTGGTCT TATCTCTCATATGGTGGTAGATTTGTGTGGA AAGAAAGAGTT TTTGGTCT TTA GAATGATTTAGCGAATATCCGCTA : 472
BA7-35 : CCTGAAGTTTATATTC TATCTTCTCTGCA TTTGGTCT TATCTCTCATATGGTGGTAGATTTGTGTGGA AAGAAAGAGTT TTTGGTCT TTA GAATGATTTAGCGAATATCCGCTA : 472
BA1-3 : CCTGAAGTTTATATTC TATCTTCTCTGCA TTTGGTCT TATCTCTCATATGGTGGTAGATTTGTGTGGA AAGAAAGAGTT TTTGGTCT TTA GAATGATTTAGCGAATATCCGCTA : 472
BA3-13 : CCTGAAGTTTATATTC TATCTTCTCTGCA TTTGGTCT TATCTCTCATATGGTGGTAGATTTGTGTGGA AAGAAAGAGTT TTTGGTCT TTA GAATGATTTAGCGAATATCCGCTA : 472
BA6-15 : CCTGAAGTTTATATTC TATCTTCTCTGCA TTTGGTCT TATCTCTCATATGGTGGTAGATTTGTGTGGA AAGAAAGAGTT TTTGGTCT TTA GAATGATTTAGCGAATATCCGCTA : 472
BA15-46 : CCTGAAGTTTATATTC TATCTTCTCTGCA TTTGGTCT TATCTCTCATATGGTGGTAGATTTGTGTGGA AAGAAAGAGTT TTTGGTCT TTA GAATGATTTAGCGAATATCCGCTA : 472
BA10-21 : CCTGAAGTTTATATTC TATCTTCTCTGCA TTTGGTCT TATCTCTCATATGGTGGTAGATTTGTGTGGA AAGAAAGAGTT TTTGGTCT TTA GAATGATTTAGCGAATATCCGCTA : 472
BA13-60 : CCTGAAGTTTATATTC TATCTTCTCTGCA TTTGGTCT TATCTCTCATATGGTGGTAGATTTGTGTGGA AAGAAAGAGTT TTTGGTCT TTA GAATGATTTAGCGAATATCCGCTA : 472
BA08-28 : CCTGAAGTTTATATTC TATCTTCTCTGCA TTTGGTCT TATCTCTCATATGGTGGTAGATTTGTGTGGA AAGAAAGAGTT TTTGGTCT TTA GAATGATTTAGCGAATATCCGCTA : 472
BA12-51 : CCTGAAGTTTATATTC TATCTTCTCTGCA TTTGGTCT TATCTCTCATATGGTGGTAGATTTGTGTGGA AAGAAAGAGTT TTTGGTCT TTA GAATGATTTAGCGAATATCCGCTA : 472
BA14-39 : CCTGAAGTTTATATTC TATCTTCTCTGCA TTTGGTCT TATCTCTCATATGGTGGTAGATTTGTGTGGA AAGAAAGAGTT TTTGGTCT TTA GAATGATTTAGCGAATATCCGCTA : 472
CCTGAAGTTTATATTC TATCTTCTCTGCA TTTGGTCT TATCTCTCATATGGTGGTAGATTTGTGTGGA AAGAAAGAGTT TTTGGTCT TTA GAATGATTTAGCGAATATCCGCTA

*      480      *      500      *      520      *      540      *      560      *      580      *
BA2-4 : TTGGGCTTTAGCTTTTGTAGTTTGAGCACCCACATGTTTACAGTTGGATTAGATGTGGATAGACGGGCTTATTTACTAGCGCTACTATAACAATGCAATCCAACCG GAGTAA : 590
BA7-35 : TTGGGCTTTAGCTTTTGTAGTTTGAGCACCCACATGTTTACAGTTGGATTAGATGTGGATAGACGGGCTTATTTACTAGCGCTACTATAACAATGCAATCCAACCG GAGTAA : 590
BA1-3 : TTGGGCTTTAGCTTTTGTAGTTTGAGCACCCACATGTTTACAGTTGGATTAGATGTGGATAGACGGGCTTATTTACTAGCGCTACTATAACAATGCAATCCAACCG GAGTAA : 590
BA3-13 : TTGGGCTTTAGCTTTTGTAGTTTGAGCACCCACATGTTTACAGTTGGATTAGATGTGGATAGACGGGCTTATTTACTAGCGCTACTATAACAATGCAATCCAACCG GAGTAA : 590
BA6-15 : TTGGGCTTTAGCTTTTGTAGTTTGAGCACCCACATGTTTACAGTTGGATTAGATGTGGATAGACGGGCTTATTTACTAGCGCTACTATAACAATGCAATCCAACCG GAGTAA : 590
BA15-46 : TTGGGCTTTAGCTTTTGTAGTTTGAGCACCCACATGTTTACAGTTGGATTAGATGTGGATAGACGGGCTTATTTACTAGCGCTACTATAACAATGCAATCCAACCG GAGTAA : 590
BA10-21 : TTGGGCTTTAGCTTTTGTAGTTTGAGCACCCACATGTTTACAGTTGGATTAGATGTGGATAGACGGGCTTATTTACTAGCGCTACTATAACAATGCAATCCAACCG GAGTAA : 590
BA13-60 : TTGGGCTTTAGCTTTTGTAGTTTGAGCACCCACATGTTTACAGTTGGATTAGATGTGGATAGACGGGCTTATTTACTAGCGCTACTATAACAATGCAATCCAACCG GAGTAA : 590
BA08-28 : TTGGGCTTTAGCTTTTGTAGTTTGAGCACCCACATGTTTACAGTTGGATTAGATGTGGATAGACGGGCTTATTTACTAGCGCTACTATAACAATGCAATCCAACCG GAGTAA : 590
BA12-51 : TTGGGCTTTAGCTTTTGTAGTTTGAGCACCCACATGTTTACAGTTGGATTAGATGTGGATAGACGGGCTTATTTACTAGCGCTACTATAACAATGCAATCCAACCG GAGTAA : 590
BA14-39 : TTGGGCTTTAGCTTTTGTAGTTTGAGCACCCACATGTTTACAGTTGGATTAGATGTGGATAGACGGGCTTATTTACTAGCGCTACTATAACAATGCAATCCAACCG GAGTAA : 590
TTGGGCTTTAGCTTTTGTAGTTTGAGCACCCACATGTTTACAGTTGGATTAGATGTGGATAGACGGGCTTATTTACTAGCGCTACTATAACAATGCAATCCAACCG GAGTAA

BA2-4 : ACTTTTAG : 599
BA7-35 : ACTTTTAG : 599
BA1-3 : ACTTTTAG : 599
BA3-13 : ACTTTTAG : 599
BA6-15 : ACTTTTAG : 599
BA15-46 : ACTTTTAG : 599
BA10-21 : ACTTTTAG : 599
BA13-60 : ACTTTTAG : 599
BA08-28 : ACTTTTAG : 599
BA12-51 : ACTTTTAG : 599
BA14-39 : ACTTTTAG : 599
AGT TTTAG

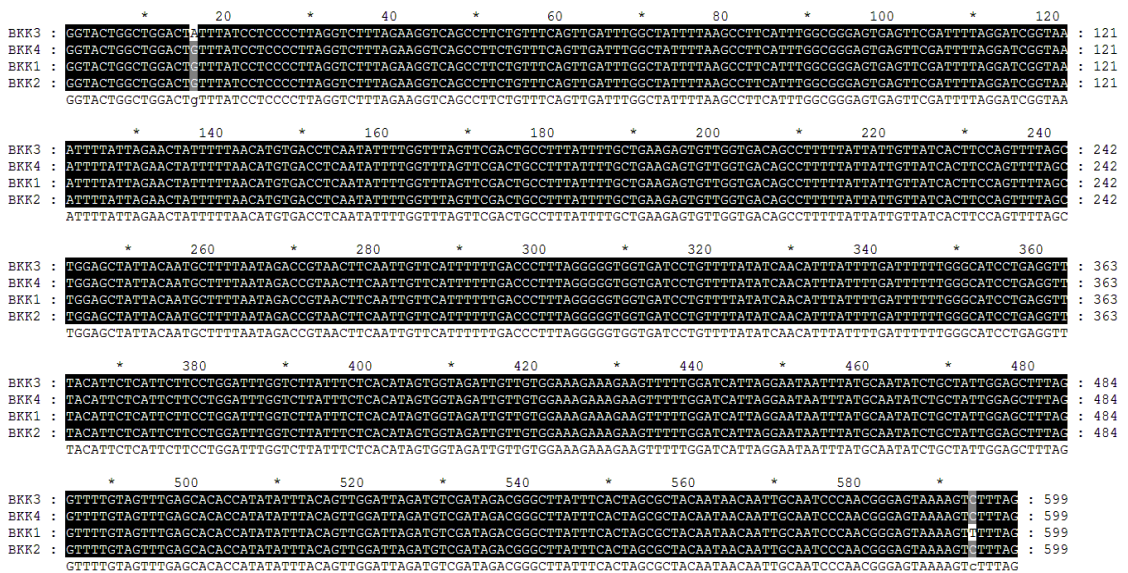
```

รูปที่ 40 แสดง multiple sequence alignment รหัสตัวอย่าง BA จังหวัดเชียงราย





รูปที่ 42 แสดง multiple sequence alignment รหัสตัวอย่าง PA จังหวัดแพร่



รูปที่ 43 แสดง multiple sequence alignment รหัสตัวอย่าง BKK กรุงเทพมหานคร







```

D002_5 : GGTACTGGCTGGACTTTTATCCCCCTTAGGTCCTAGAAAGCCACCTCTGTTTCAGTTGATTTAGCTATTTAAGCTTCATTTCGGGGGTGAGTTCGATTTAGGATCCG : 118
D004_9 : GGTACTGGCTGGACTTTTATCCCCCTTAGGTCCTAGAAAGCCACCTCTGTTTCAGTTGATTTAGCTATTTAAGCTTCATTTCGGGGGTGAGTTCGATTTAGGATCCG : 118
D001_5 : GGTACTGGCTGGACTTTTATCCCCCTTAGGTCCTAGAAAGCCACCTCTGTTTCAGTTGATTTAGCTATTTAAGCTTCATTTCGGGGGTGAGTTCGATTTAGGATCCG : 118
D003_14 : GGTACTGGCTGGACTTTTATCCCCCTTAGGTCCTAGAAAGCCACCTCTGTTTCAGTTGATTTAGCTATTTAAGCTTCATTTCGGGGGTGAGTTCGATTTAGGATCCG : 118
D005_7 : GGTACTGGCTGGACTTTTATCCCCCTTAGGTCCTAGAAAGCCACCTCTGTTTCAGTTGATTTAGCTATTTAAGCTTCATTTCGGGGGTGAGTTCGATTTAGGATCCG : 118
D006_12 : GGTACTGGCTGGACTTTTATCCCCCTTAGGTCCTAGAAAGCCACCTCTGTTTCAGTTGATTTAGCTATTTAAGCTTCATTTCGGGGGTGAGTTCGATTTAGGATCCG : 118
D007_15 : GGTACTGGCTGGACTTTTATCCCCCTTAGGTCCTAGAAAGCCACCTCTGTTTCAGTTGATTTAGCTATTTAAGCTTCATTTCGGGGGTGAGTTCGATTTAGGATCCG : 118
          GGTACTGGCTGGACT TTTATCC CC CTTAGGTCCT TAGAAGG CA CCTCTGTTTCAGTTGATTTAGCTATTTAAG CTTCATTTC GG GGGGTGAGTTCGATTTAGGATCCG

20      *      40      *      60      *      80      *      100      *      120
D002_5 : TAAATTTTATTAGAACTATTTTAAACATTCGCTCAATATTTTGGCTTAGTCGACTGCCTTATTTTGGCTGAGGCTGTGGTACACGCTTTTATATTAGCTTCACCTCCACG : 236
D004_9 : TAAATTTTATTAGAACTATTTTAAACATTCGCTCAATATTTTGGCTTAGTCGACTGCCTTATTTTGGCTGAGGCTGTGGTACACGCTTTTATATTAGCTTCACCTCCACG : 236
D001_5 : TAAATTTTATTAGAACTATTTTAAACATTCGCTCAATATTTTGGCTTAGTCGACTGCCTTATTTTGGCTGAGGCTGTGGTACACGCTTTTATATTAGCTTCACCTCCACG : 236
D003_14 : TAAATTTTATTAGAACTATTTTAAACATTCGCTCAATATTTTGGCTTAGTCGACTGCCTTATTTTGGCTGAGGCTGTGGTACACGCTTTTATATTAGCTTCACCTCCACG : 236
D005_7 : TAAATTTTATTAGAACTATTTTAAACATTCGCTCAATATTTTGGCTTAGTCGACTGCCTTATTTTGGCTGAGGCTGTGGTACACGCTTTTATATTAGCTTCACCTCCACG : 236
D006_12 : TAAATTTTATTAGAACTATTTTAAACATTCGCTCAATATTTTGGCTTAGTCGACTGCCTTATTTTGGCTGAGGCTGTGGTACACGCTTTTATATTAGCTTCACCTCCACG : 236
D007_15 : TAAATTTTATTAGAACTATTTTAAACATTCGCTCAATATTTTGGCTTAGTCGACTGCCTTATTTTGGCTGAGGCTGTGGTACACGCTTTTATATTAGCTTCACCTCCACG : 236
          TAAATTTTATTAGAACTATTTTAAACAT TC COTCAATATTTTGG CTAGTCGACTGCCTTATTTTGGCTG AG GTGGTGGT ACACGCTTTTATATTAG CTTCACCTCCACG

