ดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชสกุลกระท่อมและการประยุกต์ใช้

1. นางสาวณัฐพัชร์ สุขศรี 5236525833

2. นางสาวบุศรา เหลืองภัทรวงศ์ 5236544733

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

โครงการปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

เภสัชศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา เภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2557

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

DNA barcode of plants in the genus *Mitragyna* and applications

1. Miss Nattapat Suksri 5236525833
2. Miss Bussara Luangbhattharawong 5236544733

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

A Senior Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

for the Bachelor of Science Program in Pharmacy

Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany

Chulalongkorn University

2014

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

หัวข้อโครงการปริญญานิพนธ์	การพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชสกุล *Mitragyna* ที่พบในประเทศไทย ด้วยวิธี DNA barcoding
นิสิตผู้ดาเนินโครงการ	1. นางสาวณัฐพัชร์ สุขศรี 2. นางสาวบุศรา เหลืองภัทรวงศ์
สาขาวิชา	เภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์	รศ.ร.ต.อ.หญิงภญ.ดร.สุชาดา สุขหร่อง
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้โครงการปริญญานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต

..... คณบดี
(ผศ.ภญ.ดร.รุ่งเพ็ชร สกุลบำรุงศิลป์)

..... ประธานภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์
(ศ.ภก.ดร.กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทยาวุฒิ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์
(รศ.ร.ต.อ.หญิงภญ.ดร.สุชาดา สุขหร่อง)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม (ถ้ามี)
(ตำแหน่งทางวิชาการ ชื่อ-ชื่อสกุล)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

โครงการลำดับที่ 3.3

วันที่ 4 ธันวาคม พ.ศ. 2557

บทคัดย่อปริญญานิพนธ์

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) : ดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชสกุลกระท่อมและการประยุกต์ใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาอังกฤษ) : DNA barcode of plants in the genus *Mitragyna*and applications

หัวหน้าโครงการ : นสภ. ณัฐพัชร์สุขศรี 5236525833

ผู้ร่วมโครงการ : นสภ. บุศราเหลืองภัทรวงศ์ 5236544733

อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ร.ต.อ.หญิง ดร.สุชาดา สุขหร่อง

สาขา/ภาควิชา : สาขาการค้นพบและพัฒนายา /ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์

กระท่อมมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Mitragynaspeciosa*(Korth.) Havil.เป็นพืชในวงศ์ Rubiaceaeพบได้ทั่วไปในภาคกลางและภาคใต้ของประเทศไทย ใบกระท่อมนิยมใช้ในกลุ่มคนใช้แรงงานเพื่อเพิ่มกำลัง ทำให้ทนต่อการทำงานกลางแดดเป็นระยะเวลานาน การแพทย์แผนไทยใช้เป็นยาแก้อาการท้องเสีย แก้ไอ และแก้ปวด การแพทย์แผนปัจจุบันใช้ บำบัดผู้ป่วยที่ติดมอร์ฟีนสารหลักที่ตรวจพบในใบกระท่อมคือ mitragynine ซึ่งเป็นสารในกลุ่มอัลคาลอยด์แต่เนื่องจากกระท่อมมีคุณสมบัติทำให้เกิดการเสพติดได้ประเทศไทยจึงประกาศห้ามใช้กระท่อม และจัดว่าเป็นยาเสพติดให้โทษประเภทที่ 5 พืชสกุล *Mitragyna* ที่พบในประเทศไทยมี 4 ชนิด ได้แก่ กระท่อม [*M. speciosa*(Korth.) Havil.], กระทุ่มโคก [*M. hirsuta*Havil.], กระทุ่มนา [*M. diversifolia*(Wall. ex G. Don) Havil.] และกระทุ่มขี้หมู [*M. rotundifolia*(Roxb.) Kuntze.] ปัจจุบันพบการใช้สับสนกันของพืชในสกุลนี้จึงจำเป็นที่จะต้องมีการพิสูจน์เอกลักษณ์ เพื่อทำให้เกิดความปลอดภัยและประสิทธิผลในการใช้ การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอจึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ เนื่องจากเป็นวิธีการที่มีความถูกต้องแม่นยำสูง นอกจากนี้ดีเอ็นเอจะไม่ได้รับผลกระทบจากปัจจัยต่าง ๆ เช่น แหล่งที่อยู่ ฤดูกาล และระยะการเจริญเติบโตของพืช

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เลือกใช้ ได้แก่ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอชนิดเอเอฟแอลพี (PLFA-Amplified Fragment Length Polymorphism)ซึ่งเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างจากจีโนมพืช และลายพิมพ์ดีเอ็นเอชนิดบาร์โค้ด (DNsedocrab A) ซึ่งสร้างจากดีเอ็นเอ 4 บริเวณ คือ *mat*K, *rbc*L, *trn*H-*psb*A spacer และ ITSในการศึกษานี้ประสบความสำเร็จในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอทั้งสองชนิดนี้สามารถใช้พิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชในสกุล *Mitragyna* ได้ รวมถึงใช้แยกกระท่อมออกจาก *Mitragyna* ชนิดอื่นได้ชัดเจน ซึ่งข้อมูลที่ได้เหล่านี้สามารถนำไปพัฒนาหรือประยุกต์ใช้ในงานตรวจสอบและควบคุมคุณภาพสมุนไพรต่อไปในอนาคต

ฝ่ายวิชาการ คณะเภสัชศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

.....

อาจารย์ที่ปรึกษา

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

No. of project: 3.3

Date: 4 December 2557

Abstract

Project : DNA barcode of plants in the genus *Mitragyna*and applications

Student's name : Ms. Nattapat Suksri 5236525833

: Ms.BussaraLuangbhattharawong 5236544733

Advisor's name :cossA. forP. hP gnorkuS adahcuS.D.

Department : Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany

Mitragynaspeciosa(Korth.) Havil., known as Kratom, is an evergreen tree in the Rubiaceae family native to the central and southern region of Thailand. Kratom leaves are often used by the labourers to enhance tolerance for working in long periods of time under the scorching sun. In Thai traditional medicine, the extract from the leaves are used for the treatment of diarrhea, cough and pain. Conventional medicine also uses it as a substitute when treating morphine withdrawals. The main constituent in Kratom leaves is mitragynine, an alkaloid. Because of the addiction effects, possession of Kratom leaves in Thailand is illegal according to the narcotic drug list relating to category 5 of the narcotic drug law.There are 4 *Mitragyna* species which are indigenous in Thailand; *M. speciosa*(Korth.) Havil.[Kratom], *M. hirsuta*Havil.,*M. diversifolia* (Wall. ex G. Don) Havil. and *M. rotundifolia*(Roxb.) Kuntze. Nowadays, many confused usages among *Mitragyna* species were found. Therefore, identification is needed for safe and effective use of *Mitragyna*. DNA fingerprint is onealternative method because of its high accuracy and precision. Moreover, DNA is not affected by habitat, season and the development of plants.

In this study, the method used for creating DNA fingerprints areAFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) and DNA barcoding. AFLP method generates DNA fingerprints from the whole genome while DNA barcoding creates DNA fingerprints from 4 loci: *mat*K, *rbc*L, *trn*H-*psb*A spacer and ITS**.**The study was successful in DNA fingerprints creation. Both techniques are used not only for authentication of the *Mitragyna* species but also to differentiate Kratom from the other *Mitragyna* species. The data received from the study can be developed or applied to authenticate and control the quality of herb in the future.

Academic Affair, Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

.....

Advisor

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

คำนำ

โครงการปริญญานิพนธ์เรื่อง ดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชสกุลกระท่อมและการประยุกต์ใช้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรเภสัชศาสตรบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปีการศึกษา 2557 ซึ่งจัดทำขึ้นเพื่อค้นหาแนวทางในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชในสกุลกระท่อม เนื่องจากยังไม่มีผู้ศึกษาวิธีการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์พืชสกุลกระท่อมด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล ได้แก่ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอชนิด AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) และลายพิมพ์ดีเอ็นเอชนิด DNA barcode มาก่อน ทางผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์พืชสกุลกระท่อมด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุลทั้งสองวิธีนี้

ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจในการศึกษาหาข้อมูล และหากมีข้อผิดพลาดประการใดผู้วิจัยต้องขออภัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย

คณะผู้จัดทำ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาโครงการปริญญานิพนธ์นี้ ผู้ศึกษาขอกราบขอบพระคุณ รศ.ร.ต.อ.หญิงภญ.ดร. สุชาดา สุขหร่อง อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของโครงการนี้ ตลอดจนให้ความรู้และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงการนี้

ขอขอบคุณ ดร. ปิยรัษฎ์ ปริญญาพงษ์ เจริญทรัพย์ และโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตน์ราชสุดาฯมสยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) สำหรับการเอื้อเฟื้อสถานที่ และสนับสนุนเงินทุนในงานวิจัย

ขอขอบคุณ รศ.ภญ.ธาตรี ผดุงเจริญ สำหรับคำปรึกษาแนะนำเกี่ยวพันธุ์ไม้ที่ใช้ในโครงการปริญญานิพนธ์

ขอขอบคุณ รศ. ภก. ดร. ธงชัย สุขเศวต สำหรับตัวอย่างพืชที่ใช้ในโครงการปริญญานิพนธ์

ขอขอบคุณ ผศ. ภก. ดร. อนุชัย ธีระเรืองไชยศรี สำหรับคำปรึกษาและความรู้ทางด้านเทคโนโลยี

ขอขอบคุณ ภญ. พิรุณรัตน์ เดชบำรุง ภญ. สุปิตา อวชัย และพี่นิสิตปริญญาโทและปริญญาเอกสำหรับความช่วยเหลือและการเอื้อเฟื้อทางด้านต่างๆ

ขอขอบคุณศูนย์นวัฒนกรรมทางยาและผลิตภัณฑ์สุขภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (CU.D.HIP) สำหรับการเอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์ แลละสารเคมีในการดำเนินการ

ขอขอบคุณฝ่ายวิชาการ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับเงินทุนในการดำเนินโครงการ

ขอขอบคุณภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤษศาสตร์ ที่กรุณาให้ความสะดวกในการทำโครงการนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ช
สารบัญ	ซ
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญรูปภาพ	ฎ
คำย่อและสัญลักษณ์	ฑ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
บทที่ 2 การสร้างเครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอเอฟแอลพี	3
2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการสร้างเครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอเอฟแอลพี	3
2.2 ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการสร้างเครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอเอฟแอลพี	5
2.3 วิธีการศึกษา	6
2.3.1 การเก็บตัวอย่าง	6
2.3.2 การสกัด genomic DNA	6
2.3.3 การตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากการสกัด genomic DNA	8
2.3.4 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเครื่องหมายเอเอฟแอลพี	8
2.3.4.1 การตัดดีเอ็นเอด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ และเชื่อมต่อกับ Adapter	8
2.3.4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์	9
2.3.4.3 การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเลคโทรโฟรีซิสใน Denaturing polyacrylamide gel	13
2.3.4.4 การวิเคราะห์ข้อมูลเครื่องหมายเอเอฟแอลพี	15
2.4 ผลการศึกษาและการอภิปราย	17
2.4.1 การคัดเลือกคู่ไพร์เมอร์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการศึกษา	17
2.4.2 ร้อยละของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงโพลีมอร์ฟิซึม (Percentage of polymorphism) และจำนวนแถบดีเอ็นเอเฉลี่ยต่อคู่ไพร์เมอร์	38
2.4.3 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม	38
2.4.4 การนำแถบดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ของ *Mitragyna speciosa* ไปใช้ในการพัฒนาเป็นเครื่องเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความจำเพาะเจาะจงมากขึ้น	40
บทที่ 3 การสร้างดีเอ็นเอบาร์โค้ด	41
3.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการสร้างดีเอ็นเอบาร์โค้ด	41
3.2 ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการสร้างดีเอ็นเอบาร์โค้ด	43

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

3.3 การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด..... 44
3.3.1 การเก็บตัวอย่าง (sample collection)..... 44
3.3.2 การสกัด genomic DNA (genomic DNA extraction)..... 44
3.3.3 การตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากการสกัด genomic DNA..... 45
3.3.4 การคัดเลือกยีนส์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ การออกแบบไพร์เมอร์ และการส่งสังเคราะห์ไพร์เมอร์..... 45
3.3.4.1 Maturase K (*mat*K)..... 46
3.3.4.2 ยีน *rbc*L..... 46
3.3.4.3 บริเวณ *trn*H และ *psb*A..... 46
3.3.4.3 บริเวณ Internal transcribed spacer..... 47
3.3.5 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณที่สนใจ..... 48
3.3.6 การตรวจสอบ PCR Products ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส..... 49
3.3.7 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)..... 49
3.3.8 การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด..... 49
3.4 ผลการจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด..... 50
3.4.1. การสกัด genomic DNA..... 50
3.4.2 ผลการออกแบบไพร์เมอร์..... 50
3.4.2.1 ยีน *mat*K..... 51
3.4.2.2 ยีน *rbcL*..... 52
3.4.2.3 ส่วนของนิวโอไทด์ที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H และ *psb*A..... 53
3.4.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็น..... 53
3.4.3.1 ยีน *mat*K..... 53
3.4.3.2 ยีน *rbc*L..... 56
3.4.3.3 ส่วนของดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H และ *psb*A..... 59
3.4.4 จัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcoding)..... 61
3.4.4.1 การจัดลำดับนิวคลีโอไทด์ให้อยู่ในรูปแบบ FASTA..... 61
3.4.4.2 การสร้างบาร์โค้ดดีเอ็นเอรหัสสี (Colour-coded DNA barcodes) ด้วยโปรแกรม Clustalx 2.1..... 61

บทที่ 4
4.1 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอชนิดเอเอฟแอลพี (AFLP; Amplified Fragment Length Polymorphism)..... 69
4.2 การสร้างดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcoding)..... 70

ภาคผนวก..... 79
เอกสารอ้างอิง..... 83

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตัวอย่างพืชสกุล *Mitragyna* ที่ใช้ในศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอเอฟแอลพี	5
2	ส่วนประกอบของปฏิกิริยา Digestion	8
3	ส่วนประกอบของปฏิกิริยา Ligation	9
4	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Adapter ในขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายเอเอฟแอลพี	9
5	ส่วนประกอบของปฏิกิริยา Pre-amplification (PCR I)	10
6	สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรส	10
7	ส่วนประกอบของปฏิกิริยา Amplification	11
8	สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรส	11
9	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Primer ในขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายเอเอฟแอลพี	12
10	คู่ไพร์เมอร์ที่คัดเลือกใช้ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชในสกุล *Mitragyna*	17
11	ไพร์เมอร์ทั้ง 11 คู่ ที่ให้แถบดีเอ็นเอของ *Mitragyna speciosa* แตกต่างจาก *Mitragyna* ชนิดอื่น ๆ	40
12	ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษาปริญญานิพนธ์	42
13	ตัวอย่างพืชสกุล *Mitragyna* ที่ใช้ในโครงการปริญญานิพนธ์	43
14	ส่วนประกอบต่างๆในการเตรียมปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส	48
15	สภาวะที่กำหนดในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยการพีซีอาร์ด้วยเครื่องพีซีอาร์	49
16	ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการสร้างดีเอ็นเอบาร์โค้ด	51
17	ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L	52
18	ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ *trn*H – *psb*A spacer	53
19	ส่วนประกอบของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *mat*K	54
20	สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสยีน *mat*K	54
21	ส่วนประกอบของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *rbc*L	57
22	สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสยีน *rbc*L	57
23	ส่วนประกอบของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H และ *psb*A	59
24	ตารางแสดงสภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสของดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H และ *psb*A	59

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างของสารเคมีที่พบใน *Mitragyna speciosa*	1
2	การเตรียมกระจกสำหรับเทเจล	13
3	ส่วนประกอบของ Denaturing polyacrylamide gel	13
4	การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Polyacrylamide gel electrophoresis	14
5	การย้อมเจลด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท (Silver staining)	15
6	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างจากเครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ ER3AAG / MS3CTA	18
7	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างจากเครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ ER3AAC / MS3CAG และ ER3AAC / MS3CTA	20
8	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างจากเครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ ER3ACA / MS3CTA และ ER3AGG / MS3CCC	22
9	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างจากเครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ ER3ACA / MS3CTT	24
10	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างจากเครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ ER3ACA / MS3CAT และ ER3AGG / MS3CGA	26
11	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างจากเครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ ER3ACT / MS3CAT และ ER3ACT / MS3CTG	28
12	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างจากเครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ ER3ACA / MS3CCA และ ER3ACA / MS3CCT	30
13	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างจากเครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ ER3ACA / MS3CCC และ ER3ACA / MS3CCG	32
14	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างจากเครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ ER3ACA / MS3CGA และ ER3ACA / MS3CGC	34
15	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างจากเครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ ER3AGG / MS3CCA และ ER3AGG / MS3CCT	36
16	Dendrogram แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Mitragyna* 11 ตัวอย่าง ที่ได้มาจากการโดยใช้ Jaccard's similarity matrix และ วิธี UPGMA	39
17	การสกัด genomic DNA ด้วยชุดสกัด Genomic DNA Mini Kit (Geneaid)	44
18	ตำแหน่งของยีน *matK*	46
19	ส่วนประกอบต่างๆของบริเวณ *trn*H–*psb*A spacer	47
20	ส่วนประกอบของบริเวณ ITS	48
21	ภาพแสดงผลการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอของพืชทั้ง 4 ชนิด	50
22	ตำแหน่งของไพร์เมอร์ที่เข้าจับชิ้นดีเอ็นเอ	51
23	ตำแหน่งของไพร์เมอร์ที่เข้าจับชิ้นดีเอ็นเอ	52

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

24 ตำแหน่งของไพร์เมอร์ที่เข้าจับชิ้นดีเอ็นเอของไพร์เมอร์ ***trn*HF** และ ***psb*A-*di*R**..... 53
25 ผลการตรวจ PCR product ของยีน *mat*K ด้วย Gel electrophoresis..... 55
26 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส โดยใช้ไพร์เมอร์ *trn*K 3914F และ *trn*K2R..... 56
27 ผลการตรวจสอบ PCR product ของยีน *rbc*L ด้วยวิธี Gel elactrophoresis..... 58
28 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส โดยใช้ไพร์เมอร์ *rbc*L-Mit-f1 และ *rbc*L-Mit-r1..... 58
29 ผลการตรวจสอบ PCR product บริเวณ *trn*H-*psb*A spacer ด้วยวิธี Gel electrophoresis..... 60
30 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส โดยใช้ไพร์เมอร์ *trn*HF และ *psb*A-*di*R..... 60
31 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ของพืชในสกุล Mitragyna ที่ถูกแปลงเป็นรหัสสีด้วยโปรแกรม Clustalx 2.1..... 62
32 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ของพืชในสกุล *Mitragyna* ที่ Alignment แล้ว..... 62
33 บาร์โค้ดดีเอ็นเอรหัสสีของยีน *mat*K ของพืชในสกุล *Mitragyna* ในรูปแบบไฟล์ PDF..... 63
34 แสดงจุดแตกต่างของดีเอ็นเอที่เป็นแบบการแทนที่กันของเบส (Substitution) ในตำแหน่งที่ 593..... 64
35 แสดงจุดแตกต่างของดีเอ็นเอที่เป็นแบบการแทนที่กันของเบส (Substitution) ในตำแหน่งที่ 684..... 64
36 แสดงจุดแตกต่างของดีเอ็นเอที่เป็นแบบการแทนที่กันของเบส (Substitution) ในตำแหน่งที่ 920..... 64
37 แสดงจุดแตกต่างของดีเอ็นเอที่เป็นแบบการแทนที่กันของเบส (Substitution) ในตำแหน่งที่1411..... 64
38 แสดงจุดแตกต่างของดีเอ็นเอที่เป็นแบบการเพิ่มของเบส (Insertion) ในตำแหน่งที่ 1421-1426 (เพิ่มทั้งหมด 6 เบส)..... 64
39 แสดงจุดแตกต่างของดีเอ็นเอที่เป็นแบบการแทนที่กันของเบส (Substitution) ในตำแหน่งที่ 1316..... 65
40 แสดงจุดแตกต่างของดีเอ็นเอที่เป็นแบบการแทนที่กันของเบส (Substitution) ในตำแหน่งที่ 17 และ 23..... 65
41 แสดงจุดแตกต่างของดีเอ็นเอที่เป็นแบบการเพิ่มของเบส (Insertion) ในตำแหน่งที่ 25-26 (เพิ่มทั้งหมด 2 เบส)..... 66
42 แสดงจุดแตกต่างของดีเอ็นเอที่เป็นแบบการแทนที่กันของเบส (Substitution) ในตำแหน่งที่ 35..... 66
43 แสดงจุดแตกต่างของดีเอ็นเอที่เป็นแบบการเพิ่มของเบส (Insertion) ในตำแหน่งที่ 115 (เพิ่มทั้งหมด 1 เบส)..... 66
44 แสดงจุดแตกต่างของดีเอ็นเอที่เป็นแบบการเพิ่มของเบส (Insertion) ในตำแหน่งที่ 262-270 (เพิ่มทั้งหมด 9 เบส)..... 66

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

45 แสดงจุดแตกต่างของดีเอ็นเอที่เป็นแบบการแทนที่กันของเบส (Substitution) ในตำแหน่งที่ 42 67
46 แสดงจุดแตกต่างของดีเอ็นเอที่เป็นแบบการแทนที่กันของเบส (Substitution) ในตำแหน่งที่ 101 67
47 แสดงจุดแตกต่างของดีเอ็นเอที่เป็นแบบการเพิ่มของเบส (Insertion) ในตำแหน่งที่ 118 (เพิ่มทั้งหมด 1 เบส) 67
48 แสดงจุดแตกต่างของดีเอ็นเอที่เป็นแบบการเพิ่มของเบส (Insertion) ในตำแหน่งที่ 171 (เพิ่มทั้งหมด 1 เบส) 67
49 แสดงจุดแตกต่างของดีเอ็นเอที่เป็นแบบการเพิ่มของเบส (Insertion) ในตำแหน่งที่ 510 (เพิ่มทั้งหมด 1 เบส) 68
50 แสดงจุดแตกต่างของดีเอ็นเอที่เป็นแบบการแทนที่กันของเบส (Substitution) ในตำแหน่งที่ 514 และ 516 68
51 แสดงจุดแตกต่างของดีเอ็นเอที่เป็นแบบการแทนที่กันของเบส (Substitution) ในตำแหน่งที่ 564 และ 565 68
52 บาร์โค้ดดีเอ็นเอรหัสสีส่วนที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ของพืชในสกุล *Mitragyna* 71
53 บาร์โค้ดดีเอ็นเอรหัสสีส่วนที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L ของพืชในสกุล *Mitragyna* 74
54 บาร์โค้ดดีเอ็นเอรหัสสีส่วนที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trnH-psb*A spacer ของพืชในสกุล *Mitragyna* 77
55 บาร์โค้ดดีเอ็นเอรหัสสีส่วนที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของพืชในสกุล *Mitragyna* 78

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

คำย่อและสัญลักษณ์

bp	base pair
BSA	bovine serum albumin
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTPs	deoxynucleoside triphosphate
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
Kb	kilobase
M	molar
$MgCl_2$	magnesium chloride
mL	milliliter
µL	microliter
µM	micromolar
NCBI	National Center Biotechnology Information
PCR	polymerase chain reaction
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
TAE buffer	Tris-acetate-EDTA buffer
TBE buffer	Tris-borate-EDTA buffer
T_m	melting temperature
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
U	unit
∞	infinity

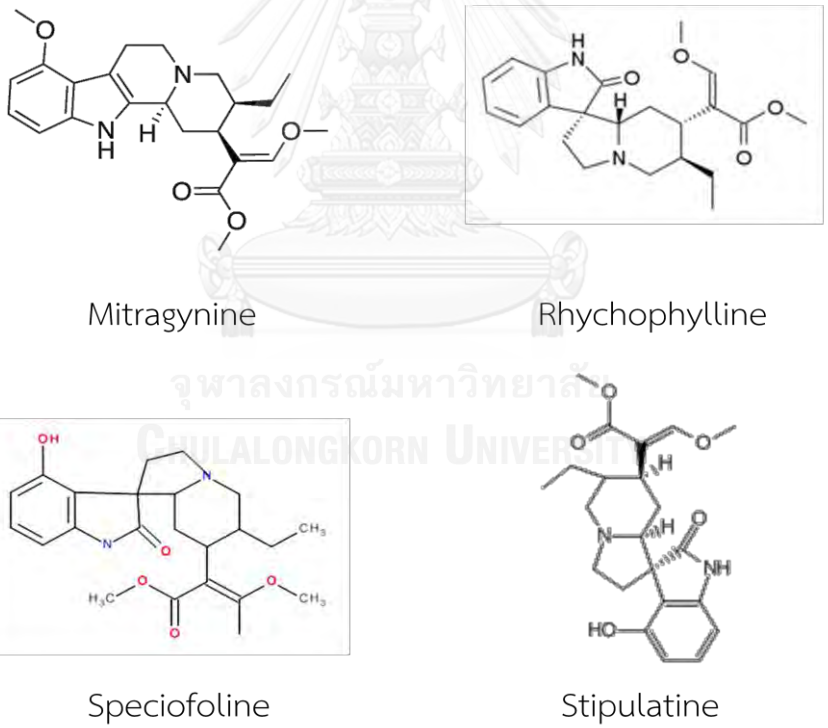
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

Mitragyna speciosa หรือกระท่อม เป็นพืชในสกุล Rubiaceae พบได้ทั่วไปในประเทศไทย โดยเฉพาะทางภาคกลางและภาคใต้ พืชกระท่อมเป็นที่นิยมใช้ในกลุ่มคนใช้แรงงานเพื่อเพิ่มกำลัง และทำให้สามารถทำงานได้อย่างทนทาน การแพทย์แผนไทยเดิมนำมาใช้เป็นยารักษาโรคท้องเสีย แก้ไอ แก้ปวด และการแพทย์แผนปัจจุบันยังคงนำมาใช้เป็นรักษาผู้ป่วยที่ติด Morphine โดยสารที่ตรวจพบในกระท่อมคือสารในกลุ่ม Alkaloid ได้แก่ Mitragynine, Speciofoline, Rhychophylline และ Stipulatine แสดงภาพโครงสร้างดังภาพที่ 1 แต่เนื่องจากกระท่อมมีคุณสมบัติทำให้เกิดการเสพติดได้[i] ประเทศไทยจึงประกาศห้ามใช้กระท่อม และจัดว่าเป็นยาเสพติดให้โทษประเภทที่ 5 ตามความในพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ พ.ศ. 2522



ภาพที่ 1 โครงสร้างของสารเคมีที่พบใน *Mitragyna speciosa*[ii]

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

สำหรับพืชสกุล *Mitragyna* มีหลายชนิด[iii] แต่ที่พบได้ในประเทศไทยมี 4 ชนิด ได้แก่ *M. speciosa* (กระท่อม), *M. hirsuta* (กระทุ่มโคก), *M. diversifolia* (กระทุ่มนา) และ *M. rotundifolia* (กระทุ่มขี้หมู) ซึ่งพืชทั้ง 3 ชนิดหลังนี้มักมีการนำมาใช้สับสนกับกระท่อม[iv] แม้ว่าสารที่ตรวจพบในพืชแต่ละชนิดจะมีชนิดและปริมาณของสารสำคัญที่แตกต่างกันไป[3]

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชในสกุล *Mitragyna* สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การใช้ลักษณะทางมหทรรศน์หรือสัณฐานวิทยา (Macroscopic or morphological identification) จำเป็นต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการตรวจสอบและจำเป็นต้องใช้ส่วนประกอบของต้นหลายส่วนและหลายบริเวณพิจารณาประกอบกัน ซึ่งทำได้ยากลำบากในทางปฏิบัติ หรือการใช้เทคนิคทางเคมี เช่น การพิสูจน์เอกลักษณ์พืชสกุล *Mitragyna* ด้วยวิธี TLC[v] ซึ่งก็มีข้อจำกัดทางด้านปริมาณหรือชนิดของสารเคมีที่สามารถตรวจพบได้อาจมีปริมาณการเปลี่ยนแปลงไปตามปัจจัยต่างๆ เช่น ฤดูกาล หรือแหล่งที่ปลูก เป็นต้น ดังนั้นการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากเป็นการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide sequence) และรูปแบบดีเอ็นเอ (DNA pattern) ในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดอันได้รับการถ่ายทอดทางพันธุกรรมมาจากบรรพบุรุษ สามารถระบุชื่อสิ่งมีชีวิตได้จากทุกระยะของการเจริญ มีความคงตัว ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงตามปัจจัยสภาพแวดล้อมดังกล่าว และแม้ว่าจะอยู่ในสภาพที่เป็นชิ้นส่วนขนาดเล็ก ทั้งที่เป็นตัวอย่างสดและตัวอย่างที่ถูกรักษาสภาพไว้[vi] ก็สามารถตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ได้และให้ผลคงเดิม

ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอเอฟแอลพี (AFLP; Amplified Fragment Length Polymorphism) และจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชสกุล *Mitragyna* ใน 4 บริเวณ ได้แก่ *mat*K, *rbc*L, *trn*H-*psb*A spacer และ ITS ซึ่งจากการทบทวนวรรณกรรมยังไม่พบการพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชสกุล *Mitragyna* โดยอาศัยทั้ง 2 วิธีดังกล่าวมาก่อน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์พืชในสกุล *Mitragyna* โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล โดยคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่เหมาะสมต่อการพิสูจน์เอกลักษณ์ และจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

บทที่ 2
การสร้างเครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอเอฟแอลพี

2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการสร้างเครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอเอฟแอลพี

อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา

2.1.1 อุปกรณ์สำหรับการสกัด วัดคุณภาพ และปริมาณดีเอ็นเอ

- โกร่งกระเบื้องและลูกโกร่ง
- ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuge Model SD 220, qualitron, INC)
- Water bath incubator
- Incubator (STUART Scientific)
- เตาไมโครเวฟ (Microwave (TURBORA TRX-1974i))
- เครื่องแยกขนาดดีเอ็นเอ (Gel electrophoresis) สำหรับ Agarose gel (Gelmate 2000, MyRun)
- อุปกรณ์ฉายแสงยูวีและถ่ายภาพเจล (Gel Documentation System)

เช่น SONY Video graphic printer UP-897MD, Transiluminator (ECX), Electronic Case

2.1.2 เครื่องพีซีอาร์ (GeneAmp PCR System 1700) สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์

2.1.3 อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์เอเอฟแอลพี ได้แก่ ชุดแยกขนาดดีเอ็นเอแบบตั้งสำหรับ Polyacrylamide gel

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา

2.1.4 สารเคมีในการสกัดวัดคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

- Liquid nitrogen
- CTAB (Cetytrimethyl ammonium bromide)
- 2-Mercaptoethanol
- TrisHCl
- EDTA (Ethylenediaminetetraacetate acid)
- Potassium acetate
- Isoamylalchohol : chloroform (16 : 1)
- Absolute ethanol
- 70% Ethanol

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

- ผง Agarose (GeneMate)

2.1.5 สารเคมีในปฏิกิริยาการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและเชื่อมต่อกับ Adapter

- เอนไซม์ *Eco*RI, *Mse*I
- T4 DNA ligase
- *Eco*RI adapter, *Mse*I adapter
- ATP
- Buffer A

2.1.6 สารเคมีในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์

- *Eco*RI primer, *Mse*I primer
- $MgCl_2$
- dNTP
- เอนไซม์ *Taq* polymerase

2.1.7 สารเคมีในการแยกขนาดดีเอ็นเอโดย Denaturated polyacrylamide gel

- สารละลายโพลีอะคริลาไมด์ (ACRYL/BIS $^{Tm\ (°C)}$ 19:1 40% (w/v) solution (Amresco))
- TEMED (N,N,N',N'-tetramethylehtylenediamine),Ammonium peroxodisulphate (AnalaR®)
- Bind silane
- Acetic acid
- Silver nitrate
- Sodium carbonate
- 37% Formaldehyde
- Sodium thiosulfate

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

2.2 ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการสร้างเครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอเอฟแอลพี

ตัวอย่างที่ใช้ในการสร้างเครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอเอฟแอลพี ประกอบด้วย ตัวอย่างพืชในสกุล *Mitragyna* 4 ชนิด ได้แก่ 1. *M.speciosa* จำนวน 4 ตัวอย่าง 2. *M.diversifolia* จำนวน 3 ตัวอย่าง 3. *M.rotundifolia* จำนวน 1 ตัวอย่าง และ 4. *M.hirsuta* จำนวน 3 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างพืชสกุล *Mitragyna* ที่ใช้ในศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอเอฟแอลพี

ชนิด	ชื่อทั่วไป	รหัส	วันที่เก็บ	สถานที่เก็บ
M.speciosa	กระท่อม	MS1	08/05/2014	จังหวัดฉะเชิงเทรา
M.speciosa		MS2	11/05/2014	จังหวัดยะลา
M.speciosa		MS3	08/05/2014	จังหวัดปทุมธานี
M.speciosa		MS4	15/05/2014	จังหวัดสมุทรปราการ
M.diversifolia	กระทุ่มนา	MD1	08/05/2014	สวนหลวง ร.9 กรุงเทพมหานคร
M.diversifolia		MD2	08/05/2014	คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร
M.diversifolia		MD3	15/05/2014	จังหวัดอุตรดิตถ์
M.rotundifolia	กระทุ่มเนิน	MR1	08/05/2014	สวนหลวง ร.9 กรุงเทพมหานคร
M.hirsuta	กระทุ่มโคก	MH1	08/05/2014	สวนหลวง ร.9 กรุงเทพมหานคร
M.hirsuta		MH2	08/05/2014	คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร
M.hirsuta		MH3	08/05/2014	สวนหลวง ร.9 กรุงเทพมหานคร

Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

2.3 วิธีการศึกษา

การสร้างเครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอเอฟแอลพีมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

2.3.1 การเก็บตัวอย่าง (Sample collection)

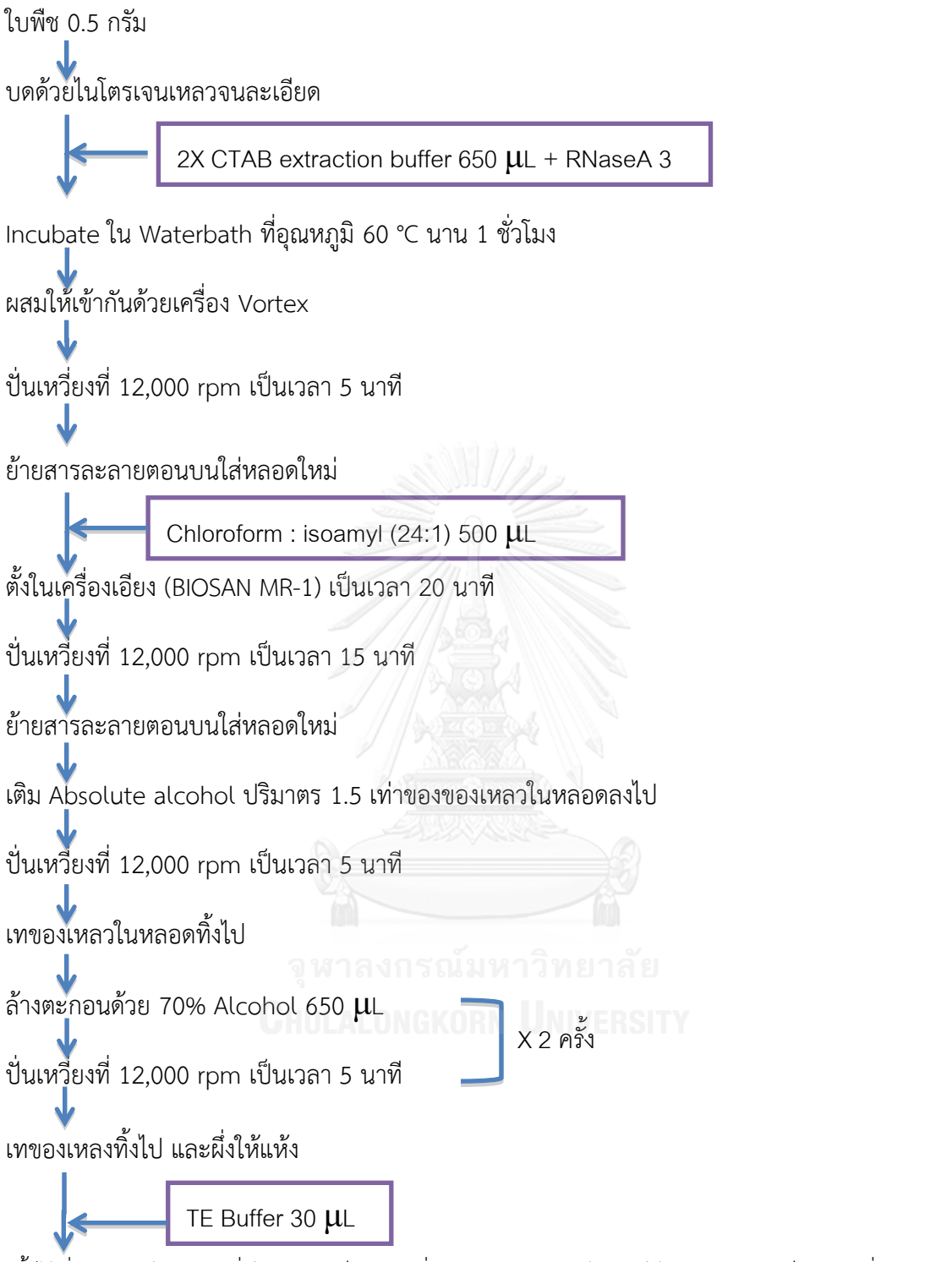
การเก็บตัวอย่างทำโดยเก็บเอาใบที่ปลายยอด มีความสมบูรณ์ และเป็นโรคน้อยที่สุด เก็บไว้ในถุงพลาสติกที่มีการพรมน้ำรักษาความชุ่มชื่น และเจาะรูระบายอากาศเล็กน้อย เมื่อนำตัวอย่างมายังห้องปฏิบัติการแล้วจึงเลือกเอาใบที่สมบูรณ์ มีสีเขียว ไม่มีโรค ไม่แก่จนเกินไป นำไปสกัด genomic DNA

2.3.2 การสกัด genomic DNA (genomic DNA extraction)

นำใบของแต่ละตัวอย่างที่เก็บไว้มาตัดเป็นชิ้นส่วนที่เล็กพอสมควร บดกับไนโตรเจนเหลวด้วยโกร่งและลูกโกร่งจนละเอียด ตักแบ่งใส่ Eppendrof หลอดละประมาณ 3 ใน 4 ของหลอด จากนั้นนำไปทำการสกัดด้วยวิธี CTAB ที่ประยุกต์มาจากวิธีของ Doyle[vii] ตามขั้นตอนดังนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

2.3.3 การตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากการสกัด genomic DNA

ทำการวัดปริมาณและตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีการวัดการเรืองแสงเมื่อนำไปส่องแสงอัลตราไวโอเลต โดยความเข้มของแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (Lambda DNA standard) ที่ทราบปริมาณแล้ว โดยนำมาทำอิเลคโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) บนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 0.8 % เตรียมจากอะกาโรส 0.8 กรัมใน 0.5x TBE buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทำการ Run โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 Volts เป็นเวลา 20 นาที เมื่อได้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอตัวอย่างแล้วเจือจางดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นตามต้องการ

2.3.4 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเครื่องหมายเอเอฟแอลพี

ปฏิบัติโดยนำดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบทำปฏิกิริยาตามขั้นตอน ดังนี้[viii]

2.3.4.1 การตัดดีเอ็นเอด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ และเชื่อมต่อกับ Adapter

Digestion : นำ genomic DNA พืชที่สกัดเข้มข้นประมาณ 100 ng/μL มาย่อยด้วยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดคือ *Eco*RI และ *Tru9I ใน* 10X bufferA ส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 2 จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของปฏิกิริยา Digestion

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น Stock	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตรต่อหนึ่งปฏิกิริยา (1x)
*Tru*9I	10 u/μL	5 u	0.5 μL
*Eco*RI	10 u/μL	5 u	0.5 μL
10X Buffer A	10X	1X	4 μL
dH_2O			30 μL
		รวม	35 μL
DNA (100 ng/μL)	100 ng/μL	500 ng	5 μL
		รวม	40 μL

Ligation นำดีเอ็นเอที่ที่ถูกย่อยแล้วจากขั้นตอน Digestion มาต่อด้วย ER-adapter และ MS-adapter ลำดับของนิวคลีโอไทด์ของ Adapter แสดงในตารางที่ 4 และส่วนประกอบของปฏิกิริยาแสดงในตารางที่ 3 จากนั้นบ่มให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อประมาณ 10 เท่า จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °C

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบของปฏิกิริยา Ligation

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น Stock	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตรต่อหนึ่งปฏิกิริยา (1x)
ER Adapter	50 pmol/μL		1 μL
MS Adapter	50 pmol/μL		1 μL
T4 DNA ligase	5u/μL		0.2 μL
ATP	10 mM	1 mM	1 μL
10X ligase buffer	10X	1X	1 μL
dH_2O			5.8 μL
		รวม	10 μL

สำหรับ Adapter ที่ใช้คือ *Eco*RI adpter และ *Mse*I adapter ที่มีลำดับเบสดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Adapter ในขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายเอเอฟแอลพี

Adapter	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5′-3′)
*Eco*RI adapter	CTCGTAGACTGCGTACC CTGACGCATGGTTAA
*Mse*I adapter	GACGATGAGTCCTGAG TACTCAGGACTCAT

2.3.4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์

- **การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ไพร์เมอร์ที่มีการเพิ่มนิวคลีโอไทด์ 1 ตัวที่ปลาย 3’ ของไพร์เมอร์** (Preselective amplification) เพื่อลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้และให้มีความจำเพาะในขั้นหนึ่งก่อน โดยส่วนประกอบและสภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสแสดงรายละเอียดดังตารางที่ 5 และตารางที่ 6 ดังต่อไปนี้

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

ตารางที่ 5 ส่วนประกอบของปฏิกิริยา Pre-amplification (PCR I)

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น Stock	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตรต่อหนึ่งปฏิกิริยา (1X)
PCR buffer	10X	1X	5 µL
$MgCl_2$	50 mM	1.5 mM	1.5 µL
dNTPs	1 mM	0.2 mM	10 µL
Primer ER-A	70 ng/µL	1.4 ng/µL	1 µL
Primer MS-C	70 ng/µL	1.4 ng/µL	1 µL
Taq DNA polymerase	5 U/µL	1 U	0.2 µL
dH_2O			26.3 µL
		รวม	45 µL
DNA			5 µL
		รวม	50 µL

ตารางที่ 6 สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรส

กระบวนการ	อุณหภูมิ (°C)	เวลาที่ใช้	
Predenaturation	94	5 Min	
Denaturation	94	30 sec	รวมทั้งหมด 20 รอบ
Annealing	56	1 Min	
Extension	72	1 Min	
Final Extension	72	5 Min	
Hold	4	α	

- การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ไพร์เมอร์ที่มีการเพิ่มนิวคลีโอไทด์ 3 ตัวที่ปลาย 3′ ของไพร์เมอร์ (Selective amplification) เพื่อลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ และเพื่อให้เกิดการคัดเลือกการเพิ่มปริมาณชนิดดีเอ็นเอบางส่วน ทำให้มีความจำเพาะมากขึ้นโดยใช้คู่ไพร์เมอร์ทั้ง 2 ชนิด (Forward และ Reverse primer) คือไพร์เมอร์ *Eco*RI + 3 กับ *Mse*I + 3 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพร์เมอร์ที่ใช้ศึกษาดังตารางที่ 9 และส่วนประกอบและสภาวะสำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส แสดงรายละเอียดดังตารางที่ 7 และตารางที่ 8

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

ตารางที่ 7 ส่วนประกอบของปฏิกิริยา Amplification

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น Stock	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตรต่อหนึ่งปฏิกิริยา (1X)
PCR buffer	10X	1X	2 µL
$MgCl_2$	50 mM	1.5 mM	0.6 µL
dNTPs	1 mM	0.2 mM	4 µL
Primer ER-ANN	30 ng/µL	1.5 ng/µL	1 µL
Primer MS-CNN	30 ng/µL	1.5 ng/µL	1 µL
Taq DNA polymerase	5 U/µL	0.5 U	0.1 µL
dH_2O			8.3 µL
		รวม	17 µL
DNA(จากขั้น PCR I)			3 µL
		รวม	20 µL

ตารางที่ 8 สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรส

กระบวนการ	อุณหภูมิ (°C)	เวลาที่ใช้	
Predenaturation	94	2 Min	
Denaturation	94	30 sec	
Annealing	65*	30 sec	รวม 12 รอบ
Extension	72	1 Min	
Denaturation	94	30 sec	
Annealing	56	30 sec	รวม 23 รอบ
Extension	72	1 Min	
Hold	4	∞	

*Touchdown PCR ลดอุณหภูมิช่วง Annealing ลงรอบละ 0.7 องศาเซลเซียส

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

ตารางที่ 9 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ในขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายเอเอฟแอลพี

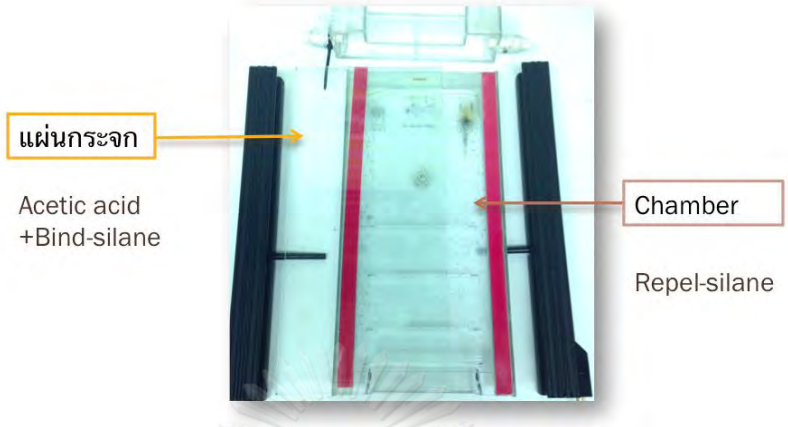
ไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5′-3′)
Primer+1	
ER1A	AGACTGCGTACCAATTC**A**
MS1C	GATGAGTCCTGAGTAA**C**
Primer+3	
ER3AAG	AGACTGCGTACCAATTC**AAG**
ER3AAC	AGACTGCGTACCAATTC**AAC**
ER3ACA	AGACTGCGTACCAATTC**ACA**
ER3ACT	AGACTGCGTACCAATTC**ACT**
ER3AGG	AGACTGCGTACCAATTC**AGG**
MS3CTA	GATGAGTCCTGAGTAA**CTA**
MS3CAG	GATGAGTCCTGAGTAA**CAG**
MS3CTT	GATGAGTCCTGAGTAA**CTT**
MS3CAT	GATGAGTCCTGAGTAA**CAT**
MS3CTG	GATGAGTCCTGAGTAA**CTG**
MS3CCA	GATGAGTCCTGAGTAA**CCA**
MS3CCT	GATGAGTCCTGAGTAA**CCT**
MS3CCC	GATGAGTCCTGAGTAA**CCC**
MS3CCG	GATGAGTCCTGAGTAA**CCG**
MS3CGA	GATGAGTCCTGAGTAA**CGA**
MS3CGC	GATGAGTCCTGAGTAA**CGC**

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

2.3.4.3 การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเลคโทรโฟรีซิสใน Denaturing polyacrylamide gel

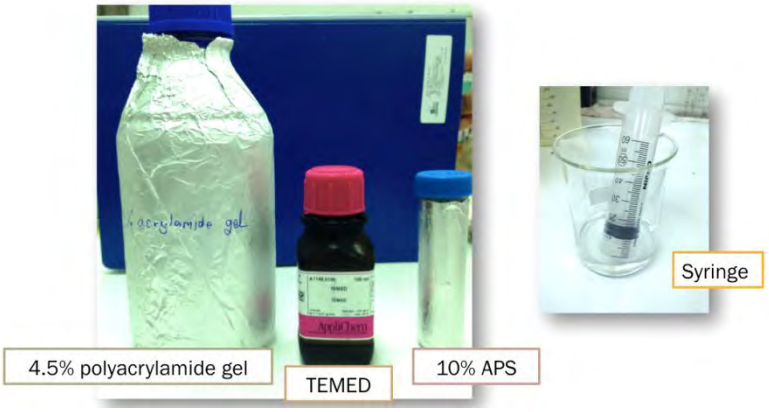
- การเตรียมกระจกสำหรับเทเจล



ภาพที่ 2 การเตรียมกระจกสำหรับเทเจล

ใช้กระจก 2 แผ่น ทำให้เกิดช่องว่างระหว่างกันโดยใช้ Spacer ซึ่งเป็นแผ่นพลาสติกแถบยาวเท่ากับกระจก และมีความหนาเท่ากับเจลที่ต้องการ นำแผ่นกระจกสำหรับเตรียมเจลมาล้างให้สะอาด และเช็ดด้วยเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 3 ครั้งให้สะอาด ทั้ง 2 แผ่น เช็ดกระจกแผ่นหลังด้วย Bind silane เพื่อให้เจลเกาะติดกับกระจก และเช็ดด้วยเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์อีก 3 ครั้งสำหรับกระจกแผ่นหน้าที่ใช้เป็น Chamber จะเช็ดให้ทั่วด้วย Repel silane เพื่อไม่ให้เจลติดกับ Chamber จากนั้นนำกระจกทั้ง 2 แผ่นประกอบเข้าชุดโดยวาง Spacer ไว้ทั้งสองข้าง เพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างกระจกทั้งสองโดยหันด้านที่เช็ดด้วย Bind silane และ Repel silane เข้าหากันแล้วใช้ Clamp ยึดให้อยู่ติดกับที่

- การเตรียม Denaturing polyacrylamide gel

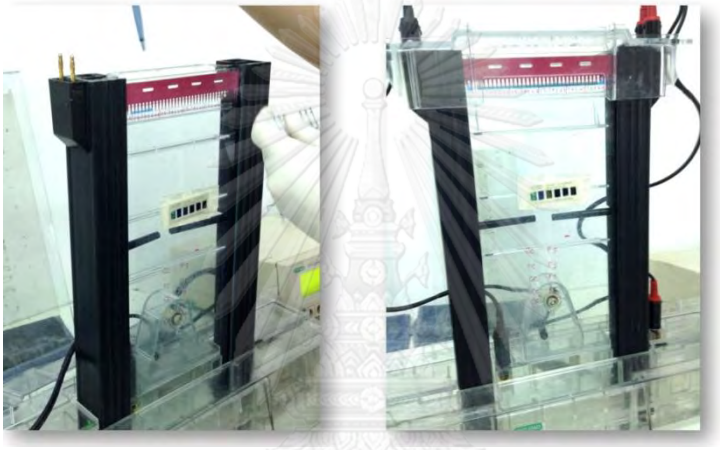


ภาพที่ 3 ส่วนประกอบของ Denaturing polyacrylamide gel

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

ใช้ 4.5% Denaturing polyacrylamide gel ที่แช่เย็นปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น 10 % (10%APS) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และ TEMED ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (อัตราส่วนนี้ใช้สำหรับการเทเจลในกระจกขนาด 21x40 cm. จำนวน 1กระจก) แกว่งภาชนะให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกันอย่างรวดเร็วระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ ใช้กระบอกฉีดยาดูดสารละลายเจลและฉีดเจลใส่ลงในช่องว่างระหว่างกระจกจนเจลไหลถึงขอบแผ่นกระจกด้านบน จากนั้นเสียบหวีด้านที่เรียบเป็นเส้นตรงลงไปด้านบน ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 2 ชั่วโมง

- การแยกขนาดดีเอ็นเอโดยใช้กระแสไฟฟ้า



ภาพที่ 4 การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Polyacrylamide gel electrophoresis

เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้วดึงหวีออก และทำความสะอาดกระจกด้านนอกให้สะอาดด้วยน้ำสะอาดแล้วประกอบกระจกเข้ากับชุดอิเลคโทรโฟรีซิสแนวตั้ง เติมบัฟเฟอร์ 1X TBE ลงในช่องสำหรับใส่บัฟเฟอร์ทั้งด้านบนและด้านล่าง จากนั้นทำการต่อสายไฟเข้ากับเครื่องอิเลคโทรโฟรีซิส ทำการ Pre-run ใช้กำลังไฟฟ้าคงที่ 50 วัตส์ เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาให้ปิดเครื่อง จากนั้นทำความสะอาดผิวหน้าของเจลให้สะอาด เสียบหวีด้านที่เป็นซี่หวีลงไปให้ซี่หวีสัมผัสกับผิวหน้าเจล จากนั้นนำ PCR II Product ที่ผ่านการทำการคลายเกลียวดีเอ็นเอแล้ว (โดยให้ความร้อนอุณหภูมิ 96 °C เป็นเวลานาน 3 นาที จากนั้นลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว โดยวางบน Ice box ทันที) หยอดตัวอย่างดีเอ็นเอลงในช่องแต่ละช่องของหวี พร้อมกับหยอดดีเอ็นเอมาตรฐาน (ØX174 DNA/HinfI) จากนั้นจึงเปิดเครื่อง โดยใช้กำลังไฟฟ้าคงที่จนกว่า Loading buffer จะเคลื่อนที่ลงมาประมาณ 15-18 เซนติเมตร ปิดเครื่องแยกกระจกทั้ง 2 แผ่นออกจากกันนำเจลไปย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ในเตรทต่อไป

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

- การย้อมเจลด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท (Silver staining)

ภาพที่ 5 การย้อมเจลด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท (Silver staining)

นำแผ่นกระจกที่มีเจลติดอยู่มาแช่ในสารละลาย Fixative (10% Acetic acid) นาน 20 นาที เขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่า จากนั้นเขย่าล้างด้วยน้ำ Deionized 3 ครั้ง นานครั้งละ 2 นาที ต่อมาแช่กระจกต่อในสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท เพื่อย้อมเจล เป็นเวลา 30 นาที เขย่าอย่างสม่ำเสมอ เมื่อครบเวลาล้างแผ่นเจลด้วยน้ำ Deionized อย่างรวดเร็วไม่เกิน 5 วินาที และยกแผ่นกระจกใส่ในสารละลาย Developer ที่แช่เย็นเก็บไว้ เขย่าจนกว่าจะปรากฏแถบดีเอ็นเอชัดเจนจึงทำการหยุดปฏิกิริยา โดยการเติมสารละลาย Fixative (10% Acetic acid) และเขย่าต่อเป็นเวลานาน 3-5 นาที จนกระทั่งหมดฟอง จากนั้นจึงนำแผ่นกระจกล้างด้วยน้ำ Deionized และยกมาผึ่งให้แห้ง

2.3.4.4 การวิเคราะห์ข้อมูลเครื่องหมายเอเอฟแอลพี

- คัดเลือกคู่ไพร์เมอร์ที่เหมาะสมจากทั้งหมด 37 คู่ โดยเลือกเฉพาะคู่ที่ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมาก ชัดเจน และแสดงความแตกต่างระหว่าง *Mitragyna* แต่ละชนิด
- คำนวณหาร้อยละของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงโพลีมอร์ฟิซึม (Percentage of polymorphism) และจำนวนแถบดีเอ็นเอเฉลี่ยต่อคู่ไพร์เมอร์ได้จาก

$$\text{percentage of polymorphism} = \frac{\text{จำนวนของแถบดีเอ็นเอที่แสดงโพลีมอร์ฟิซึม}}{\text{จำนวนของแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่ศึกษา}} \times 100$$

$$\text{จำนวนแถบดีเอ็นเอเฉลี่ยต่อคู่ไพร์เมอร์} = \frac{\text{จำนวนของแถบดีเอ็นเอทั้งหมด}}{\text{จำนวนคู่ไพร์เมอร์ที่ศึกษา}}$$

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

- วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ทำการแปลผลข้อมูลจากแถบดีเอ็นเอที่สามารถใช้แยกความแตกต่างของ *Mitragyna* แต่ละชนิด โดยเปรียบเทียบจากความเหมือนและความแตกต่างของรูปแบบของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น โดยตำแหน่งที่พบแถบดีเอ็นเอที่แถวหนึ่ง ๆ ให้มีสัญลักษณ์เป็น “1” ส่วนตำแหน่งที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นที่แถวเดียวกันนั้นให้มีสัญลักษณ์เป็น “0” แล้วนำไปวิเคราะห์ค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้ Jaccard’s similarity สร้าง Dendrogram ด้วยวิธี UPGMA[ix] โดยโปรแกรม SAHN[x] แสดงผลในรูปแบบของแผนภาพความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม นอกจากนี้ ได้ทำการหาค่า Cophenetic correlation (r) เพื่อตรวจสอบความเหมาะสมในการจัดกลุ่มซึ่งดูจากค่า Goodness of fit[xi] โดยใช้โปรแกรม COPH และ MXCOMP

