การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของโลดทะนง

ทิพเนตร เขียววิจิตร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชกรรมไทย
ปีการศึกษา 2560
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

A STUDY ON DNA FINGERPRINT OF TRIGONOSTEMON REIDOIES (KURZ) CRAIB

TIPPANATE KEAWVIJIT

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for

Master of Science Program in Thai Traditional Pharmacy

Academic Year 2017

Copyright of Bansomdejchaopraya Rajabhat University

ชื่อเรื่อง	**การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของโลดทะนง**
ชื่อผู้วิจัย	**ทิพแนตร เขียววิจิตร**
สาขาวิชา	**เภสัชกรรมไทย**
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	**ดร.อัจฉรา แก้วน้อย**
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	**ดร.ปิยรัษฎ์ ปริญญาพงษ์ เจริญทรัพย์**

มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยาอนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชกรรมไทย

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อารีวรรณ เอี่ยมสะอาด)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการสอบ

(รองศาสตราจารย์ ดร.อ้อมบุญ วัลลิสุต)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร.อัจฉรา แก้วน้อย)

.....กรรมการ

(ดร.ปิยรัษฎ์ ปริญญาพงษ์ เจริญทรัพย์)

.....กรรมการ

(อาจารย์สุชาดา มานอก)

.....กรรมการและเลขานุการ

(อาจารย์สุภรัตน์ ดวนใหญ่)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

ชื่อเรื่อง **การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของโลดทะนง**
ชื่อผู้วิจัย **ทิพเนตร เขียววิจิตร**
สาขาวิชา **เภสัชกรรมไทย**
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก **ดร.อัจฉรา แก้วน้อย**
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม **ดร.ปิยรัษฎ์ ปริญญาพงษ์เจริญทรัพย์**
ปีการศึกษา **2560**

บทคัดย่อ

การศึกษาวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ1) พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลต์ที่จำเพาะกับโลดทะนงแดง ที่ใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของสมุนไพรที่จะนำมาใช้ในการผลิตยาสมุนไพร และ 2) สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอสำหรับระบุเอกลักษณ์ของสมุนไพรโลดทะนง โดยใช้โลดทะนงที่ใช้ในการศึกษาจำนวน 22 ตัวอย่างและคัดเลือกสังเคราะห์ไพรเมอร์ทั้งหมด 25 คู่ โดยเริ่มจากขั้นตอนสร้างคลังดีเอ็นเอของจีโนมที่มีไมโครแซทเทลไลท์ จากนั้นการวิเคราะห์หาลำดับไมโครแซทเทลไลท์และออกแบบไพรเมอร์ แล้วนำไปวิเคราะห์ทางพันธุกรรมโดยตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็คโตรโฟริซีสแบบเจลโพลีอะคริละไมด์ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์กลุ่ม ด้วยวิธี UPGAM โดยใช้สัมประสิทธิ์ความคล้ายทางพันธุกรรมแบบ simple matching เพื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ภายในกลุ่ม ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYSpc version 2.11T

ผลการวิจัยพบว่า

1. ได้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์ 3 เครื่องหมาย (LT_AC_100, LT_GT_065 และ LT_GT_169) ที่จำเพาะเจาะจงกับโลดทะนงแดงสามารถใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องในการผลิตยาสมุนไพร

2. ได้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์ 3 เครื่องหมายเพื่อใช้ในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ พบจำนวนอัลลีลทั้งหมด 58 อัลลีลโดยในแต่ละไพรเมอร์ให้อัลลีลที่แตกต่างกัน ตั้งแต่ 18-21 อัลลีล ค่า melting temperature (Tm) อยู่ระหว่าง 58-60 องศาเซลเซียส ขนาดของอัลลีล อยู่ระหว่าง 170 - 260 bp มีค่า polymorphism information contents (PICs) เฉลี่ยเท่ากับ 0.87 แสดงถึงความสามารถในการแยกความแตกต่างของตัวอย่างโลดทะนงสูง เมื่อนำมาวิเคราะห์กลุ่ม ด้วยวิธี UPGAM โดยใช้สัมประสิทธิ์ความคล้ายทางพันธุกรรมแบบ simple matching พบว่ามีค่า cophenetic correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.794 ถือว่ามีความสัมพันธ์กันแบบทางเดียวกัน แต่จัดกลุ่มได้เหมาะสมน้อย สามารถแบ่งกลุ่มโลดทะนงได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่อย่างชัดเจน โดยมีค่า

สัมประสิทธิ์ความคล้ายเท่ากับ 0.66 แสดงว่าพื้นที่ที่เพาะปลูกต้นโลดทะนงที่แตกต่างกันจะทำให้มีความแตกต่างทางพันธุกรรม

จากการศึกษาในครั้งนี้ถือว่าเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการศึกษาลักษณะทางโมเลกุลพืชในวงศ์ Euphorbiaceae ถือว่าบรรลุวัตถุประสงค์สามารถใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องระบุเอกลักษณ์ของสมุนไพรโลดทะนงได้

คำสำคัญ: โลดทะนงแดง ไมโครแซทเทลไลท์ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

Title **A study on DNA fingerprint of *Trigonostemon reidioides* (Kurz) Craib**

Author **Tippanate Keawvijit**

Program **Traditional Pharmacy**

Major Advisor **Dr. Atchara Kaewnoi**

Co-advisor **Dr. Piyarat ParinyaphongChareonsap**

Academic Year **2017**

ABSTRACT

The purpose of this study were 1) to develop specific molecular microsatellite markers from *Trigonostemon reidioides* (Kurz) Craib to be used to verifying the accuracy of herbs that are used in the production of herbal medicines and 2) to establish DNA fingerprint to identify *Trigonostemon reidioides* (Kurz) Craib. Twenty-two samples of the *Trigonostemon reidiodes* (Kurz) Craib were used in this study. The 25 synthetic primer pairs were designed accordingly. Firstly, microsatellite DNA genome library was made. Secondly, microsatellite sequencing was analzed to designed specific primers, and lastly, DNA fingerprint analysis using polyacrylamide gel electrophoresis technique. The obtained data were analyzed by cluster analysis through UPGAM using coefficient similarity by simple matching method to compare the relationships within the group by NTSYSpc version 2.11T program.

The findings revealed as follows.

1. The 3 molecular microsatellite markers (LT_AC_100, LT_GT_065 and LT_GT_169) particularly matching with *Trigonostemon reidioides* (Kurz) Craib which could be used in validating herb production were obtained.

2. Total of 58 alleles were found (18-21 alleles). Melting temperature (Tm) values were between 58-60 °C. The size of the allele were between 170-260 bp. The average PICs value was 0.87 (0.82 to 0.90). This indicated high polymorphic capability. Cophenetic correlation coefficient (r) value was 0.794, shown correlation coefficient and similarity coefficient were relationship the same way but the group has less appropriate. Two main groups were separated

clearly, similarity coefficient value was 0.66 showed that the *Trigonostemon reidioides* (Kurz) Craib in different cultivated area had the genetic differences. The study was considered as an importantly basic information on the molecular histology study of plants in the Euphorbiaceae family and can be used to verifying the accuracy of *Trigonostemon reidioides* (Kurz) Craib.