240      *      260      *      280      *      300      *      320      *      340      *
D002_5 : TTTAGCTGGAGCTATTACAATGCTCTTAATAGACCGTAATTCCAATTGCTCAATTTTTTGACCTTAGGGGGTGGTGCATCCGTTTTATAGCAACATTTATTTGATTTTTGGCCAT : 354
D004_9 : TTTAGCTGGAGCTATTACAATGCTCTTAATAGACCGTAATTCCAATTGCTCAATTTTTTGACCTTAGGGGGTGGTGCATCCGTTTTATAGCAACATTTATTTGATTTTTGGCCAT : 354
D001_5 : TTTAGCTGGAGCTATTACAATGCTCTTAATAGACCGTAATTCCAATTGCTCAATTTTTTGACCTTAGGGGGTGGTGCATCCGTTTTATAGCAACATTTATTTGATTTTTGGCCAT : 354
D003_14 : TTTAGCTGGAGCTATTACAATGCTCTTAATAGACCGTAATTCCAATTGCTCAATTTTTTGACCTTAGGGGGTGGTGCATCCGTTTTATAGCAACATTTATTTGATTTTTGGCCAT : 354
D005_7 : TTTAGCTGGAGCTATTACAATGCTCTTAATAGACCGTAATTCCAATTGCTCAATTTTTTGACCTTAGGGGGTGGTGCATCCGTTTTATAGCAACATTTATTTGATTTTTGGCCAT : 354
D006_12 : TTTAGCTGGAGCTATTACAATGCTCTTAATAGACCGTAATTCCAATTGCTCAATTTTTTGACCTTAGGGGGTGGTGCATCCGTTTTATAGCAACATTTATTTGATTTTTGGCCAT : 354
D007_15 : TTTAGCTGGAGCTATTACAATGCTCTTAATAGACCGTAATTCCAATTGCTCAATTTTTTGACCTTAGGGGGTGGTGCATCCGTTTTATAGCAACATTTATTTGATTTTTGGCCAT : 354
          TTTAGCTGGAGCTATTACAATGCT TTAATAGACCGTAA TTCCAATTG CTCAATTTTTGA CCTTAGGGGGTGGTGCATCCGTTTTATA CAACATTTATTTGATTTTTGG CCAT

360      *      380      *      400      *      420      *      440      *      460      *
D002_5 : CCTGAGTTTATATCTGATTCCTCCGGATTGGCTTATCTCTCAATGCTGGTAGATGTTGTGGAAAGAAGAAGTTTTGGGTCATTAGGAATGATTTAGCAATATCCGCTA : 472
D004_9 : CCTGAGTTTATATCTGATTCCTCCGGATTGGCTTATCTCTCAATGCTGGTAGATGTTGTGGAAAGAAGAAGTTTTGGGTCATTAGGAATGATTTAGCAATATCCGCTA : 472
D001_5 : CCTGAGTTTATATCTGATTCCTCCGGATTGGCTTATCTCTCAATGCTGGTAGATGTTGTGGAAAGAAGAAGTTTTGGGTCATTAGGAATGATTTAGCAATATCCGCTA : 472
D003_14 : CCTGAGTTTATATCTGATTCCTCCGGATTGGCTTATCTCTCAATGCTGGTAGATGTTGTGGAAAGAAGAAGTTTTGGGTCATTAGGAATGATTTAGCAATATCCGCTA : 472
D005_7 : CCTGAGTTTATATCTGATTCCTCCGGATTGGCTTATCTCTCAATGCTGGTAGATGTTGTGGAAAGAAGAAGTTTTGGGTCATTAGGAATGATTTAGCAATATCCGCTA : 472
D006_12 : CCTGAGTTTATATCTGATTCCTCCGGATTGGCTTATCTCTCAATGCTGGTAGATGTTGTGGAAAGAAGAAGTTTTGGGTCATTAGGAATGATTTAGCAATATCCGCTA : 472
D007_15 : CCTGAGTTTATATCTGATTCCTCCGGATTGGCTTATCTCTCAATGCTGGTAGATGTTGTGGAAAGAAGAAGTTTTGGGTCATTAGGAATGATTTAGCAATATCCGCTA : 472
          CCTGA GTTAT ATTC TCTCTCCGGATTGGCTTAT CTCTCAATG CTGGTAGATGTTGTGGAAAGAAGAAGTTTTGG TCAATTAGGAAT ATTTA GCAATATC GCTA

480      *      500      *      520      *      540      *      560      *
D002_5 : TTGGGCTTTAGTTTTGTAGTTTGGAGCACACCAATTTTACAGTTGGATTAGATGCTGATAGACGGGCTTATTTACTAGCGCTACTATAACAATTCGAATCCACCGGGAGTAA : 590
D004_9 : TTGGGCTTTAGTTTTGTAGTTTGGAGCACACCAATTTTACAGTTGGATTAGATGCTGATAGACGGGCTTATTTACTAGCGCTACTATAACAATTCGAATCCACCGGGAGTAA : 590
D001_5 : TTGGGCTTTAGTTTTGTAGTTTGGAGCACACCAATTTTACAGTTGGATTAGATGCTGATAGACGGGCTTATTTACTAGCGCTACTATAACAATTCGAATCCACCGGGAGTAA : 590
D003_14 : TTGGGCTTTAGTTTTGTAGTTTGGAGCACACCAATTTTACAGTTGGATTAGATGCTGATAGACGGGCTTATTTACTAGCGCTACTATAACAATTCGAATCCACCGGGAGTAA : 590
D005_7 : TTGGGCTTTAGTTTTGTAGTTTGGAGCACACCAATTTTACAGTTGGATTAGATGCTGATAGACGGGCTTATTTACTAGCGCTACTATAACAATTCGAATCCACCGGGAGTAA : 590
D006_12 : TTGGGCTTTAGTTTTGTAGTTTGGAGCACACCAATTTTACAGTTGGATTAGATGCTGATAGACGGGCTTATTTACTAGCGCTACTATAACAATTCGAATCCACCGGGAGTAA : 590
D007_15 : TTGGGCTTTAGTTTTGTAGTTTGGAGCACACCAATTTTACAGTTGGATTAGATGCTGATAGACGGGCTTATTTACTAGCGCTACTATAACAATTCGAATCCACCGGGAGTAA : 590
          TTGG GCTTTAGTTTTGTAGTTTGGAGCACACCA AT TTTACAGTTGGATTAGATGCT GATAGACGGGCTTATTT ACTAGCGCTAC ATAACAATTCGAAT CCACCGGGAGTAA

D002_5 : AGT tttag : 599
D004_9 : AGT tttag : 599
D001_5 : AGT tttag : 599
D003_14 : AGT tttag : 599
D005_7 : AGT tttag : 599
D006_12 : AGT tttag : 599
D007_15 : AGT tttag : 599
          AGT tttag

```

รูปที่ 46 แสดง multiple sequence alignment รหัสตัวอย่าง D จังหวัดน่าน



```

S001_3 : GGTACTGGCTGGACTTTTATCCCCCTTAGGTCCTAGAAAGCCACCTCTGTTTCAGTTGATTTAGCTATTTAAGCTTCATTACGAGGAGTGGAGTTCGATTTAGGATCAGTAA : 121
S003_4 : GGTACTGGCTGGACTTTTATCCCCCTTAGGTCCTAGAAAGCCACCTCTGTTTCAGTTGATTTAGCTATTTAAGCTTCATTACGAGGAGTGGAGTTCGATTTAGGATCAGTAA : 121
          GGTACTGGCTGGACT TTTATCCCCCTTAGGTCCTAGAAAGCCACCTCTGTTTCAGTTGATTTAGCTATTTAAGCTTCATTACGAGGAGTGGAGTTCGATTTAGGATCAGTAA

140      *      160      *      180      *      200      *      220      *      240
S001_3 : TTTTATTAGAACTATTTTAAACATATGGCCCTCAATATTTTGGCTTAGTCGACTGCCTTATTTTGGCTGGAGAGTGTGGTAAACAGCCTTTTATATTACTGCTCCTCCAGTTTATAG : 242
S003_4 : TTTTATTAGAACTATTTTAAACATATGGCCCTCAATATTTTGGCTTAGTCGACTGCCTTATTTTGGCTGGAGAGTGTGGTAAACAGCCTTTTATATTACTGCTCCTCCAGTTTATAG : 242
          TTTTATTAGAACTATTTTAAACATATGGCCCTCAATATTTTGGCTTAGTCGACTGCCTTATTTTGGCTGGAGAGTGTGGTAAACAGCCTTTTATATTACTGCTCCTCCAGTTTATAG

260      *      280      *      300      *      320      *      340      *      360
S001_3 : TGGAGCTATTACAATGCTCTTAATAGACCGTAATTCCAATTGCTCAATTTTTTGACCTTAGGGGGTGGTGCATCCGTTTTATAGCAACATTTATTTGATTTTTGGGACATCCGAGT : 363
S003_4 : TGGAGCTATTACAATGCTCTTAATAGACCGTAATTCCAATTGCTCAATTTTTTGACCTTAGGGGGTGGTGCATCCGTTTTATAGCAACATTTATTTGATTTTTGGGACATCCGAGT : 363
          TGGAGCTATTACAATGCTCTTAATAGACCGTAATTCCAATTGCTCAATTTTTTGATCCCTTAGGGGGTGGTGCATCCGTTTTATAACAACATTTATTTGATTTTTGGGACATCCGAGT

380      *      400      *      420      *      440      *      460      *      480
S001_3 : TATATCTTATTCCTCCGGATTGGCTTATCTCTCATATGGTGGTAGATGTTGTGGAAAGAAGAAGTTTTGGGTCATTAGGAATGATTTAGCAATATCCGCTATTGGGGCTTTAG : 484
S003_4 : TATATCTTATTCCTCCGGATTGGCTTATCTCTCATATGGTGGTAGATGTTGTGGAAAGAAGAAGTTTTGGGTCATTAGGAATGATTTAGCAATATCCGCTATTGGGGCTTTAG : 484
          TATATCTTATTCCTCCGGATTGGCTTATCTCTCATATGGTGGTAGATGTTGTGGAAAGAAGAAGTTTTGGGTCATTAGGAATGATTTAGCAATATCCGCTATTGGGGCTTTAG

500      *      520      *      540      *      560      *      580
S001_3 : GTTTTCTAGTTTGGAGCACATCACAATGTTTACAGTTGGATTAGATGCTGATAGACGGGCTTATTTACTAGCGCTACTATAACAATTCGAATCCACCGGGAGTAAAGCTTTTAC : 599
S003_4 : GTTTTCTAGTTTGGAGCACATCACAATGTTTACAGTTGGATTAGATGCTGATAGACGGGCTTATTTACTAGCGCTACTATAACAATTCGAATCCACCGGGAGTAAAGCTTTTAC : 599
          GTTTTCTAGTTTGGAGCACATCACAATGTTTACAGTTGGATTAGATGCTGATAGACGGGCTTATTTACTAGCGCTACTATAACAATTCGAATCCACCGGGAGT AAAGCTTTTAC


```

รูปที่ 47 แสดง multiple sequence alignment รหัสตัวอย่าง S จังหวัดน่าน

```

*      20      *      40      *      60      *      80      *      100      *      1
A001-2 : GGTACTGGCTGGACTTTTATCCCCCTTAGGTCCTAGAGGCCAACCTTCIGTTTCGTTGATTTAGCTATTTAAGCTTCATTTCGCGGAGTGGAGTCGATTTAGGATCAG : 118
A004-9 : GGTACTGGCTGGACTTTTATCCCCCTTAGGTCCTAGAGGCCAACCTTCIGTTTCGTTGATTTAGCTATTTAAGCTTCATTTCGCGGAGTGGAGTCGATTTAGGATCAG : 118
A005-13 : GGTACTGGCTGGACTTTTATCCCCCTTAGGTCCTAGAGGCCAACCTTCIGTTTCGTTGATTTAGCTATTTAAGCTTCATTTCGCGGAGTGGAGTCGATTTAGGATCAG : 118
A006-16 : GGTACTGGCTGGACTTTTATCCCCCTTAGGTCCTAGAGGCCAACCTTCIGTTTCGTTGATTTAGCTATTTAAGCTTCATTTCGCGGAGTGGAGTCGATTTAGGATCAG : 118
A002-6 : GGTACTGGCTGGACTTTTATCCCCCTTAGGTCCTAGAGGCCAACCTTCIGTTTCGTTGATTTAGCTATTTAAGCTTCATTTCGCGGAGTGGAGTCGATTTAGGATCAG : 118
      GGTACTGGCTGGACTTTTATCCCCCTTAGGTCCTAGAGGCCAACCTTCIGTTTCGTTGATTTAGCTATTTAAGCTTCATTTCGCGGAGTGGAGTCGATTTAGGATCAG