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

2.4 ผลการศึกษาและการอภิปราย

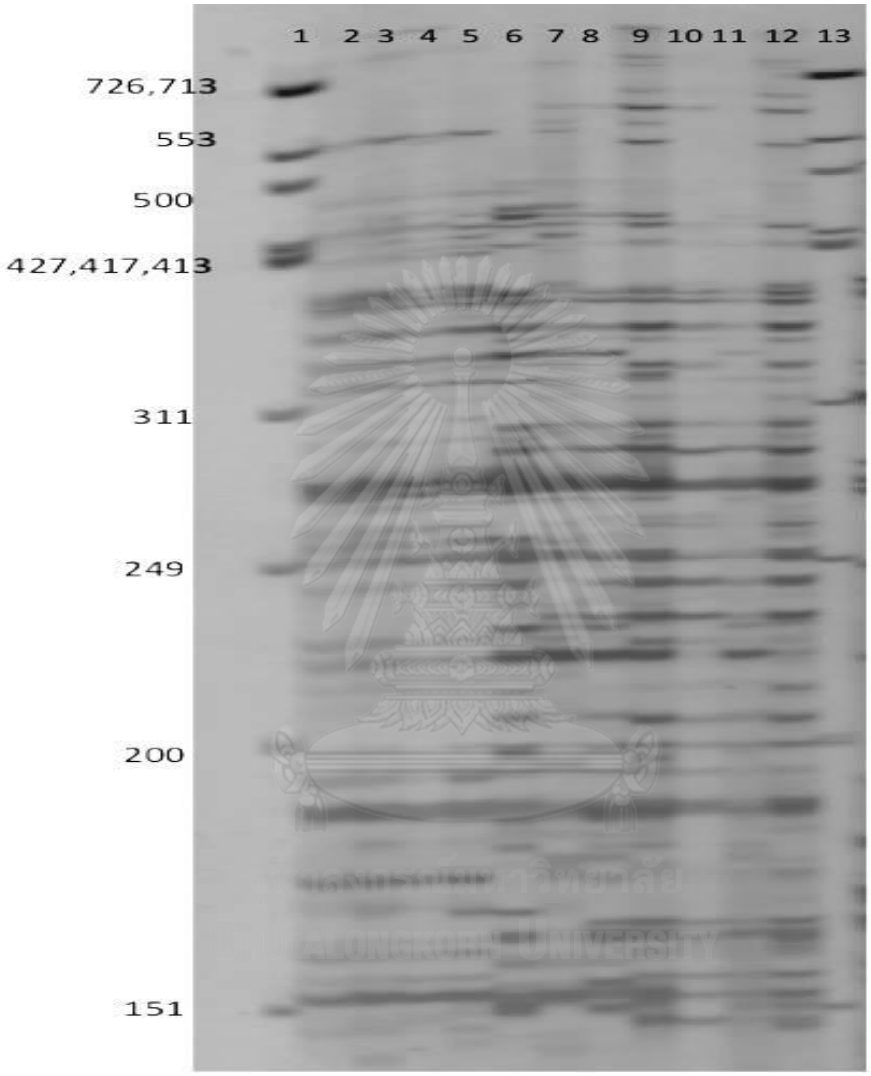
2.4.1 การคัดเลือกคู่ไพร์เมอร์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการศึกษา

จากการนำไพร์เมอร์จำนวน 37 คู่ มาเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอในขั้นตอน Selective amplification และแยกขนาดด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสภายใต้ตัวกลางชนิด Denaturing polyacrylamide gel แล้วคัดเลือกคู่ไพร์เมอร์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการศึกษา ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ พบไพร์เมอร์ที่เหมาะสมจำนวน 18 คู่ ในแต่ละคู่ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน สามารถแสดงความแตกต่างของ *Mitragyna* แต่ละชนิด และมีจำนวนแถบดีเอ็นเอตั้งแต่ 16-46 แถบ ดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 คู่ไพร์เมอร์ที่คัดเลือกใช้ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชในสกุล *Mitragyna*

No.	Primer combination	Number of AFLP bands	Size range (bps)	Percentage of polymorphic bands
1	ER3AAG / MS3CTA	39	118-553	29
2	ER3AAC / MS3CAG	29	118-726	20
3	ER3AAC / MS3CTA	42	100-726	32
4	ER3ACA / MS3CTA	32	200-1000	27
5	ER3ACA / MS3CTT	39	140-1000	34
6	ER3ACA / MS3CAT	38	151-1000	25
7	ER3ACT / MS3CAT	46	140-1000	36
8	ER3ACT / MS3CTG	42	118-1000	40
9	ER3ACA / MS3CCA	30	151-726	23
10	ER3ACA / MS3CCT	37	151-1000	32
11	ER3ACA / MS3CCC	30	140-1000	24
12	ER3ACA / MS3CCG	22	118-1000	16
13	ER3ACA / MS3CGA	21	118-500	17
14	ER3ACA / MS3CGC	16	151-1000	12
15	ER3AGG / MS3CCA	22	200-553	15
16	ER3AGG / MS3CCT	22	151-553	12
17	ER3AGG / MS3CCC	37	151-1000	32
18	ER3AGG / MS3CGA	44	118-1000	38
Total		588		78.91

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



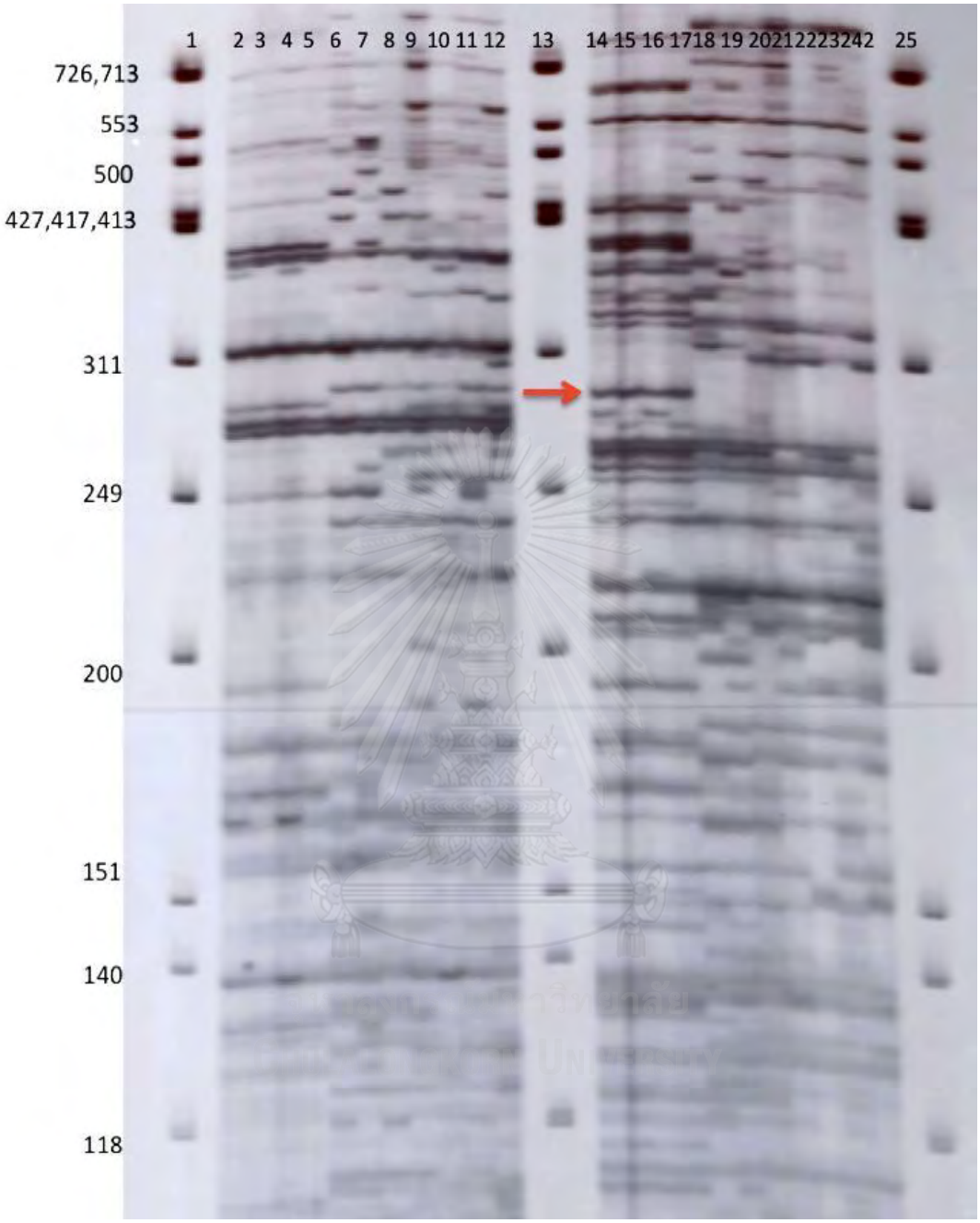
ภาพที่ 6 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างจากเครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ ER3AAG / MS3CTA

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

คำอธิบายภาพที่ 6

Lane 1: phiX174 DNA/*Hinf*I Marker
Lane 2: *M. speciosa* MS1
Lane 3: *M. speciosa* MS2
Lane 4: *M. speciosa* MS3
Lane 5: *M. speciosa* MS4
Lane 6: *M. diversifolia* MD1
Lane 7: *M. diversifolia* MD2
Lane 8: *M. diversifolia* MD3
Lane 9: *M. rotundifolia* MR1
Lane 10: *M. hirsuta* MH1
Lane 11: *M. hirsuta* MH2
Lane 12: *M. hirsuta* MH3
Lane 13: phiX174 DNA/*Hinf*I Marker

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



ภาพที่ 7 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างจากเครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ ER3AAC / MS3CAG และ ER3AAC / MS3CTA

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

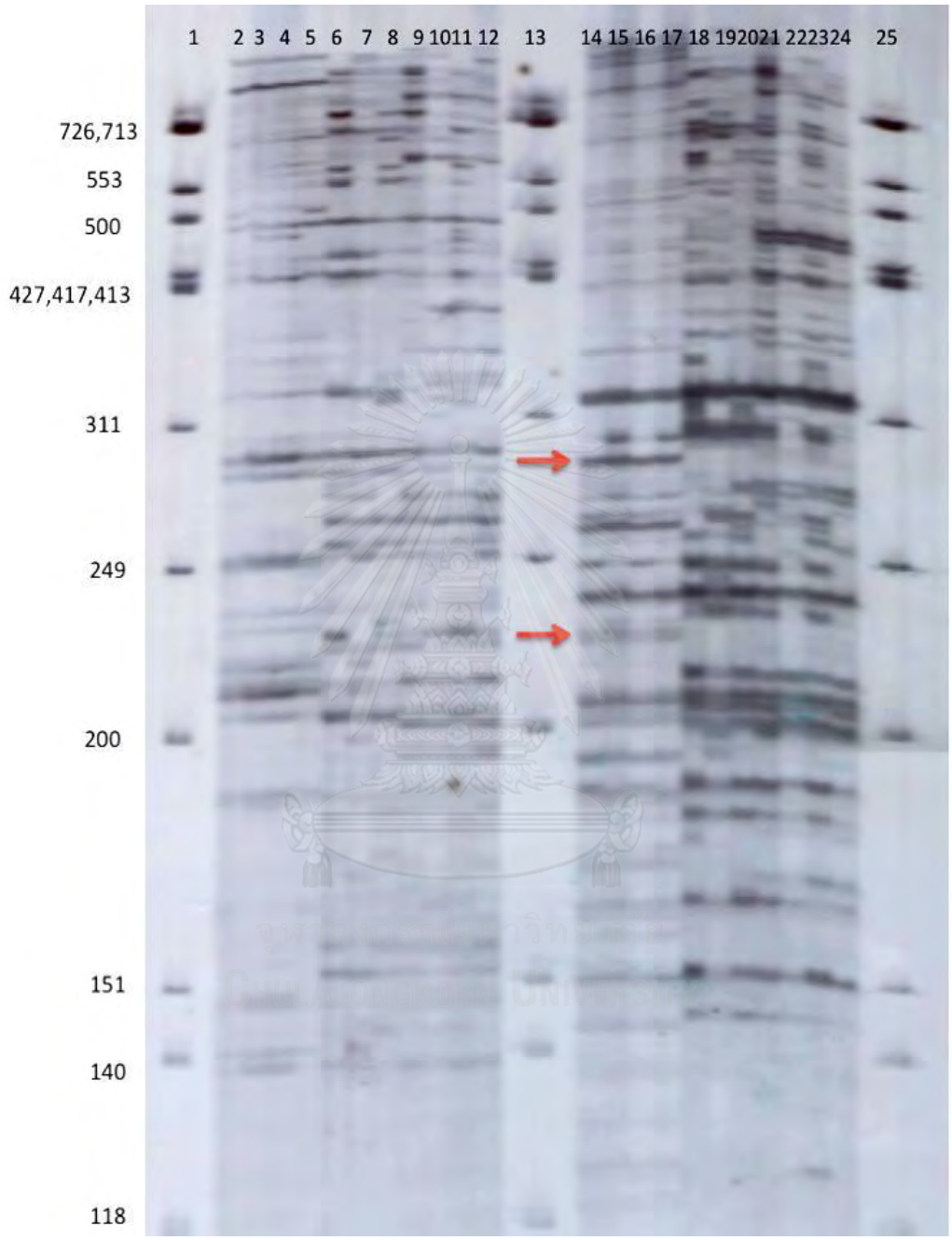
คำอธิบายภาพที่ 7

ตำแหน่งที่มีลูกศรชี้ แสดงถึงตำแหน่งที่มีแถบดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ของ *M. speciosa*

Lane 1: phiX174 DNA/*Hinf*I Marker
Lane 2: *M. speciosa* MS1 Lane 3: *M. speciosa* MS2
Lane 4: *M. speciosa* MS3 Lane 5: *M. speciosa* MS4
Lane 6: *M. diversifolia* MD1 Lane 7: *M. diversifolia* MD2
Lane 8: *M. diversifolia* MD3 Lane 9: *M. rotundifolia* MR1
Lane 10: *M. hirsuta* MH1 Lane 11: *M. hirsuta* MH2
Lane 12: *M. hirsuta* MH3
Lane 13: phiX174 DNA/*Hinf*I Marker
Lane 14: *M. speciosa* MS1 Lane 15: *M. speciosa* MS2
Lane 16: *M. speciosa* MS3 Lane 17: *M. speciosa* MS4
Lane 18: *M. diversifolia* MD1 Lane 19: *M. diversifolia* MD2
Lane 20: *M. diversifolia* MD3 Lane 21: *M. rotundifolia* MR1
Lane 22: *M. hirsuta* MH1 Lane 23: *M. hirsuta* MH2
Lane 24: *M. hirsuta* MH3
Lane 25: phiX174 DNA/*Hinf*I Marker

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



ภาพที่ 8 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างจากเครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี
โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ ER3ACA / MS3CTA และ ER3AGG / MS3CCC

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

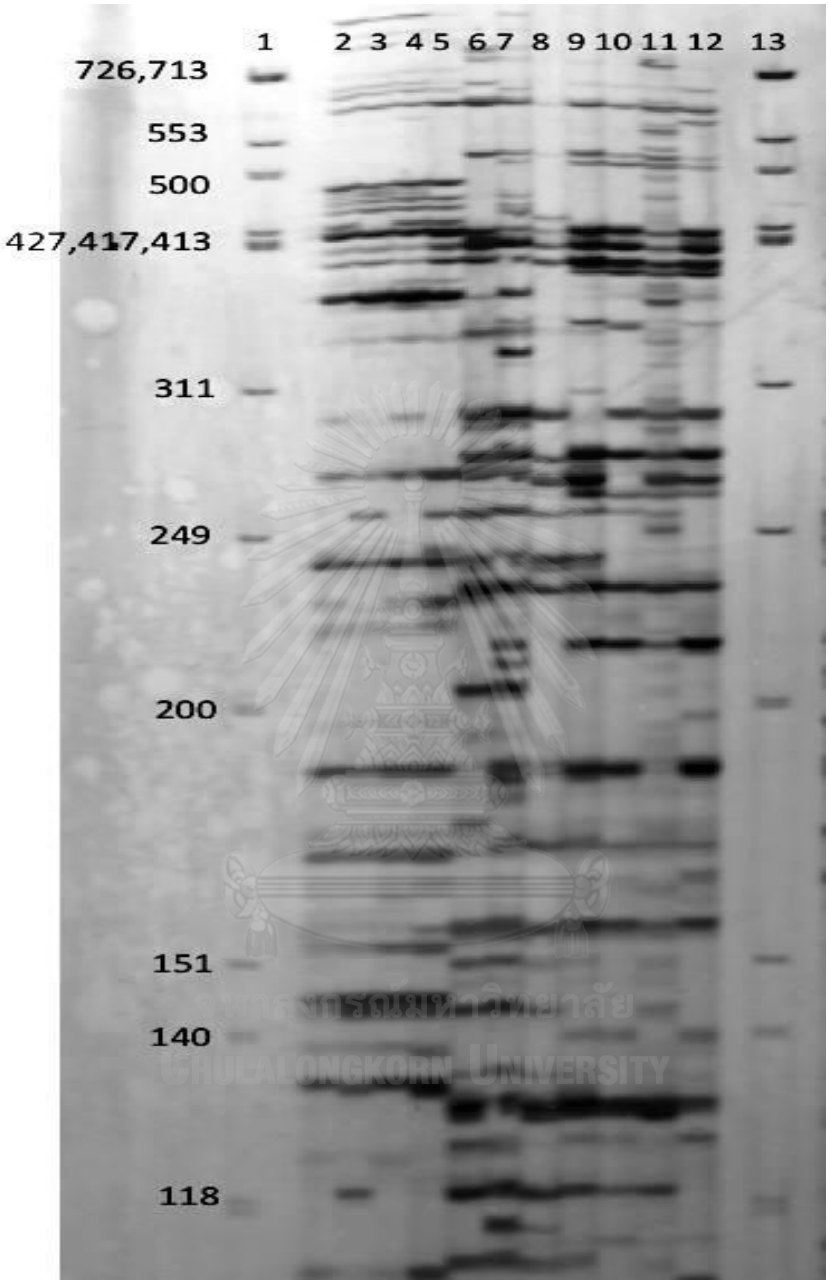
คำอธิบายภาพที่ 8

ตำแหน่งที่มีลูกศรชี้ แสดงถึงตำแหน่งที่มีแถบดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ของ *M. speciosa*

Lane 1: phiX174 DNA/*Hinf*I Marker
Lane 2: *M. speciosa* MS1 Lane 3: *M. speciosa* MS2
Lane 4: *M. speciosa* MS3 Lane 5: *M. speciosa* MS4
Lane 6: *M. diversifolia* MD1 Lane 7: *M. diversifolia* MD2
Lane 8: *M. diversifolia* MD3 Lane 9: *M. rotundifolia* MR1
Lane 10: *M. hirsuta* MH1 Lane 11: *M. hirsuta* MH2
Lane 12: *M. hirsuta* MH3
Lane 13: phiX174 DNA/*Hinf*I Marker
Lane 14: *M. speciosa* MS1 Lane 15: *M. speciosa* MS2
Lane 16: *M. speciosa* MS3 Lane 17: *M. speciosa* MS4
Lane 18: *M. diversifolia* MD1 Lane 19: *M. diversifolia* MD2
Lane 20: *M. diversifolia* MD3 Lane 21: *M. rotundifolia* MR1
Lane 22: *M. hirsuta* MH1 Lane 23: *M. hirsuta* MH2
Lane 24: *M. hirsuta* MH3
Lane 25: phiX174 DNA/*Hinf*I Marker

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



ภาพที่ 9 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างจากเครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี
โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ ER3ACA / MS3CTT

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

คำอธิบายภาพที่ 17

Lane 1: phiX174 DNA/*Hinf*I Marker

Lane 2: *M. speciosa* MS1 Lane 3: *M. speciosa* MS2

Lane 4: *M. speciosa* MS3 Lane 5: *M. speciosa* MS4

Lane 6: *M. diversifolia* MD1 Lane 7: *M. diversifolia* MD2

Lane 8: *M. diversifolia* MD3 Lane 9: *M. rotundifolia* MR1

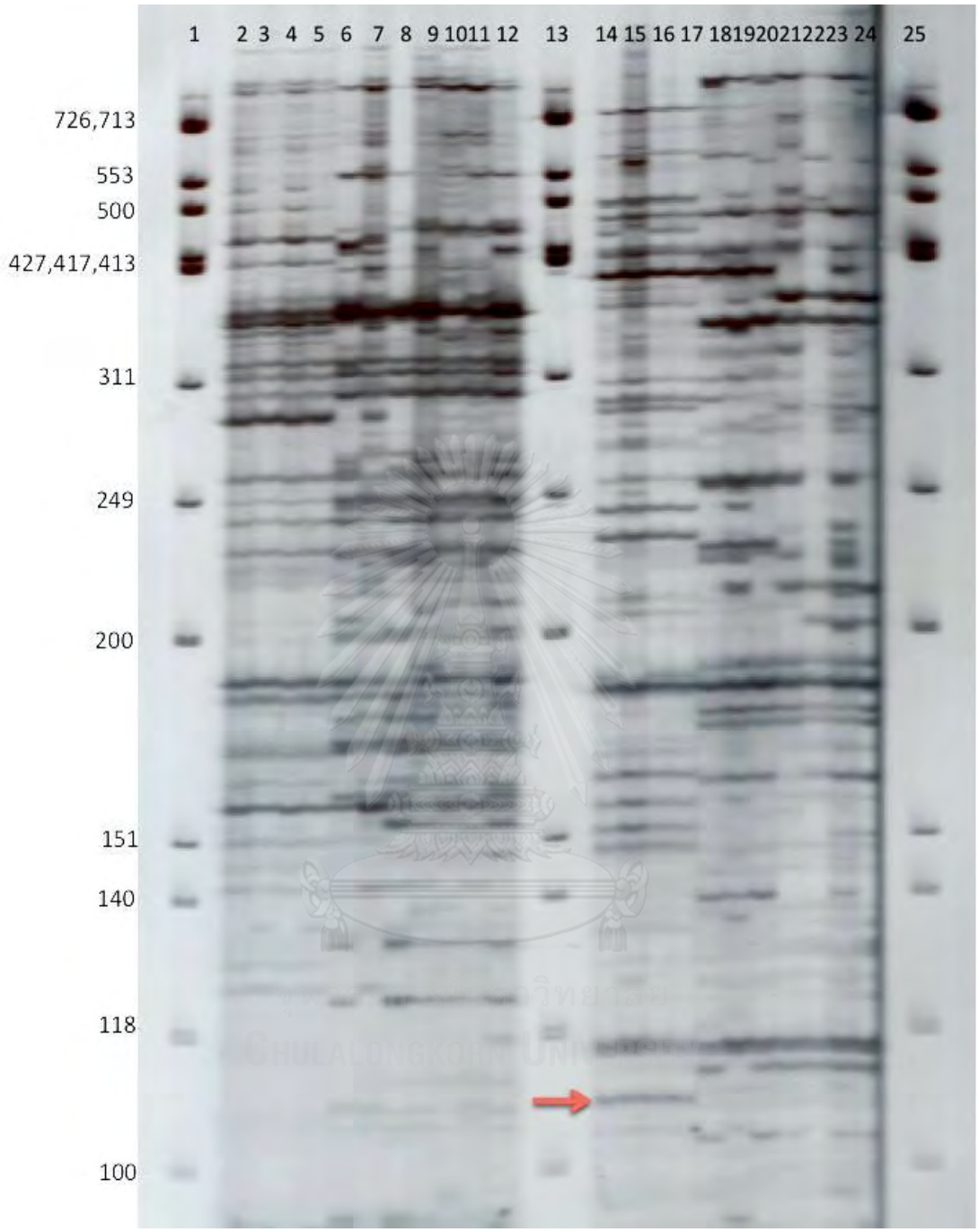
Lane 10: *M. hirsuta* MH1 Lane 11: *M. hirsuta* MH2

Lane 12: *M. hirsuta* MH3

Lane 13: phiX174 DNA/*Hinf*I Marker

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



ภาพที่ 10 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างจากเครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ ER3ACA / MS3CAT และ ER3AGG / MS3CGA

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

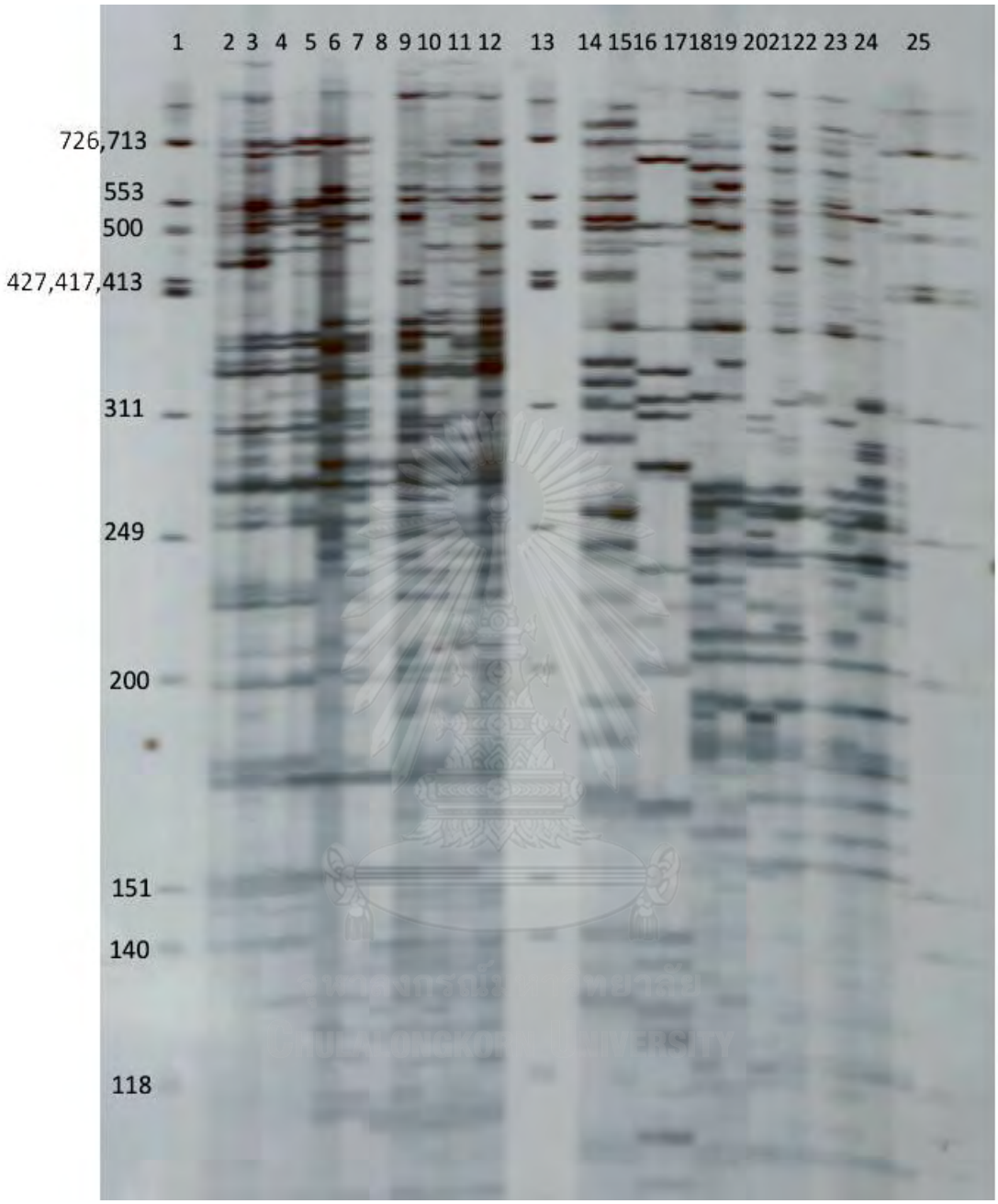
คำอธิบายภาพที่ 10

ตำแหน่งที่มีลูกศรชี้ แสดงถึงตำแหน่งที่มีแถบดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ของ *M. speciosa*

Lane 1: phiX174 DNA/*Hinf*I Marker
Lane 2: *M. speciosa* MS1 Lane 3: *M. speciosa* MS2
Lane 4: *M. speciosa* MS3 Lane 5: *M. speciosa* MS4
Lane 6: *M. diversifolia* MD1 Lane 7: *M. diversifolia* MD2
Lane 8: *M. diversifolia* MD3 Lane 9: *M. rotundifolia* MR1
Lane 10: *M. hirsuta* MH1 Lane 11: *M. hirsuta* MH2
Lane 12: *M. hirsuta* MH3
Lane 13: phiX174 DNA/*Hinf*I Marker
Lane 14: *M. speciosa* MS1 Lane 15: *M. speciosa* MS2
Lane 16: *M. speciosa* MS3 Lane 17: *M. speciosa* MS4
Lane 18: *M. diversifolia* MD1 Lane 19: *M. diversifolia* MD2
Lane 20: *M. diversifolia* MD3 Lane 21: *M. rotundifolia* MR1
Lane 22: *M. hirsuta* MH1 Lane 23: *M. hirsuta* MH2
Lane 24: *M. hirsuta* MH3
Lane 25: phiX174 DNA/*Hinf*I Marker

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



ภาพที่ 11 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างจากเครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี
โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ ER3ACT / MS3CAT และ ER3ACT / MS3CTG