Keywords: *Trigonostemon reidioides* (Kurz) Craib, Microsattellite, DNA fingerprint

กิตติกรรมประกาศ

การทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เพราะความกรุณาเป็นอย่างดียิ่งจากท่านอาจารย์ ดังนี้

ขอขอบคุณ ดร.อัจฉรา แก้วน้อย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ท่านได้กรุณาเอื้อเฟื้อ ให้แนวทาง ให้ความรู้ ให้คำแนะนำ ให้ข้อคิดเห็น รวมทั้งวิธีการในการทำวิจัยตลอดจนการแก้ไขปัญหาต่างๆ ระหว่างการทำวิจัยอย่างใกล้ชิดเสมอมาและผลักดันและกระตุ้นข้าพเจ้าจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์บรรลุวัตถุประสงค์

ขอขอบคุณ ดร.ปิยรัษฎ์ ปริญญาพงษ์ เจริญทรัพย์ ท่านช่วยให้คำแนะนำ ช่วยแหลือ เอื้อเฟื้อและเปิดทางได้อย่างเต็มที่ ไม่ว่าจะเป็นเรื่องการอนุมัติสถานที่ วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทำวิจัยตลอดจนคอยดูแลอย่างใกล้ชิด ตลอดเวลาในการการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณคุณอินทิรา จารุเพ็ง (พี่อิน) คุณอรชร โชติญาณวงษ์ (พี่ปาหนัน) และคุณประไพ โมจรินทร์ (พี่แมะ) หน่วยปฏิบัติการชีวโมเลกุลพืช โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ (อพ.สธ) สวนจิตรลดา พระราชวังดุสิต ที่ช่วยให้คำแนะนำ วิธีการดำเนินการวิจัย ช่วยแก้ปัญหาที่มีอยู่ตลอดเวลาในการทำวิจัย แนะแนวทาง รวมถึงสอนทั้งทฤษฎีและปฏิบัติในการทำวิจัย รวมถึงตรวจแก้วิทยานิพนธ์ ตลอดจนคอยดูแลเอาใจใส่เป็นอย่างดี เปรียบเสมือนข้าพเจ้าเป็นส่วนหนึ่งของหน่วยงาน ตลอดระยะเวลาในการทำวิจัย

ขอบขอบคุณอาจารย์ศุภรัตน์ ดวนใหญ่ และอาจารย์สุชาดา มานอก ที่คอยแนะแนวทางให้คำแนะนำต่างๆ ที่จำเป็นในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้อย่างดียิ่งและสม่ำเสมอ ขอขอบคุณจากใจที่ท่านได้กรุณาให้ความช่วยเหลือในเอกสารทางด้านวิชาการ ตลอดจนคำแนะนำต่างๆ

ขอขอบคุณ คุณรักษา สุนินทบูรณ์ นักวิชาการป่าไม้ชำนาญการ หัวหน้าหน่วยงานสถานีวนวัฒนวิจัยเขาสอยดาว ที่กรุณาดำเนินการเก็บตัวอย่างที่ใช้การวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณพี่ๆ น้องๆ ศูนย์พิษวิทยา รพ.ศิริราช ที่คอยให้กำลังใจ ช่วยเหลือ ทำงานแทนข้าพเจ้า เมื่อข้าพเจ้าลาไปทำวิจัย

ขอขอบคุณน้องๆ และเจ้าหน้าที่ สาขาวิชาการแพทย์แผนไทยและเภสัชกรรมไทย มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา ที่คอยช่วยเหลืออย่างเต็มใจตลอดระยะเวลาในการทำวิจัย

ทิพเนตร เขียววิจิตร

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ค

กิตติกรรมประกาศ ..... จ

สารบัญ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ซ

สารบัญภาพ ..... ฌ

บทที่ 1 บทนำ 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย 3

ขอบเขตของการวิจัย 3

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย 3

นิยามศัพท์เฉพาะ 3

กรอบแนวคิดในการวิจัย 5

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 6

ข้อมูลทั่วไปของโลดทะนงแดง 6

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA Fingerprinting) ในพืช 8

เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular Marker) 8

เทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR) 10

อิเล็กโตรโฟรีซีส (Electrophoresis) 12

ไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellite) 13

การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellite Marker Development) 15

การวิเคราะห์การจัดกลุ่ม (Cluster Analysis) 17

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 20

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย 21

กลุ่มตัวอย่าง 24

วิธีดำเนินการวิจัย 26

การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้ 47

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล..... 49
ผลการสกัดดีเอ็นเอตัวอย่างที่ใช้การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์..... 49
ผลการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์..... 50
ผลการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของโลดทะนงโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์..... 60
สรุปผลการวิเคราะห์ข้อมูล..... 63
บทที่ 5 สรุปผล อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ..... 68
สรุปผลการวิจัย..... 68
การอภิปรายผล..... 69
ข้อเสนอแนะ..... 71
บรรณานุกรม..... 72
ภาคผนวก..... 76
ภาคผนวก ก แบบฟอร์มที่ใช้ในการส่ง DNA sequencing..... 77
ภาคผนวก ข วิธีการเก็บตัวอย่างใบโลดทะนง..... 79
ภาคผนวก ค ผลการทำ Colony PCR และผลการเช็คความเข้มข้นของ Plasmid ที่สกัดได้..... 81
ภาคผนวก ง ผลการกำหนด Genotyping Data เพื่อนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของโลดทะนง..... 101
ภาคผนวก จ หนังสือตอบรับลงบทความวิจัย..... 105
ประวัติผู้วิจัย..... 107

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตัวอย่างโลดทะนงที่ใช้ในการศึกษา.....	24
2	ส่วนประกอบในปฏิกิริยาการทำ Digestion.....	29
3	ส่วนประกอบในปฏิกิริยาการทำ Ligation.....	30
4	โปรแกรมการทำ ligation (L2 LINKER).....	31
5	ส่วนประกอบในปฏิกิริยาการทำ PCR เช็ค Ligation Product.....	31
6	PCR Program สำหรับตรวจสอบ Ligation product.....	32
7	ส่วนประกอบการทำ Hybridization ในปฏิกิริยา.....	32
8	ส่วนประกอบในปฏิกิริยา Amplification of Linker Ligated and Oligo DNA by Hybridized DNA	34
9	PCR Program การทำ Amplification of Linker Ligated and Oligo DNA by Hybridized DNA.....	35
10	ส่วนประกอบในปฏิกิริยา Ligation with pGEM®-T Easy Vector.....	36
11	ส่วนประกอบในปฏิกิริยา PCR เช็ค Ligation with pGEM-T +Easy Vector.....	36
12	PCR Program การทำ Ligation with pGEM®-T Easy Vector (Ligate Pgemt).....	37
13	ส่วนประกอบในปฏิกิริยาการทำ Colony PCR.....	39
14	PCR Program การทำ Colony PCR.....	39
15	ส่วนประกอบในการทดสอบไพรเมอร์.....	44
16	PCR Programในการทดสอบไพรเมอร์.....	45
17	ประสิทธิภาพการทำ Bacterial Transformation ด้วยเทคนิค Heat Shock Method.	55
18	แสดงคุณลักษณะเฉพาะของ Primer.....	58
19	ไพรเมอร์ที่ใช้, จำนวนอัลลีล, ขนาดอัลลีล และ PIC ที่ได้จากการตรวจสอบในโลดทะนงแดง (Trigonostemon reidioides (Kurz) Craib) จำนวน 22 ตัวอย่าง.....	64
20	แสดงค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงที่ได้จากการคำนวณด้วยวิธี Simple Maching ของแต่ละคู่…….....	67