20      *      140      *      160      *      180      *      200      *      220      *
A001-2 : TAAATTTTATTAGAAGCTATTTTAAACATATGCGCTCAATATTTGGCTTAGTTCGACTGCCTTATTTTGGCTGAGAGTGTGGTACAGCCTTTTATATTACTCTCACTCCAGT : 236
A004-9 : TAAATTTTATTAGAAGCTATTTTAAACATATGCGCTCAATATTTGGCTTAGTTCGACTGCCTTATTTTGGCTGAGAGTGTGGTACAGCCTTTTATATTACTCTCACTCCAGT : 236
A005-13 : TAAATTTTATTAGAAGCTATTTTAAACATATGCGCTCAATATTTGGCTTAGTTCGACTGCCTTATTTTGGCTGAGAGTGTGGTACAGCCTTTTATATTACTCTCACTCCAGT : 236
A006-16 : TAAATTTTATTAGAAGCTATTTTAAACATATGCGCTCAATATTTGGCTTAGTTCGACTGCCTTATTTTGGCTGAGAGTGTGGTACAGCCTTTTATATTACTCTCACTCCAGT : 236
A002-6 : TAAATTTTATTAGAAGCTATTTTAAACATATGCGCTCAATATTTGGCTTAGTTCGACTGCCTTATTTTGGCTGAGAGTGTGGTACAGCCTTTTATATTACTCTCACTCCAGT : 236
      TAAATTTTATTAGAAGCTATTTTAAACATATGCGCTCAATATTTGGCTTAGTTCGACTGCCTTATTTTGGCTGAGAGTGTGGTACAGCCTTTTATATTACTCTCACTCCAGT

240      *      260      *      280      *      300      *      320      *      340      *
A001-2 : TTTAGCTGGAGCTATTACAATGCTTTAATAGACCGTAATTCAAATGCTCATTTTTTGAACCTTAGGGGGTGGTGCCTGTTTTATACACACTTTATTTGATTTTTGGACAT : 354
A004-9 : TTTAGCTGGAGCTATTACAATGCTTTAATAGACCGTAATTCAAATGCTCATTTTTTGAACCTTAGGGGGTGGTGCCTGTTTTATACACACTTTATTTGATTTTTGGACAT : 354
A005-13 : TTTAGCTGGAGCTATTACAATGCTTTAATAGACCGTAATTCAAATGCTCATTTTTTGAACCTTAGGGGGTGGTGCCTGTTTTATACACACTTTATTTGATTTTTGGACAT : 354
A006-16 : TTTAGCTGGAGCTATTACAATGCTTTAATAGACCGTAATTCAAATGCTCATTTTTTGAACCTTAGGGGGTGGTGCCTGTTTTATACACACTTTATTTGATTTTTGGACAT : 354
A002-6 : TTTAGCTGGAGCTATTACAATGCTTTAATAGACCGTAATTCAAATGCTCATTTTTTGAACCTTAGGGGGTGGTGCCTGTTTTATACACACTTTATTTGATTTTTGGACAT : 354
      TTTAGCTGGAGCTATTACAATGCTTTAATAGACCGTAATTCAAATGCTCATTTTTTGAACCTTAGGGGGTGGTGCCTGTTTTATACACACTTTATTTGATTTTTGGACAT

360      *      380      *      400      *      420      *      440      *      460      *
A001-2 : CCTCACTTTAATTCATTCCTCCCGGATTTGCTCATATCTCAATCTGGTAGTTCCTCGAAGAAAGAAAGTFTTTGGCTCATAGCAATATTTAGCAATTCGCA : 472
A004-9 : CCTCACTTTAATTCATTCCTCCCGGATTTGCTCATATCTCAATCTGGTAGTTCCTCGAAGAAAGAAAGTFTTTGGCTCATAGCAATATTTAGCAATTCGCA : 472
A005-13 : CCTCACTTTAATTCATTCCTCCCGGATTTGCTCATATCTCAATCTGGTAGTTCCTCGAAGAAAGAAAGTFTTTGGCTCATAGCAATATTTAGCAATTCGCA : 472
A006-16 : CCTCACTTTAATTCATTCCTCCCGGATTTGCTCATATCTCAATCTGGTAGTTCCTCGAAGAAAGAAAGTFTTTGGCTCATAGCAATATTTAGCAATTCGCA : 472
A002-6 : CCTCACTTTAATTCATTCCTCCCGGATTTGCTCATATCTCAATCTGGTAGTTCCTCGAAGAAAGAAAGTFTTTGGCTCATAGCAATATTTAGCAATTCGCA : 472
      CCTCACTTTAATTCATTCCTCCCGGATTTGCTCATATCTCAATCTGGTAGTTCCTCGAAGAAAGAAAGTFTTTGGCTCATAGCAATATTTAGCAATTCGCA

480      *      500      *      520      *      540      *      560      *      580      *
A001-2 : TTGGGCTTTAGCTTTTGTAGTTTGGACACATCAATTTTACAGTTGGATTAGATGCTGATAGACGGGCTTATTTACTAGCGCTACTATACAAATTCGAATCCCAACGGGATAA : 590
A004-9 : TTGGGCTTTAGCTTTTGTAGTTTGGACACATCAATTTTACAGTTGGATTAGATGCTGATAGACGGGCTTATTTACTAGCGCTACTATACAAATTCGAATCCCAACGGGATAA : 590
A005-13 : TTGGGCTTTAGCTTTTGTAGTTTGGACACATCAATTTTACAGTTGGATTAGATGCTGATAGACGGGCTTATTTACTAGCGCTACTATACAAATTCGAATCCCAACGGGATAA : 590
A006-16 : TTGGGCTTTAGCTTTTGTAGTTTGGACACATCAATTTTACAGTTGGATTAGATGCTGATAGACGGGCTTATTTACTAGCGCTACTATACAAATTCGAATCCCAACGGGATAA : 590
A002-6 : TTGGGCTTTAGCTTTTGTAGTTTGGACACATCAATTTTACAGTTGGATTAGATGCTGATAGACGGGCTTATTTACTAGCGCTACTATACAAATTCGAATCCCAACGGGATAA : 590
      TTGGGCTTTAGCTTTTGTAGTTTGGACACATCAATTTTACAGTTGGATTAGATGCTGATAGACGGGCTTATTTACTAGCGCTACTATACAAATTCGAATCCCAACGGGATAA

A001-2 : AGCTTTAG : 599
A004-9 : AGCTTTAG : 599
A005-13 : AGCTTTAG : 599
A006-16 : AGCTTTAG : 599
A002-6 : AGCTTTAG : 599
      AGcttTAG

```

รูปที่ 48 แสดง multiple sequence alignment รหัสตัวอย่าง A จังหวัดมุกดาหาร



```

*      20      *      40      *      60      *      80      *      100      *      120
T001 : GGTACTGGCTGGACTTTTATCCCCCTTAGGTCCTAGAGGCCAACCTTCIGTTTCGTTGATTTAGCTATTTAAGCTTCATTTCGCGGAGTGGAGTCGATTTAGGATCAGTAAAT : 123
T003 : GGTACTGGCTGGACTTTTATCCCCCTTAGGTCCTAGAGGCCAACCTTCIGTTTCGTTGATTTAGCTATTTAAGCTTCATTTCGCGGAGTGGAGTCGATTTAGGATCAGTAAAT : 123
T002 : GGTACTGGCTGGACTTTTATCCCCCTTAGGTCCTAGAGGCCAACCTTCIGTTTCGTTGATTTAGCTATTTAAGCTTCATTTCGCGGAGTGGAGTCGATTTAGGATCAGTAAAT : 123
      GGTACTGGCTGGACTTTTATCCCCCTTAGGTCCTAGAGGCCAACCTTCIGTTTCGTTGATTTAGCTATTTAAGCTTCATTTCGCGGAGTGGAGTCGATTTAGGATCAGTAAAT

*      140      *      160      *      180      *      200      *      220      *      240
T001 : TTTATTAGAAGCTATTTTAAACATATGCGCTCAATATTTGGCTTAGTTCGACTGCCTTATTTTGGCTGAGAGTGTGGTACAGCCTTTTATATTACTCTCACTCCAGTTTTAGCTGGA : 246
T003 : TTTATTAGAAGCTATTTTAAACATATGCGCTCAATATTTGGCTTAGTTCGACTGCCTTATTTTGGCTGAGAGTGTGGTACAGCCTTTTATATTACTCTCACTCCAGTTTTAGCTGGA : 246
T002 : TTTATTAGAAGCTATTTTAAACATATGCGCTCAATATTTGGCTTAGTTCGACTGCCTTATTTTGGCTGAGAGTGTGGTACAGCCTTTTATATTACTCTCACTCCAGTTTTAGCTGGA : 246
      TTTATTAGAAGCTATTTTAAACATATGCGCTCAATATTTGGCTTAGTTCGACTGCCTTATTTTGGCTGAGAGTGTGGTACAGCCTTTTATATTACTCTCACTCCAGTTTTAGCTGGA

*      260      *      280      *      300      *      320      *      340      *      360
T001 : GCTATTACAATGCTCTTAATAGACCGTAATTCAAATGCTCATTTTTTGAACCTTAGGGGGTGGTGCCTGTTTTATACCAACATTTATTTGATTTTTTGGACATCCCTGAAGTTTTATATT : 369
T003 : GCTATTACAATGCTCTTAATAGACCGTAATTCAAATGCTCATTTTTTGAACCTTAGGGGGTGGTGCCTGTTTTATACCAACATTTATTTGATTTTTTGGACATCCCTGAAGTTTTATATT : 369
T002 : GCTATTACAATGCTCTTAATAGACCGTAATTCAAATGCTCATTTTTTGAACCTTAGGGGGTGGTGCCTGTTTTATACCAACATTTATTTGATTTTTTGGACATCCCTGAAGTTTTATATT : 369
      GCTATTACAATGCTCTTAATAGACCGTAATTCAAATGCTCATTTTTTGAACCTTAGGGGGTGGTGCCTGTTTTATACCAACATTTATTTGATTTTTTGGACATCCCTGAAGTTTTATATT

*      380      *      400      *      420      *      440      *      460      *      480
T001 : CTTATTCTCCCTGGATTTGGCTTATCTCTCATATGGTGGTAGATTGTTGTGGAAGAAGAAGTTTTGGGTCATTAGGAATGATTTACGCAATATCCGCTATTGGGGCTTTAGGTTTTGTA : 492
T003 : CTTATTCTCCCTGGATTTGGCTTATCTCTCATATGGTGGTAGATTGTTGTGGAAGAAGAAGTTTTGGGTCATTAGGAATGATTTACGCAATATCCGCTATTGGGGCTTTAGGTTTTGTA : 492
T002 : CTTATTCTCCCTGGATTTGGCTTATCTCTCATATGGTGGTAGATTGTTGTGGAAGAAGAAGTTTTGGGTCATTAGGAATGATTTACGCAATATCCGCTATTGGGGCTTTAGGTTTTGTA : 492
      CTTATTCTCCCTGGATTTGGCTTATCTCTCATATGGTGGTAGATTGTTGTGGAAGAAGAAGTTTTGGGTCATTAGGAATGATTTACGCAATATCCGCTATTGGGGCTTTAGGTTTTGTA

500      *      520      *      540      *      560      *      580      *
T001 : GTTTGAGCACATCACATGTTTACAGTTGGATTAGATGGTAGACGGGCTTATTTACTAGCGCTACTATAACAATTCGAATCCCAACGGGAGTAAAAGCTTTTAG : 599
T003 : GTTTGAGCACATCACATGTTTACAGTTGGATTAGATGGTAGACGGGCTTATTTACTAGCGCTACTATAACAATTCGAATCCCAACGGGAGTAAAAGCTTTTAG : 599
T002 : GTTTGAGCACATCACATGTTTACAGTTGGATTAGATGGTAGACGGGCTTATTTACTAGCGCTACTATAACAATTCGAATCCCAACGGGAGTAAAAGCTTTTAG : 599
      GTTTGAGCACATCACATGTTTACAGTTGGATTAGATGGTAGACGGGCTTATTTACTAGCGCTACTATAACAATTCGAATCCCAACGGGAGTAAAAGCTTTTAG

```

รูปที่ 49 แสดง multiple sequence alignment รหัสตัวอย่าง T จังหวัดนครราชสีมา