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

คำอธิบายภาพที่ 11

Lane 1: phiX174 DNA/*Hinf*I Marker

Lane 2: *M. speciosa* MS1 Lane 3: *M. speciosa* MS2

Lane 4: *M. speciosa* MS3 Lane 5: *M. speciosa* MS4

Lane 6: *M. diversifolia* MD1 Lane 7: *M. diversifolia* MD2

Lane 8: *M. diversifolia* MD3 Lane 9: *M. rotundifolia* MR1

Lane 10: *M. hirsuta* MH1 Lane 11: *M. hirsuta* MH2

Lane 12: *M. hirsuta* MH3

Lane 13: phiX174 DNA/*Hinf*I Marker

Lane 14: *M. speciosa* MS1 Lane 15: *M. speciosa* MS2

Lane 16: *M. speciosa* MS3 Lane 17: *M. speciosa* MS4

Lane 18: *M. diversifolia* MD1 Lane 19: *M. diversifolia* MD2

Lane 20: *M. diversifolia* MD3 Lane 21: *M. rotundifolia* MR1

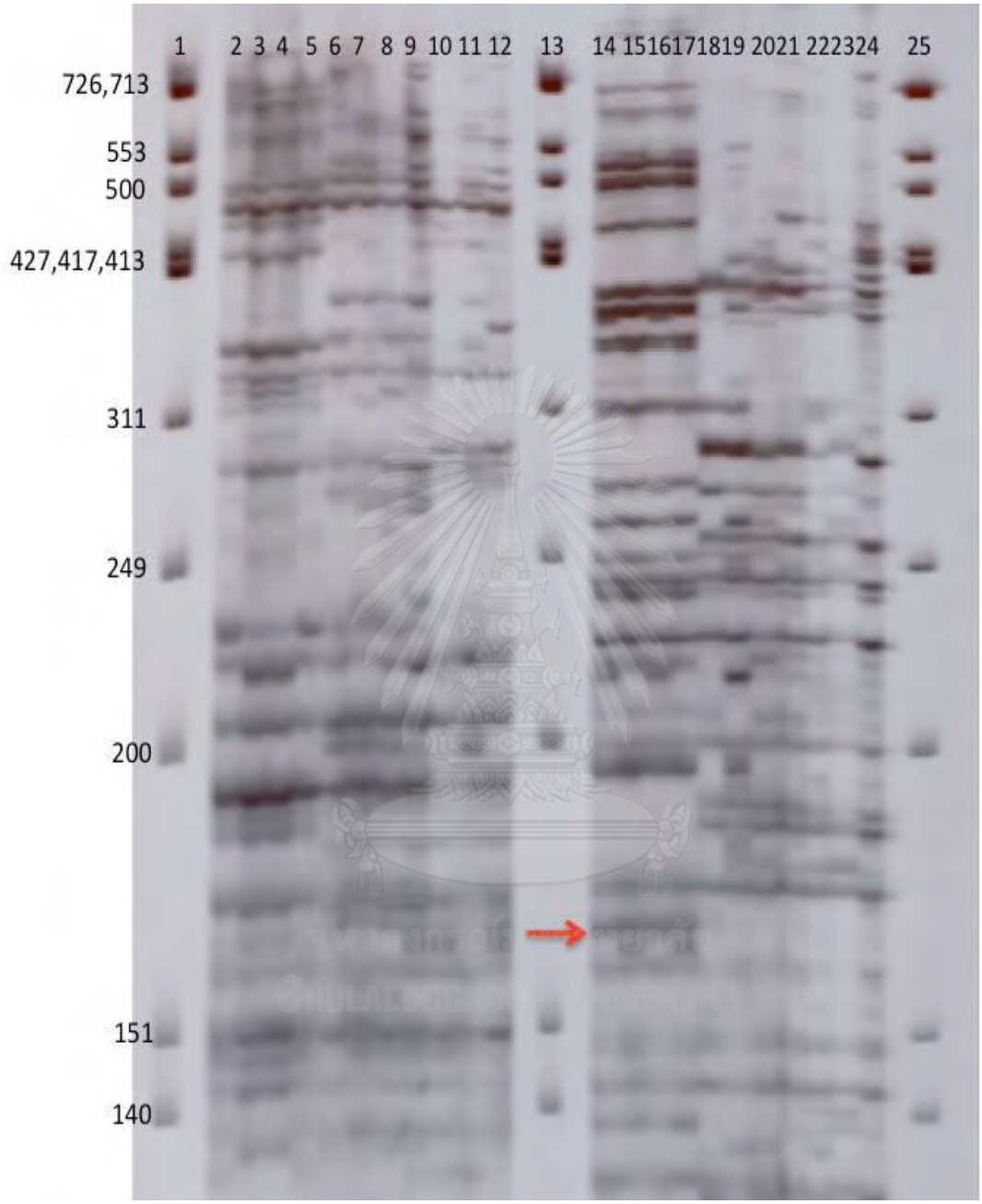
Lane 22: *M. hirsuta* MH1 Lane 23: *M. hirsuta* MH2

Lane 24: *M. hirsuta* MH3

Lane 25: phiX174 DNA/*Hinf*I Marker

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



ภาพที่ 12 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างจากเครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี
โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ ER3ACA / MS3CCA และ ER3ACA / MS3CCT

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

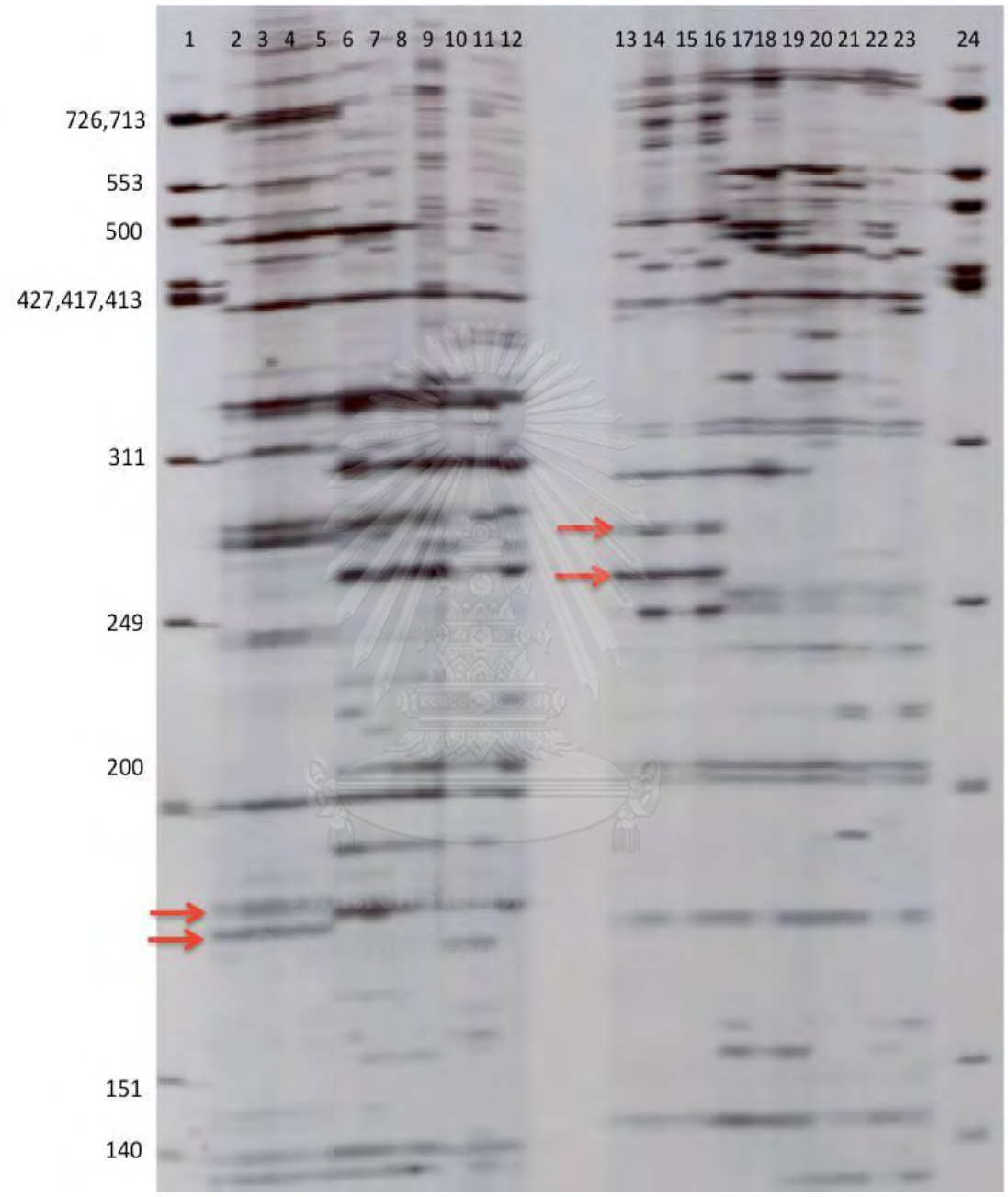
คำอธิบายภาพที่ 12

ตำแหน่งที่มีลูกศรชี้ แสดงถึงตำแหน่งที่มีแถบดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ของ *M. speciosa*

Lane 1: phiX174 DNA/*Hinf*I Marker
Lane 2: *M. speciosa* MS1 Lane 3: *M. speciosa* MS2
Lane 4: *M. speciosa* MS3 Lane 5: *M. speciosa* MS4
Lane 6: *M. diversifolia* MD1 Lane 7: *M. diversifolia* MD2
Lane 8: *M. diversifolia* MD3 Lane 9: *M. rotundifolia* MR1
Lane 10: *M. hirsuta* MH1 Lane 11: *M. hirsuta* MH2
Lane 12: *M. hirsuta* MH3
Lane 13: phiX174 DNA/*Hinf*I Marker
Lane 14: *M. speciosa* MS1 Lane 15: *M. speciosa* MS2
Lane 16: *M. speciosa* MS3 Lane 17: *M. speciosa* MS4
Lane 18: *M. diversifolia* MD1 Lane 19: *M. diversifolia* MD2
Lane 20: *M. diversifolia* MD3 Lane 21: *M. rotundifolia* MR1
Lane 22: *M. hirsuta* MH1 Lane 23: *M. hirsuta* MH2
Lane 24: *M. hirsuta* MH3
Lane 25: phiX174 DNA/*Hinf*I Marker

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



ภาพที่ 13 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างจากเครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี
โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ ER3ACA / MS3CCC และ ER3ACA / MS3CCG

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

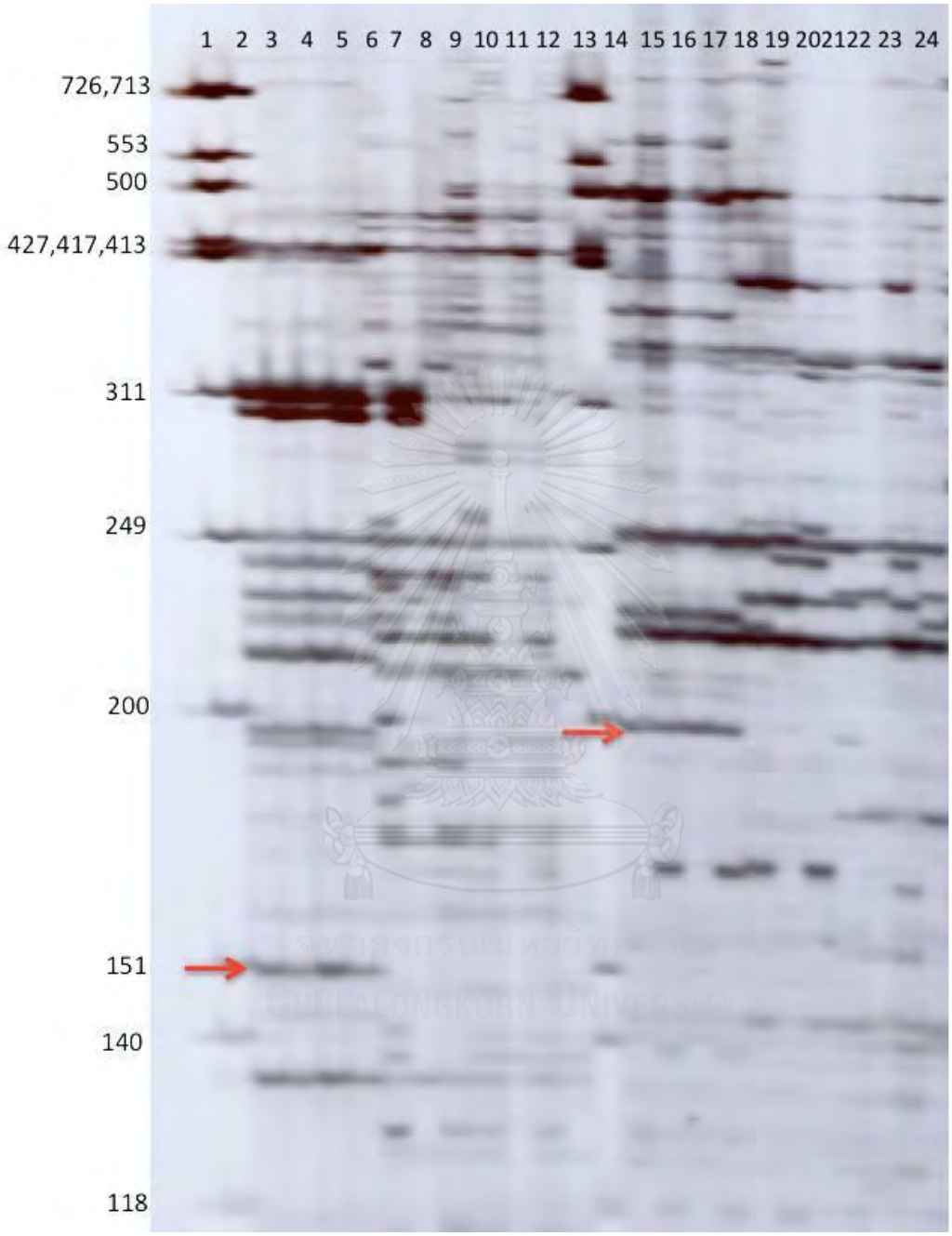
คำอธิบายภาพที่ 13

ตำแหน่งที่มีลูกศรชี้ แสดงถึงตำแหน่งที่มีแถบดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ของ *M. speciosa*

Lane 1: phiX174 DNA/*Hinf*I Marker
Lane 2: *M. speciosa* MS1 Lane 3: *M. speciosa* MS2
Lane 4: *M. speciosa* MS3 Lane 5: *M. speciosa* MS4
Lane 6: *M. diversifolia* MD1 Lane 7: *M. diversifolia* MD2
Lane 8: *M. diversifolia* MD3 Lane 9: *M. rotundifolia* MR1
Lane 10: *M. hirsuta* MH1 Lane 11: *M. hirsuta* MH2
Lane 12: *M. hirsuta* MH3
Lane 13: *M. speciosa* MS1 Lane 14: *M. speciosa* MS2
Lane 15: *M. speciosa* MS3 Lane 16: *M. speciosa* MS4
Lane 17: *M. diversifolia* MD1 Lane 18: *M. diversifolia* MD2
Lane 19: *M. diversifolia* MD3 Lane 20: *M. rotundifolia* MR1
Lane 21: *M. hirsuta* MH1 Lane 22: *M. hirsuta* MH2
Lane 23: *M. hirsuta* MH3
Lane 24: phiX174 DNA/*Hinf*I Marker

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



ภาพที่ 14 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างจากเครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี
โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ ER3ACA / MS3CGA และ ER3ACA / MS3CGC

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

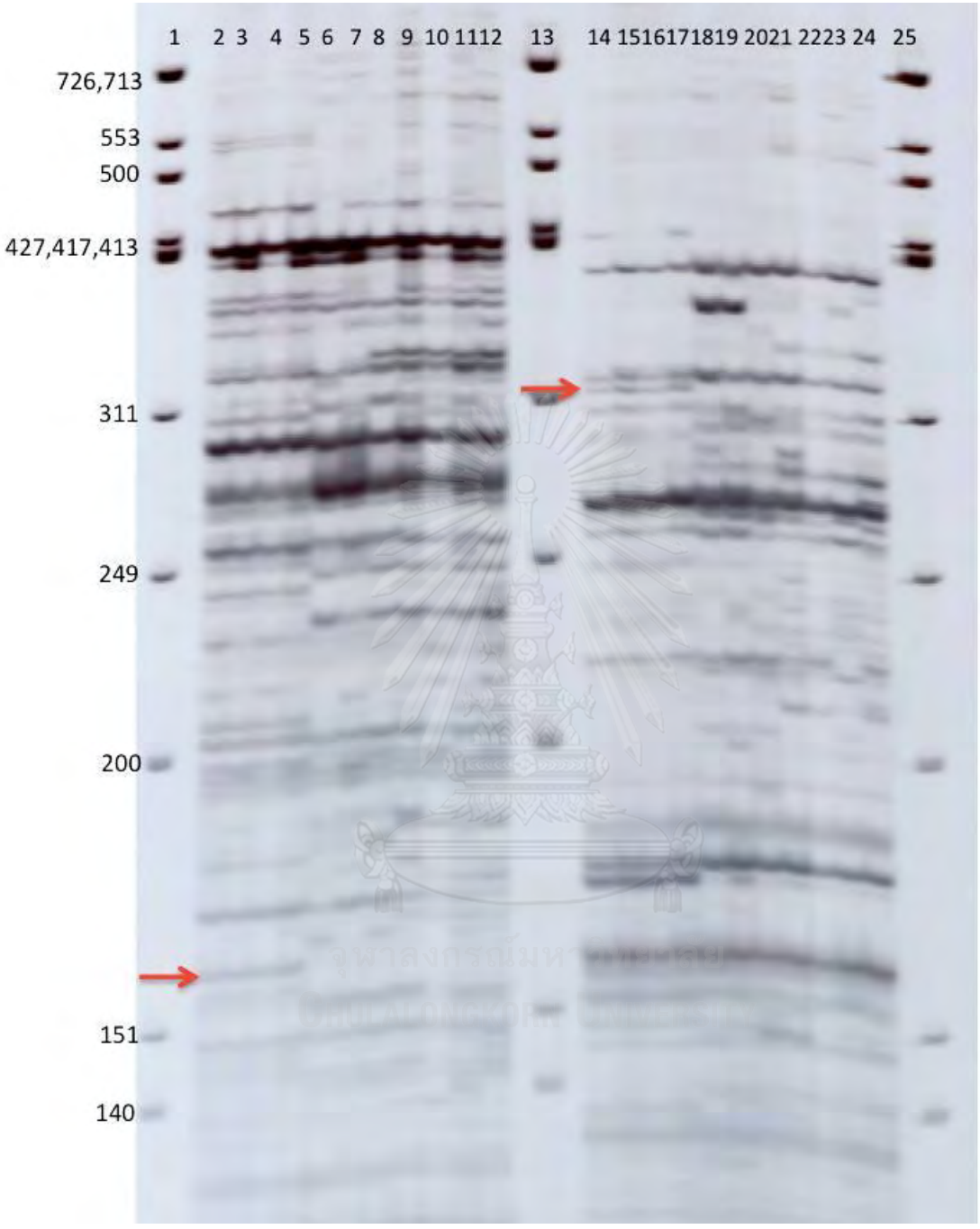
คำอธิบายภาพที่ 14

ตำแหน่งที่มีลูกศรชี้ แสดงถึงตำแหน่งที่มีแถบดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ของ *M. speciosa*

Lane 1: phiX174 DNA/*Hinf*I Marker
Lane 2: *M. speciosa* MS1 Lane 3: *M. speciosa* MS2
Lane 4: *M. speciosa* MS3 Lane 5: *M. speciosa* MS4
Lane 6: *M. diversifolia* MD1 Lane 7: *M. diversifolia* MD2
Lane 8: *M. diversifolia* MD3 Lane 9: *M. rotundifolia* MR1
Lane 10: *M. hirsuta* MH1 Lane 11: *M. hirsuta* MH2
Lane 12: *M. hirsuta* MH3
Lane 13: phiX174 DNA/*Hinf*I Marker
Lane 14: *M. speciosa* MS1 Lane 15: *M. speciosa* MS2
Lane 16: *M. speciosa* MS3 Lane 17: *M. speciosa* MS4
Lane 18: *M. diversifolia* MD1 Lane 19: *M. diversifolia* MD2
Lane 20: *M. diversifolia* MD3 Lane 21: *M. rotundifolia* MR1
Lane 22: *M. hirsuta* MH1 Lane 23: *M. hirsuta* MH2
Lane 24: *M. hirsuta* MH3

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



ภาพที่ 15 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างจากเครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี
โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ ER3AGG / MS3CCA และ ER3AGG / MS3CCT

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

คำอธิบายภาพที่ 15

ตำแหน่งที่มีลูกศรชี้ แสดงถึงตำแหน่งที่มีแถบดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ของ *M. speciosa*

Lane 1: phiX174 DNA/*Hinf*I Marker
Lane 2: *M. speciosa* MS1 Lane 3: *M. speciosa* MS2
Lane 4: *M. speciosa* MS3 Lane 5: *M. speciosa* MS4
Lane 6: *M. diversifolia* MD1 Lane 7: *M. diversifolia* MD2
Lane 8: *M. diversifolia* MD3 Lane 9: *M. rotundifolia* MR1
Lane 10: *M. hirsuta* MH1 Lane 11: *M. hirsuta* MH2
Lane 12: *M. hirsuta* MH3
Lane 13: phiX174 DNA/*Hinf*I Marker
Lane 14: *M. speciosa* MS1 Lane 15: *M. speciosa* MS2
Lane 16: *M. speciosa* MS3 Lane 17: *M. speciosa* MS4
Lane 18: *M. diversifolia* MD1 Lane 19: *M. diversifolia* MD2
Lane 20: *M. diversifolia* MD3 Lane 21: *M. rotundifolia* MR1
Lane 22: *M. hirsuta* MH1 Lane 23: *M. hirsuta* MH2
Lane 24: *M. hirsuta* MH3
Lane 25: phiX174 DNA/*Hinf*I Marker

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

2.4.2 ร้อยละของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงโพลีมอร์ฟิซึม (Percentage of polymorphism) และจำนวนแถบดีเอ็นเอเฉลี่ยต่อคู่ไพร์เมอร์

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบรูปแบบและจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏใน *Mitragyna* ทั้ง 11 ตัวอย่าง โดยใช้ไพร์เมอร์จำนวน 18 คู่ พบว่า ที่ตำแหน่งแถบดีเอ็นเอ 100 bp – 1 kbp ส่วนใหญ่มีความแตกต่างกัน จากจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 588 แถบ แบ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน 124 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 464 แถบ เมื่อนำมาคำนวณหาจำนวนแถบดีเอ็นเอเฉลี่ยต่อคู่ไพร์เมอร์มีค่าเท่ากับ 32.67 แถบ คิดเป็นสัดส่วนค่าโพลีมอร์ฟิซึม (Polymorphism) ที่เกิดขึ้นเท่ากับ 78.91 เปอร์เซ็นต์ รูปแบบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น อาจเกิดการกลายของเบสที่ตำแหน่งจดจำของ เอ็นไซม์ตัดจำเพาะโดยการเปลี่ยนแปลง ขาดหายไปหรือเกิดตำแหน่งเอ็นไซม์ตัดจำเพาะเพิ่มขึ้นมาใหม่ การมีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไป และมีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลดีเอ็นเอใหม่ในช่วงระหว่างตำแหน่งจำเพาะเดิม ทำให้ขนาดชิ้นดีเอ็นเอเกิดการเปลี่ยนแปลง[xii,xiii,xiv]

2.4.3 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

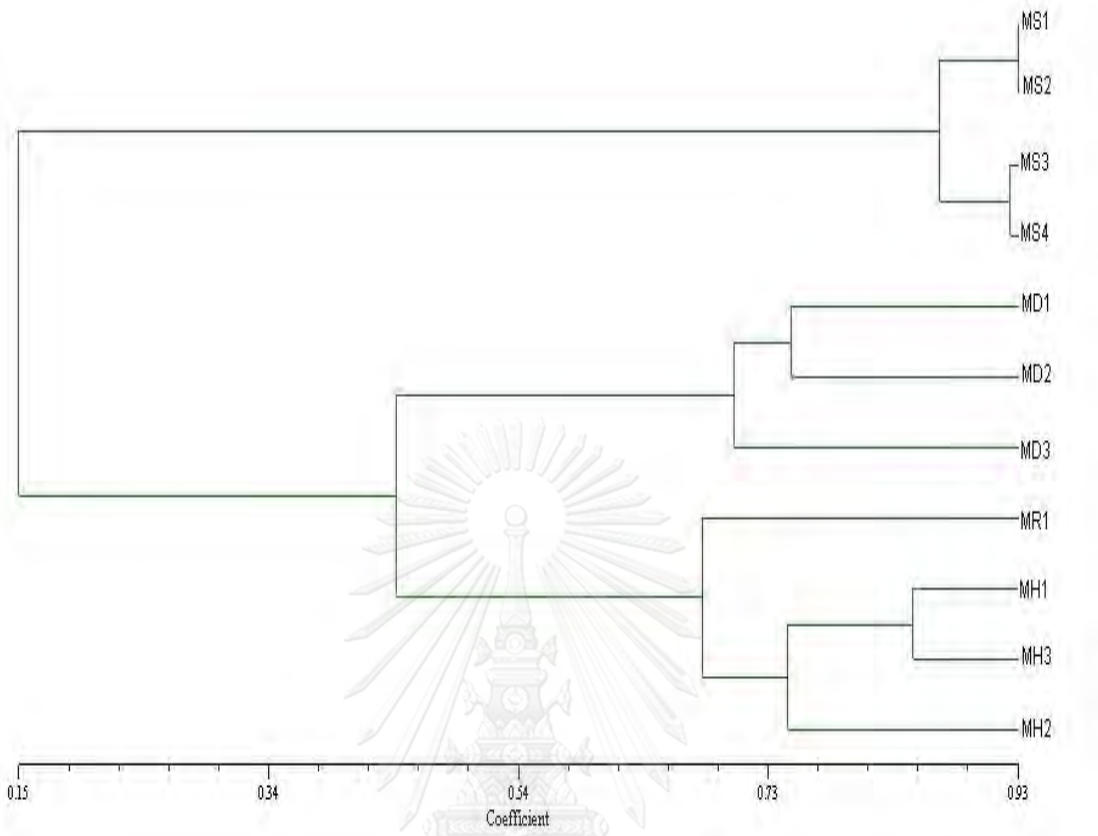
ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชในสกุล *Mitragyna* ทั้ง 4 ชนิด รวมทั้งหมด 11 ตัวอย่าง โดยนำข้อมูลของขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยเครื่องหมายเอเอฟแอลพี จากทั้งหมด 18 คู่ไพร์เมอร์ พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 588 แถบ โดยแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจำนวน 464 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันจำนวน 124 แถบ เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยใช้ Jaccard's similarity matrix สร้าง Dendrogram และ วิธี UPGMA พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงของ Jaccard (Jaccard's similarity) อยู่ระหว่าง 0.15-0.93 แสดงผลในรูปแบบของ Phylogenetic tree สามารถแบ่ง *Mitragyna* ออกเป็น 2 กลุ่มตามความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ปรากฏ (ภาพที่ 16) ดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย *Mitragyna speciosa* หรือ กระท่อม จากทั้ง 4 แหล่งตัวอย่าง

กลุ่มที่ 2 แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่

- *Mitragyna diversifolia*
- *Mitragyna rotundifolia* และ *Mitragyna hirsuta*

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



ภาพที่ 16 Dendrogram แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Mitragyna* 11 ตัวอย่าง ที่ได้มาจากการโดยใช้ Jaccard's similarity matrix และ วิธี UPGMA

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมข้างต้น พบว่า มีค่า Cophenetic correlation (r) เท่ากับ 0.99 ซึ่งถือว่าเป็นการจัดกลุ่มที่ดีมาก[xv] ตามเกณฑ์ค่าประสิทธิภาพของการจัดกลุ่มของ Rohlf[11] คือ

$r \geq 0.9$ ถือว่าการจัดกลุ่มมีความเหมาะสมมาก

$0.8 < r \leq 0.9$ ถือว่ามีความเหมาะสม

$0.7 < r \leq 0.8$ ถือว่ามีความเหมาะสมน้อย

$r \leq 0.7$ ถือว่ามีความเหมาะสมน้อยมาก

และสำหรับค่า r ที่มีค่ามาก อาจเนื่องมาจาก

I. จำนวนตัวอย่างของพืชที่ศึกษา (n) หากมีจำนวนตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษามาก จะช่วยให้ข้อมูลที่ได้มีความน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น

II. ความแตกต่างทางพันธุกรรมของกลุ่มตัวอย่าง หากพืชที่ต้องการศึกษามีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมมาก จะทำให้สามารถจัดกลุ่มพืชได้อย่างชัดเจน

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

2.4.4 การนำแถบดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ของ *Mitragyna speciosa* ไปใช้ในการพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความจำเพาะเจาะจงมากขึ้น

จากสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอเอฟแอลพีของพืชสกุล *Mitragyna* ทั้ง 4 ชนิดพบว่า จากไพร์เมอร์ที่ใช้จำนวน 18 คู่ มีไพร์เมอร์จำนวน 11 คู่ ที่ให้แถบดีเอ็นเอของ *Mitragyna speciosa* แตกต่างจาก *Mitragyna* ชนิดอื่น ๆ แสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ไพร์เมอร์ทั้ง 11 คู่ ที่ให้แถบดีเอ็นเอของ *Mitragyna speciosa* แตกต่างจาก *Mitragyna* ชนิดอื่น ๆ

Primers	Size	Number of unique bands
AGG / CGA	100-118	1
ACA / CGC	200	1
ACA / CCT	151-200	1
ACA / CCC	151-200	2
AGG / CCA	151-200	1
ACA / CGA	151	1
AGG / CCC	200-249	1
AGG / CCC	249-311	1
AAC / CTA	249-311	1
ACA / CCG	249-311	2
AGG / CCT	311-427	1
Total		13