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กรอบแนวคิดในการวิจัย.....	5
2	รากโลดทะนงแดง.....	6
3	ตัวอย่างใบโลดทะนงที่ใช้ในการศึกษา (ก) ใบโลดทะนงดอกสีขาว LT09PW (ข) ใบโลดทะนงดอกสีแดง LT09P(ค)ใบโลดทะนงดอกสีแดง LT13J (ง) ใบโลดทะนงดอกสีแดง LT16J.....	26
4	แสดงการสกัด DNA จากใบโลดทะนงแดง.....	49
5	แสดงการตรวจสอบปริมาณ Digested Product ด้วยร้อยละ 0.8 Agarose Gel.....	50
6	แสดงการตรวจสอบปริมาณ DNA Purification ด้วยร้อยละ 0.8 Agarose Gel.....	51
7	แสดงการตรวจสอบปริมาณ PCR Ligation ด้วยร้อยละ Agarose Gel.....	51
8	เช็ค Amplification of Linker Ligated and Oligo DNA by Hybridized DNA (AC/AAC).....	52
9	ตัดเจลในช่วงขนาด 500-1,000 bp (AC/AAC).....	52
10	เช็ค Amplification of Linker Ligated and Oligo DNA by Hybridized DNA (GT/AAC).....	53
11	ตัดเจลในช่วงขนาด 500-1,000 bp (GT/AAC).....	53
12	ผลการตรวจสอบปริมาณ Gel Extraction DNA ด้วยร้อยละ 1 Agarose Gel Electrophoresis.....	53
13	ผลการตรวจสอบปริมาณ PCR เช็ค Ligation with pGEM®-T Easy Vector ด้วยร้อยละ 1 Agarose Gel Electrophoresis.....	54
14	แสดง Blue-wWhite Colony ของ AC/AAC.....	54
15	แสดง Master Plate และสารละลาย Colony.....	55
16	Colony PCR No. LT-AC 151-174.....	56
17	Colony PCR No. LT-AC 175-198.....	57
18	Plasmid DNA No. LT-AC 064-100.....	57
19	Plasmid DNA No. LT-AC 151-177.....	58
20	แสดงผลการสกัด DNA จากตัวอย่างใบโลดทะนงที่ใช้ในโครงการ.....	60

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
21	แสดงตัวอย่างผลการทำ PCR Protocol ของตัวอย่างทั้งหมด 22 ตัวอย่างโดยใช้ Primer ชื่อ LT_GT_083.....	61
22	ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอของโลดทะนงของ Primer LT_AC_100.....	62
23	ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอของโลดทะนงของ Primer LT_GT_065.....	62
24	ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอของโลดทะนงของ Primer LT_GT_169.....	63
25	ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอของโลดทะนงของ Primer LT_AC_182.....	63
26	วิเคราะห์ค่า Cophenetic Correlation Coefficient (r) โดยแผนภาพการกระจาย.....	66
27	แผนภูมิต้นไม้จำลองที่ได้จากการคำนวณแบบ Simple matching และการจัดกลุ่มแบบ UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYS ของประชากรโลดทะนง จำนวน 22 ตัวอย่าง.....	66

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โลดทะนงแดงมีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ Trigonostemon reidioides (Kurz) Craib เป็นพืชในวงศ์ Euphorbiaceae มีชื่อเรียกต่างกันไปในแต่ละภูมิภาค เช่น ข้าวเย็นเนิน (ราชบุรี ประจวบคีรีขันธ์); ดู่เบี้ย ดู่เตี้ย (เพชรบุรี); ทะนง รักทะนง (นครราชสีมา); ทะนงแดง (ประจวบคีรีขันธ์); นางแซง (อุบลราชธานี); โลดทะนงแดง (บุรีรัมย์); หนาดคำ (เหนือ) มีฤทธิ์เป็นยาสมุนไพรรสร้อน พบสารสำคัญจากรากต้นโลดทะนง (แดง) ได้แก่ Rediocide A Rediocide B Rediocide C (+)-Syringaresinol และ Scopoletin (ระวีวรรณ, 2556) และนอกจากนั้นยังสารสำคัญกลุ่ม Novel Falvonoidas Indole Alkaloid ซึ่งประกอบไปด้วย Afzelechib- (4α8) -Afzelechin, Trigonostemone, Phenantherenone, Llotthanongine, Daphane Ditherpenoid (Redioside A) Daphnane Ditetpenes (Rediocides B-F และ Redioside G) (Tempeam A. et al., 2002; 2005) ในแง่ยาสมุนไพรพื้นบ้านใช้ราก เข้ายากับน้ำมะนาว ฝนกับน้ำดื่ม แก้ผิดสำแดง พิษแมงมุม ทำให้อาเจียน ถอนพิษเบื่อเมา ใช้เหง้า ฝนทา แก้สิว ฝ้าและฟกช้ำ เคล็ดบวม ราก ต้มน้ำดื่ม หรือฝนรับประทาน ทำให้อาเจียนอย่างหนัก ใช้ถอนพิษคนกินยาเบื่อยาเมา หรือฝนน้ำกินช่วยให้เลิกดื่มเหล้า และนอกจากนี้แล้ว รากต้นโลดทะนงสามารถไปยับยั้งประสิทธิภาพ การทำงานของพิษงูชนิดที่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท (ระวีวรรณ, 2556) และสามารถออกฤทธิ์ต้านพิษงูได้ เช่น งูเห่าไทย เป็นต้น โดยสารเคมีในรากต้นโลดทะนงไปจับกับกรดอะมิโนใน Neurotoxin3 ซึ่งเป็นสารพิษที่มีผลต่อระบบประสาท ในบริเวณ Binding Site ทำให้ Binding Site ของ Neurotoxin3 ไม่ว่าง ก็ไม่สามารถไปจับกับ Areceptor (Zeng & Hawrot, 2002) ได้ จึงทำให้ไม่เกิดพิษ (คเณศและโอภา, 2541) สำหรับวิธีการใช้ยาสำหรับแก้พิษงู ให้นำรากโลดทะนงแดงมาฝนกับหมากแห้งใช้น้ำสะอาดเป็นกระสายยา ฝนจนกระทั่งน้ำเป็นสีขุ่น ใช้ประมาณ 1 แก้ว ให้ผู้ป่วยดื่มยา รอสัก 3-5 นาที คนไข้จะอาเจียนออกมา 30 นาที หลังจากนั้นให้ดื่มยาซ้ำอีก ขณะเดียวกันทำยาปิดปากแผลที่งูกัด โดยมีมะนาวบีบมะนาวเป็นกระสายยา นำรากโลดทะนงแดงและหมากแห้งมาฝนปิดบริเวณปากแผลที่งูกัด ทำซ้ำทุก 2 ชั่วโมง

ต้นโลดทะนงแดงในปัจจุบันประเทศไทยสามารถพบหาได้ยาก และประชาชนทั่วไปของประเทศ ยังไม่รู้จักหรือเคยเห็นต้นโลดทะนงมาก่อน หรือมีผู้รู้หรือผู้ทรงคุณวุฒิที่สามารถระบุเอกลักษณ์หรือบอกลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของโลดทะนงน้อยมากและงานวิจัยส่วนใหญ่เป็นงานด้านการทดสอบฤทธิ์ต่างๆ โดยไม่มีการตรวจสอบอย่างแน่ชัดว่าเป็นโลดทะนงแดงจริงหรือไม่ จาก

ข้อมูลการตรวจสอบพันธุกรรมโลดทะนงในประเทศไทย พบความแตกต่างระหว่างตัวอย่างต่ำ งานวิจัยนี้ได้พัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ที่สามารถตรวจสอบความหลากหลายได้สูง เพื่อใช้ในการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมโลดทะนงที่ปลูกอยู่ในประเทศไทย และใช้ตรวจสอบพันธุ์เพื่อประโยชน์ในการรับรองพันธุ์ ปรับปรุงพันธุ์ และพัฒนาพันธุ์ต่อไปในอนาคต