```

*          20          *          40          *          60          *          80          *          100          *          120
N001 : GGTACTGGCTGGACTTTTATCCCCCTTAGGTCCTAGAAAGGCCAACCTTCTGTTTCAGTTGATTAGCTATTTAAGTCCTCATTAGCAGGAGTGAGTTCGATTTTAGGATCAGTAA : 121
N003 : GGTACTGGCTGGACTTTTATCCCCCTTAGGTCCTAGAAAGGCCAACCTTCTGTTTCAGTTGATTAGCTATTTAAGTCCTCATTAGCAGGAGTGAGTTCGATTTTAGGATCAGTAA : 121
N004 : GGTACTGGCTGGACTTTTATCCCCCTTAGGTCCTAGAAAGGCCAACCTTCTGTTTCAGTTGATTAGCTATTTAAGTCCTCATTAGCAGGAGTGAGTTCGATTTTAGGATCAGTAA : 121
N006 : GGTACTGGCTGGACTTTTATCCCCCTTAGGTCCTAGAAAGGCCAACCTTCTGTTTCAGTTGATTAGCTATTTAAGTCCTCATTAGCAGGAGTGAGTTCGATTTTAGGATCAGTAA : 121
N002 : GGTACTGGCTGGACTTTTATCCCCCTTAGGTCCTAGAAAGGCCAACCTTCTGTTTCAGTTGATTAGCTATTTAAGTCCTCATTAGCAGGAGTGAGTTCGATTTTAGGATCAGTAA : 121
N005 : GGTACTGGCTGGACTTTTATCCCCCTTAGGTCCTAGAAAGGCCAACCTTCTGTTTCAGTTGATTAGCTATTTAAGTCCTCATTAGCAGGAGTGAGTTCGATTTTAGGATCAGTAA : 121
GGTACTGGCTGGACT TTTATCCCCCTTAGGTCCTAGAAAGGCCAACCTTCTGTTTCAGTTGATTAGCTATTTAAGTCCTCATTAGCAGGAGTGAGTTCGATTTTAGGATCAGTAA

*          140          *          160          *          180          *          200          *          220          *          240
N001 : ATTTTATTAGAACAATTTTAAACATATGGCCCTCAATATTTGGCTTAGTTCGACTGCCTTATTTTGGCTGGAGAGTGTGGTAAACAGCCTTTTATTTACTGTCACTCCAGTTTTAGG : 242
N003 : ATTTTATTAGAACAATTTTAAACATATGGCCCTCAATATTTGGCTTAGTTCGACTGCCTTATTTTGGCTGGAGAGTGTGGTAAACAGCCTTTTATTTACTGTCACTCCAGTTTTAGG : 242
N004 : ATTTTATTAGAACAATTTTAAACATATGGCCCTCAATATTTGGCTTAGTTCGACTGCCTTATTTTGGCTGGAGAGTGTGGTAAACAGCCTTTTATTTACTGTCACTCCAGTTTTAGG : 242
N006 : ATTTTATTAGAACAATTTTAAACATATGGCCCTCAATATTTGGCTTAGTTCGACTGCCTTATTTTGGCTGGAGAGTGTGGTAAACAGCCTTTTATTTACTGTCACTCCAGTTTTAGG : 242
N002 : ATTTTATTAGAACAATTTTAAACATATGGCCCTCAATATTTGGCTTAGTTCGACTGCCTTATTTTGGCTGGAGAGTGTGGTAAACAGCCTTTTATTTACTGTCACTCCAGTTTTAGG : 242
N005 : ATTTTATTAGAACAATTTTAAACATATGGCCCTCAATATTTGGCTTAGTTCGACTGCCTTATTTTGGCTGGAGAGTGTGGTAAACAGCCTTTTATTTACTGTCACTCCAGTTTTAGG : 242
ATTTTATTAGAACAATTTTAAACATATGGCCCTCAATATTTGGCTTAGTTCGACTGCCTTATTTTGGCTGGAGAGTGTGGTAAACAGCCTTTTATTTACTGTCACTCCAGTTTTAGG

*          260          *          280          *          300          *          320          *          340          *          360
N001 : TGGAGCTATTACAATGCCTTAAATAGACCGTAATTCGAATGCTCAATTTTATGTCCTTTAGGGGCTGGTATCCTGTTTTATACCAACATTTATTTGATTTTTGGACATCCTGAAGTT : 363
N003 : TGGAGCTATTACAATGCCTTAAATAGACCGTAATTCGAATGCTCAATTTTATGTCCTTTAGGGGCTGGTATCCTGTTTTATACCAACATTTATTTGATTTTTGGACATCCTGAAGTT : 363
N004 : TGGAGCTATTACAATGCCTTAAATAGACCGTAATTCGAATGCTCAATTTTATGTCCTTTAGGGGCTGGTATCCTGTTTTATACCAACATTTATTTGATTTTTGGACATCCTGAAGTT : 363
N006 : TGGAGCTATTACAATGCCTTAAATAGACCGTAATTCGAATGCTCAATTTTATGTCCTTTAGGGGCTGGTATCCTGTTTTATACCAACATTTATTTGATTTTTGGACATCCTGAAGTT : 363
N002 : TGGAGCTATTACAATGCCTTAAATAGACCGTAATTCGAATGCTCAATTTTATGTCCTTTAGGGGCTGGTATCCTGTTTTATACCAACATTTATTTGATTTTTGGACATCCTGAAGTT : 363
N005 : TGGAGCTATTACAATGCCTTAAATAGACCGTAATTCGAATGCTCAATTTTATGTCCTTTAGGGGCTGGTATCCTGTTTTATACCAACATTTATTTGATTTTTGGACATCCTGAAGTT : 363
TGGAGCTATTACAATGCCTTAAATAGACCGTAATTCGAATGCTCAATTTTATGTCCTTTAGGGGCTGGTATCCTGTTTTATACCAACATTTATTTGATTTTTGGACATCCTGAAGTT

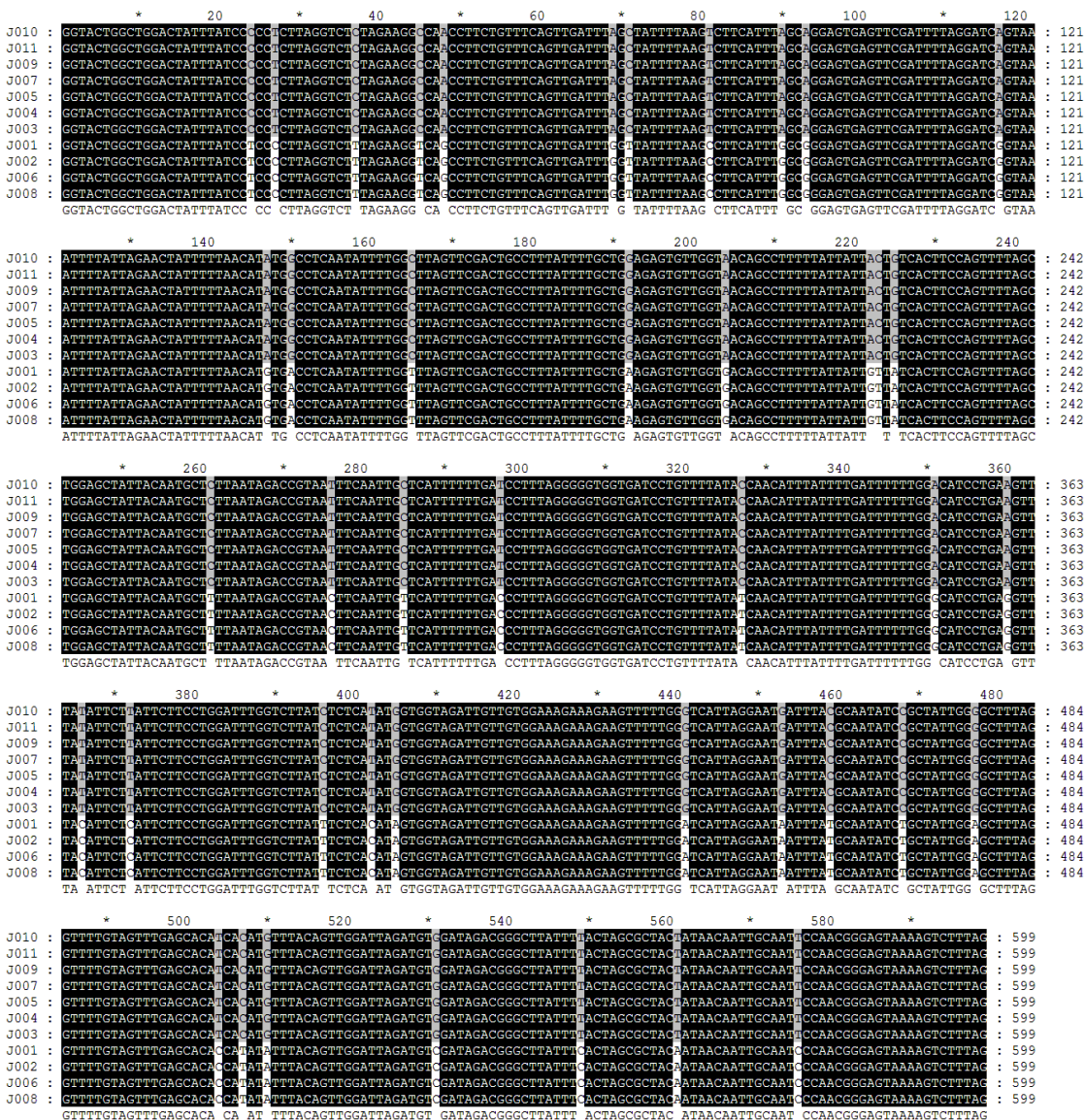
*          380          *          400          *          420          *          440          *          460          *          480
N001 : TATATTTCTTATTTCTCCRGGATTTGGCTTATCTCTCATARGTGGTAGATTCTGTGGAAGAAGAAGTTTTGGGTCATTAGGAATGATTTACGCAATATCCCGTATTGGGGCTTTAG : 484
N003 : TATATTTCTTATTTCTCCRGGATTTGGCTTATCTCTCATARGTGGTAGATTCTGTGGAAGAAGAAGTTTTGGGTCATTAGGAATGATTTACGCAATATCCCGTATTGGGGCTTTAG : 484
N004 : TATATTTCTTATTTCTCCRGGATTTGGCTTATCTCTCATARGTGGTAGATTCTGTGGAAGAAGAAGTTTTGGGTCATTAGGAATGATTTACGCAATATCCCGTATTGGGGCTTTAG : 484
N006 : TATATTTCTTATTTCTCCRGGATTTGGCTTATCTCTCATARGTGGTAGATTCTGTGGAAGAAGAAGTTTTGGGTCATTAGGAATGATTTACGCAATATCCCGTATTGGGGCTTTAG : 484
N002 : TATATTTCTTATTTCTCCRGGATTTGGCTTATCTCTCATARGTGGTAGATTCTGTGGAAGAAGAAGTTTTGGGTCATTAGGAATGATTTACGCAATATCCCGTATTGGGGCTTTAG : 484
N005 : TATATTTCTTATTTCTCCRGGATTTGGCTTATCTCTCATARGTGGTAGATTCTGTGGAAGAAGAAGTTTTGGGTCATTAGGAATGATTTACGCAATATCCCGTATTGGGGCTTTAG : 484
TATATTTCTTATTTCTCCRGGATTTGGCTTATCTCTCATARGTGGTAGATTCTGTGGAAGAAGAAGTTTTGGGTCATTAGGAATGATTTACGCAATATCCCGTATTGGGGCTTTAG

*          500          *          520          *          540          *          560          *          580
N001 : GTTTTGTAGTTTGGACACATCACATGTTTACAGTTGGATTAGATGTGGATAGACGGGCTTATTTTACTAGCGCTACTATAACAATTGCAATTCACACGGGACTAAAAGTCTTTAG : 599
N003 : GTTTTGTAGTTTGGACACATCACATGTTTACAGTTGGATTAGATGTGGATAGACGGGCTTATTTTACTAGCGCTACTATAACAATTGCAATTCACACGGGACTAAAAGTCTTTAG : 599
N004 : GTTTTGTAGTTTGGACACATCACATGTTTACAGTTGGATTAGATGTGGATAGACGGGCTTATTTTACTAGCGCTACTATAACAATTGCAATTCACACGGGACTAAAAGTCTTTAG : 599
N006 : GTTTTGTAGTTTGGACACATCACATGTTTACAGTTGGATTAGATGTGGATAGACGGGCTTATTTTACTAGCGCTACTATAACAATTGCAATTCACACGGGACTAAAAGTCTTTAG : 599
N002 : GTTTTGTAGTTTGGACACATCACATGTTTACAGTTGGATTAGATGTGGATAGACGGGCTTATTTTACTAGCGCTACTATAACAATTGCAATTCACACGGGACTAAAAGTCTTTAG : 599
N005 : GTTTTGTAGTTTGGACACATCACATGTTTACAGTTGGATTAGATGTGGATAGACGGGCTTATTTTACTAGCGCTACTATAACAATTGCAATTCACACGGGACTAAAAGTCTTTAG : 599
GTTTTGTAGTTTGGACACATCACATGTTTACAGTTGGATTAGATGTGGATAGACGGGCTTATTTTACTAGCGCTACTATAACAATTGCAATTCACACGGGACTAAAAGTCTTTAG