ซึ่งแถบดีเอ็นเอดังกล่าวสามารถพัฒนาต่อไปเป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสคาร์ (SCAR; Sequence Characterized Amplified Regions) ซึ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีข้อดีคือ มีความจำเพาะเจาะจงในการพิสูจน์[xvi] มีความเสถียร สามารถทำซ้ำได้ผลเหมือนเดิม และสะดวกในการใช้ตรวจพิสูจน์พืช[xvii]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

บทที่ 3
การสร้างดีเอ็นเอบาร์โค้ด

3.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการสร้างดีเอ็นเอบาร์โค้ด

อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา

3.1.1 อุปกรณ์สำหรับการสกัด วัดคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

- โกร่งกระเบื้องและลูกโกร่ง
- ถุงมือปราศจากแป้ง
- กระติกเก็บความเย็น
- เครื่องชั่งดิจิตอล ทศนิยมสี่ตำแหน่ง
- เครื่อง Digital dry bath (Accublock™ (℃); Elite, Major sciences)
- เครื่องผลิตน้ำ DI (Deionize water, Millipore®)
- 1.5 mL Microcentrifuge tube
- Micropipette และ Micropipette tip
- ลังโฟมสำหรับใส่น้ำแข็ง
- ถาดแม่พิมพ์เจล (Tray) และหวี (Comb)
- แผ่นถุงพลาสติก
- ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuge, Denville 260D)
- เตาไมโครเวฟ (Sharp Microwave Oven)
- เครื่องแยกขนาดดีเอ็นเอ (Gel electrophoresis) สำหรับ Agarose gel (Biorad)
- อุปกรณ์ฉายแสงยูวีและถ่ายภาพเจล (GelDoc™ (℃)XR, Biorad)

3.1.2 อุปกรณ์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์

- เครื่องพีซีอาร์ (C1000™ (℃) Thermal cycler, Biorad)
- PCR tube (Strip)

3.1.3 โปรแกรมที่ใช้ในการวิเคราะห์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

- โปรแกรม Quantity one® 1-D Analysis (BioRad)
- GenBank®, NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)
- โปรแกรม DNA star® Lasergene 8.0 (DNASTAR, Inc)
- โปรแกรม FinchTV
- โปรแกรม Multalin
- โปรแกรม Clustalx 2.1

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา

3.1.4 สารเคมีในการสกัด และตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

- Liquid nitrogen
- ผง Agarose (Molecular Biology Grade Vivantis)
- Ultrapure water
- 50X Tris-Acetate-EDTA (TAE) buffer, pH 8.0 (Invitrogen)
- Ethidium bromide solution (Biorad)
- 6X loading dye (Vivantis)
- Hind III ladder (Vivantis)
- VC 100 bp plus ladder (Vivantis)
- Genomic DNA Mini Kit (Geneaid)

3.1.5 สารเคมีในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์

- PCR buffer (Invitrogen)
- Ultrapure water
- 50 mM $MgCl_2$ (Invitrogen)
- 10 mM dNTPs (Invitrogen)
- *Taq* DNA polymerase (5U/µL) (Invitrogen)
- Primers (Eurofins MWG Operon) แสดงรายละเอียดดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษาปริญญานิพนธ์

ไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5′-3′)
*trn*K3914F	TGGGTTGCTAACTCAATGG
*mat*Kmit(-56)F	CTTTGGTTTGACTATATCGCACTA
*mat*Kmit483F	CCCACCCCGTCCATCTA
*mat*Kmit1166R	CGGCTTACTAACGGGATGTC
*trn*K2R	AACTAGTCGGATGGAGTAC
*trn*HF	CGCGCATGGTGGATTCACAATCC
*psb*A-*di*R	GTAATGCATGAACGTAATGCTC
*rbc*L-Mit-f1	TGTCACCACAAACAGAAACTAAAGCAAGT
*rbc*L-Mit-r1	CTTTTAGTAAAGATTGGGCCGAG
*rbc*L-Mit-f2	CGAGTAGCTCTAGAAGCATGTGTAAAAG
*rbc*L-Mit-r2	TTTGTAACGATCAAGGCTGGTAAGTAA

3.2 ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการสร้างดีเอ็นเอบาร์โค้ด

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

ตัวอย่างที่ใช้ในการสร้างดีเอ็นเอบาร์โค้ดประกอบด้วย ตัวอย่างพืชในสกุล *Mitragyna* จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *M. speciosa* จำนวน 1 ตัวอย่าง, *M. diversifolia* จำนวน 1 ตัวอย่าง, *M. rotundifolia* จำนวน 1 ตัวอย่าง และ *M. hirsuta* จำนวน 1 ตัวอย่าง และเนื่องจากการศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอเอฟแอลพีพบว่าพืชแต่ละชนิดมีความเหมือนกัน จึงสามารถใช้ตัวอย่างของพืชเพียงแหล่งเดียวเป็นตัวอย่างในการทำการศึกษา ดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ตัวอย่างพืชสกุล *Mitragyna* ที่ใช้ในโครงการปริญญานิพนธ์

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อทั่วไป	code	วันที่เก็บ	สถานที่เก็บ
M. speciosa	กระท่อม	MS1	27/06/2013	คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาฯ
M. diversifolia	กระทุ่มนา	MD1	26/06/2013	สวนหลวง ร.9
M. rotundifolia	กระทุ่มเนิน	MR1	26/06/2013	สวนหลวง ร.9
M. hirsuta	กระทุ่มโคก	MH1	26/06/2013	คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาฯ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.3 การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

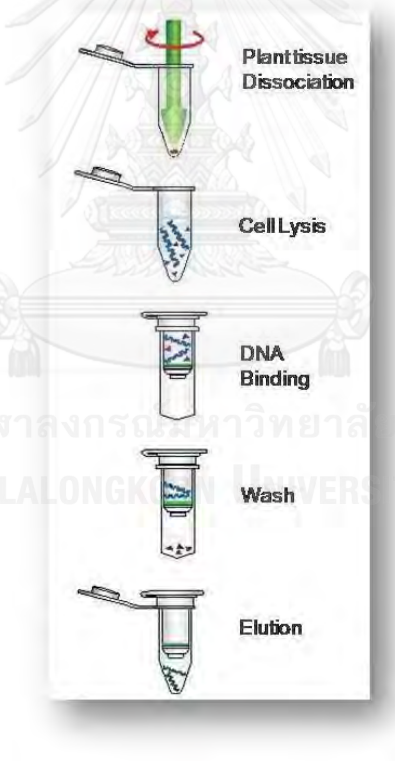
การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดมีขั้นตอน ดังนี้

3.3.1 การเก็บตัวอย่าง (Sample collection)

การเก็บตัวอย่างทำโดยเก็บเอาใบที่ปลายยอด มีความสมบูรณ์ และเป็นโรคน้อยที่สุด เก็บไว้ในถุงพลาสติก ที่มีการพรมน้ำรักษาความชุ่มชื่น และเจาะรูระบายอากาศเล็กน้อย เมื่อนำตัวอย่างมายังห้องปฏิบัติการแล้วจึงเลือกเอาใบที่สมบูรณ์ มีสีเขียว ไม่มีโรค ไม่แก่จนเกินไป นำไปสกัด genomic DNA

3.3.2 การสกัด genomic DNA (genomic DNA extraction)

นำใบของแต่ละตัวอย่างที่เก็บไว้มาตัดเป็นชิ้นส่วนที่เล็กพอสมควร บดกับไนโตรเจนเหลวด้วยโกร่งและลูกโกร่งจนละเอียด ชั่งประมาณ 100 มิลลิกรัมใส่ในหลอด แล้วทำการสกัด genomic DNA ของแต่ละตัวอย่างด้วย Genomic DNA Mini Kit โดยวิธีการแสดงไว้ในรูปที่ 17



รูปที่ 17 การสกัด genomic DNA ด้วยชุดสกัด Genomic DNA Mini Kit [xviii]

3.3.3 การตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากการสกัด genomic DNA

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

หลังเสร็จสิ้นการสกัด ทำการตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากการสกัด genomic DNA ของแต่ละตัวอย่างโดยใช้ Agarose gel electrophoresis เริ่มจากเตรียมสารละลาย 0.8% Agarose ใน 1X TAE buffer อุ่นด้วยไมโครเวฟให้ Agarose ละลายจนหมด (หรือจากการให้ความร้อนเจล 0.8% Agarose ใน 1X TAE buffer ที่แข็งอยู่ให้เหลว) ทิ้งให้อุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 60 องศาเซลเซียส จึงเทสารละลาย Agarose ลงบนถาดที่อยู่ในแม่พิมพ์เจลซึ่งใส่หวีไว้ เทให้สูงประมาณ 0.5 เซนติเมตร รอให้เจลคงรูปดีแล้วจึงนำหวีออก วางถาดเจลใน Gel electrophoresis chamber แล้วเท 1x TAE buffer ลงใน Chamber จนระดับ Buffer อยู่เหนือผิวหน้าเจลเล็กน้อย ใช้ Micropipette ผสมผลผลิตที่ได้กับ Loading dye บนแผ่นพลาสติกและหยอดลงในหลุมของ Agarose gel ต่อขั้วไฟฟ้า ตั้งค่าความต่างศักย์ที่ 100 โวลต์ รอจนกระทั่งแถบสีตัวล่างและตัวบนของ Loading dye เคลื่อนที่ไปได้ระยะเหมาะสมจึงปิดกระแสไฟฟ้า นำเจลออกมาจาก Chamber ย้อมดีเอ็นเอในเจลด้วยสารละลาย Ethidium bromide ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที แล้วจึงนำมาแช่ต่อใน Ultrapure water ประมาณ 10 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอบน Agarose gel ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตผ่านเครื่องถ่ายภาพ GelDoc™ XR (Biorad) และโปรแกรม Quantity one ® 1-D เมื่อได้ภาพแล้วจึงทำการบันทึกภาพที่ถ่ายได้ลงในคอมพิวเตอร์

3.3.4 การคัดเลือกยีนส์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์, การออกแบบไพร์เมอร์ และการส่งสังเคราะห์ไพร์เมอร์

การสร้างและพัฒนา DNA barcode จำเป็นจะต้องมีการเลือกบริเวณของดีเอ็นเอที่เหมาะสมเพื่อให้บาร์โค้ดที่พัฒนาขึ้นมานั้นมีความน่าเชื่อถือ ซึ่งหลักเกณฑ์ที่ใช้ในการประเมินเพื่อหาบริเวณของดีเอ็นเอที่เหมาะสมเป็นไปตาม CBOL Plant Working Group, 2009[xix] คือ มีคุณลักษณะ 3 ประการ ได้แก่ 1.บริเวณที่เป็นมาตรฐานสากล (Universality) 2. บริเวณที่สามารถให้คุณภาพของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ชัดเจน (Sequence quality) และ 3. บริเวณดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการแยกชนิดพืช (Species discrimination) สามารถให้ผลการแยกและระบุชนิดพืชได้ดี หรือมีความแม่นยำสูง แต่จากการวิจัยของนักวิจัยในกลุ่ม CBOL Plant Working Group พบว่าไม่มีดีเอ็นเอบริเวณใดในจีโนมของพืชที่มีคุณลักษณะเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้ครบทุกข้อ [xx] และการใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานมากกว่า 1 บริเวณ (Multi-loci DNA barcode) มีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้ระบุพืชกลุ่มต่างๆ ได้ดีกว่าการใช้เพียงบริเวณเดียว (Single-locus DNA barcode) ดังนั้นในการคัดเลือกบริเวณของดีเอ็นเอที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอในการศึกษาในครั้งนี้ ได้แก่ 4 บริเวณ ดังนี้

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

3.3.4.1 maturase K (*mat*K)

ยีน *mat*K มีขนาดประมาณ 1,550 คู่เบส แทรกตัวอยู่ในส่วน Intron ระหว่าง 5′ และ 3′ ของยีน *trn*K ซึ่งมีขนาดประมาณ 2,600 คู่เบส ดังภาพ 18 เมื่อถอดรหัสและแปลรหัสยีนจะได้เป็นเอนไซม์ Maturase ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างกรดอะมิโนไลซีน (Lysine: K)[xxi] เมื่อเปรียบเทียบกันกับยีนที่อยู่ในคลอโรพลาสต์จีโนมด้วยกันแล้วพบว่ายีน *mat*K เป็นยีนที่มีวิวัฒนาการเร็วที่สุด

ยีน *mat*K เป็นยีนที่เพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์ได้ง่าย โดยอาจจะใช้ไพร์เมอร์ที่มีตำแหน่งจับอยู่ในส่วนของยีนเอง หรือใช้ไพร์เมอร์คู่ที่จับที่ตำแหน่ง *rps*16 กับ *psb*A ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ถัดจาก *mat*K ไปทางด้านซ้าย และขวา ตามลำดับ หรือจะใช้ไพร์เมอร์ที่จับตำแหน่ง 5′ *trn*K กับ 3′ *trn*K ซึ่งอยู่ใกล้กันก็ได้ แต่เนื่องจาก *mat*K เป็นยีนที่มีวิวัฒนาการเร็ว ดังนั้นจึงต้องออกแบบไพร์เมอร์จำเพาะสำหรับพืชแต่ละชนิดเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย

ภาพที่ 18 ตำแหน่งของ ยีน matK [xxii]

3.3.4.2 ยีน *rbc*L

ยีน *rbc*L เป็นยีนในส่วนของคลอโรพลาสต์จีโนม ทำหน้าที่ถอดรหัสเอนไซม์ Ribolose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) หน่วยย่อยขนาดใหญ่ (Large subunit) เอนไซม์ Rubisco ที่สมบูรณ์ (หน่วยย่อยขนาดใหญ่ และขนาดเล็กรวมตัวกัน) จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการรวมตัวของ Rubisco กับ CO_2 ในวัฏจักรคาลวิน (Calvin cycle)[21] ความยาวของยีนมีความแปรผันเล็กน้อยในพืชแต่ละชนิด โดยทั่วไปมีความยาวเฉลี่ย 1400 คู่เบส[xxiii]

ดีเอ็นเอในส่วนของยีน *rbc*L จะได้รับการถ่ายทอดมาจากฝ่ายแม่เพียงฝ่ายเดียว (Uniparental inheritance) ทำให้รูปแบบของดีเอ็นเอเป็นแบบโฮโมโลกัส (Homozygous)[16] คือยีนทุกคู่เหมือนกันหมด และไม่พบสภาวะเฮทเทอโรไซกัส (Heterozygous) ทำให้สามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ง่าย นอกจากนี้เนื่องจากจำนวนของโมเลกุลของคลอโรพลาสต์ต่อจำนวนเซลล์สูง ทำให้สามารถตรวจสอบได้ง่ายยิ่งขึ้น

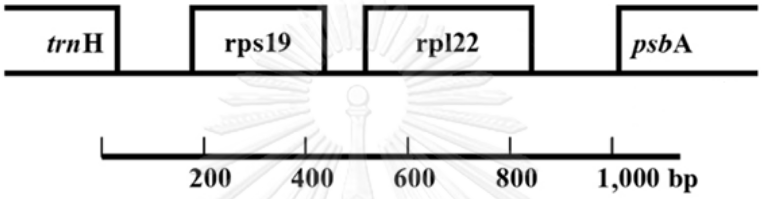
3.3.4.3 ส่วนของนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H และ *psb*A (*trn*H – *psb*A spacer)

ยีน *trn*H เป็นยีนในส่วน Non-coding region ของคลอโรพลาสต์ ถูกถอดรหัสได้เป็น $tRNA^{his}$ (GUG) และจับกับกรดอะมิฮิสทิดีน (Histidine: H) เพื่อนำไปสู่การต่อสายพอลิเปป

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

ไทด์และกลายเป็นโปรตีน ส่วนยีน *psb*A เป็นยีนที่สร้างโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของ Photosystem II ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืช

*trn*H – *psb*A spacer มีขนาดประมาณ 450 คู่เบส ประกอบด้วยยีนขนาดเล็กอีก 2 ยีนแทรกอยู่ ได้แก่ *rps*19 และ *rps* 12 ดังภาพ 19 *trn*H–*psb*A spacer เป็นส่วนของดีเอ็นเอที่นิยมใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์บริเวณหนึ่ง เนื่องจากมีการแปรผันของดีเอ็นเอในสปีชีส์สูงที่สุดในพลาสติดจีโนมของพืชดอก[16] แต่หากให้ *trn*H – *psb*A เพียงบริเวณเดียวในการระบุชนิดของพืชพบว่ามีศักยภาพในการระบุชนิดได้ต่ำกว่าการใช้ร่วมกับบริเวณอื่น[21] ดังนั้นจึงมักใช้ *trn*H – *psb*A ร่วมกับบริเวณอื่นๆ เช่น *ยีน rbc*L[xxiv] หรือยีน *mat*K[xxv] เป็นต้น



*ภาพที่ 19 ส่วนประกอบต่างๆของยีน trn*H–*psb*A spacer[xxvi]

3.3.4.4 บริเวณ Internal transcribed spacer (ITS)

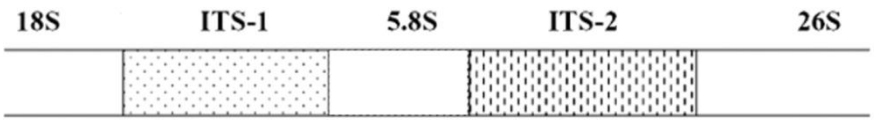
บริเวณ ITS เป็นบริเวณที่แรกอยู่ภายในชุดยีน Ribosomal DNA ขนาด 18S, 5.8S และ 26S ความยาวของดีเอ็นเอบริเวณ *ITS* มีความยาวและลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่แน่นอนขึ้นกับชนิดของพืช

ดีเอ็นเอบริเวณ *ITS* แบ่งได้เป็น 2 บริเวณ คือ *ITS*1 และ *ITS2* ซึ่งอยู่ระหว่าง 18S-5.8S และ 5.8S-26S ตามลำดับ ดังภาพที่ 19 *ITS*1 และ *ITS2* เป็นส่วนหนึ่งของไรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ถูกถอดรหัสเป็นไรโบโซมอาร์เอ็นเอแต่ไม่ได้ถูกรวมอยู่ในโครงสร้างของไรโบโซมที่เป็นส่วนหนึ่งของการสร้างโปรตีน แต่ทำหน้าที่เพียงช่วยให้ 5.8S และ 26S ซึ่งรวมกับเป็น Large subunit rRNA และ 18S ซึ่งทำหน้าที่เป็น Small subunit rRNA ของไรโบโซมเข้ามาใกล้กันมากขึ้นจนมีโครงสร้างเป็นโดเมนส่งผลให้สามารถทำหน้าที่ในการสร้างโปรตีนได้

ดีเอ็นเอบริเวณ *ITS เป็นบริเวณหนึ่งที่ถูกใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์พืชสมุนไพรมากที่สุด เนื่องจากมีบริเวณอนุรักษ์ จึงสามารถใช้เป็นตำแหน่งเกาะของยูนิเวอร์ซอลไพร์เมอร์ (Universal primer) สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆได้ นอกจากนี้ ดีเอ็นเอบริเวณนี้ยังสามารถเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์ได้ง่าย ดีเอ็นเอมีความยาวกำลังพอดีสำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยทั่วไปแต่ส่วนของ ITS*1 และ *ITS2* จะยาวไม่เกิน 300 คู่เบส และความยาวรวมของ *ITS*1, *ITS และ 5.8S ประมาณ 600-700 คู่เบส*[16] *นอกจากนี้ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS ยังมีความแปรผันสูงเพียงพอที่จะใช้แยกและระบุชนิดพืชได้ดี*

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

แต่สำหรับการศึกษาปริญญานิพนธ์ในครั้งนี้ ได้นำข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนส่วน ITS จากการศึกษาของ Suchada Sukrong และคณะ[1] *เพื่อนำมาสร้างเป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ด*



ภาพที่ 20 ส่วนประกอบของยีน ITS[xxvii]

3.3.5 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณที่สนใจ (DNA Amplification)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณที่สนใจ โดยอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส หรือพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction : PCR) เพื่อเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอในบริเวณที่ต้องการศึกษาให้เพิ่มมากขึ้นสำหรับการศึกษาในขั้นตอนต่อไป ซึ่งขั้นตอนในการเตรียมปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสประกอบด้วยส่วนประกอบต่างๆ ดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 ส่วนประกอบต่างๆในการเตรียมปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส

	ความเข้มข้นของสาร	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตรสารที่เติม (µL)
dIwater			13.3
PCR buffer	5x	1x	5
$MgCl_2$	25 mM	1.5 mM	1.5
dNTPs mix	2.5 mM	0.2 mM	2
Forward primer	10 mM	10 pmol	1
Reverse primer	10 mM	10 pmol	1
Taq DNA polymerase	5 U/µL	1 U	0.2
Master mix volume			24
DNA template			1
Final volume			25

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

ทำการผสมส่วนประกอบต่างๆลง PCR tube จากนั้นนำ PCR tube ที่ได้ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยการพีซีอาร์ด้วยเครื่องพีซีอาร์ และกำหนดสภาวะต่างตามตารางที่ 15 ทั้งนี้อุณหภูมิ และระยะเวลาที่ใช้ในขั้นตอนต่างๆจะขึ้นกับขนาดของยีนที่ต้องการเพิ่มปริมาณ ซึ่งจะกล่าวต่อไปในบทถัดไป

ตารางที่ 15 สภาวะที่กำหนดในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยการพีซีอาร์ด้วยเครื่องพีซีอาร์

	Temperature (°C)	Time (min.)
Predenaturation	96	3
Denaturation	96	1
Annealing	...	1
Extension	72	...
Final Extension	72	...
cycle	...	

3.3.6 การตรวจสอบ PCR Products ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส

เมื่อครบเวลาของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสตามที่ได้ตั้งโปรแกรมไว้ ทำการเก็บ PCR tube ออกจากเครื่องพีซีอาร์ จากนั้นทำการตรวจสอบคุณภาพของ PCR product ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis (1% Agarose gel, 1XTAE buffer)

3.3.7 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

ทำการส่ง PCR product และ Sequencing primer ที่ออกแบบ ไปยังบริษัท AIT biotech สาธารณรัฐสิงคโปร์ เพื่อทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และเมื่อได้รับไฟล์ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากบริษัท AIT biotech ทำการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ และคัดเลือกช่วงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่น่าเชื่อถือโดยอาศัยโปรแกรม Finch TV จากนั้นนำลำดับที่ได้เปรียบเทียบกับพืช Reference เพื่อตรวจสอบตำแหน่งหรือบริเวณของลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวด้วยโปรแกรม Multalin และ http://blast.ncbi.nlm.nih.gov

3.3.8 การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด

ทำการเปรียบเทียบ วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เต็มความยาวยีนของยีน *mat*K, *rbc*L และบริเวณ *trn*H-*psb*A spacer และ ITS ของแต่ละตัวอย่าง และทำการเลือกวิธีการแสดงผลบาร์โค้ด สำหรับโครงการปริญญานิพนธ์นี้ รูปแบบของบาร์โค้ดที่เลือกใช้คือบาร์โค้ดดีเอ็นเอรหัสสี (Colour-coded DNA barcodes)

ในการสร้างบาร์โค้ดดีเอ็นเอรหัสสีเป็นการแสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืช สกุล *Mitragyna* ทั้ง 4 ชนิด โดยอักษร 4 ตัว ที่แสดงชนิดของเบส (A, T, C และ G) จะถูกแปลงไปเป็นแถบสีที่ต่างกัน เพื่อให้ง่ายต่อการสังเกตด้วยตา สำหรับโปรแกรมที่ใช้ในการสร้างบาร์โค้ด คือ โปรแกรม

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

Clustalx 2.1 ทำการเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชในสกุล *Mitragyna* ทั้ง 4 ชนิด ที่แสดงผลเป็นลำดับของตัวอักษรในรูปแบบ FASTA format ให้เป็นแถบของรหัสสี 4 แถบเรียงเทียบกัน ทั้งนี้แถบรหัสสีที่ใช้แทนลำดับนิวคลีโอไทด์ Adenine, Thymine, Cytosine และ Guanine ได้แก่ สีแดง, สีเขียว, สีน้ำเงิน และสีส้ม ตามลำดับ

3.4 ผลการจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด

3.4.1. การสกัด genomic DNA

จากการนำใบสดของตัวอย่างพืชในสกุล *Mitragyna* ที่พบในประเทศไทย จำนวน 4 ชนิด นำมาทำการสกัด genomic DNA ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป Geneaid kit จากนั้นนำสารสกัดของแต่ละตัวอย่างทำการตรวจสอบขนาดของ genomic DNA ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis พบว่าได้ผล ดังภาพที่ 21 คือขนาดของ genomic DNA ที่สกัดมีขนาดอยู่ระหว่าง 9.4 kb ถึง 23.1 kb

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาพที่ 21 ภาพแสดงผลการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอของพืชทั้ง 4 ชนิด จากการสกัดด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป Genomic DNA Mini Kit ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis (1% Agarose, 0.5X TAE buffer)

3.4.2 ผลการออกแบบไพร์เมอร์

ยีนที่ได้ทำการศึกษาในปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ประกอบด้วย 4 บริเวณ ได้แก่ *mat*K, *rbc*L, *trn*H-*psb*A spacer และ ITS แต่ส่วนบริเวณ ITS ได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์จากการศึกษาของ

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

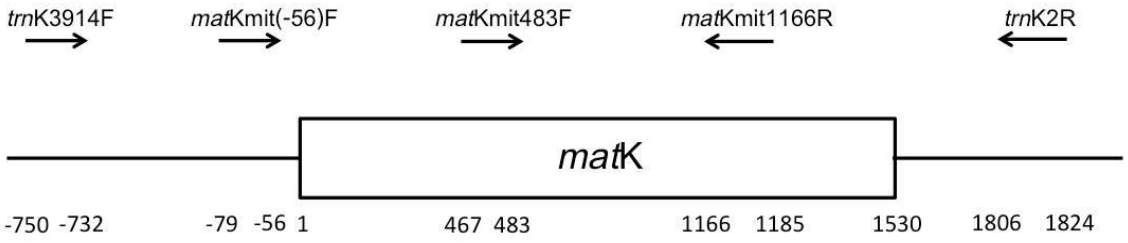
Suchada Sukrong และคณะ[4] มาใช้ในการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด ดังนั้นบริเวณที่ได้ทำการออกแบบไพร์เมอร์จึงมีเพียง 3 บริเวณ คือ *mat*K, *rbc*L และ *trn*H-*psb*A spacer ทั้งนี้เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าวใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชสกุล *Mitragyna* ทั้ง 4 ชนิดด้วยกัน จึงได้ทำการสืบค้นข้อมูลเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชสกุล *Mitragyna* ที่มีอยู่ใน GenBank® และวางแผนการทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต่างๆ ดังนี้

3.4.2.1 ยีน *mat*K

สำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *mat*K ของพืชสกุล *Mitragyna* ได้ทำการศึกษาวิธีการพีซีอาร์ยีน *mat*K จากงานวิจัยของ Leigh A. Johnson and Douglas E. Soltis[22] จึงได้ทำการเลือกใช้คู่ไพร์เมอร์ *trn*K3914F และ *trn*K2R สำหรับเป็น Amplifying primers และนำลำดับของนิวคลีโอไทด์จากการพีซีอาร์ด้วย Amplifying primers มาออกแบบ Sequencing primer โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์แสดงดังตารางที่ 15 โดยใช้นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืช *Nicotiana sylvestris* (GenBank®: NC_007500.1) ซึ่งเป็น Complete genome มาเป็นพืชต้นแบบสำหรับการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในการออกแบบไพร์เมอร์ ซึ่งรายละเอียดของ ไพร์เมอร์ที่ออกแบบแสดงในภาคผนวก(ลำดับที่ 1, 2, 3) สำหรับรายละเอียดอย่างย่อของ ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้แสดงดังตารางที่16 และภาพที่ 22

ตารางที่ 16 ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการสร้างดีเอ็นเอบาร์โค้ด

ไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5′-3′)	Tm (°C)
*trn*K3914F	TGGGTTGCTAACTCAATGG (19)	54.5
*mat*Kmit(-56)F	CTTTGGTTTGACTATATCGCACTA (24)	57.6
*mat*Kmit483F	CCCACCCCGTCCATCTA (17)	57.6
*mat*Kmit1166R	CGGCTTACTAACGGGATGTC (20)	59.4
*trn*K2R	AACTAGTCGGATGGAGTAC (19)	54.5



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

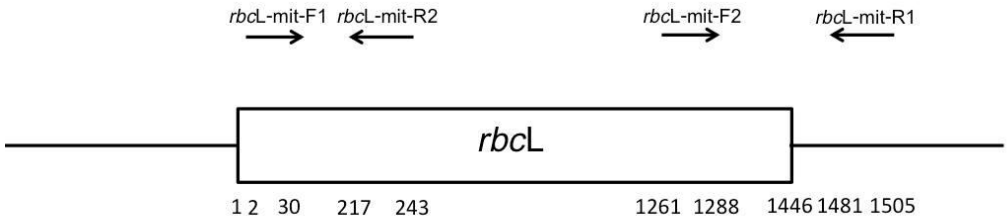
ภาพที่ 22 ตำแหน่งของไพร์เมอร์ที่เข้าจับชิ้นดีเอ็นเอ[22]