ปัจจุบันเทคโนโลยีเครื่องหมายโมเลกุล (Molecular Marker Technology) ซึ่งเป็นเทคโนโลยีที่ได้รับความนิยมในปัจจุบัน เป็นเทคนิคทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล (Molecular Genetics) ที่เข้ามามีบทบาทสำคัญในการศึกษาทางด้านพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด รวมถึงการศึกษาวิจัยทั้งทางด้านการเกษตร การแพทย์ และงานด้านการอนุรักษ์ การคัดเลือกปรับปรุงและพัฒนาสายพันธุ์พืชและสัตว์ (Semagn, et al., 2006, Hubert & Hedgecock, 2004, Sekino & Hara, 2007) จากข้อมูลงานวิจัย พบว่ามีการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลขึ้นหลากหลายชนิด และการนำไปประยุกต์ใช้นั้นก็แตกต่างกันขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของเครื่องหมายแต่ละชนิดและลักษณะของงานวิจัยอย่างไรก็ตาม เครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์หรือเอสเอสอาร์ (Microsatellite or SSR: Simple Sequence Repeat) เป็นชนิดที่ได้รับความนิยมและมีการนำมาประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลาย (Varshney, et al., 2005) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในวิเคราะห์การถ่ายทอดร่วมทางพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตต่างๆ วิธีที่นิยมใช้ในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล ไมโครแซทเทลไลท์ คือ การวิเคราะห์หาไมโครแซทเทลไลท์จากฐานข้อมูลทั้งที่เป็น Genomic DNA และ cDNA หรือ Gene แล้วออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรมต่างๆ (Tangphatsornruang, et al., 2008) เช่น WebSat-Web Tools (Martins, et al., 2009) โดยจะทำให้วิธีนี้นั้นรวดเร็วและประหยัด (Zhan et al.,2009) แต่มีข้อจำกัดในสิ่งมีชีวิตที่ไม่มีฐานข้อมูล (Varshney, et al., 2005) ดังนั้นในกรณีของสิ่งมีชีวิตที่มีข้อมูลทางพันธุกรรมน้อย หรือไม่มี เช่นพืชสมุนไพร พืชถิ่นเดียว พืชหายาก และพืชใกล้สูญพันธุ์ของประเทศไทย วิธีการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์ด้วยการสร้างคลังดีเอ็นเอของจีโนมแบบ Enriched (Enriched Libraries) จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุด ข้อดีคือ พบไมโครแซทเทลไลท์เป็นจำนวนมาก (Zane, et al., 2002, Nunome, et al., 2006) แม้ว่าจะมีการซ้ำของไมโครแซทเทลไลท์ ที่เหมือนกันเป็นจำนวนมากและมีค่าใช้จ่ายสูง (Squirrell, et al., 2003, Burns, et al., 2001)

ดังนั้นโครงการวิจัยนี้ต้องการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและลายพิมพ์ดีเอ็นเอของโลดทะนงแดง โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์เพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลสำหรับการอนุรักษ์และการปรับปรุงพันธุ์ รวมถึงขึ้นทะเบียนพันธุ์ต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลต์ ที่จำเพาะกับโลดทะนงแดง เพื่อใช้ประโยชน์ในการตรวจสอบความถูกต้องของสมุนไพรที่จะนำมาใช้ในการผลิตยาสมุนไพร

2. เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลต์เพื่อใช้ในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอสำหรับระบุเอกลักษณ์ของสมุนไพรโลดทะนง

ขอบเขตของการวิจัย

1. พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลต์ที่จำเพาะกับโลดทะนงแดง โดยใช้ต้นพันธุ์โลดทะนงแดงที่เพาะเลี้ยง ในหน่วยปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มาทำการวิจัย ณ หน่วยปฏิบัติการชีวโมเลกุลพืช โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ (อพ.สธ) สวนจิตรลดา พระราชวังดุสิต

2. ใช้กลุ่มตัวอย่างโลดทะนงตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของโลดทะนงโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ มากกว่าหรือเท่ากับ 20 ตัวอย่าง และมากกว่าหรือเท่ากับ 2 แหล่ง

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. ได้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์เพื่อใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอสำหรับขึ้นทะเบียนพันธุ์ต่อไป

2. ได้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์ที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของโลดทะนงแดงที่นำมาใช้ในการผลิตยาสมุนไพร

นิยามศัพท์เฉพาะ

โลดทะนงแดง หมายถึง พืชที่อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก สูงได้ถึง 1 เมตร มีรากเก็บสะสมอาหารพองโต ผิวสีแดงอมม่วง เนื้อสีขาว ลำต้นเรียวเล็ก ขึ้นเป็นกอ ทุกส่วนของต้นมีขน ลำต้นมีขนสั้นนุ่มหนาแน่น ใบเดี่ยว เรียงสลับ เนื้อใบหนา แผ่นใบรูปขอบขนาน หรือรูปขอบขนานแกมใบหอก กว้าง 2-4 เซนติเมตร ยาว 6-10 เซนติเมตร โคนใบมน มีต่อมเล็กๆ 2 ต่อม ขอบใบเรียบ ปลายใบแหลม เห็นเส้นใบย่อยเห็นชัด และมีขนนุ่มหนาแน่นบนผิวใบทั้งสองด้าน ก้านใบยาว 1-1.5 เซนติเมตร ช่อดอกแบบกระจะ ดอกสีขาว ชมพู ม่วงเข้มหรือเกือบดำ ออกเป็นช่อตามซอกใบและตามกิ่งก้าน ยาว 7-10 เซนติเมตร

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ หมายถึง การตรวจสอบระดับความแตกต่างของจีโนมของสิ่งมีชีวิต โดยใช้เทคนิค ทางชีวโมเลกุล ซึ่งมีความจำเพาะสำหรับสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด

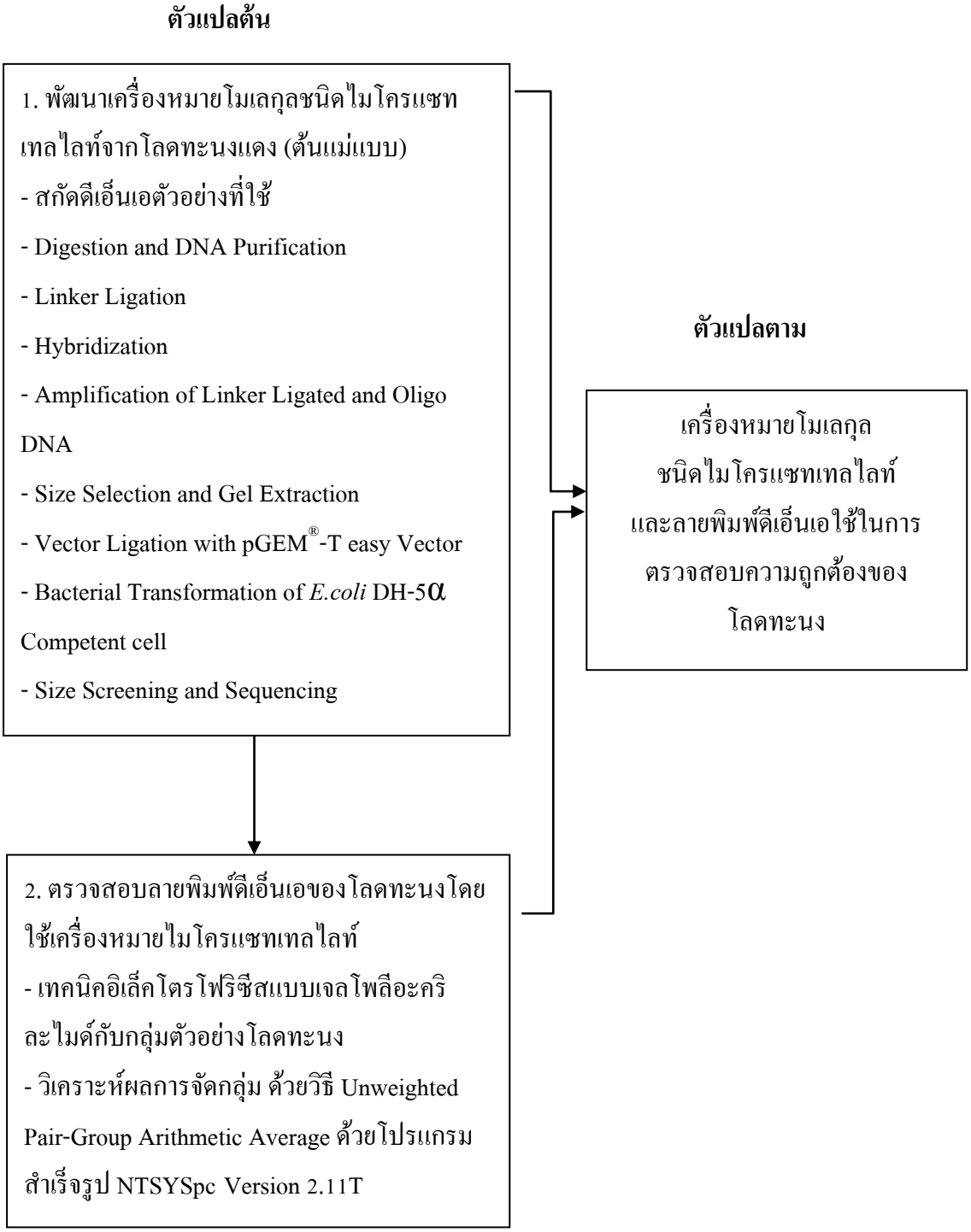
เครื่องหมายโมเลกุล หมายถึง เครื่องหมายที่สามารถระบุความแตกต่างหรือจำแนกลักษณะปรากฏและลักษณะทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต

อิเล็กโตรโฟรีซีส หมายถึง การเคลื่อนย้ายอนุภาคที่อยู่ในสารละลายด้วยกระแสไฟฟ้าโดยอาศัยคุณสมบัติของอนุภาคที่มีประจุไฟฟ้าบวกหรือลบ ซึ่งจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วลบหรือขั้วบวกในสนามไฟฟ้าด้วยอัตราการเคลื่อนที่และทิศทางต่างกันไปตามแต่ละชนิดของประจุบนอนุภาคนั้นๆ

ไมโครแซทเทลไลท์ หมายถึง กลุ่มดีเอ็นเอที่มีเบสซ้ำ มีลำดับเบสซ้ำเป็นยูนิตจำนวน 2-6 เบส จำนวนซ้ำตั้งแต่ 3 ซ้ำไปจนถึงหลายสิบซ้ำ พบมากในจีโนมของสิ่งมีชีวิตขั้นสูง

การวิเคราะห์การจัดกลุ่ม หมายถึง วิธีการทางคณิตศาสตร์ที่ใช้ในการจำแนกหรือแบ่งข้อมูล หรือตัวอย่างที่ศึกษาออกเป็นกลุ่มย่อย ตั้งแต่ 2 กลุ่มขึ้นไป กลุ่มที่แบ่งออกจะแสดงให้เห็นว่าข้อมูลหรือตัวอย่างที่อยู่กลุ่มเดียวกันจะมีลักษณะคล้ายกันหรือมีความสัมพันธ์กันมาก ส่วนข้อมูลหรือตัวอย่างที่อยู่ต่างกลุ่มกันจะมีลักษณะที่ต่างกันหรือมีความสัมพันธ์กันน้อยหรือไม่มีความสัมพันธ์กันเลย

กรอบแนวคิดในการวิจัย



ภาพที่ 1 กรอบแนวคิดในการวิจัย

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในบทนี้จะกล่าวถึงข้อมูลทั่วไปของโลดทะนงแดง ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ สรรพคุณ สารสำคัญ สารออกฤทธิ์ การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA Fingerprinting) ในพืช เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular Marker) ประเภทของเครื่องหมายโมเลกุล เทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR) อิเล็กโตรโฟรีซีส (Electrophoresis) อิเล็คโตรโฟรีซีสแบบเจลอะกาโรส (Agarose Gel Electrophoresis) อิเล็คโตรโฟริซีสแบบเจลโพลีอะคริละไมด์ (Polyacrylamide Gel Electrophoresis: PAGE) ไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellite) การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellite Marker Development) และการวิเคราะห์การจัดกลุ่ม (Cluster Analysis) ดังต่อไปนี้

ข้อมูลทั่วไปของโลดทะนงแดง

โลดทะนงแดง มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ Trigonostemon reidioides (Kurz) Craib เป็นพืชในวงศ์ Euphorbiaceae มีชื่อเรียกต่างกันไปในแต่ละภูมิภาค เช่น ข้าวเย็นเนิน (ราชบุรี ประจวบคีรีขันธ์); ดู่เบี้ย ดู่เตี้ย (เพชรบุรี); ทะนง รักทะนง (นครราชสีมา); ทะนงแดง (ประจวบคีรีขันธ์); นางแซง (อุบลราชธานี); โลดทะนงแดง (บุรีรัมย์); หนาดคำ (เหนือ) หัวยาเข้าเย็นเนิน ข้าวเย็นเนิน (ราชบุรี ประจวบคีรีขันธ์) มีรากสะสมอาหารพองโต ผิวสีแดงอมม่วง เนื้อสีขาว

ภาพที่ 2 รากโลดทะนงแดง

(ฐานข้อมูลเครื่องยาสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, ออนไลน์)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก สูงได้ถึง 1 เมตร มีรากเก็บสะสมอาหารพองโต ผิวสีแดงอมม่วง เนื้อสีขาว ลำต้นเรียวเล็ก ขึ้นเป็นกอ ทุกส่วนของต้นมีขน ลำต้นมีขนสั้นนุ่มหนาแน่น ใบเดี่ยว เรียงสลับ เนื้อใบหนา แผ่นใบรูปขอบขนาน หรือรูปขอบขนานแกมใบหอก กว้าง 2-4 เซนติเมตร ยาว 6-10 เซนติเมตร โคนใบมน มีต่อมเล็ก ๆ 2 ต่อม ขอบใบเรียบ ปลายใบแหลม เห็นเส้นใบย่อยเห็นชัด และมีขนนุ่มหนาแน่นบนผิวใบทั้งสองด้าน ก้านใบยาว 1-1.5 เซนติเมตร ช่อดอกแบบกระจะ ดอกสีขาวชมพู ม่วงเข้มหรือเกือบดำ ออกเป็นช่อตามซอกใบและตามกิ่งก้าน ยาว 7-10 เซนติเมตร พบตามป่าเต็งรัง ป่าเบญจพรรณ ป่าดิบแล้ง ออกดอกตลอดปี

สรรพคุณ

ในแง่ยาสมุนไพรพื้นบ้านจังหวัดอุบลราชธานี ใช้ ราก เข้ายากับน้ำมะนาว ฝนกับน้ำดื่ม แก้ผิดสำแดง พิษแมงมุม ทำให้อาเจียน ถอนพิษเบื่อเมา เหง้า ฝนทา แก้สิว ฝ้าและฟกช้ำ เคล็ดบวม ราก ผสมกับพญาไฟและปลาไหลเผือก ฝนน้ำดื่มถอนเมาเหล้า หากยาพื้นบ้านใช้ ราก ผสมกับเมล็ดหมาก ฝนน้ำกินและผสมกับน้ำมะนาว ทาแผลแก้พิษงูชนิดที่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท ซึ่งควรมีการวิจัยเพิ่มเติม ต้มน้ำดื่ม หรือฝนรับประทาน ทำให้อาเจียนอย่างหนัก ใช้ถอนพิษคนกินยาเบื่อยาเมา หรือฝนน้ำกินช่วยให้เลิกดื่มเหล้า (ระวีวรรณ, 2556)