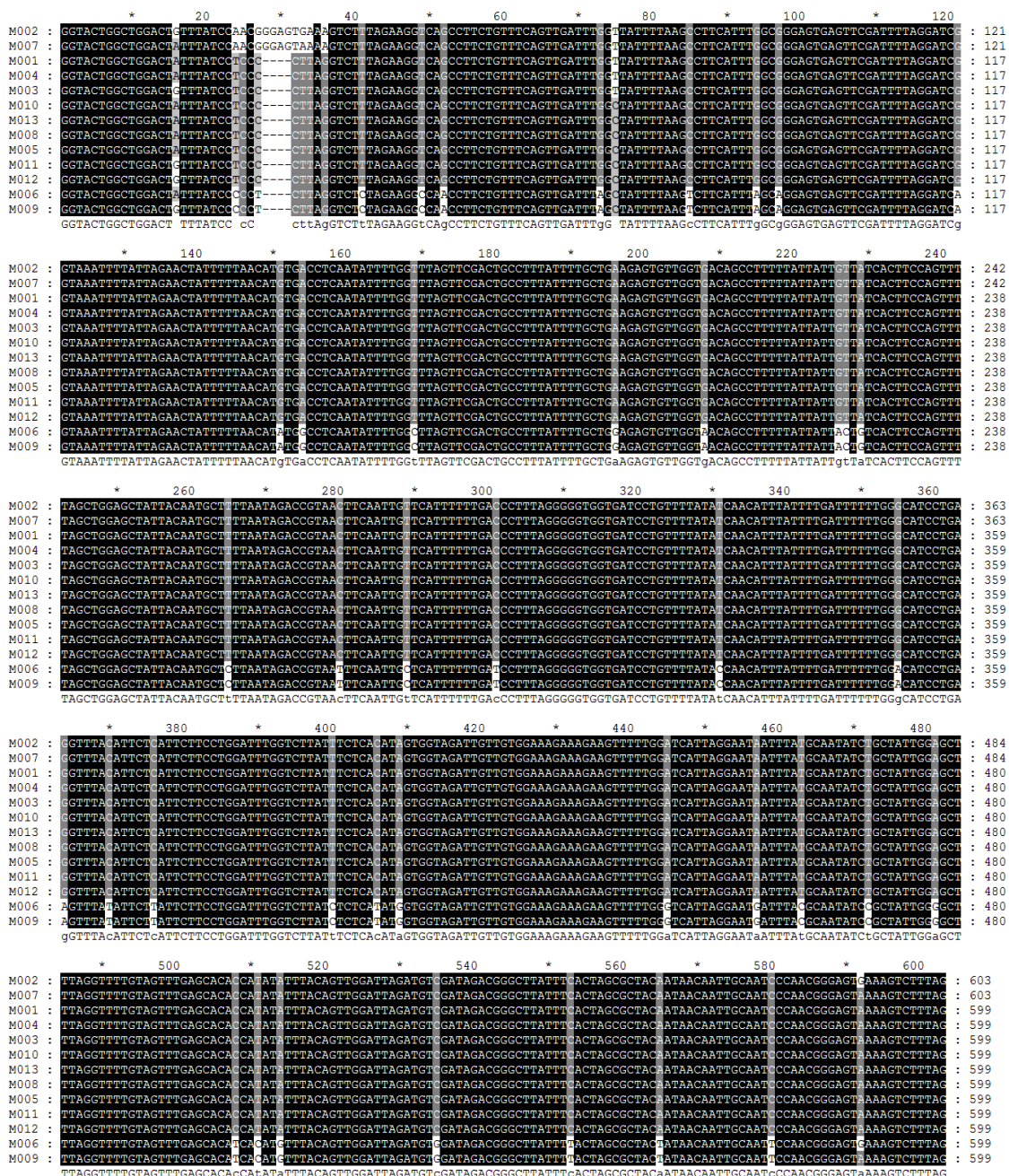
```

รูปที่ 51 แสดง multiple sequence alignment รหัสตัวอย่าง N จังหวัดนครราชสีมา

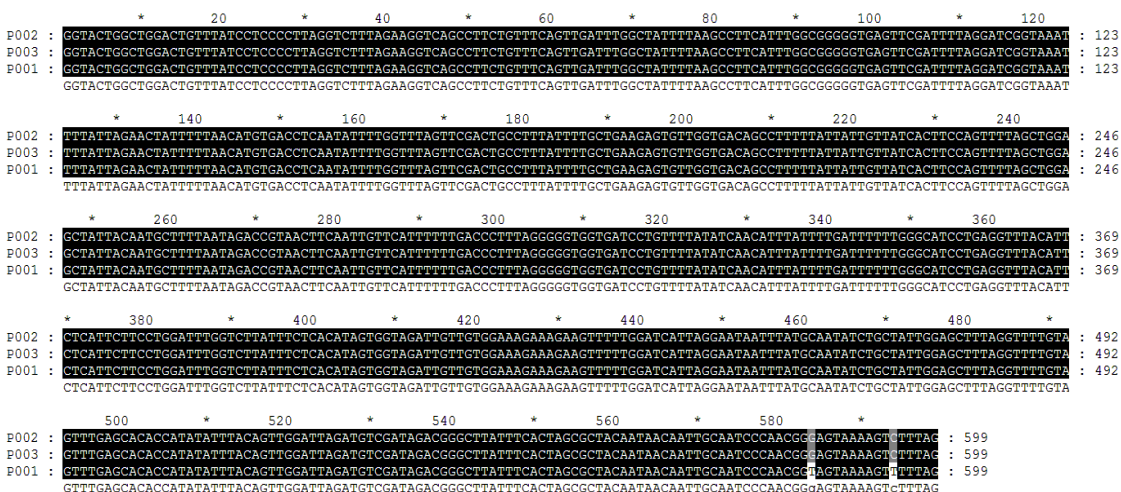




รูปที่ 52 แสดง multiple sequence alignment รหัสตัวอย่าง J จังหวัดเลย



รูปที่ 53 แสดง multiple sequence alignment รหัสตัวอย่าง M จังหวัดเลย



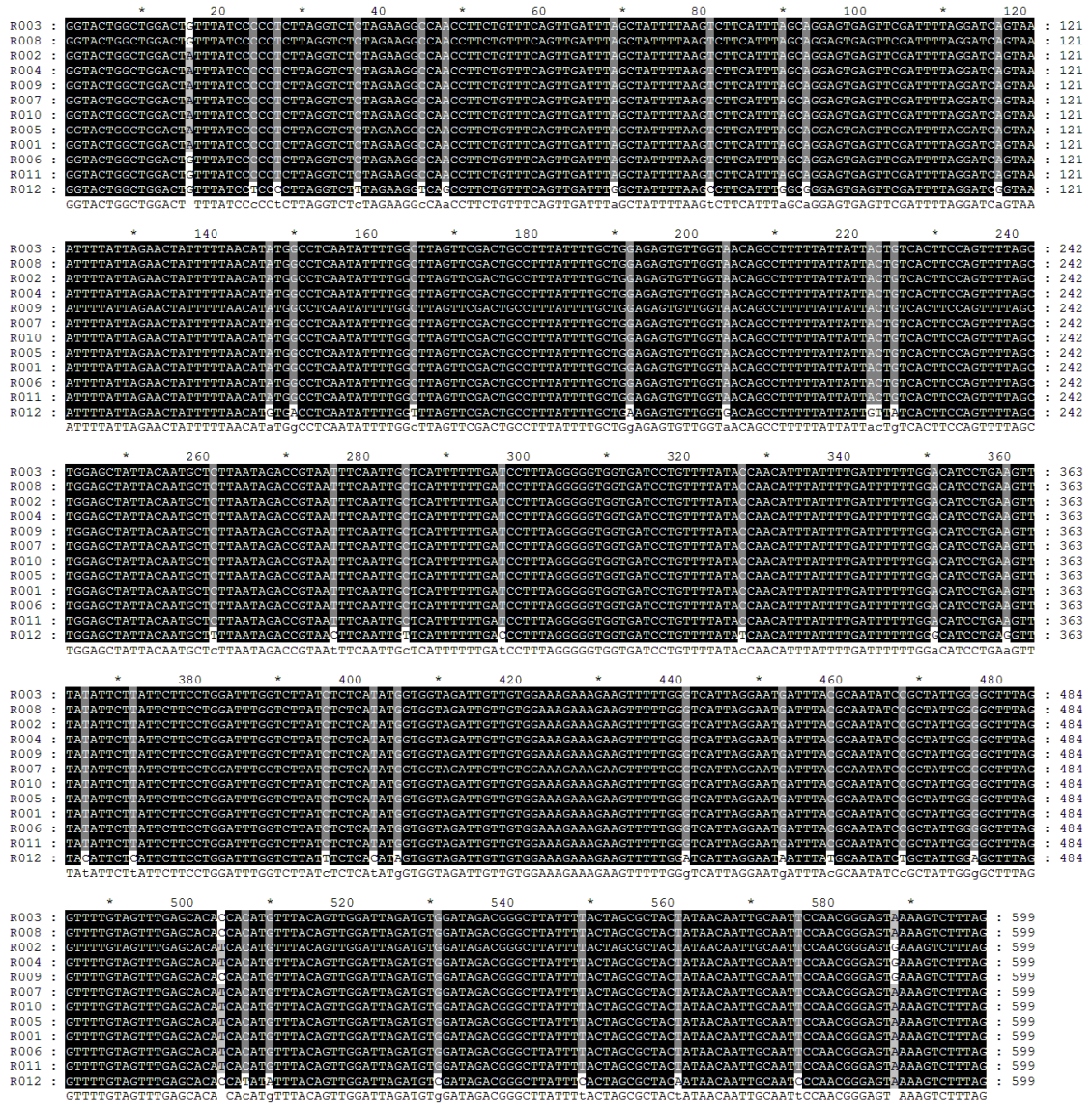
รูปที่ 54 แสดง multiple sequence alignment รหัสตัวอย่าง P จังหวัดพัทลุง



รูปที่ 55 แสดง multiple sequence alignment รหัสตัวอย่าง W จังหวัดพัทลุง

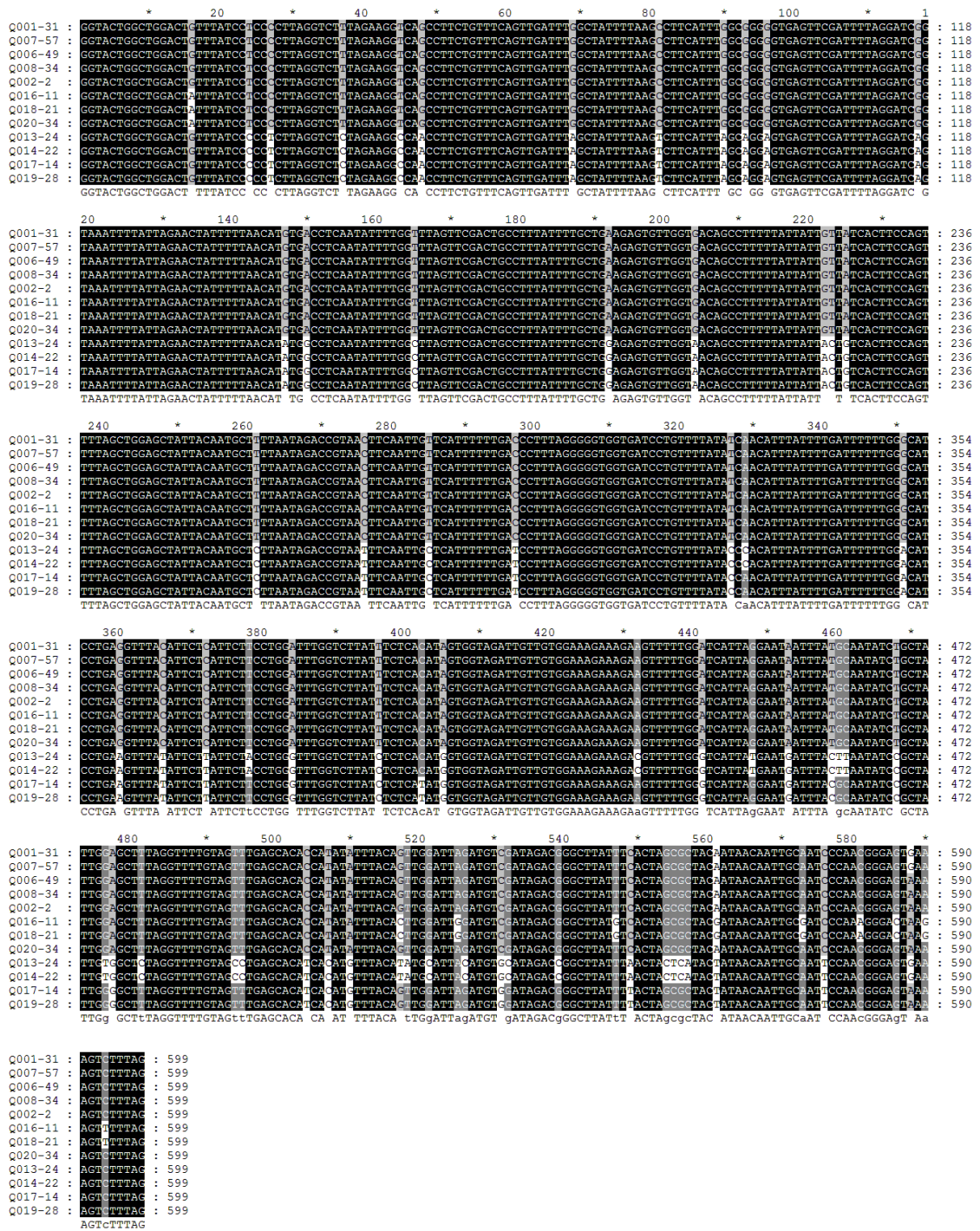






รูปที่ 57 แสดง multiple sequence alignment รหัสตัวอย่าง R จังหวัดระยอง





รูปที่ 59 แสดง multiple sequence alignment รหัสตัวอย่าง Q จังหวัดสงขลา