3.4.2.2 **ยีน *rbc*L**

สำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนส่วน *rbc*L ของ *Mitragyna* ทั้ง 4 ชนิด ได้ทำการสืบค้นข้อมูลจาก GenBank® เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชสกุล *Mitragyna* ที่มีอยู่ พบว่าพบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ *M. speciosa, M. diversifolia* และ *M. rotundifolia* และได้ทำการสืบค้นข้อมูลเพื่อหาไพรเมอร์ที่ได้มีการใช้ในการทำการศึกษาของ Korapin Srisiri และคณะ[xxviii] มีการใช้คู่ไพรเมอร์ *rbc*L-Mit-f1 และ *rbc*L-Mit-r1 สำหรับหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชกระท่อม แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ดังตารางที่ 17 ดังนั้น จึงได้นำลำดับไพรเมอร์ดังกล่าวใช้เป็น Amplifying primers และเมื่อได้ลำดับของนิวคลีโอไทด์จากการพีซีอาร์ด้วย Amplifying primers มาแล้วจะนำมาเทียบหาตำแหน่งหรือบริเวณของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์พืช *Coffea arabica* (GenBank®: EF044213.1) ซึ่งเป็นพืชที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของคลอโรพลาสต์ครบถ้วน สมบูรณ์ และมีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์พืชกระท่อมมากที่สุด จากนั้นจึงทำการออกแบบ Sequencing primer ต่อเพื่อเติมลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่ขาดหายไป โดยรายละเอียดของของไพร์เมอร์ที่ออกแบบแสดงในภาคผนวก (ลำดับที่ 3 และ 4) สำหรับรายละเอียดอย่างย่อของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้แสดงดังตารางที่ 17 และภาพที่ 23

ตารางที่ 17 ตารางแสดงไพร์เมอร์ที่ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L

ไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5′-3′)	Tm (°C)
*rbc*L-Mit-f1	TGTCACCACAAACAGAAACTAAAGCAAGT (29)	62.4
*rbc*L-Mit-r1	CTTTTAGTAAAGATTGGGCCGAG (23)	58.9
*rbc*L-Mit-f2	CGAGTAGCTCTAGAAGCATGTGTAAAAG (28)	63.7
*rbc*L-Mit-r2	TTTGTAACGATCAAGGCTGGTAAGTAA (27)	63.4



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

ภาพที่ 23 ตำแหน่งของไพร์เมอร์ที่เข้าจับชิ้นดีเอ็นเอ[26]

3.4.2.3 ส่วนของนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H และ *psb*A (*trn*H – *psb*A spacer)

สำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H และ *psb*A ของพืชสกุล *Mitragyna* ได้ศึกษาข้อมูลมาจากงานวิจัยของ Boonyadist Vongsak และคณะ[26] ซึ่งมีการใช้ไพร์เมอร์ *trn*HF คู่กับ *psb*A-*di*R ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืช *Stemona tuberosa* แสดงลำดับดังตารางที่ 18 จึงได้นำมาเป็นข้อมูลสำหรับ Amplifying primers ในการพีซีอาร์ และใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์พืช *Coffea arabica* (GenBank®: EF044213.1) ซึ่งเป็นพืชที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของคลอโรพลาสต์ครบถ้วน สมบูรณ์ และมีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์พืชกระท่อมมากที่สุด เป็นตัวเทียบหาตำแหน่งหรือบริเวณของนิวคลีโอไทด์ที่ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์มาได้

ตารางที่ 18 ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ *trn*H – *psb*A spacer

ไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5′-3′)	Tm (°C)
*trn*HF	CGCGCATGGTGGATTCACAATCC (21)	62.6
*psb*A-*di*R	GTAATGCATGAACGTAATGCTC (22)	58.9

ภาพที่ 24 ตำแหน่งของไพร์เมอร์ที่เข้าจับชิ้นดีเอ็นเอของไพร์เมอร์ *trn*HF และ *psb*A-*di*R

3.4.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

3.4.3.1 ยีน *mat*K

ชิ้นดีเอ็นเอที่ทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้มาจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณที่เราสนใจ คือส่วนของดีเอ็นเอของยีน *mat*K โดยอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสตามส่วนประกอบและเงื่อนไข ดังตารางที่ 19 และตารางที่ 20 จากนั้นทำการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ดังแสดงในภาพที่ 25

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

ตารางที่ 19 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *mat*K

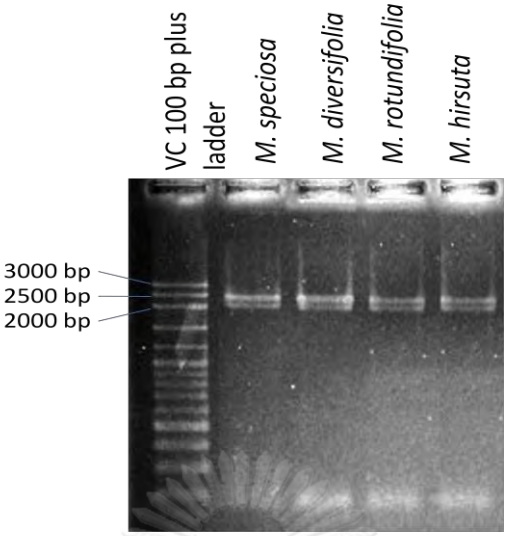
	ความเข้มข้นของสาร	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตรสารที่เติม (µL)
dIwater			13.3
PCR buffer	5x	1x	5
$MgCl_2$	25 mM	1.5 mM	1.5
dNTPs mix	2.5 mM	0.2 mM	2
Forward primer	10 mM	10 pmol	1
Reverse primer	10 mM	10 pmol	1
Tag DNA polymerase	5 U/µL	1 U	0.2
Master mix volume			24
DNA template			1
Final volume			25

ตารางที่ 20 สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส

	Temperature (°C)	Time (min.)
Predenaturation	96	3
Denaturation	96	1
Annealing	55	1
Extension	72	45 sec.
Final Extension	72	7
Cycle	29X	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

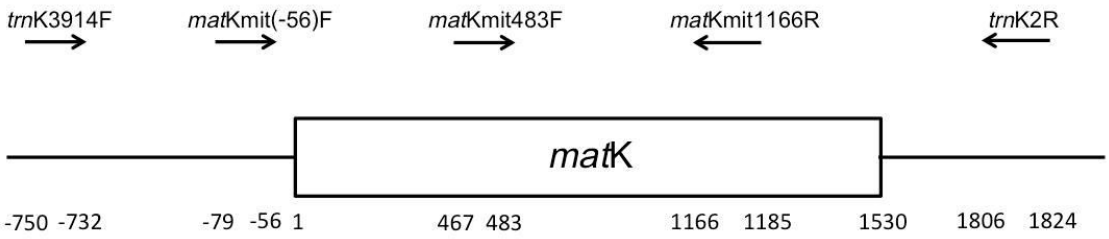
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



ภาพที่ 25 ผลการตรวจ PCR product ของยีน *mat*K ด้วยวิธี Gel electrophoresis (1%agarose 0.5XTAE buffer)

จากผลการตรวจสอบปริมาณของดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสของยีน *mat*K ของพืชสกุล *Mitragyna* โดยใช้ Amplifying primer คือ *trn*K3914F และ *trn*K2R พบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนมีขนาดอยู่ที่ประมาณ 2500 bp ซึ่งเป็นขนาดที่ใกล้เคียงกับ Expected size คือ 2574 bp และเป็นขนาดที่อยู่ช่วงกำหนดของยีน *mat*K (ตามข้อความในข้อ 2.4.4 การคัดเลือกยีนส์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการพิสูจน์) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไพร์เมอร์ที่เลือกใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสสามารถเข้าจับกับชิ้นดีเอ็นเอตามตำแหน่งที่คาดไว้ แสดงดังภาพที่ 26 ทำให้มั่นใจได้ว่าชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสคือยีน *mat*K สำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพิ่มเติมส่วนที่ยังไม่ครบโดยใช้ Sequencing primer จะใช้ PCR product ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสด้วย Amplifying primer คือ *trn*K3914F และ *trn*K2R นำส่งให้กับบริษัท AIT biotech พร้อมกับ Sequencing primer ที่ได้ออกแบบ

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



ภาพที่ 26 ภาพแสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส
โดยใช้ไพร์เมอร์ *trn*K3914F และ *trn*K2R[22]

3.4.3.2 ยีน *rbc*L

ชิ้นดีเอ็นเอที่ทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้มาจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณที่เราสนใจ คือยีน *rbc*L โดยอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส ตามส่วนประกอบ และเงื่อนไขดังตารางที่ 21 และตารางที่ 22 จากนั้นทำการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ได้ผลดังภาพที่ 27

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

ตารางที่ 21 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *rbc*L

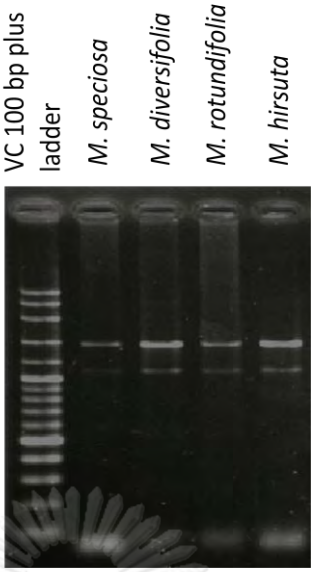
	ความเข้มข้นของสาร	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตรสารที่เติม (µL)
dIwater			13.3
PCR buffer	5x	1x	5
$MgCl_2$	25 mM	1.5 mM	1.5
dNTPs mix	2.5 mM	0.2 mM	2
Forward primer	10 mM	10 pmol	1
Reverse primer	10 mM	10 pmol	1
Tag DNA polymerase	5 U/µL	1 U	0.2
Master mix volume			24
DNA template			1
Final volume			25

ตารางที่ 22 สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส

	Temperature (°C)	Time (min.)
Predenaturation	96	3
Denaturation	96	1
Annealing	57	1
Extension	72	2
Final Extension	72	10
Cycle	34X	

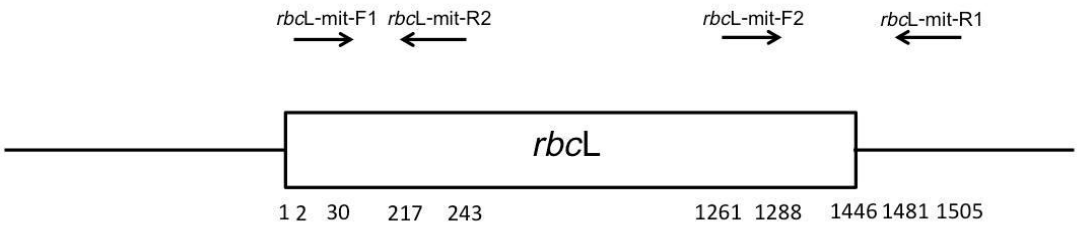
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



ภาพที่ 27 ผลการตรวจสอบ PCR product ของยีน *rbc*L ด้วยวิธี Gel electrophoresis

จากผลการตรวจสอบปริมาณของดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสของยีน *rbc*L ของพืชสกุล *Mitragyna* โดยใช้ Amplifying primer คือ *rbc*L-Mit-f1 และ *rbc*L-Mit-r1 พบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนมีขนาดอยู่ที่ประมาณ 1500 bp ซึ่งเป็นขนาดเดียวกับ Expected size คือ 1504 bp และเป็นขนาดที่อยู่ช่วงกำหนดของยีน *rbc*L (ตามข้อความในข้อ 2.4.4 การคัดเลือกยีนส์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไพร์เมอร์ที่เลือกใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสสามารถเข้าจับกับชิ้นดีเอ็นเอตามตำแหน่งที่คาดไว้ แสดงดังภาพที่ 28 และทำให้มั่นใจได้ว่าชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสคือยีน *rbc*L สำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพิ่มเติมส่วนที่ยังไม่ครบโดยใช้ Sequencing primer จะใช้ PCR product ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสด้วย Amplifying primer คือ *rbc*L-Mit-f1 และ *rbc*L-Mit-r1 นำส่งให้กับบริษัท AIT biotech พร้อมกับ Sequencing primer ที่ได้ออกแบบ



ภาพที่ 28 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส
โดยใช้ไพร์เมอร์ *rbc*L-Mit-f1 และ *rbc*L-Mit-r1[26]

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

3.4.3.3 ส่วนของดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H และ *psb*A

ชิ้นดีเอ็นที่ทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้มาจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณที่เราสนใจ คือส่วนของดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H และ *psb*A โดยอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสตามส่วนประกอบ และเงื่อนไข ดังตารางที่ 23 และตารางที่ 24 จากนั้นทำการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis แสดงผลการตรวจสอบดังภาพที่ 29

ตารางที่ 23 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H และ *psb*A

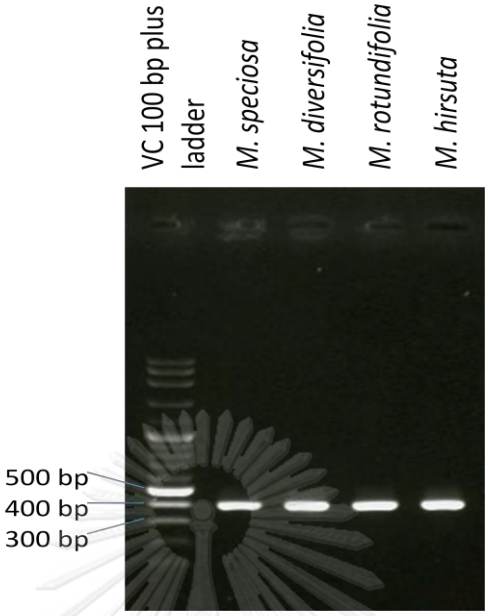
	ความเข้มข้นของสาร	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตรสารที่เติม (µL)
dIwater			13.3
PCR buffer	5x	1x	5
$MgCl_2$	25 mM	1.5 mM	1.5
dNTPs mix	2.5 mM	0.2 mM	2
Forward primer	10 mM	10 pmol	1
Reverse primer	10 mM	10 pmol	1
Tag DNA polymerase	5 U/µL	1 U	0.2
Master mix volume			24
DNA template			1
Final volume			25

ตารางที 24 ตารางแสดงสภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส

	Temperature (°C)	Time (min.)
Predenaturation	96	3
Denaturation	96	1
Annealing	55	1
Extension	72	45 sec.
Final Extension	72	7
Cycle	29X	

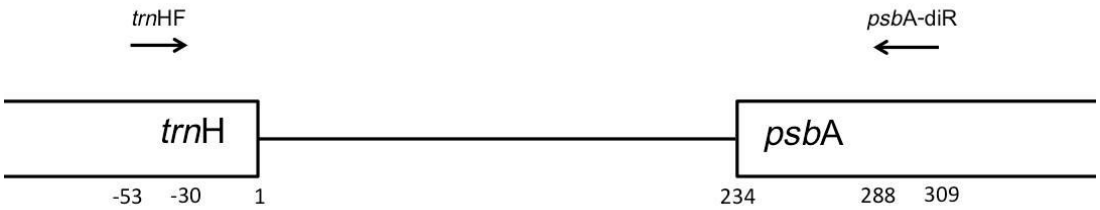
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



ภาพที่ 29 ผลการตรวจสอบ PCR product บริเวณ *trn*H-*psb*A spacer ด้วยวิธี Gel electrophoresis

จากผลการตรวจสอบปริมาณของดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสของบริเวณ *trn*H-*psb*A spacer ของพืชสกุล *Mitragyna* โดยใช้ Amplifying primer คือ *trn*HF และ *psb*A-*di*R พบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนมีขนาดอยู่อยู่ในช่วง 300 bp ถึง 500 bp ซึ่งเป็นขนาดเดียวกับ Expected size คือ 362 bp และเป็นขนาดที่อยู่ช่วงกำหนดของบริเวณ *trn*H-*psb*A (ตามข้อความใน 2.4.4 การคัดเลือกยีนส์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไพร์เมอร์ที่เลือกใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสสามารถเข้าจับกับชิ้นดีเอ็นเอตามตำแหน่งที่คาดไว้ แสดงดังภาพที่ 30 และทำให้มั่นใจได้ว่าชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสคือ บริเวณ *trn*H-*psb*A spacer



ภาพที่ 30 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส
โดยใช้ไพร์เมอร์ *trn*HF และ *psb*A-*di*R

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

3.4.4. **การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcoding)**

3.4.4.1 การจัดลำดับนิวคลีโอไทด์ให้อยู่ในรูปแบบ FASTA

ภายหลังจากการจัดทำลำดับนิวคลีโอไทด์เต็มความยาวยีน (Full length sequence) ของยีน *mat*K, *rbc*L และ *trn*H-*psb*A spacer ของแต่ละตัวอย่างแล้ว จึงทำการแปลงลำดับเบสทั้งหมดให้อยู่ในรูปแบบ FASTA เนื่องจาก FASTA format เป็นหนึ่งในรูปแบบของไฟล์นำเข้าที่โปรแกรม Clustalx 2.1 สามารถนำไปประมวลผลได้ นอกจากนี้แล้ว ทำการสืบค้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ITS ของพืชในสกุล *Mitragyna* ทั้ง 4 ชนิดจาก GenBank® ประกอบด้วย

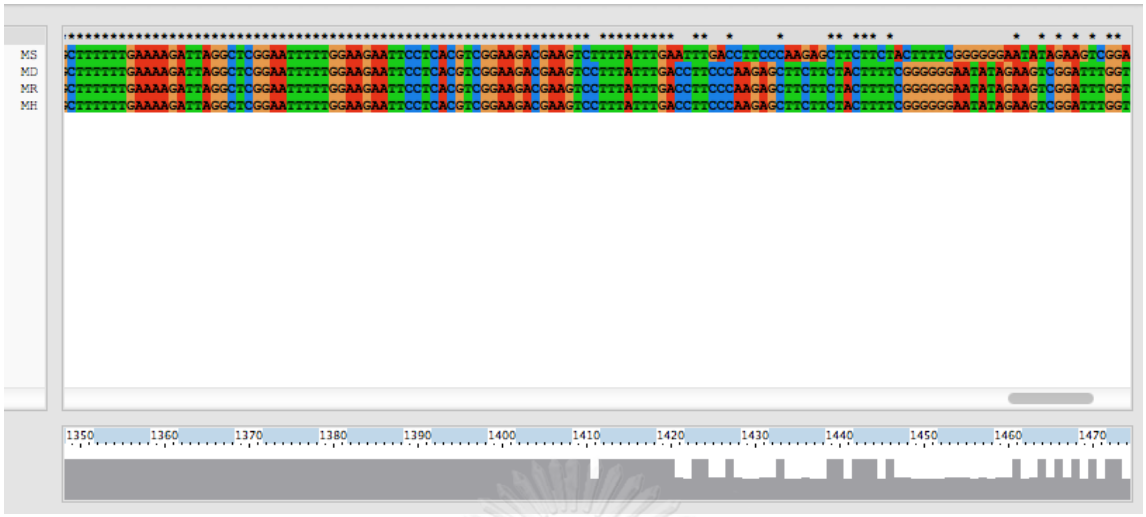
1. *Mitragyna speciosa* genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, partial and complete sequence [AB249645.1]
2. *Mitragyna diversifolia* genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, partial and complete sequence [AB249646.1]
3. *Mitragyna rotundifolia* genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, partial and complete sequence [AB249648.1]
4. *Mitragyna hirsuta* genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, partial and complete sequence [AB249647.1]

และบันทึกข้อมูลทั้งหมดในรูปแบบของ FASTA

3.4.4.2 การสร้างบาร์โค้ดดีเอ็นเอรหัสสี (Colour-coded DNA barcodes) ด้วยโปรแกรม Clustalx 2.1

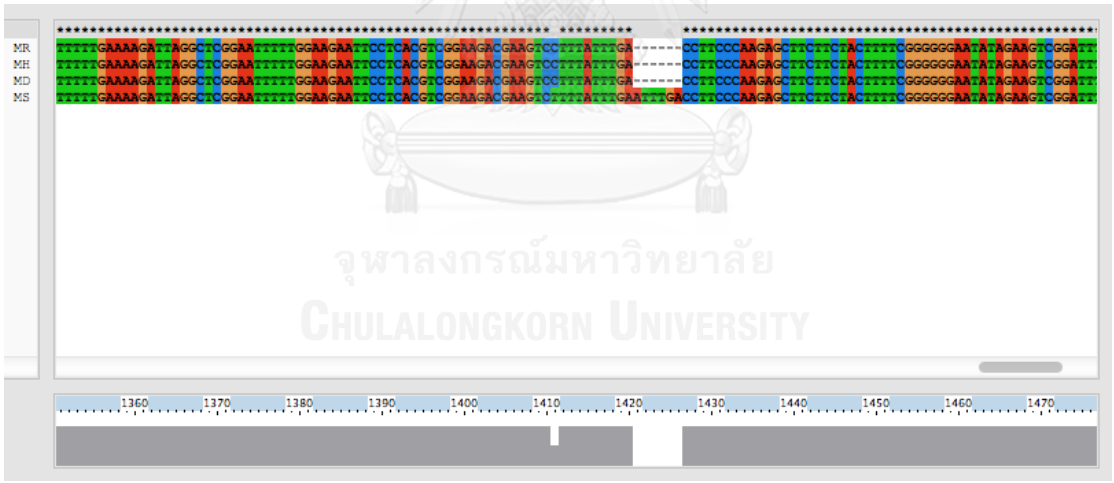
ทำการสร้างบาร์โค้ดดีเอ็นเอรหัสสีครั้งละ 1 ยีน โดยเริ่มจากการนำเข้าไฟล์ FASTA ของพืชสกุล *Mitragyna* ทั้ง 4 ชนิด จะปรากฏภาพของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกแปลงอักษรเป็นรหัสสีแล้ว ดังแสดงในภาพที่ 31

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



ภาพที่ 31 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ของพืชในสกุล *Mitragyna* ที่ถูกแปลงเป็นรหัสสี ด้วยโปรแกรม Clustalx 2.1

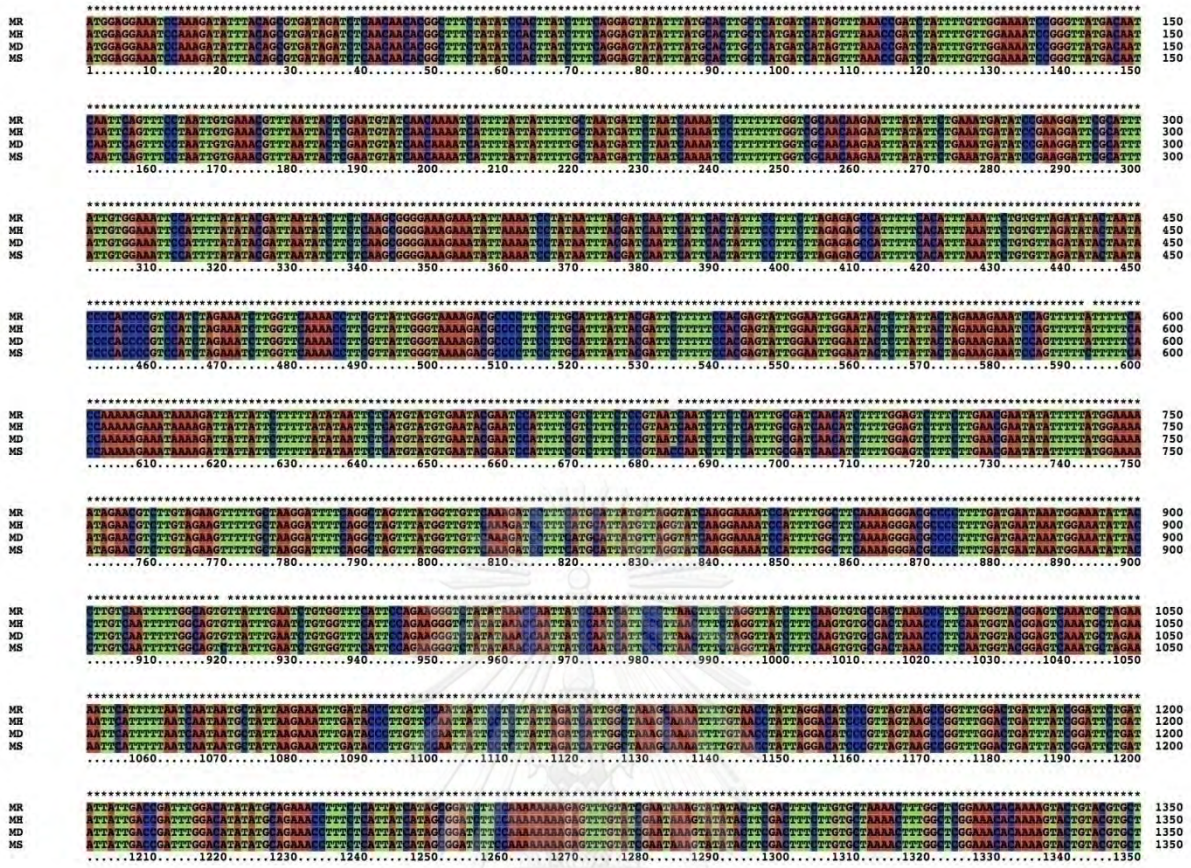
จากนั้นทำการเลือกฟังก์ชั่น Do complete alignment จะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ผ่าน alignment แล้ว ดังแสดงในภาพที่ 32



ภาพที่ 32 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ของพืชในสกุล *Mitragyna* ที่ Alignment แล้ว

บันทึกบาร์โค้ดดีเอ็นเอรหัสสีที่ได้ ด้วยการเลือกฟังก์ชั่น Write alignment as postscript โปรแกรมจะทำการบันทึกให้ในรูปแบบไฟล์ PDF ดังแสดงในภาพที่ 33

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



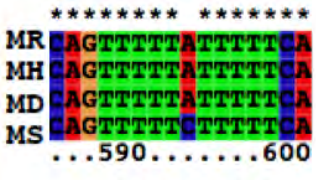
ภาพที่ 33 บาร์โค้ดดีเอ็นเอรหัสสีของยีน *mat*K ของพืชในสกุล *Mitragyna* ในรูปแบบไฟล์ PDF

เมื่อทำการสร้างบาร์โค้ดดีเอ็นเอรหัสสีด้วยโปรแกรม Clustalx 2.1 ครบทั้ง 4 บริเวณแล้ว แล้วทำการสังเกตความแตกต่างระหว่างชนิดของพืชในสกุล *Mitragyna*

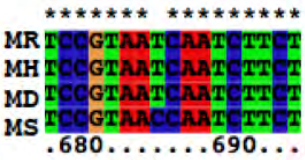
- ยีน *mat*K

สังเกตความแตกต่างซึ่งเป็นเอกลักษณ์ของ *M. speciosa* พบว่าตำแหน่งที่มีจุดแตกต่างของรหัสสีมีทั้งหมด 5 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่งที่ 593, 684, 920, 1411 และ 1421-1426 ดังแสดงในภาพที่ 34 ถึง 38 ตามลำดับ ซึ่งจุดต่างในภาพที่ 34-38 เป็นความแตกต่างของดีเอ็นเอที่เป็นแบบการแทนที่กันของเบส (Substitution) ในขณะที่จุดต่างในภาพที่ 38 เป็นความแตกต่างของดีเอ็นเอที่เป็นแบบการเพิ่มของเบส (Insertion)

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

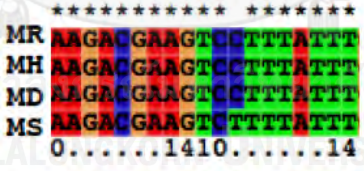


ภาพที่ 34 แสดงจุดแตกต่างของดีเอ็นเอที่เป็นแบบการแทนที่กันของเบส (Substitution) ในตำแหน่งที่ 593



ภาพที่ 35 แสดงจุดแตกต่างของดีเอ็นเอที่เป็นแบบการแทนที่กันของเบส (Substitution) ในตำแหน่งที่ 684

ภาพที่ 36 แสดงจุดแตกต่างของดีเอ็นเอที่เป็นแบบการแทนที่กันของเบส (Substitution) ในตำแหน่งที่ 920



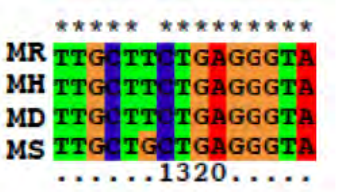
ภาพที่ 37 แสดงจุดแตกต่างของดีเอ็นเอที่เป็นแบบการแทนที่กันของเบส (Substitution) ในตำแหน่งที่1411

ภาพที่ 38 แสดงจุดแตกต่างของดีเอ็นเอที่เป็นแบบการเพิ่มของเบส (Insertion) ในตำแหน่งที่ 1421-1426 (เพิ่มทั้งหมด 6 เบส)

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

- ยีน *rbc*L

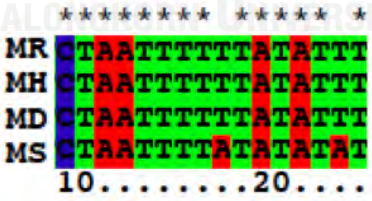
สังเกตความแตกต่างซึ่งเป็นเอกลักษณ์ของ *M. speciosa* พบว่าตำแหน่งที่มีจุดแตกต่างของรหัสสีมี 1 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ 1316 ดังแสดงในภาพที่ 39 จัดเป็นความแตกต่างของดีเอ็นเอที่เป็นแบบการแทนที่กันของเบส (Substitution)