ส่วนตำรายาไทยใช้ ราก มีรสร้อน ฝนน้ำกินทำให้อาเจียน เพื่อถอนพิษคนกินยาเบื่อ เมาพิษเห็ดและหอย แก้พิษงู แก้เสมหะเป็นพิษ (เสมหะหรืออุจจาระเป็นมูกเลือด) แก้หืด แก้วัณโรค เป็นยาระบาย ฝนเกลื่อนฝี หรือดูดหนองถ้าฝีแตก แก้ฟกช้ำ เคล็ดบวม แก้ปวดฝี คุมกำเนิด ต้มดื่ม แก้วัณโรค ฝนกับน้ำมะนาว หรือสุรา รับประทานแก้พิษงู ฝนทาแก้ฟกช้ำ เคล็ดขัดยอก

สำหรับวิธีการใช้ยา ให้นำรากโลดทะนงแดงมาฝนกับหมากแห้งใช้น้ำสะอาดเป็นกระสายยา ฝนจนกระทั่งน้ำเป็นสีขุ่น ใช้ประมาณ 1 แก้ว ให้ผู้ป่วยดื่มยา รอสัก 3-5 นาที คนไข้จะอาเจียนออกมา 30 นาที หลังจากนั้นให้ดื่มยาซ้ำอีก ขณะเดียวกันทำยาปิดปากแผลที่งูกัด โดยมีมะนาวบีบมะนาวเป็นกระสายยา นำรากโลดทะนงแดงและหมากแห้งมาฝนปิดบริเวณปากแผลที่งูกัด ทำซ้ำทุก 2 ชั่วโมง ส่วนกรณีมีรอยไหม้ แผลเน่า ให้ใช้ว่านอึ่งทุบปิดแผล หากใช้ในเด็กต้องลดปริมาณตามขนาด

สารสำคัญของโลดทะนง

พบสารประกอบทางเคมีในสารสกัดจากรากต้นโลดทะนง (แดง) ที่สำคัญ 5 ชนิด ได้แก่ Rediocidee A Rediocidee B Rediocidee C (+)-Syringaresinol และ Scopoletin (ระวีวรรณ, 2556) และนอกจากนั้นยังสารสำคัญกลุ่ม Novel Falvonoidas Indole Alkaloid ซึ่งประกอบไปด้วย Afzelechib - (4α8) - Afzelechin, Trigonostemone, Phenantherenone, Lotthanongine, Daphane

Ditherpenoid (Redioside A) Daphnane Ditetpenes (Rediocides B-F และ Redioside G) (Tempeam, et al., 2002; 2005) พบสารประกอบสำคัญทางเคมีจากรากโลดทะนง (ขาว) 5 ชนิด คือ Rediocide B Rediocide C (+)-Syringaresinol และ Coumarin Tomentin (สุภาวดี, 2556)

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ในพืช

เป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจสอบระดับความแตกต่างของจีโนมของสิ่งมีชีวิตได้อย่างรวดเร็วและครอบคลุมได้อย่างกว้างขวาง โดยใช้เทคนิคต่างๆ ทางชีวโมเลกุล เนื่องจากดีเอ็นเอเป็นสายพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต ซึ่งมีความจำเพาะสำหรับสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจึงเป็นลักษณะเฉพาะในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ซึ่งสามารถบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ได้เป็นอย่างดีและไม่เปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อม ลายพิมพ์ดีเอ็นเอพืชสามารถทำได้หลายวิธีโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดต่างๆ ตัวอย่างเช่น RFLP (Restriction Fragment Polymorphism) RAPD (Random –Amplified Polymorphic DNA) (William, et al., 1990) AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Vos, et al., 1995) SSR (Simple Sequence Repeat Microsatellite) (Powell, et al., 1996) SNP (Single Nucleotide Polymorphism) (ฐิติกาและภูวดล, 2556)

ประโยชน์ของการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอในพืช

1. เพื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular Marker) ในการจำแนกพันธุ์พืช (Plant Identification and Plant Taxonomy) โดยใช้ความแตกต่างในระดับชีวโมเลกุลของพืชซึ่งไม่สามารถแยกความแตกต่างได้โดยลักษณะของพืชภายนอก (Phenotype)

2. เพื่อใช้นำข้อมูลไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชในอนาคตได้ โดยสามารถช่วยในการตรวจสอบ Linkage ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่ศึกษากับลักษณะที่เป็นประโยชน์ต่อพันธุ์พืช เช่น ต่านทานโรคแมลง ฯลฯ เพื่อช่วยในการคัดเลือกและทำแผนที่ยีนบนโครโมโซม

3. ช่วยในการตรวจสอบ Somaclonal Variation ว่ามีการกลายพันธุ์ในระดับชีวโมเลกุลหรือไม่ ในกรณีที่มีการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สามารถใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ต้องการได้เร็วยิ่งขึ้น โดยไม่ต้องรอให้มีผลผลิตในการแปลงหรือแหล่งปลูก

4. เพื่อใช้เป็นข้อมูลที่เชื่อถือได้ในการจำสิทธิบัตรรับรองพันธุ์ นอกเหนือไปจากลักษณะภายนอก

เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular Marker)

ความหมายโดยทั่วไปของคำว่า “เครื่องหมาย” คือสิ่งที่ใช้บอกความแตกต่างระหว่างสิ่ง 2 สิ่ง ซึ่งสามารถนำมาใช้กับสิ่งมีชีวิตได้เช่นกัน สำหรับเครื่องหมายโมเลกุลเป็นสิ่งที่บอกความแตกต่างในสิ่งมีชีวิตซึ่งสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้

ความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic Diversity) หรือความแปรปรวนทางพันธุกรรม (Genetic Variation) เป็นที่มาของเครื่องหมายทางพันธุกรรม (Genetic Marker) ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ที่ระดับทางสัณฐานวิทยา (Morphological Marker) ระดับชีวเคมี (Biochemical Marker) และระดับโมเลกุล (Molecular Marker หรือ DNA Marker) (อรรัตน์, 2548)

1. Morphological Marker เป็นเครื่องหมายที่สามารถมองเห็นและระบุความแตกต่างได้ทันที ซึ่งก็คือลักษณะภายนอกที่แตกต่างกันของสิ่งมีชีวิตนั่นเอง เช่น ลักษณะสีตาหรือสีผมในมนุษย์ ลักษณะสีกลีบดอกไม้ เป็นต้น

2. Biochemical Marker เป็นเครื่องหมายที่สร้างขึ้นจากการศึกษาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในสิ่งมีชีวิต ได้แก่ เอนไซม์ต่างๆ วิธีการศึกษาเอนไซม์ ค่อนข้างง่ายและจัดว่าไม่แพง แต่ Marker ชนิดนี้มีข้อจำกัดที่การแสดงออกของเอนไซม์ได้รับผลกระทบโดยตรงจากสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงและระยะการเจริญเติบโตของพืช เช่นเดียวกับ Morphological Marker นอกจากนี้ยังมีข้อจำกัดในเรื่องความจำเพาะเจาะจงต่ำ กล่าวคือ ถ้ายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์นั้นมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสไปเล็กน้อย ซึ่งอาจมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของชนิดกรดอะมิโนหรืออาจไม่มีก็ตาม การเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสเพียงเล็กน้อยนี้ไม่สามารถตรวจสอบได้