```

*          20          *          40          *          60          *          80          *          100          *          120
KA101 : GGTACTGGCTGGACATTTATCCOCT---CTAGGTCTCAGAGGCCACCTTCCTGTTTCAGTTGATTTGCTATTTAAGCTTCATTGAGAGGAGTGAATTCGATTTAGGATC : 116
KA102 : GGTACTGGCTGGACATTTATCCOCT---CTAGGTCTCAGAGGCCACCTTCCTGTTTCAGTTGATTTGCTATTTAAGCTTCATTGAGAGGAGTGAATTCGATTTAGGATC : 116
KP101 : GGTACTGGCTGGACATTTATCCOCT---CTAGGTCTCAGAGGCCACCTTCCTGTTTCAGTTGATTTGCTATTTAAGCTTCATTGAGAGGAGTGAATTCGATTTAGGATC : 116
KP102 : GGTACTGGCTGGACATTTATCCOCT---CTAGGTCTCAGAGGCCACCTTCCTGTTTCAGTTGATTTGCTATTTAAGCTTCATTGAGAGGAGTGAATTCGATTTAGGATC : 116
KP601 : GGTACTGGCTGGACATTTATCCOCT---CTAGGTCTCAGAGGCCACCTTCCTGTTTCAGTTGATTTGCTATTTAAGCTTCATTGAGAGGAGTGAATTCGATTTAGGATC : 116
KP602 : GGTACTGGCTGGACATTTATCCOCT---CTAGGTCTCAGAGGCCACCTTCCTGTTTCAGTTGATTTGCTATTTAAGCTTCATTGAGAGGAGTGAATTCGATTTAGGATC : 116
KP603 : GGTACTGGCTGGACATTTATCCOCT---CTAGGTCTCAGAGGCCACCTTCCTGTTTCAGTTGATTTGCTATTTAAGCTTCATTGAGAGGAGTGAATTCGATTTAGGATC : 116
KP202 : GGTACTGGCTGGACATTTATCCOCT---CTAGGTCTCAGAGGCCACCTTCCTGTTTCAGTTGATTTGCTATTTAAGCTTCATTGAGAGGAGTGAATTCGATTTAGGATC : 120
KP304 : GGTACTGGCTGGACATTTATCCOCT---CTAGGTCTCAGAGGCCACCTTCCTGTTTCAGTTGATTTGCTATTTAAGCTTCATTGAGAGGAGTGAATTCGATTTAGGATC : 120
KP502 : GGTACTGGCTGGACATTTATCCOCT---CTAGGTCTCAGAGGCCACCTTCCTGTTTCAGTTGATTTGCTATTTAAGCTTCATTGAGAGGAGTGAATTCGATTTAGGATC : 116
GGTACTGGCTGGACT TTTATCC c c tagGTCr taGaaG Ca CCTTCCTGTTTCAGTTGATTT GCTATTTAAG CTTCATT GC GGAGTGAATTCGATTTAGG ATC

```

```

*          140          *          160          *          180          *          200          *          220          *          240
KA101 : AGTAAATTTATTAGAACATTTTAAACATTTGCCTCAATATTTGGCTTAGTTCGACTGCCTTTATTTGGCTGAGAGTGTGGTACAGCCTTTTATTATTTAGTTCACCTTCCAGT : 236
KA102 : AGTAAATTTATTAGAACATTTTAAACATTTGCCTCAATATTTGGCTTAGTTCGACTGCCTTTATTTGGCTGAGAGTGTGGTACAGCCTTTTATTATTTAGTTCACCTTCCAGT : 236
KP101 : AGTAAATTTATTAGAACATTTTAAACATTTGCCTCAATATTTGGCTTAGTTCGACTGCCTTTATTTGGCTGAGAGTGTGGTACAGCCTTTTATTATTTAGTTCACCTTCCAGT : 236
KP102 : AGTAAATTTATTAGAACATTTTAAACATTTGCCTCAATATTTGGCTTAGTTCGACTGCCTTTATTTGGCTGAGAGTGTGGTACAGCCTTTTATTATTTAGTTCACCTTCCAGT : 236
KP601 : AGTAAATTTATTAGAACATTTTAAACATTTGCCTCAATATTTGGCTTAGTTCGACTGCCTTTATTTGGCTGAGAGTGTGGTACAGCCTTTTATTATTTAGTTCACCTTCCAGT : 236
KP602 : AGTAAATTTATTAGAACATTTTAAACATTTGCCTCAATATTTGGCTTAGTTCGACTGCCTTTATTTGGCTGAGAGTGTGGTACAGCCTTTTATTATTTAGTTCACCTTCCAGT : 236
KP603 : AGTAAATTTATTAGAACATTTTAAACATTTGCCTCAATATTTGGCTTAGTTCGACTGCCTTTATTTGGCTGAGAGTGTGGTACAGCCTTTTATTATTTAGTTCACCTTCCAGT : 236
KP202 : AGTAAATTTATTAGAACATTTTAAACATTTGCCTCAATATTTGGCTTAGTTCGACTGCCTTTATTTGGCTGAGAGTGTGGTACAGCCTTTTATTATTTAGTTCACCTTCCAGT : 240
KP304 : AGTAAATTTATTAGAACATTTTAAACATTTGCCTCAATATTTGGCTTAGTTCGACTGCCTTTATTTGGCTGAGAGTGTGGTACAGCCTTTTATTATTTAGTTCACCTTCCAGT : 240
KP502 : AGTAAATTTATTAGAACATTTTAAACATTTGCCTCAATATTTGGCTTAGTTCGACTGCCTTTATTTGGCTGAGAGTGTGGTACAGCCTTTTATTATTTAGTTCACCTTCCAGT : 236
GTAATTTATTAGAACATTTTAAACAT TG CCTCAATATTTGG CTAGTTCGACTGCCTTTATTTGGCTG AGAGTGTGGT ACAGCCTTTTATTAT T TCACCTTCCAGT

```

```

*          260          *          280          *          300          *          320          *          340          *          360
KA101 : TTTAGCTGGAGCTATTACAATGCCCTTAATAGACCGTAA TTCCAATTCCTCAATTTTTCACCTTTAGGGGTGGTGATCCCGTTTTATACCAACATTTATTTGATTTTTGGCATCC : 356
KA102 : TTTAGCTGGAGCTATTACAATGCCCTTAATAGACCGTAA TTCCAATTCCTCAATTTTTCACCTTTAGGGGTGGTGATCCCGTTTTATACCAACATTTATTTGATTTTTGGCATCC : 356
KP101 : TTTAGCTGGAGCTATTACAATGCCCTTAATAGACCGTAA TTCCAATTCCTCAATTTTTCACCTTTAGGGGTGGTGATCCCGTTTTATACCAACATTTATTTGATTTTTGGCATCC : 356
KP102 : TTTAGCTGGAGCTATTACAATGCCCTTAATAGACCGTAA TTCCAATTCCTCAATTTTTCACCTTTAGGGGTGGTGATCCCGTTTTATACCAACATTTATTTGATTTTTGGCATCC : 356
KP601 : TTTAGCTGGAGCTATTACAATGCCCTTAATAGACCGTAA TTCCAATTCCTCAATTTTTCACCTTTAGGGGTGGTGATCCCGTTTTATACCAACATTTATTTGATTTTTGGCATCC : 356
KP602 : TTTAGCTGGAGCTATTACAATGCCCTTAATAGACCGTAA TTCCAATTCCTCAATTTTTCACCTTTAGGGGTGGTGATCCCGTTTTATACCAACATTTATTTGATTTTTGGCATCC : 356
KP603 : TTTAGCTGGAGCTATTACAATGCCCTTAATAGACCGTAA TTCCAATTCCTCAATTTTTCACCTTTAGGGGTGGTGATCCCGTTTTATACCAACATTTATTTGATTTTTGGCATCC : 356
KP202 : TTTAGCTGGAGCTATTACAATGCCCTTAATAGACCGTAA TTCCAATTCCTCAATTTTTCACCTTTAGGGGTGGTGATCCCGTTTTATACCAACATTTATTTGATTTTTGGCATCC : 360
KP304 : TTTAGCTGGAGCTATTACAATGCCCTTAATAGACCGTAA TTCCAATTCCTCAATTTTTCACCTTTAGGGGTGGTGATCCCGTTTTATACCAACATTTATTTGATTTTTGGCATCC : 360
KP502 : TTTAGCTGGAGCTATTACAATGCCCTTAATAGACCGTAA TTCCAATTCCTCAATTTTTCACCTTTAGGGGTGGTGATCCCGTTTTATACCAACATTTATTTGATTTTTGGCATCC : 356
TTTAGCTGGAGCTATTACAATGCCCTTAATAGACCGTAA TTCCAATTCCTCAATTTTTCACCTTTAGGGGTGGTGATCCCGTTTTATACCAACATTTATTTGATTTTTGGCATCC

```

```

*          380          *          400          *          420          *          440          *          460          *          480
KA101 : TGAAGTTTAAATTCCTATTCCTCCCGATTGGCTTATCTCTCAATGCTGGTAGATTGTTGTGGAAGAAGAAGTTTTTGGTTCATTAGGAATGATTTAGCAATATCGCTATTGG : 476
KA102 : TGAAGTTTAAATTCCTATTCCTCCCGATTGGCTTATCTCTCAATGCTGGTAGATTGTTGTGGAAGAAGAAGAAGTTTTTGGTTCATTAGGAATGATTTAGCAATATCGCTATTGG : 476
KP101 : TGAAGTTTAAATTCCTATTCCTCCCGATTGGCTTATCTCTCAATGCTGGTAGATTGTTGTGGAAGAAGAAGAAGTTTTTGGTTCATTAGGAATGATTTAGCAATATCGCTATTGG : 476
KP102 : TGAAGTTTAAATTCCTATTCCTCCCGATTGGCTTATCTCTCAATGCTGGTAGATTGTTGTGGAAGAAGAAGAAGTTTTTGGTTCATTAGGAATGATTTAGCAATATCGCTATTGG : 476
KP601 : TGAAGTTTAAATTCCTATTCCTCCCGATTGGCTTATCTCTCAATGCTGGTAGATTGTTGTGGAAGAAGAAGAAGTTTTTGGTTCATTAGGAATGATTTAGCAATATCGCTATTGG : 476
KP602 : TGAAGTTTAAATTCCTATTCCTCCCGATTGGCTTATCTCTCAATGCTGGTAGATTGTTGTGGAAGAAGAAGAAGTTTTTGGTTCATTAGGAATGATTTAGCAATATCGCTATTGG : 476
KP603 : TGAAGTTTAAATTCCTATTCCTCCCGATTGGCTTATCTCTCAATGCTGGTAGATTGTTGTGGAAGAAGAAGAAGTTTTTGGTTCATTAGGAATGATTTAGCAATATCGCTATTGG : 476
KP202 : TGAAGTTTAAATTCCTATTCCTCCCGATTGGCTTATCTCTCAATGCTGGTAGATTGTTGTGGAAGAAGAAGAAGTTTTTGGTTCATTAGGAATGATTTAGCAATATCGCTATTGG : 480
KP304 : TGAAGTTTAAATTCCTATTCCTCCCGATTGGCTTATCTCTCAATGCTGGTAGATTGTTGTGGAAGAAGAAGAAGTTTTTGGTTCATTAGGAATGATTTAGCAATATCGCTATTGG : 480
KP502 : TGAAGTTTAAATTCCTATTCCTCCCGATTGGCTTATCTCTCAATGCTGGTAGATTGTTGTGGAAGAAGAAGAAGTTTTTGGTTCATTAGGAATGATTTAGCAATATCGCTATTGG : 476
TGA GTTTAA ATTC ATTCCTCCCGATTGGCTTAT CTCTCAATGCTGGTAGATTGTTGTGGAAGAAGAAGAAGTTTTTGGTTCATTAGGAAT ATTTA GCAATATC GCTATTGG

```