ภาพที่ 39 แสดงจุดแตกต่างของดีเอ็นเอที่เป็นแบบการแทนที่กันของเบส (Substitution) ในตำแหน่งที่ 1316

- *trn*H-*psb*A spacer

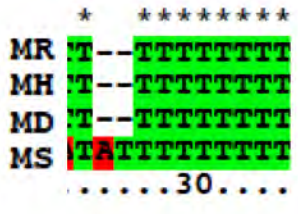
สังเกตความแตกต่างซึ่งเป็นเอกลักษณ์ของ *M. speciosa* พบว่าตำแหน่งที่มีจุดแตกต่างของรหัสสีมีทั้งหมด 6 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ 17 และ 23 ดังแสดงในภาพที่ 40 ตำแหน่งที่ 25-26, 35, 115 และ 262-270 ดังแสดงในภาพที่ 41 ถึง 44 ตามลำดับ ซึ่งจุดต่างในรูปที่ 40 และ 42 เป็นความแตกต่างของดีเอ็นเอที่เป็นแบบการแทนที่กันของเบส (Substitution) ในขณะที่จุดต่างในภาพที่ 41, 43 และ 44 เป็นความแตกต่างของดีเอ็นเอที่เป็นแบบการเพิ่มของเบส (Insertion)



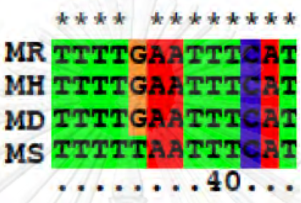
ภาพที่ 40 แสดงจุดแตกต่างของดีเอ็นเอที่เป็นแบบการแทนที่กันของเบส (Substitution) ในตำแหน่งที่ 17 และ 23

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

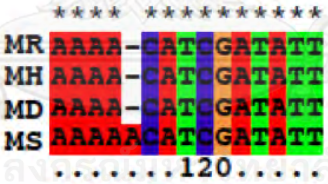
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



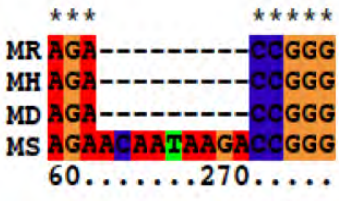
ภาพที่ 41 แสดงจุดแตกต่างของดีเอ็นเอที่เป็นแบบการเพิ่มของเบส (Insertion) ในตำแหน่งที่ 25-26 (เพิ่มทั้งหมด 2 เบส)



ภาพที่ 42 แสดงจุดแตกต่างของดีเอ็นเอที่เป็นแบบการแทนที่กันของเบส (Substitution) ในตำแหน่งที่ 35



ภาพที่ 43 แสดงจุดแตกต่างของดีเอ็นเอที่เป็นแบบการเพิ่มของเบส (Insertion) ในตำแหน่งที่ 115 (เพิ่มทั้งหมด 1 เบส)

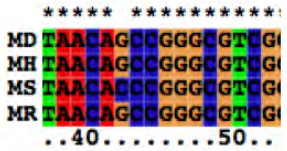


ภาพที่ 44 แสดงจุดแตกต่างของดีเอ็นเอที่เป็นแบบการเพิ่มของเบส (Insertion) ในตำแหน่งที่ 262-270 (เพิ่มทั้งหมด 9 เบส)

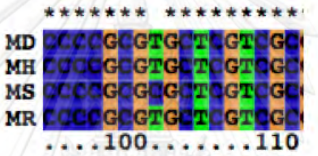
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

- Internal Transcribed Spacer (ITS)

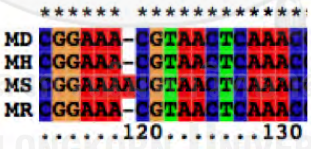
สังเกตความแตกต่างซึ่งเป็นเอกลักษณ์ของ *M. speciosa* พบว่าตำแหน่งที่มีจุดแตกต่างของรหัสสีมีทั้งหมด 9 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ 42, 101, 118, 171, 510, 514 และ 516, 564 และ 565 ดังแสดงในภาพที่ 45 ถึง 51 ตามลำดับ ซึ่งจุดต่างในภาพที่ 45, 46, 50 และ 51 เป็นความแตกต่างของดีเอ็นเอที่เป็นแบบการแทนที่กันของเบส (Substitution) ในขณะที่จุดต่างในภาพที่ 47, 48 และ 49 เป็นความแตกต่างของดีเอ็นเอที่เป็นแบบการเพิ่มของเบส (Insertion)



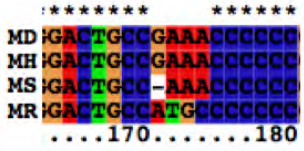
ภาพที่ 45 แสดงจุดแตกต่างของดีเอ็นเอที่เป็นแบบการแทนที่กันของเบส (Substitution) ในตำแหน่งที่ 42



ภาพที่ 46 แสดงจุดแตกต่างของดีเอ็นเอที่เป็นแบบการแทนที่กันของเบส (Substitution) ในตำแหน่งที่ 101

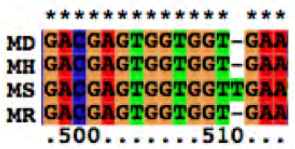


ภาพที่ 47 แสดงจุดแตกต่างของดีเอ็นเอที่เป็นแบบการเพิ่มของเบส (Insertion) ในตำแหน่งที่ 118 (เพิ่มทั้งหมด 1 เบส)

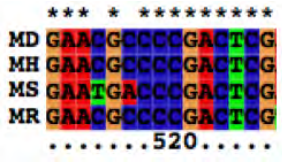


ภาพที่ 48 แสดงจุดแตกต่างของดีเอ็นเอที่เป็นแบบการเพิ่มของเบส (Insertion) ในตำแหน่งที่ 171 (เพิ่มทั้งหมด 1 เบส)

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



ภาพที่ 49 แสดงจุดแตกต่างของดีเอ็นเอที่เป็นแบบการเพิ่มของเบส (Insertion) ในตำแหน่งที่ 510 (เพิ่มทั้งหมด 1 เบส)



ภาพที่ 50 แสดงจุดแตกต่างของดีเอ็นเอที่เป็นแบบการแทนที่กันของเบส (Substitution) ในตำแหน่งที่ 514 และ 516

ภาพที่ 51 แสดงจุดแตกต่างของดีเอ็นเอที่เป็นแบบการแทนที่กันของเบส (Substitution) ในตำแหน่งที่ 564 และ 565

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง

ในการพิสูจน์เอกลักษณ์สมุนไพร สามารถใช้ชนิดของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน หรือใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอหลายชนิดประกอบกัน เพื่อให้ได้ข้อมูลที่มีความครบถ้วนสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น สำหรับโครงการปริญญานิพนธ์นี้ได้ใช้เทคนิคการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชในสกุล *Mitragyna* 2 วิธี ได้แก่ การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอชนิดเอเอฟแอลพี (AFLP; Amplified Fragment Length Polymorphism) และการสร้างดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcoding)

4.1. การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอชนิดเอเอฟแอลพี (AFLP; Amplified Fragment Length Polymorphism)

จากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสกุล *Mitragyna* โดยใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพี พบว่า มีไพร์เมอร์ 18 คู่ไพร์เมอร์ จากจำนวน 37 คู่ไพร์เมอร์ ที่สามารถสร้างเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เพื่อใช้พิสูจน์เอกลักษณ์ และจำแนกความแตกต่างของพืชสกุล *Mitragyna* ได้ มีเปอร์เซ็นต์โพลีมอร์ฟิซึมเท่ากับ 78.035 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเมื่อสร้างเป็น Dendrogram ด้วย Jaccard's similarity matrix และ UPGMA method พบว่าสามารถจำแนกพืชออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

1) กลุ่มของ *Mitragyna speciosa* หรือ กระท่อม
2) กลุ่มของ *Mitragyna* อื่นๆ แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่
    a. *Mitragyna diversifolia*
    b. *Mitragyna rotundifolia* และ *Mitragyna hirsuta*

โดยค่าของ Cophenetic correlation coefficient (r) มีค่าเท่ากับ 0.99148 ซึ่งถือว่ามีประสิทธิภาพในการกลุ่มได้ดีมาก

นอกจากนี้แล้ว มีไพร์เมอร์จำนวน 11 คู่ ที่สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ของพืช *Mitragyna speciosa* ซึ่งจะสามารถนำไปใช้ออกแบบไพร์เมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิด สคาร์ (Sequence Characterized Amplified Regions) ต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

4.2 การสร้างดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcoding)

จากการศึกษาข้างต้นสามารถสร้างดีเอ็นเอบาร์โค้ดในรูปแบบของบาร์โค้ดดีเอ็นเอรหัสสีเพื่อใช้ในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชในสกุล *Mitragyna* โดยใช้บริเวณมาตรฐาน 4 บริเวณ ได้แก่ *mat*K, *rbc*L, *trn*H-*psb*A spacer และ ITS ดังแสดงในภาพที่ 52 ถึง 55

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชในสกุล *Mitragyna* ที่สร้างขึ้น สามารถแสดงและพิสูจน์เอกลักษณ์พืชในสกุล *Mitragyna* รวมถึงแสดงความแตกต่างระหว่าง *Mitragyna speciosa* กับ *Mitragyna* ชนิดอื่น ๆ อีก 3 ชนิดได้ชัดเจน ดังนั้นสามารถสรุปผลได้ว่า บริเวณมาตรฐานทั้ง 4 บริเวณ ที่เลือกมาทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดนั้นมีความเหมาะสมในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชในสกุล *Mitragyna*

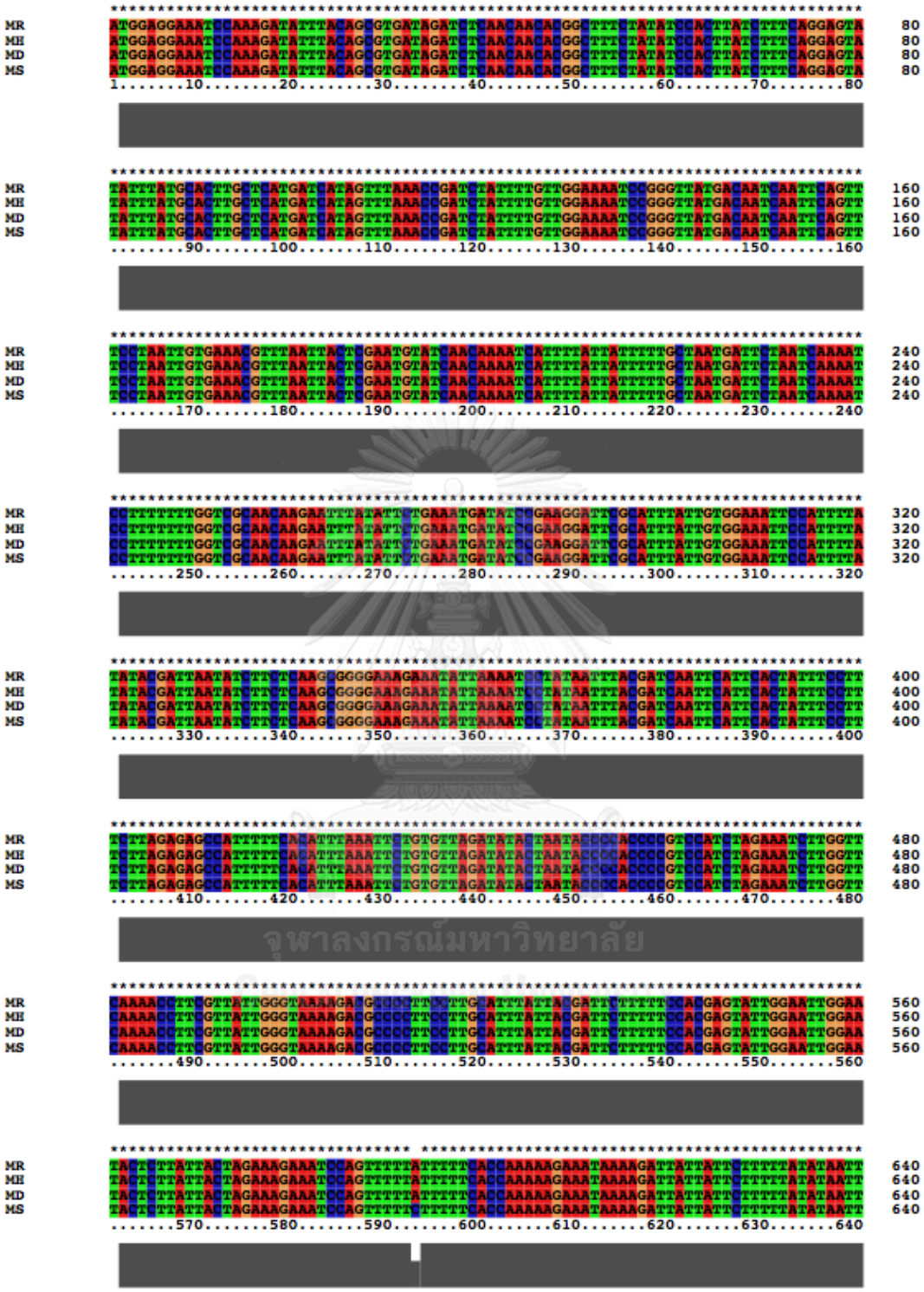
ดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชในสกุล *Mitragyna* มีประโยชน์ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชในสกุล *Mitragyna* เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการแยก *Mitragyna speciosa* หรือกระท่อมออกจากต้นอื่น ๆ ในสกุลเดียวกัน เพื่อป้องกันการนำพืชกระท่อมมาใช้โดยอาจมีสาเหตุทั้งจากความสับสน เนื่องจากลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่มีความคล้ายคลึงกัน หรือโดยความตั้งใจ ซึ่งการนำพืชกระท่อมไปใช้นั้นเป็นการกระทำที่ผิดต่อกฎหมายประเทศไทย เนื่องจากเป็นยาเสพติดให้โทษประเภทที่ 5 ตามความใน พระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ พ.ศ. 2522

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอชนิดเอเอฟแอลพี และดีเอ็นเอบาร์โค้ดนั้น มีข้อดีและข้อจำกัดที่แตกต่างกัน โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอชนิดเอเอฟแอลพีเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้ครั้งละหลายตำแหน่งพร้อมกันทั่วทั้งจีโนมพืช แต่มีข้อจำกัดคือ แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจำนวนมากและมีขนาดเท่ากันในลายพิมพ์ดีเอ็นเอ อาจเกิดมาจากการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอคนละตำแหน่งได้

ส่วนดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่สร้างขึ้นมาจากการหาลำดับเบสนั้น เป็นวิธีที่สามารถตรวจสอบความแตกต่างของพืชได้อย่างละเอียด สามารถทราบได้ถึงความแตกต่างในระดับเบส เช่น จากการศึกษาพบว่าการเกิดการแทนที่กันของเบส (Substitution) หรือ การเพิ่มของเบส (Insertion) ของดีเอ็นเอของต้นกระท่อม อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อจำกัดคือ ดีเอ็นบาร์โค้ดเป็นการศึกษาในบริเวณใดบริเวณหนึ่งของดีเอ็นเอ ทำให้ข้อมูลที่ได้อาจจะไม่ได้เป็นตัวแทนของจีโนมทั้งหมด ซึ่งการตรวจสอบทั้งจีโนมด้วยวิธีการหาลำดับเบสนั้นทำได้ลำบากเนื่องจากใช้ทุนสูง

ดังนั้นแนวทางการพัฒนาการตรวจสอบเอกลักษณ์ของพืชกระท่อม อาจทำได้โดยนำข้อมูลของแถบดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ของพืชกระท่อมที่ได้ไปพัฒนาต่อให้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความจำเพาะเจาะจงในการพิสูจน์เอกลักษณ์มากขึ้น เช่น ลายพิมพ์ดีเอ็นเอชนิดสคาร์ จะทำให้สามารถค้นพบความแตกต่างของลำดับเบสบนยีนอื่น ๆ ในจีโนมได้

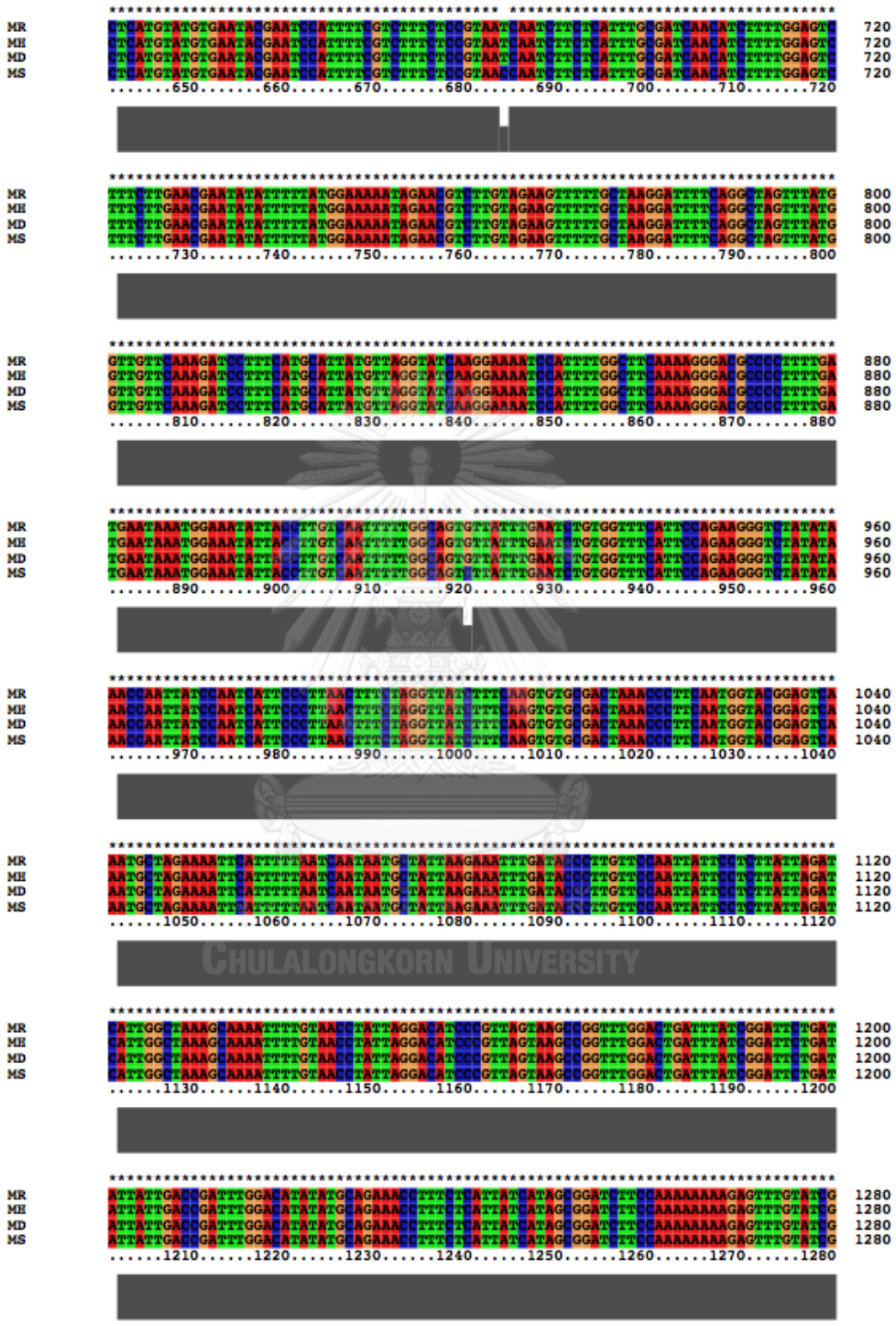
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



ภาพที่ 52 บาร์โค้ดดีเอ็นเอรหัสสีส่วนที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ของพืชในสกุล *Mitragyna*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



ภาพที่ 52 (ต่อ) บาร์โค้ดดีเอ็นเอรหัสสีส่วนที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ของพืชในสกุล *Mitragyna*

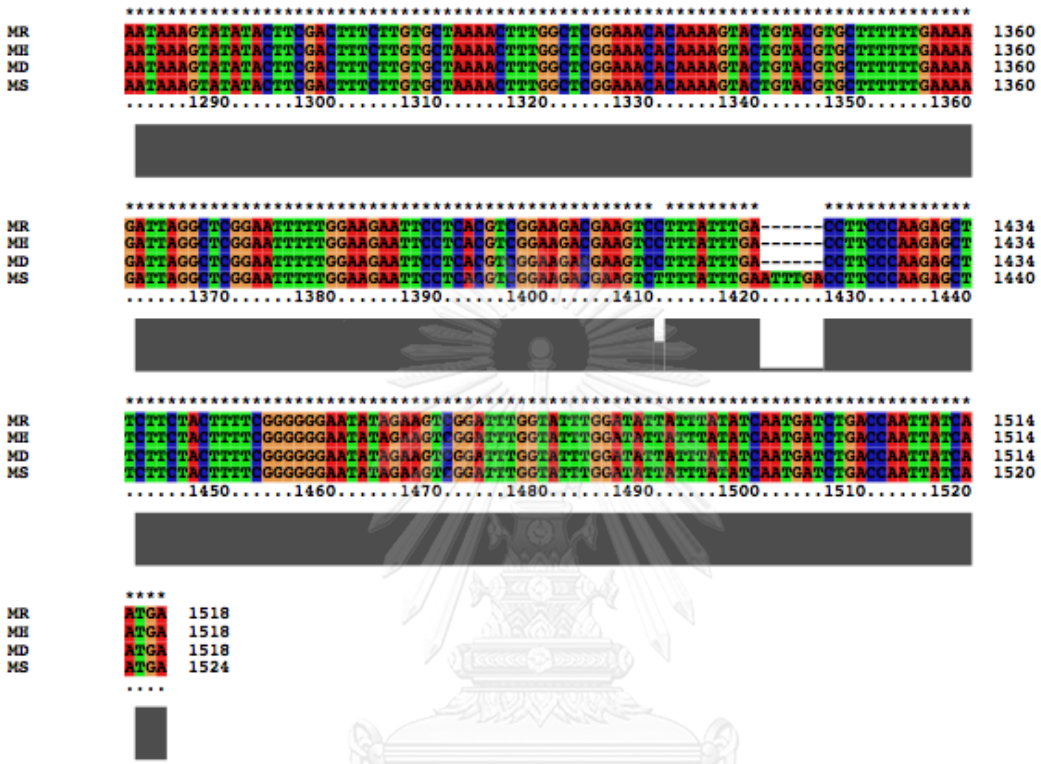
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

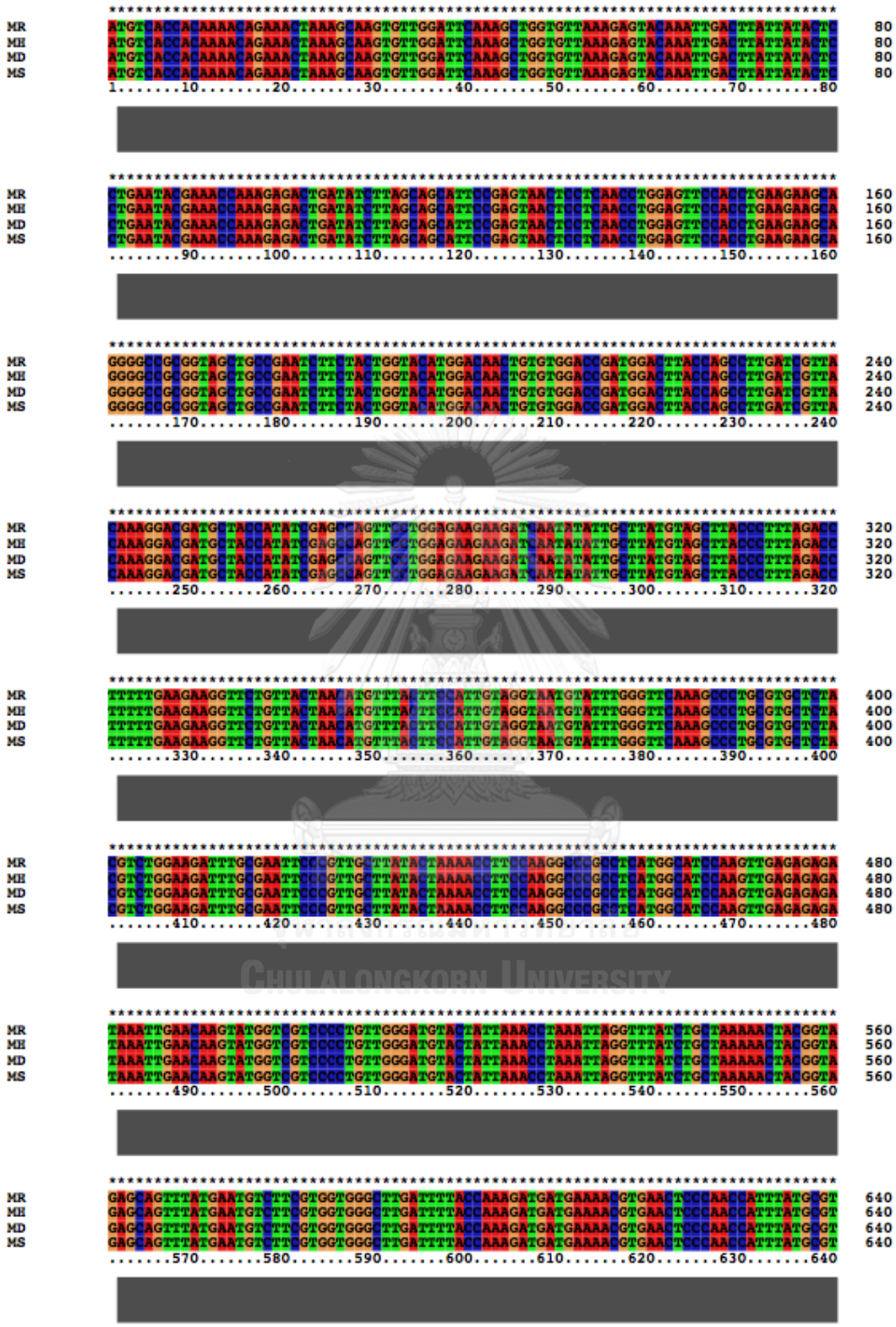
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



ภาพที่ 52 (ต่อ) บาร์โค้ดดีเอ็นเอรหัสสีส่วนที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ของพืชในสกุล *Mitragyna*

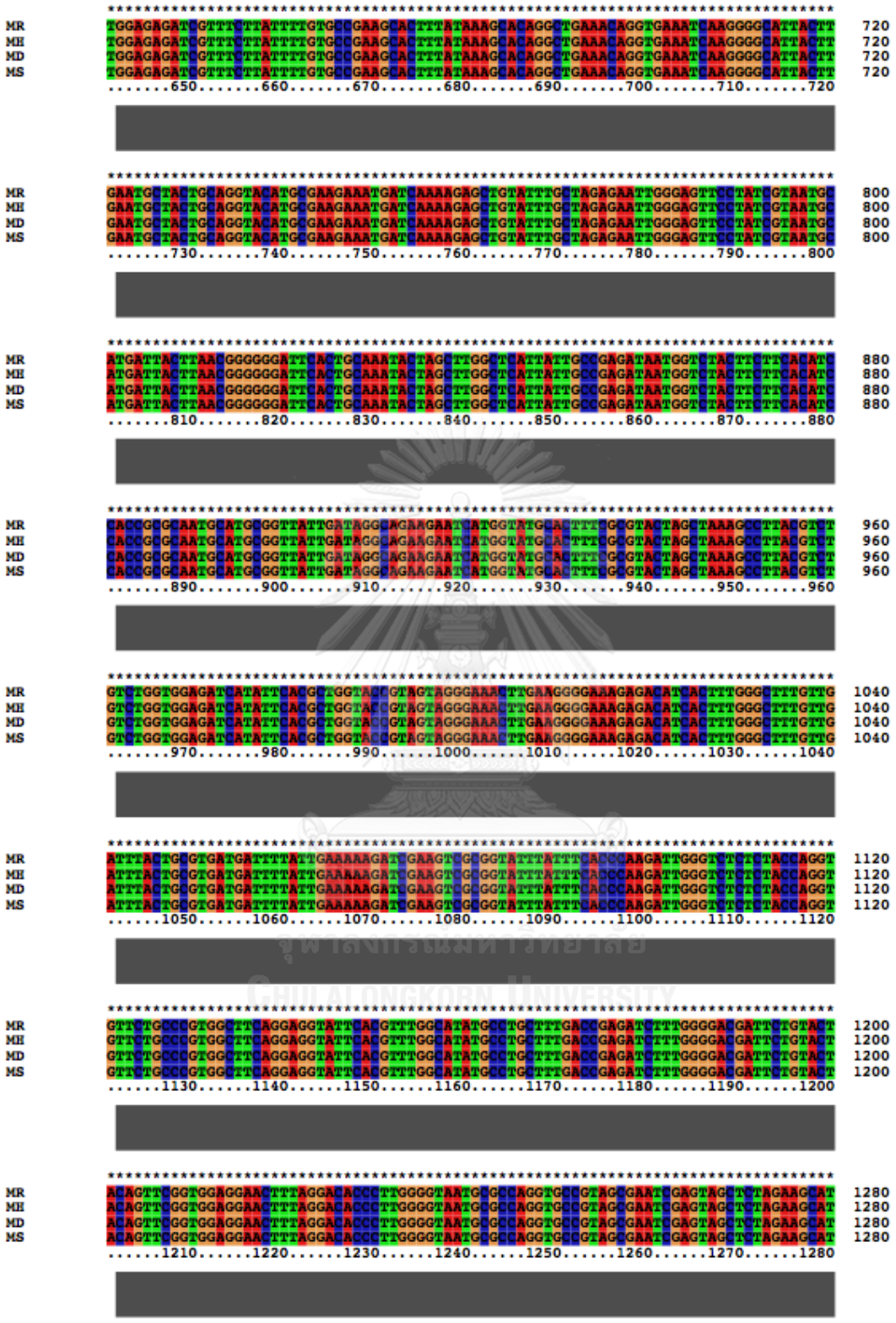
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