3. Molecular Marker เป็นเครื่องหมายที่สร้างมาจากชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ ดังนั้นในความหมายเดียวกัน Marker ชนิดนี้จึงถูกเรียกว่า DNA Marker ด้วย ในทางตรงข้ามกับ Marker ที่กล่าวมาแล้วทั้งสองชนิด Molecular Marker มีข้อได้เปรียบตรงที่มีจำนวนมากมายมหาศาลและสภาพแวดล้อมและระยะการเจริญเติบโตของพืชไม่มีอิทธิพลต่อการแสดงออกของ Marker ชนิดนี้

ประเภทของเครื่องหมายโมเลกุล

เครื่องหมายโมเลกุลถูกแบ่งเป็น 2 ประเภท ได้แก่ Hybridization-Base Marker และ PCR-Based Marker

1. Hybridization-Base Marker ต้องอาศัยเทคนิค DNA Hybridization ที่รู้จักกันดี คือ Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

2. PCR-Based Marker อาศัยเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยปฏิกิริยา

ลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) นับเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์มากในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขึ้นส่วนที่ต้องการ ทั้งนี้ต้องอาศัยความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ ไพรเมอร์ที่ใช้ในงาน PCR มีมากมาย สามารถแบ่งได้เป็น 3 ประเภทตามระดับความจำเพาะเจาะจง ได้แก่

2.1 Random Primers เป็นไพรเมอร์ที่มีขนาดสั้น ที่นิยมใช้มีความยาว 10 Nucleotide เทคนิค Marker ที่ใช้ Random Primers ได้แก่ RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

2.2 Semi-Specific Primers เป็นไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอเป้าหมายมากขึ้น เช่น ต้องการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนที่เป็น Microsatellite แต่ไม่เจาะจงชัดเจนว่าเป็นตำแหน่งใด ไพรเมอร์ประเภทนี้ ได้แก่ ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) โดยใช้ Microsatellite ที่มีความยาวประมาณ 15-18 Nucleotide เป็น Singer Primer เช่น $(ATG)_6$ หรือ $(GA)_8A$ หรือ $(GGAGA)_3$ ผลที่ได้จากการใช้ ISSR Primer จึงเห็นแถบดีเอ็นเอที่ได้จาก PCR มีหลายแถบเช่นเดียวกับ RAPD

2.3 Specific Primers เป็นไพรเมอร์ที่ถูกสร้างขึ้นให้จับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย ณ ตำแหน่งที่ต้องการ เช่น ยีนที่สนใจ หรือเป็นตำแหน่ง Microsatellite ที่เจาะจง ดังนั้นจึงจำเป็นที่ต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายก่อน แล้วจึงสร้างไพรเมอร์ให้ Complementary กับดีเอ็นเอเป้าหมายทั้งสองสาย ทำให้ต้องใช้ไพรเมอร์เป็นคู่

เทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain rEaction: PCR)

เป็นเทคนิคที่ถูกค้นพบโดย Kary Mullis ในปี ค.ศ. 1983 นำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอเป้าหมายให้มีปริมาณที่สูงขึ้นเป็นทวีคูณ โดยเลียนแบบจากขบวนการจำลองดีเอ็นเอ (DNA Replication) (นุจรีย์, 2550) โดยปฏิกิริยา PCR ใช้ Enzyme DNA Polymerase และ DNA สังเคราะห์ชิ้นสั้นๆ (10-24 Nucleotide) เรียกว่า Primer เพื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณที่ต้องการ (อรรัตน์, 2548) ซึ่งในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสนี้ จำเป็นต้องทำให้สายพันธุกรรมที่เป็นสายคู่ในธรรมชาติเสียสภาพกลายเป็นสายเดี่ยว ด้วยความร้อนที่ได้รับในขั้นตอนการทำ PCR ซึ่งจะเปิดโอกาสให้ชิ้นไพรเมอร์ (Primer) ที่มีนิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีเบสคู่สมกับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอต้นแบบนั้น เข้ากับและเกิดปฏิกิริยา ได้เป็นดีเอ็นเอสายใหม่ และจะมีการทำขั้นตอนต่างๆ นี้ซ้ำกันในหลายๆ รอบปฏิกิริยา ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการในปริมาณที่มาก

ขั้นตอนการใช้ความร้อนในการคลายเกลียวของดีเอ็นเอต้นแบบ (Denaturation) เป็นสายเดี่ยว ตามด้วยการลดความร้อนในอุณหภูมิต่างๆ ที่เหมาะสม เพื่อการเข้าจับของไพรเมอร์ (Annealing) บนดีเอ็นเอต้นแบบ และมีการต่อเพิ่มของสายดีเอ็นเอ ด้วยการใช้เอนไซม์โพรีเมอเรส ทำให้ได้ดีเอ็นเอคู่ผสมกับสายต้นแบบเป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่มีความยาวและขนาดตามต้องการ

(Extension) ซึ่งปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มมากขึ้นจะมีมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับจำนวนรอบของปฏิกิริยา และความสามารถในการเข้าจับกับสายดีเอ็นเอต้นแบบของไพรเมอร์ (Newton, 1995)

ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยสาร ดังนี้

1. DNA แม่แบบหรือ DNA แม่พิมพ์ (DNA Template) ที่ทราบลำดับเบสแล้ว

2. DNA สายเริ่มต้นขนาดสั้นๆ เรียกว่า ไพรเมอร์ (Primer)

3. Deoxynucleotide Triphosphate (dNTPs) ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ อะดีนิน (Adenine, A) กัวนีน (Guanine, G) ไซโตซีน (Cytosine, C) และไธมีน (Thymine, T)

4. เอนไซม์ DNA โพลีเมอเรส (DNA Polymerase) ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ DNA สายใหม่ เอนไซม์นี้มีหลายชนิด ที่นิยมใช้กันทั่วไปเป็นเอนไซม์ที่สกัดได้จากแบคทีเรียชื่อ เทอร์มัส อาควอติคัส (Thermus Aquaticus) จึงเรียกเอนไซม์นี้ว่า Taq DNA Polymerase แบคทีเรียชนิดนี้อาศัยอยู่ในน้ำพุร้อน มีคุณสมบัติทนต่ออุณหภูมิสูงได้ถึง 95 °C และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ ประมาณ 72 °C

5. แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) เป็นสารเร่งปฏิกิริยาเอนไซม์ DNA Polymerase

6. บัฟเฟอร์ (Buffer) เป็นสารที่ทำให้สภาพของสารในหลอดทดลองมีสภาวะความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา

7. น้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ซึ่งใช้ผสมสารตั้งต้นดังกล่าวทั้งหมด

โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยการนำส่วนผสมดังกล่าวข้างต้นมาเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณ DNA อัตโนมัติ ซึ่งเป็นเครื่องที่สามารถเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิสูง-ต่ำ ได้อย่างรวดเร็ว รวมทั้งกำหนดจำนวนรอบและเวลาสำหรับทำปฏิกิริยาในแต่ละขั้นตอนได้อย่างอัตโนมัติ มีการแบ่งระดับการควบคุมอุณหภูมิเป็นรอบๆ โดยแต่ละรอบประกอบไปด้วยขั้นตอน 3 ขั้นตอนหลัก ดังต่อไปนี้

1. การแยกสาย DNA แม่แบบ (Denaturation) โดยใช้อุณหภูมิสูง 90-95 °C เป็นเวลาประมาณ 30-60 วินาที เพื่อให้ DNA คลายเกลียวคู่ออกจากกันเป็นสายเดี่ยวและทำหน้าที่เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ DNA

2. การจับของสายไพรเมอร์ (Primer Annealing) โดยใช้อุณหภูมิ 60-65 °C เป็นเวลาประมาณ 30-60 วินาที เพื่อให้ไพรเมอร์เข้าจับกับ DNA แม่แบบในบริเวณที่ลำดับเบสเข้าคู่กัน