```

*          500          *          520          *          540          *          560          *          580          *          600
KA101 : GCCTTTAGGTTTTGAGTTTGGACACACCAATTTACAGTTGGATTAGATGTCGATAGACGGGCTTATTTACTAGCGCTACATAACAATTTGCAATCCACGGGAGTAAAGTCTTT : 596
KA102 : GCCTTTAGGTTTTGAGTTTGGACACACCAATTTACAGTTGGATTAGATGTCGATAGACGGGCTTATTTACTAGCGCTACATAACAATTTGCAATCCACGGGAGTAAAGTCTTT : 596
KP101 : GCCTTTAGGTTTTGAGTTTGGACACACCAATTTACAGTTGGATTAGATGTCGATAGACGGGCTTATTTACTAGCGCTACATAACAATTTGCAATCCACGGGAGTAAAGTCTTT : 596
KP102 : GCCTTTAGGTTTTGAGTTTGGACACACCAATTTACAGTTGGATTAGATGTCGATAGACGGGCTTATTTACTAGCGCTACATAACAATTTGCAATCCACGGGAGTAAAGTCTTT : 596
KP601 : GCCTTTAGGTTTTGAGTTTGGACACACCAATTTACAGTTGGATTAGATGTCGATAGACGGGCTTATTTACTAGCGCTACATAACAATTTGCAATCCACGGGAGTAAAGTCTTT : 596
KP602 : GCCTTTAGGTTTTGAGTTTGGACACACCAATTTACAGTTGGATTAGATGTCGATAGACGGGCTTATTTACTAGCGCTACATAACAATTTGCAATCCACGGGAGTAAAGTCTTT : 596
KP603 : GCCTTTAGGTTTTGAGTTTGGACACACCAATTTACAGTTGGATTAGATGTCGATAGACGGGCTTATTTACTAGCGCTACATAACAATTTGCAATCCACGGGAGTAAAGTCTTT : 596
KP202 : GCCTTTAGGTTTTGAGTTTGGACACACCAATTTACAGTTGGATTAGATGTCGATAGACGGGCTTATTTACTAGCGCTACATAACAATTTGCAATCCACGGGAGTAAAGTCTTT : 600
KP304 : GCCTTTAGGTTTTGAGTTTGGACACACCAATTTACAGTTGGATTAGATGTCGATAGACGGGCTTATTTACTAGCGCTACATAACAATTTGCAATCCACGGGAGTAAAGTCTTT : 600
KP502 : GCCTTTAGGTTTTGAGTTTGGACACACCAATTTACAGTTGGATTAGATGTCGATAGACGGGCTTATTTACTAGCGCTACATAACAATTTGCAATCCACGGGAGTAAAGTCTTT : 596
GCTTTAGGTTTTGAGTTTGGACACA CA AT TTTACAGTTGGATTAGATGTCGATAGACGGGCTTATTT ACTAGCGCTAC ATACAATTTGCAAT CCACGGGAGTAAAGTCTTT

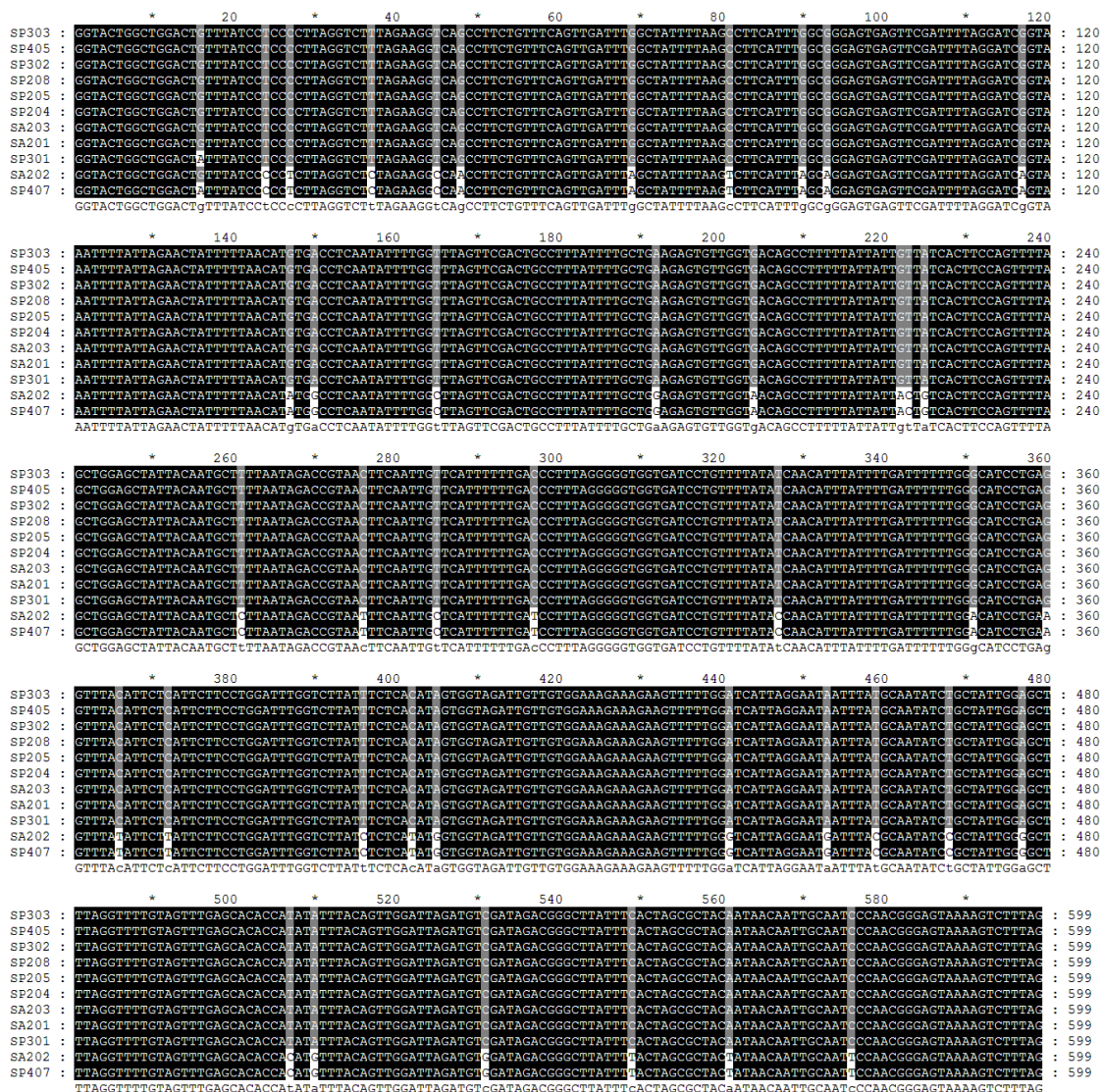
```

```

KA101 : TAG : 599
KA102 : TAG : 599
KP101 : TAG : 599
KP102 : TAG : 599
KP601 : TAG : 599
KP602 : TAG : 599
KP603 : TAG : 599
KP202 : TAG : 603
KP304 : TAG : 603
KP502 : TAG : 599
TAG