ภาพที่ 53 บาร์โค้ดดีเอ็นเอรหัสสีส่วนที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L ของพืชในสกุล *Mitragyna*

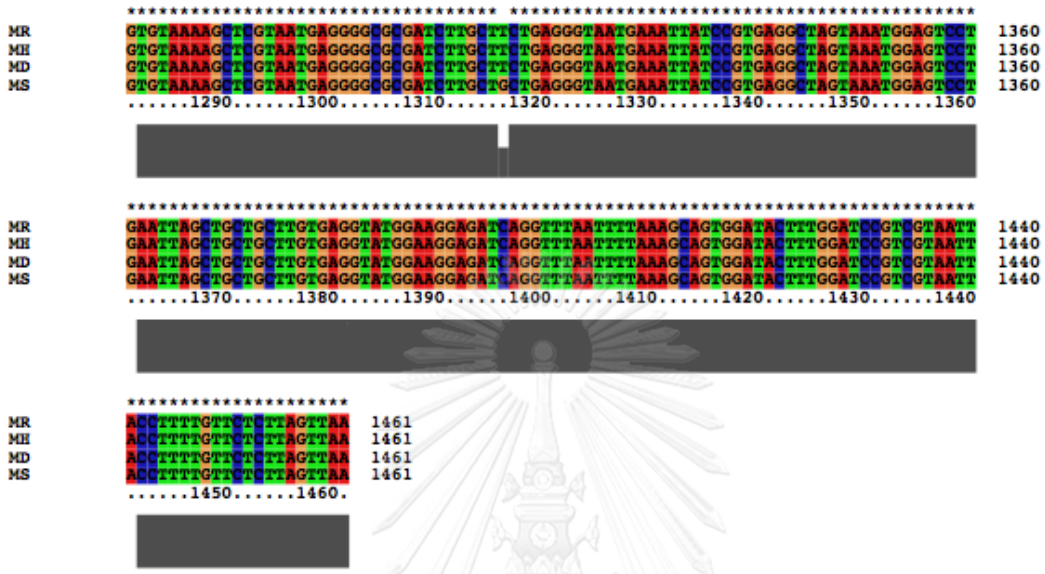
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



ภาพที่ 53 (ต่อ) บาร์โค้ดดีเอ็นเอรหัสสีส่วนที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L ของพืชในสกุล *Mitragyna*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

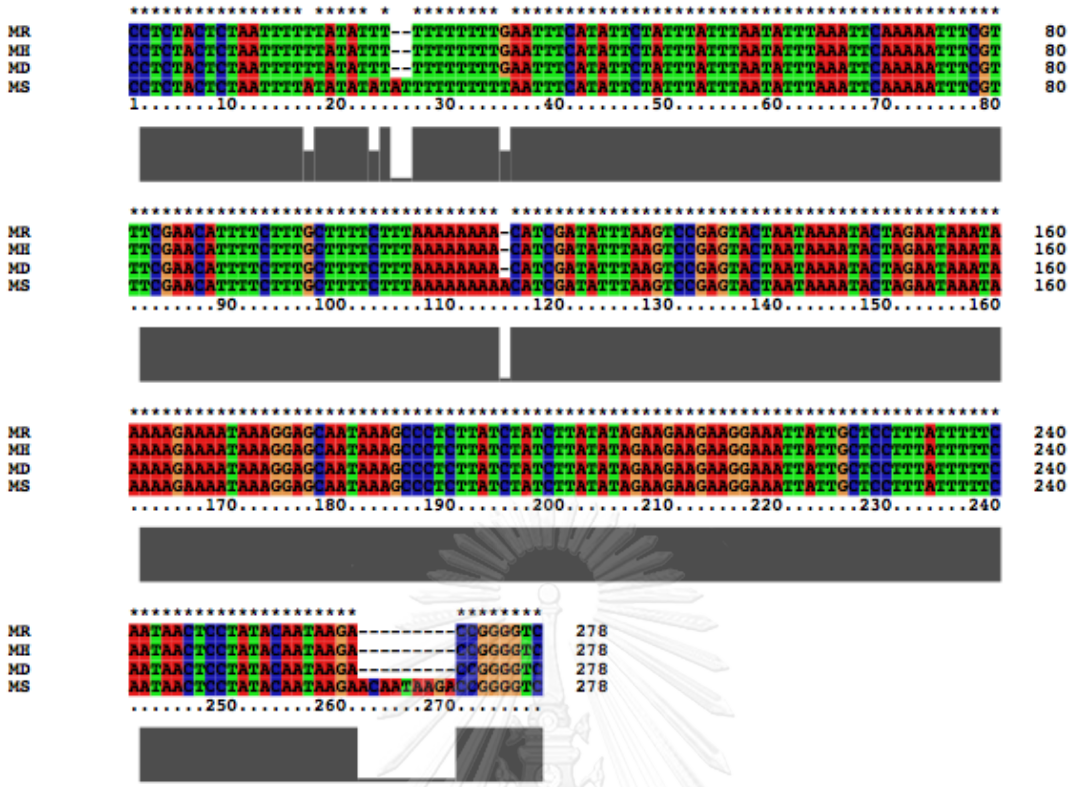
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



ภาพที่ 53 (ต่อ) บาร์โค้ดดีเอ็นเอรหัสสีส่วนที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L ของพืชในสกุล *Mitragyna*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

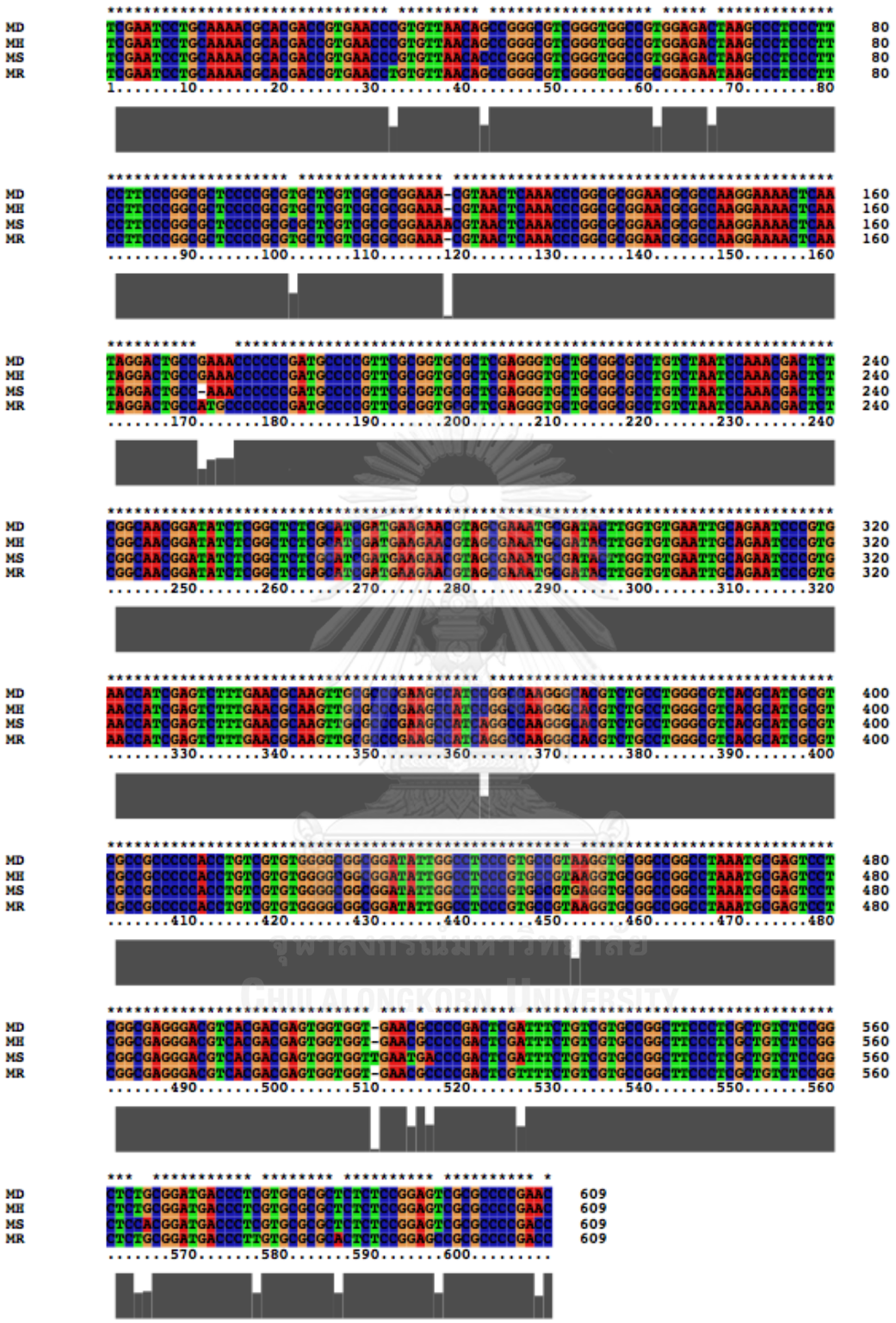
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



ภาพที่ 54 บาร์โค้ดดีเอ็นเอรหัสสีส่วนที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trnH-psb*A spacer ของพืชในสกุล *Mitragyna*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



ภาพที่ 55 บาร์โค้ดดีเอ็นเอรหัสสีส่วนที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของพืชในสกุล *Mitragyna*

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

เอกสารอ้างอิง

1. Suwanlert S. A study of kratom eaters in Thailand. Bull Narc. 1975;27(3):21-8.
2. ที่มา http://i.imgur.com/RQssQ5E.png
3. Shellard EJ. The alkaloids of *Mitragyna* with special reference to those of *Mitragyna speciosa*, Korth. Bull Narc. 1974;2:41-55.
4. Sukrong S, Zhu S, Ruangrungsri N, Phadungcharroen T, Palanuvej C, Komatsu K. Molecular analysis of the genus *Mitragyna* existing in Thailand based on rDNA ITS sequences and its application to identify a narcotic species: *Mitragyna speciosa*. Biol Pharm Bull. 2007;30(7):1284-88.
5. จิตประพัทธ์ ต.เจริญ. การประยุกต์วิธีการทางชีววิทยาและเคมีในการระบุใบกระท่อม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยมหิดล 2010.
6. Mahakham W. DNA barcodes of plants: basic concept, application and limitation. Thai journal of Botany. 2011;3(1):1-30.
7. Doyle J. DNA Protocols for Plants. Molecular Techniques in Taxonomy. NATO ASI Series. 1991:57.
8. ฝ่ายวิชาการ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี. เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการการศึกษาและวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอพืช (Plant DNA fingerprint Analysis). 2557.
9. Sakal RR, Michener CD. A statistic method for evaluating systematic relationships. Univ. of Kansas Sci. Bul. 1958;28:1409-1438.
10. Sneath PHA, Sokal RR. The principles and practice of numerical classification. Numerical taxonomy. 1973;573.
11. Rohlf FI. NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.21a. Exeter Software, New York. 2004.
12. Lee T, Witte ID, Drenth A, Alfonso C, Govers F. AFLP linkage map of omycete phytophthora infestans. Fungi Genet. Biol. 1997;21:278-91.
13. Kokotovic B, Friis NF, Jensen J, Ahrens P. Amplified fragment length polymorphism fingerprint of Mycoplasma species. J. Clin. Microbiol. 1999; 37:3300-07.
14. Saliba-Colombani V, Causse M, Gervais L, Philouze J. Efficiency of RFLP, RAPD and AFLP markers for the construction of an intraspecific map of the tomato genome. Genome. 2000;43:29-40.

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

15. ลลิดา อาจสูงเนิน. 2552. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อพันธุกรรมทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) สายพันธุ์แท้โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับเครื่องหมายเอเอฟแอลพี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
16. สุชาดา สุขหร่อง. 2553. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสมุนไพร. สำนักพิมพ์โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
17. วรธัช ฐิติกรพงศ์. 2553. ข้อกำหนดทางเภสัชเวทและเอกลักษณ์ทางโมเลกุลของใบอินทนิลน้ำ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
18. ที่มา: http://www.dnature.co.nz/assets/Uploads/Geneaid/plant-process.jpg
19. CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2009;161:12794-12797.
20. Fazekas AJ, Kesanakurti PR, Burgess KS, Percy DM, Graham SW, Barrett SCH, et al. Are plant species inherently harder to discriminate than animal species using DNA barcoding markers?. Molecular Ecology Resources. 2009;9:130-139.
21. วุฒิพงศ์ มหาคำ. DNA barcodes ของพืช: หลักการพื้นฐาน การประยุกต์ใช้ และข้อจำกัด. Thai journal of botany 2011;3(1):1-30.
22. Johnson L, Soltis DE. *mat*K DNA sequences and phylogenetic reconstruction in Saxifragaceae s. str. Systematic Botany. 1994;19(1):143-156.
23. Ford CS, Ayres KL, Toomey N, Haider N, Van Alphen Stahl J, Kelly LJ, et al. Selection of candidate coding DNA barcoding regions for use on land plants. Botanical Journal of the Linnean Society. 2009;159:1-11.
24. Kress WJ, Erickson DL. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbc*L gene complements the non-coding region *trn*H-*psb*A spacer region. PLoS ONE. 2007;2(6):e508.
25. Newmaster SG, Fazekas AJ, Steeves RAD, Janovec J. Testing candidate plant barcode regions in the Myristicaceae. Molecular Ecology Resources. 2008;8:480-490.
26. Vongsak B, Kengtong S, Vajrodaya S, Sukrong S. Sequencing Analysis of the Medicinal Plant *Stemona tuberosa* and Five Related Species Existing in Thailand Based on *trn*H-*psb*A Chloroplast DNA. Planta Med 2008;74:1764–1766.
27. Ahmad S, Al-Mahmeed M, Khan ZU. Characterization of *Trichosporon* species isolated from clinical specimens in Kuwait. Journal of Medical Microbiology.2005;54:639–646.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

28. Srisiri K, Panvisavas N, Sojikul P. The study of ITS, *rbc*L, AND *trn*T-F regions in 'KRATOM' (*Mitragyna speciosa* Korth.) for forensic identification by DNA. 8th National Grad Research Conference; 2007 Sep 7-8; Mahidol University. Bangkok; 2007

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

ภาคผนวก

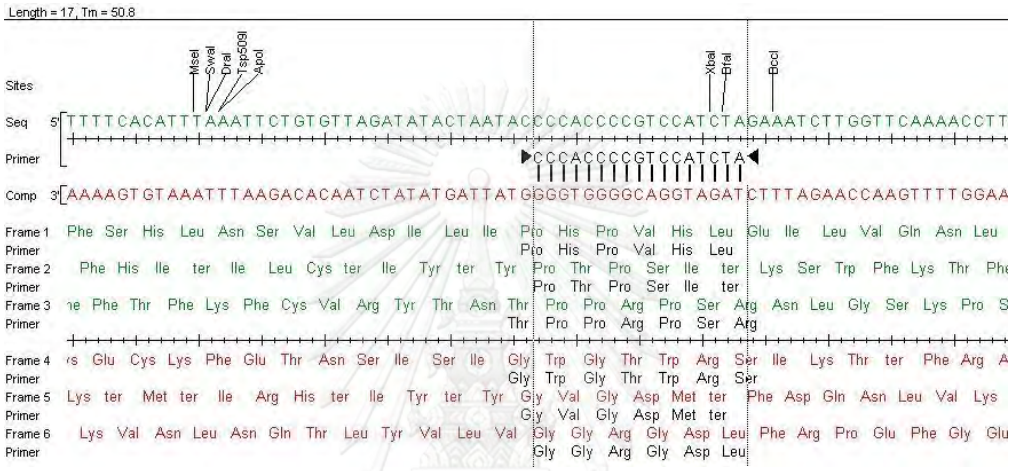
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

ภาคผนวก

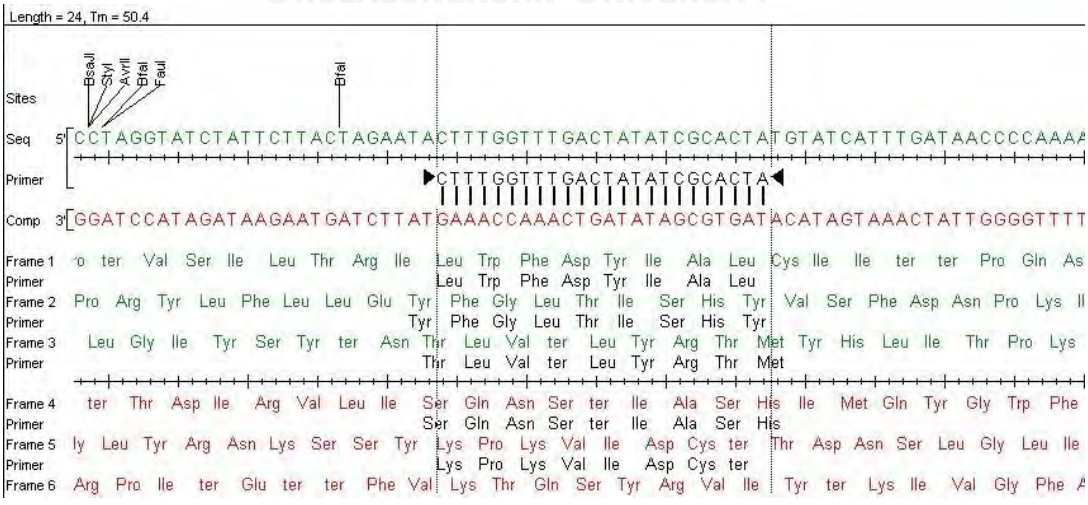
รายละเอียดของไพร์เมอร์ที่ออกแบบ

1. ชื่อไพร์เมอร์ : *mat*Kmit483F
   ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5′-3′) : CCCACCCCGTCCATCTA



2. ชื่อไพร์เมอร์ : *matKmit(-56)F*
   ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5′-3′) : CTTTGGTTTGACTATATCGCACTA

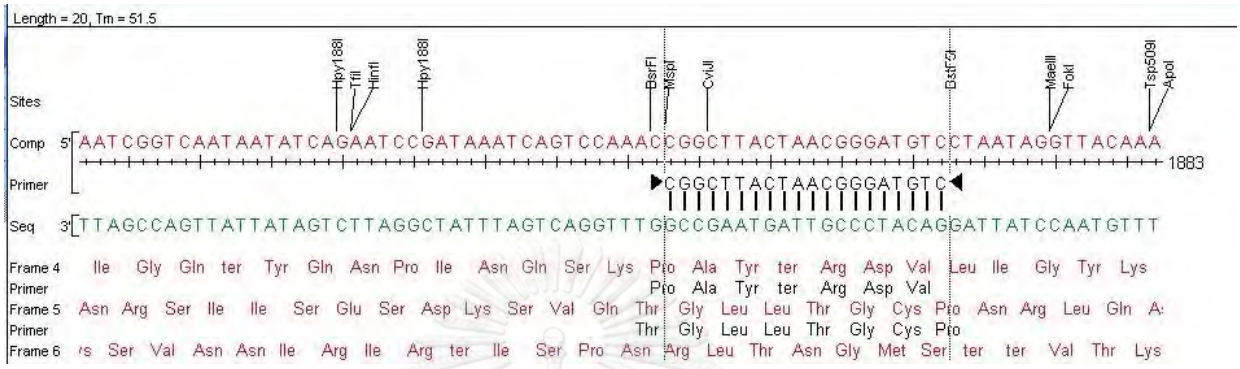
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

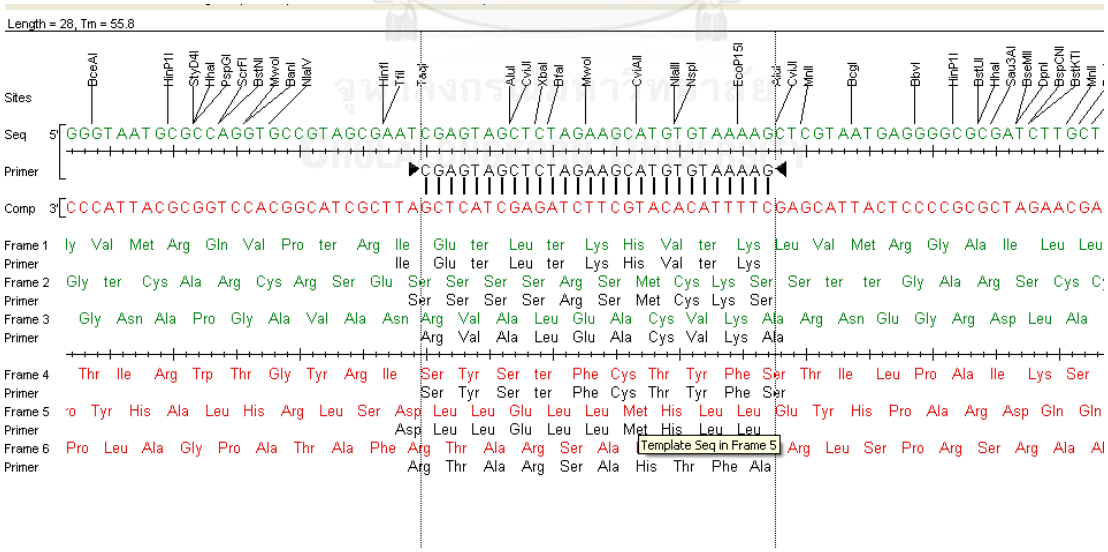
3. ชื่อไพร์เมอร์ : *mat*Kmit1166R

ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5′-3′) : CGGCTTACTAACGGGATGTC



4. ชื่อไพร์เมอร์ : *rbc*L-mit-F2

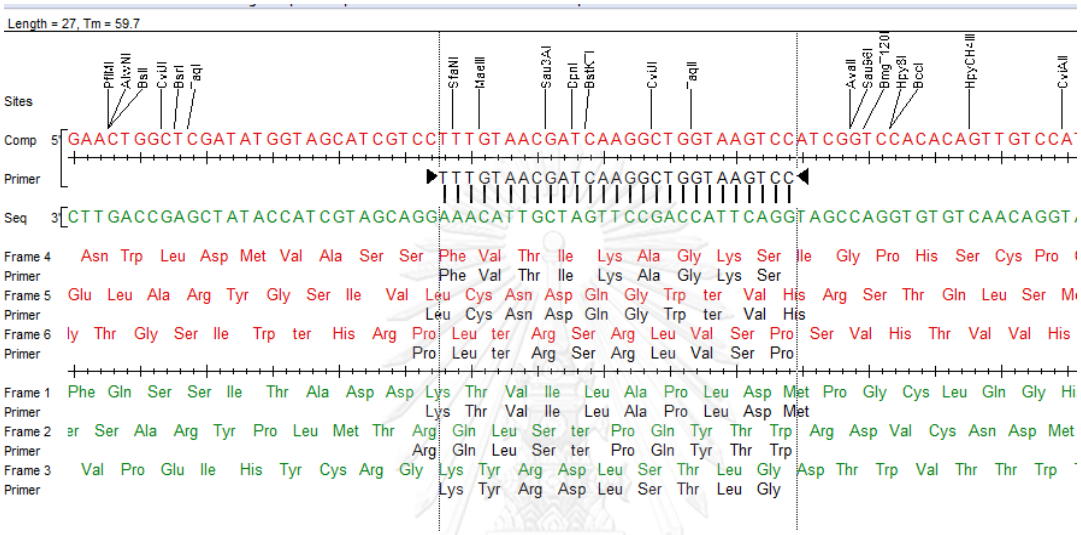
ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5′-3′) : CGAGTAGCTCTAGAAGCATGTGTAAAAG



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

5. ชื่อไพร์เมอร์ : *rbc*L-mit-R2

ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5′-3′) : TTTGTAACGATCAAGGTGGTAAGTCC



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

[i] Suwanlert S. A study of kratom eaters in Thailand. Bull Narc. 1975;27(3):21-8.

[ii] (ที่มา http://i.imgur.com/ROssO5E.png)

[iii] Shellard EJ. The alkaloids of *Mitragyna* with special reference to those of *Mitragyna speciosa*, Korth. Bull Narc. 1974;2:41-55.

[iv] Sukrong S, Zhu S, Ruangrungsri N, Phadungcharroen T, Palanuvej C, Komatsu K. Molecular analysis of the genus *Mitragyna* existing in Thailand based on rDNA ITS sequences and its application to identify a narcotic species: *Mitragyna speciosa*. Biol Pharm Bull. 2007;30(7):1284-88.

[v] จิตประพัทธ์ ต.เจริญ. การประยุกต์วิธีการทางชีววิทยาและเคมีในการระบุใบกระท่อม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยมหิดล 2010.

[vi] Mahakham W. DNA barcodes of plants: basic concept, application and limitation. Thai journal of Botany. 2011;3(1):1-30.

[vii] Doyle J. DNA Protocols for Plants. Molecular Techniques in Taxonomy. NATO ASI Series. 1991:57

[viii] ฝ่ายวิชาการ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี. เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการการศึกษาและวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอพืช (Plant DNA fingerprint Analysis). 2557.

[ix] Sakal RR, Michener CD. A statistic method for evaluating systematic relationships. Univ. of Kansas Sci. Bul. 1958;28:1409-1438.

[x] Sneath PHA, Sokal RR. The principles and practice of numerical classification. Numerical taxonomy. 1973;573 .

[xi] Rohlf FI. NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.21a. Exeter Software, New York. 2004.

[xii] (Lee *et al.*, 1997;

[xiii] Kokotovic *et al.*, 1999

[xiv] Saliba *et al.*, 2000)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

[xv] ลลิดา อาจสูงเนิน. 2552. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อพันธุกรรมทานตะวัน (Helianthus annuus L.) สายพันธุ์แท้โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับเครื่องหมายเอเอฟแอลพี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

[xvi] สุชาดา สุขหร่อง. 2553. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสมุนไพร. สำนักพิมพ์โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

[xvii] วรธัช ฐิติกรพงศ์. 2553. ข้อกำหนดทางเภสัชเวทและเอกลักษณ์ทางโมเลกุลของใบอินทนิลน้ำ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

[xviii] (ที่มา: http://www.dnature.co.nz/assets/Uploads/Geneaid/plant-process.jpg)

[xix] CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2009;161:12794-12797.

[xx] Fazekas AJ, Kesanakurti PR, Burgess KS, Percy DM, Graham SW, Barrett SCH, et al. Are plant species inherently harder to discriminate than animal species using DNA barcoding markers?. Molecular Ecology Resources. 2009;9 (Supplement 1):130-139.

Author. Article Title. Journal Title Abbreviation. Date;Volume(Issue):Page.

[xxi] วุฒิพงศ์ มหาคำ. DNA barcodes ของพืช: หลักการพื้นฐาน การประยุกต์ใช้ และข้อจำกัด. Thai journal of botany 2011;3(1):1-30.

[xxii] Johnson L, Soltis DE. *mat*K DNA sequences and phylogenetic reconstruction in Saxifragaceae s. str. Systematic Botany. 1994;19(1):143-156.

[xxiii] Ford CS, Ayres KL, Toomey N, Haider N, Van Alphen Stahl J, Kelly LJ, et al. Selection of candidate coding DNA barcoding regions for use on land plants. Botanical Journal of the Linnean Society. 2009;159:1-11.

[xxiv] Kress WJ, Erickson DL. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbc*L gene complements the non-coding region *trn*H-*psb*A spacer region. PLoS ONE. 2007;2(6):e508.

[xxv] Newmaster SG, Fazekas AJ, Steeves RAD, Janovec J. Testing candidate plant barcode regions in the Myristicaceae. Molecular Ecology Resources. 2008;8:480-490.

[xxvi] Vongsak B, Kengtong S, Vajrodaya S, Sukrong S. Sequencing Analysis of the Medicinal Plant Stemona tuberosa and Five Related Species Existing in Thailand Based on trnH-psbA Chloroplast DNA. Planta Med 2008;74:1764–1766.

[xxvii] Ahmad s, Al-Mahmeed M, Khan ZU. Characterization of *Trichosporon* species isolated from clinical specimens in Kuwait. Journal of Medical Microbiology.2005;54:639–646.

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

[xxviii] Srisiri K, Panvisasas N, Sojikul P. The study of ITS, *rbc*L and *trn*T-F regions in 'KRATOM' (*Mitragyna speciosa* KORTH.) for forensic identification by DNA. Forensic Science Graduate Programme, Mahidol University

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.