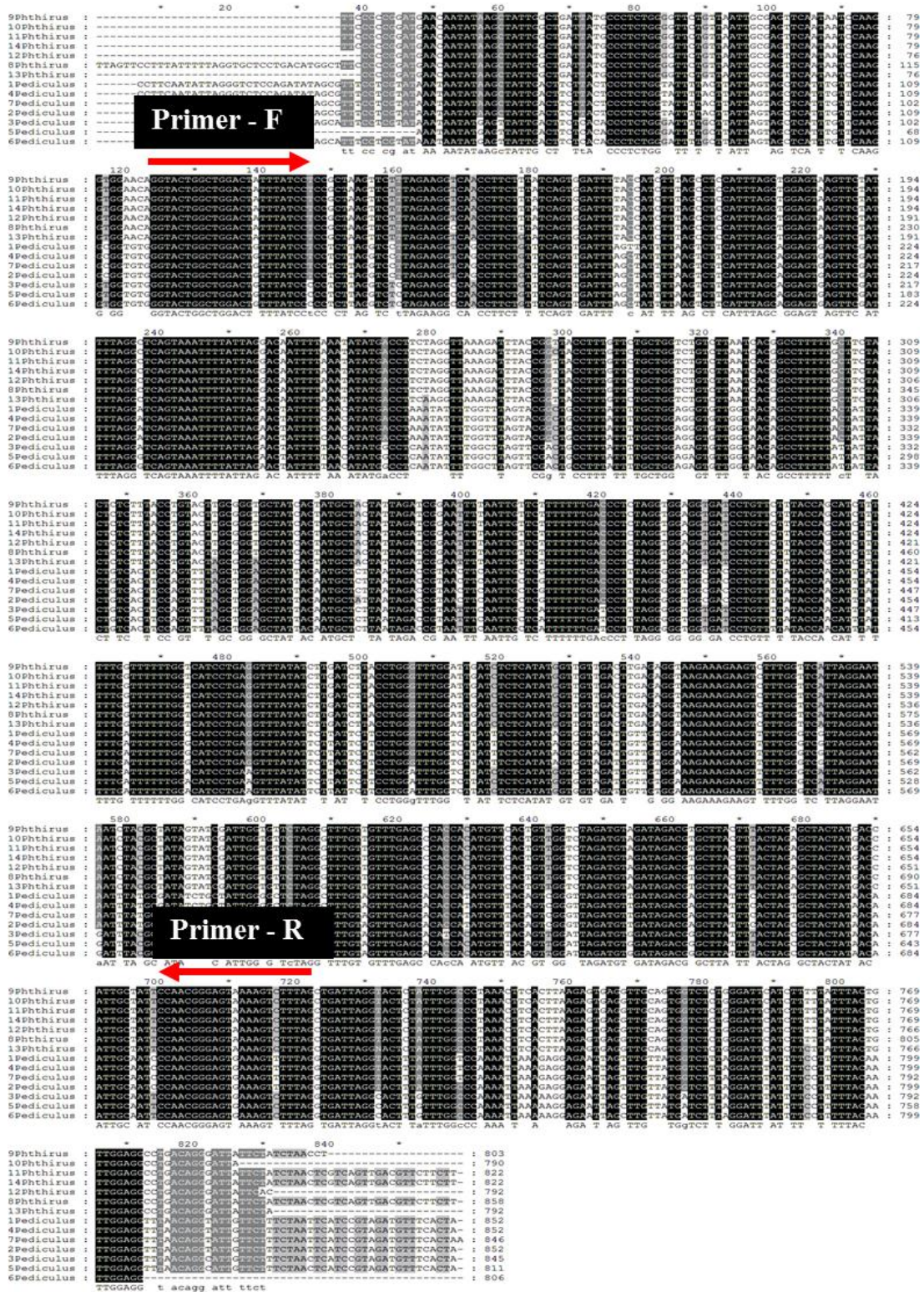
```

รูปที่ 62 แสดง multiple sequence alignment รหัสตัวอย่าง KA และ KP จังหวัดนครปฐม



รูปที่ 63 แสดง multiple sequence alignment รหัสตัวอย่าง SA และ SP จังหวัดนครปฐม





รูปที่ 64 แสดงการออกแบบ Primer เพื่อใช้ในงานขั้นตอน PCR

ตารางที่ 19 ขนาดยีน COI เลขทะเบียนยีน ค่า %identity และฐานข้อมูลอ้างอิง

สถานที่และรหัสตัวอย่าง	(Accession No.)	ขนาดยีน COI (bp)	%identity	อ้างอิง
น่าน				
S001	KP143459	599	99	KC685851
S003	KP143460	599	99	KC685851
D001	KP143290	599	100	EU493392
D002	KP143291	599	99	EU493392
D003	KP143292	599	99	EU493392
D004	KP143293	599	99	EU493392
D005	KP143294	599	97	KC685849
D006	KP143295	599	97	KC685849
D007	KP143296	599	97	KC685849
แพร่				
PA01	KP143404	599	99	KC867686
PA02	KP143405	599	99	KC867686
PA03	KP143406	599	99	KC867686
PA04	KP143407	599	99	KC867686
เชียงราย				
BA1	KP143266	599	99	EU493442
BA2	KP143267	599	99	EU493442
BA3	KP143268	599	99	EU493442
BA6	KP143269	599	99	KC685851
BA7	KP143270	599	99	EU493442
BA8	KP143271	599	100	EU493392
BA10	KP143272	599	99	EU493392
BA12	KP143273	599	99	EU493392
BA13	KP143274	599	99	EU493392
BA14	KP143275	599	91	EU493392
BA15	KP143276	599	99	EU493392
RA1	KP143449	599	99	KC685851
RA2	KP143450	599	98	KC685849
RA3	KP143451	599	99	KC685851
RA4	KP143452	599	97	KC685849
RA5	KP143453	599	100	EU493392
RA6	KP143454	599	99	KC867686
RA7	KP143455	599	99	EU493392
RA8	KP143456	599	99	EU493392
RA9	KP143457	599	97	KC685849
RA10	KP143458	599	97	KC685849

สถานที่และรหัสตัวอย่าง	(Accession No.)	ขนาดยีน COI (bp)	%identity	อ้างอิง
ลพบุรี				
L001	KP143359	599	99	KC685851
L002	KP143360	599	99	KC685851
L003	KP143361	599	99	KC685851
L004	KP143362	599	99	KC685851
L005	KP143363	599	95	KC685851
L006	KP143364	599	99	KC685851
L007	KP143365	599	100	KC685851
L008	KP143366	599	99	KC685851
L009	KP143367	599	99	KC685851
L010	KP143368	599	99	KC685851
สระบุรี				
C001	KP143281	599	97	KC685849
C002	KP143282	599	97	KC685841
C003	KP143283	599	97	KC685849
C004	KP143284	599	97	KC685849
C005	KP143285	599	97	KC685849
C006	KP143286	599	97	KC685849
C007	KP143287	599	97	KC685849
C008	KP143288	599	97	KC685849
C009	KP143289	599	97	KC685849
กรุงเทพฯ				
BKK1	KP143277	599	97	KC685849
BKK2	KP143278	599	97	KC685849
BKK3	KP143279	599	97	KC685849
BKK4	KP143280	599	97	KC685849
นครปฐม				
KA101	KP143486	599	99	KC685851
KA102	KP143487	599	99	KC685851
KP101	KP143488	599	99	KC685851
KP102	KP143489	599	99	KC685851
KP202	KP143490	603*	98	KC685849
KP304	KP143491	603*	98	KC685849
KP502	KP143492	599	97	KC685849
KP601	KP143493	599	99	EU493442
KP602	KP143494	599	99	EU493442
KP603	KP143495	599	99	EU493442

สถานที่และรหัสตัวอย่าง	(Accession No.)	ขนาดยีน COI (bp)	%identity	อ้างอิง
นครปฐม				
SA201	KP143496	599	97	KC685849
SA202	KP143497	599	99	KC867686
SA203	KP143498	599	97	KC685849
SP204	KP143499	599	97	KC685849
SP205	KP143500	599	97	KC685849
SP208	KP143501	599	97	KC685849
SP301	KP143502	599	97	KC685849
SP302	KP143503	599	97	KC685849
SP303	KP143504	599	97	KC685849
SP405	KP143505	599	97	KC685849
SP407	KP143506	599	99	KC867686
เลย				
J001	KP143336	599	97	KC685849
J002	KP143337	599	97	KC685849
J003	KP143338	599	99	KC685851
J004	KP143339	599	99	KC685851
J005	KP143340	599	99	KC685851
J006	KP143341	599	97	KC685849
J007	KP143342	599	99	KC685851
J008	KP143343	599	97	KC685849
J009	KP143344	599	99	KC685851
J010	KP143345	599	99	KC685851
J011	KP143346	599	99	KC685851
M001	KP143369	599	97	KC685849
M002	KP143370	603	98	KC685849
M003	KP143371	599	97	KC685849
M004	KP143372	599	97	KC685849
M005	KP143373	599	97	KC685849
M006	KP143374	599	99	KC685851
M007	KP143375	603	98	KC685849
M008	KP143376	599	97	KC685849
M009	KP143377	599	99	KC685851
M010	KP143378	599	97	KC685849
M011	KP143379	599	97	KC685849
M012	KP143380	599	97	KC685849
M013	KP143381	599	97	KC685849

สถานที่และรหัสตัวอย่าง	(Accession No.)	ขนาดยีน COI (bp)	%identity	อ้างอิง
นครราชสีมา				
T001	KP143461	599	99	KC685851
T002	KP143462	599	99	KC685851
T003	KP143463	599	99	KC685851
N001	KP143382	599	99	KC685851
N002	KP143383	599	99	KC685851
N003	KP143384	599	99	KC685851
N004	KP143385	599	99	KC685851
N005	KP143386	599	99	KC685851
N006	KP143387	599	99	KC685851
G001	KP143297	599	97	KC685849
G002	KP143298	599	99	KC685851
G003	KP143299	599	99	KC685851
G004	KP143300	599	99	KC685851
G005	KP143301	599	99	KC685851
G006	KP143302	599	99	KC685851
G007	KP143303	599	97	KC685849
G008	KP143304	599	99	KC685851
G009	KP143305	599	99	KC685851
G010	KP143306	599	99	KC685851
G011	KP143307	599	99	KC685851
G012	KP143308	599	99	KC867686
G013	KP143309	599	99	KC685851
G014	KP143310	599	99	KC685851
G015	KP143311	599	99	KC685851
G016	KP143312	599	99	KC685851
G017	KP143313	599	99	KC685851
มุกดาหาร				
A001	KP143232	599	99	KC685851
A002	KP143233	599	97	KC685849
A004	KP143234	599	99	KC685851
A005	KP143235	599	99	KC685851
A006	KP143236	599	99	KC685851

สถานที่และรหัสตัวอย่าง	(Accession No.)	ขนาดยีน COI (bp)	%identity	อ้างอิง
กาญจนบุรี				
B002	KP143237	599	99	KC685851
B003	KP143238	599	99	KC685851
B005	KP143239	599	99	KC685851
B006	KP143240	599	99	KC685851
B007	KP143241	599	99	KC685851
B010	KP143242	599	99	KC685851
B011	KP143243	599	99	KC685851
B012	KP143244	599	99	KC685851
B013	KP143245	599	99	KC685851
B014	KP143246	599	99	KC685851
B015	KP143247	599	99	KC685851
B016	KP143248	599	99	KC685851
B017	KP143249	599	99	KC685851
B018	KP143250	599	99	KC685851
B019	KP143251	599	99	KC685851
B021	KP143252	599	99	KC685851
B022	KP143253	599	99	KC685851
B023	KP143254	599	99	KC685851
B024	KP143255	599	99	KC685851
B025	KP143256	599	99	KC685851
B026	KP143257	599	99	KC685851
B027	KP143258	599	99	KC685851
B028	KP143259	599	99	KC685851
B029	KP143260	599	99	KC685851
B031	KP143261	599	99	KC685851
B032	KP143262	599	99	KC685851
B033	KP143263	599	99	KC685851
B034	KP143264	599	99	KC685851
B035	KP143265	599	99	KC685851
H001	KP143314	599	97	KC685849
H002	KP143315	599	99	KC685851
H005	KP143316	599	99	KC685851
H006	KP143317	599	99	KC685851
H007	KP143318	599	99	KC685851
H008	KP143319	599	99	KC685851

สถานที่และรหัสตัวอย่าง	(Accession No.)	ขนาดยีน COI (bp)	%identity	อ้างอิง
กาญจนบุรี				
H009	KP143320	599	99	KC685851
H010	KP143321	599	99	KC685851
H011	KP143322	599	99	KC685851
H012	KP143323	599	99	KC685851
H013	KP143324	599	99	KC685851
H014	KP143325	599	99	KC685851
H015	KP143326	599	99	KC685851
H016	KP143327	599	99	KC685851
H017	KP143328	599	99	KC685851
H018	KP143329	599	99	KC685851
H019	KP143330	599	99	KC685851
H020	KP143331	599	99	KC685851
H021	KP143332	599	97	KC685849
H022	KP143333	599	99	KC685851
H023	KP143334	599	97	KC685849
H024	KP143335	599	97	KC685849
ระยอง				
R001	KP143437	599	99	KC685851
R002	KP143438	599	99	KC685851
R003	KP143439	599	99	KC685851
R004	KP143440	599	99	KC685851
R005	KP143441	599	99	KC685851
R006	KP143442	599	99	KC685851
R007	KP143443	599	99	KC685851
R008	KP143444	599	99	KC685851
R009	KP143445	599	99	KC685851
R010	KP143446	599	99	KC685851
R011	KP143447	599	99	KC685851
R012	KP143448	599	97	KC685849

สถานที่และรหัสตัวอย่าง	(Accession No.)	ขนาดยีน COI (bp)	%identity	อ้างอิง
พืชลู่				
P001	KP143401	599	97	KC685849
P002	KP143402	599	97	KC685849
P003	KP143403	599	97	KC685849
PT2	KP143408	599	97	KC685849
PT3	KP143409	599	97	KC685849
PT4	KP143410	599	97	KC685849
PT5	KP143411	599	99	KC685851
PT6	KP143412	599	97	KC685849
PT7	KP143413	599	99	KC685851
PT8	KP143414	599	97	KC685849
PT9	KP143415	599	97	KC685849
PT10	KP143416	599	97	KC685849
PT11	KP143417	599	99	KC685851
PT12	KP143418	599	99	KC685851
PT13	KP143419	599	99	KC685851
PT14	KP143420	599	99	KC685851
PT15	KP143421	599	97	KC685849
PT16	KP143422	599	97	KC685849
PT17	KP143423	599	97	KC685849
PT20	KP143424	599	97	KC685849
W001	KP143481	599	99	EU493392
W002	KP143482	599	97	KC685849
W004	KP143483	599	99	EU493392
W005	KP143484	599	97	KC685849
W006	KP143485	599	97	EU493392



สถานที่และรหัสตัวอย่าง	(Accession No.)	ขนาดยีน COI (bp)	%identity	อ้างอิง
สงขลา				
K003	KP143347	599	97	KC685849
K004	KP143348	599	99	KC685851
K005	KP143349	599	97	KC685849
K006	KP143350	599	97	KC685849
K008	KP143351	599	97	KC685849
K009	KP143352	599	99	KC685851
K010	KP143353	599	99	KC685851
K011	KP143354	599	99	KC685851
K013	KP143355	599	97	KC685849
K015	KP143356	599	97	KC685849
K016	KP143357	599	97	KC685849
K018	KP143358	599	99	KC685851
Q001	KP143425	599	97	KC685849
Q002	KP143426	599	97	KC685849
Q006	KP143427	599	97	KC685849
Q007	KP143428	599	97	KC685849
Q008	KP143429	599	97	KC685849
Q013	KP143430	599	96	KC685851
Q014	KP143431	599	96	KC685851
Q016	KP143432	599	96	KC685849
Q017	KP143433	599	99	KC685851
Q018	KP143434	599	96	KC685849
Q019	KP143435	599	99	KC685851
Q020	KP143436	599	97	KC685849

สถานที่และรหัสตัวอย่าง	(Accession No.)	ขนาดยีน COI (bp)	%identity	อ้างอิง
นครศรีธรรมราช				
NK1	KP143388	599	97	KC685849
NK2	KP143389	599	97	KC685849
NK4	KP143390	599	95	KC685849
NK5	KP143391	599	97	KC685849
NK10	KP143392	599	97	KC685849
NK11	KP143393	599	97	KC685849
NK12	KP143394	599	97	KC685849
NK14	KP143395	599	95	KC685849
NK15	KP143396	599	97	KC685849
NK16	KP143397	599	97	KC685849
NK17	KP143398	599	97	KC685849
NK18	KP143399	599	99	KC685851
NK19	KP143400	599	99	KC685851
V003	KP143464	599	99	KC685851
V004	KP143465	599	99	KC685851
V005	KP143466	599	99	KC685851
V006	KP143467	599	99	KC685851
V007	KP143468	599	99	KC685851
V008	KP143469	599	99	KC685851
V009	KP143470	599	99	KC685851
V011	KP143471	599	99	KC685851
V012	KP143472	599	99	KC685851
V013	KP143473	599	97	KC685849
V014	KP143474	599	99	KC685851
V015	KP143475	599	97	KC685849
V016	KP143476	599	99	KC685851
V017	KP143477	599	100	KC685851
V018	KP143478	599	99	KC685851
V019	KP143479	599	97	KC685849
V020	KP143480	599	97	KC685849

### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายสกล สุนันทราภรณ์ เกิดวันที่ 5 เดือนมีนาคม พ.ศ. 2530 ที่โรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา จ. นครราชสีมา ที่อยู่ปัจจุบัน 1555 ถ. สีปศิริ ต. ในเมือง อ. เมืองนครราชสีมา จ. นครราชสีมา 30000 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) จากคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต พ.ศ. 2553 ทำงานตำแหน่งนักเทคนิคการแพทย์ หน่วยคลังเลือด ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามธิบดี พ.ศ. 2554 จากนั้นเข้าศึกษาต่อปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การแพทย์) แขนงวิชาเซลล์ชีววิทยาและอณูพันธุศาสตร์ของมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีพ.ศ. 2555