3. การสังเคราะห์ DNA สายใหม่โดยการต่อสายไพรเมอร์ (Primer Extension) โดยใช้อุณหภูมิ 70-75°C เป็นเวลาประมาณ 30-120 วินาที ขึ้นอยู่กับความยาวของ DNA ที่ต้องการเพิ่มจำนวน ขั้นตอนนี้เอนไซม์ DNA Polymerase จะทำหน้าที่นำเบส (A, T, C, G) ที่เข้าคู่กับ DNA แม่แบบมาต่อเข้าที่ปลายของสายไพรเมอร์ทั้งสองเพื่อให้ได้ DNA สายใหม่

ปฏิกิริยา PCR จะเกิดขึ้นซ้ำๆ ประมาณ 25-40 รอบ โดยสาย DNA ที่สังเคราะห์ขึ้นในแต่ละรอบจะถูกใช้เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ DNA สายใหม่ในรอบต่อๆ ไปจนสิ้นสุดปฏิกิริยา ดังนั้น ผลผลิต DNA ที่ได้จึงเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ เรียกการเพิ่มจำนวนแบบนี้ว่า Exponential Amplification ซึ่งคำนวณได้เท่ากับ 2^n (n คือจำนวนรอบที่ปฏิกิริยา) เช่น ถ้าทำปฏิกิริยา 35 รอบ จะมีการสังเคราะห์ DNA เพิ่มขึ้นเป็น 2^{35} หรือประมาณ 34 พันล้านเท่าของปริมาณ DNA เริ่มต้น ปฏิกิริยาทั้งหมดใช้เวลาเพียง 2-3 ชั่วโมง

อิเล็กโตรโฟรีซีส (Electrophoresis)

อิเล็กโตรโฟรีซีส (Electrophoresis) หมายถึง การเคลื่อนย้ายอนุภาคที่อยู่ในสารละลายด้วยกระแสไฟฟ้าโดยอาศัยคุณสมบัติของอนุภาคที่มีประจุไฟฟ้าบวกหรือลบ ซึ่งจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วลบหรือขั้วบวกในสนามไฟฟ้าด้วยอัตราการเคลื่อนที่และทิศทางต่างกันไปตามแต่ละชนิดของประจุบนอนุภาคนั้นๆ การเคลื่อนที่ของอนุภาคด้วยอัตราความเร็วที่ต่างกันนี้ ช่วยในการจำแนกโมเลกุลต่างๆ ออกจากกันได้และสามารถบ่งบอกถึงชนิด รูปร่าง ขนาดและน้ำหนักโมเลกุลของสารได้ รวมทั้งบอกถึงชนิดของประจุการเปลี่ยนแปลงประจุของอนุมูลต่างๆ ในโมเลกุลได้ (พิสสาวรรณ, 2531)

Gel Electrophoresis

เป็นอิเล็กโตรโฟรีซีส ชนิด Zone Electrophoresis โดยใช้สารตัวกลางจำพวกเจลที่เป็นสารกึ่งแข็ง เช่น แป้ง (Starch) อะกาโรส (Agarose) หรือ โพลีอะคริละไมด์ (Polyacrylamide) การแยกของโมเลกุลจะอาศัยสภาพของเนื้อเจลและขนาดช่อง (Pore Size)

อิเล็คโตรโฟรีซีสแบบเจลอะกาโรส (Agarose Gel Electrophoresis)

เป็นวิธีแยกโมเลกุลของดีเอ็นเอโดยอาศัยความแตกต่างของประจุ ขนาดและรูปร่างของดีเอ็นเอบนตัวกลางที่เป็นอะกาโรส ซึ่งเป็นสารโพลีเมอร์สายตรงที่เป็นอนุพันธ์ของโพลีแซคคาไรด์ที่เป็นวุ้น (Agar) โดยเฉพาะในสกุล Gelidium sp. หรือสังเคราะห์ขึ้นโดยตรง ประกอบด้วย D-galactose และ 3,6-anhydro-L-galactose ที่เชื่อมโยงกันด้วยพันธะ Glycosidic อะกาโรสบริสุทธิ์อยู่ในรูปผงละเอียดละลายได้ดีในน้ำเดือด เมื่อละลายดีแล้วนำไปใช้ในขณะร้อนประมาณ 55 องศาเซลเซียส โดยเทลงในถาดรองรับ เมื่ออะกาโรสเย็นและแข็งตัวเนื่องจากการโพลีเมอไรด์เซชันโมเลกุลของอะกาโรสมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจน จนมีสภาพกึ่งแข็งคล้ายเจล โดยมีคุณสมบัติยอมให้สารเคลื่อนที่ผ่านไปได้ง่ายกว่าสารที่มีขนาดใหญ่กว่าและอะกาโรสที่ใช้ในห้องปฏิบัติการมีความบริสุทธิ์สูงกว่าอะกาโรสที่มีจำหน่ายอยู่ทั่วไปตามท้องตลาด (ฤทธิ์, 2553)

อะกาโรสมีความสามารถในการแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลประมาณ 100-50,000 คู่เบส (สุรินทร์, 2545)

อิเล็คโตรโฟริซีสแบบเจลโพลีอะคริละไมด์ (Polyacrylamide Gel Electrophoresis: PAGE)

เป็นเทคนิคที่ปกติจะใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณและขนาด การแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็ก (ประมาณ 50-100 bp) โดยเจลเกิดจากปฏิกิริยาโพลีเมอร์ไรเซชัน (polymerization reaction) ของอะคริละไมด์มอนอเมอร์ (Monoacrylamide) และบิสอะคริละไมด์ (Bis-Acrylamide) ไปเป็นสายยาวของโพลีอะคริลาไมด์ (ฤทธิ์, 2553) และในการเตรียมเจลอะคริลาไมด์จะต้องตรียมระหว่างกระจกสองแผ่น ที่คั่นไว้ด้วยแผ่นพลาสติก 2 ชิ้น ด้านข้างที่เรียกว่า “Spacer” มีความหนาประมาณ 0.3-0.4 มิลลิเมตร ทำให้เจลที่ได้บางมากจึงทำให้อ่านแถบดีเอ็นเอได้ชัดเจน

ไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellite)

ไมโครแซทเทลไลท์ เป็นกลุ่มดีเอ็นเอที่มีเบสซ้ำ (Repetitive DNA) พบมากในจีโนมของสิ่งมีชีวิตขั้นสูง ความผันแปรของจำนวนเบสซ้ำในจีโนมของสิ่งมีชีวิต สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ดีโดยที่โพลีมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นนั้นเป็นผลเนื่องมาจากจำนวนครั้งของเบสซ้ำของไมโครแซทเทลไลท์ในโลกัสหนึ่งๆ

ไมโครแซทเทลไลท์มีชื่อเรียกแตกต่างกันไป เช่น Simple Sequence Repeats (SSR),Simple Sequence Length Polymorphisms (SSLP) และ Sequence-Tagged Microsatellite Site (STMS) เป็นต้น

ไมโครแซทเทลไลท์ คือ บริเวณของเส้นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำเป็นยูนิตจำนวน 2-6 เบส เช่น $(AG)_n$, $(GCT)_n$, $(ATGC)_n$, $(CAGGC)_n$ เป็นต้น (Tautz, et al., 1986, Morgante, et al., 2002) โดยที่ n เป็นจำนวนซ้ำตั้งแต่ 3 ซ้ำไปจนถึงหลายสิบซ้ำ โดยการเรียงตัวของลำดับเบสซ้ำนี้อาจเกิดจากการแทรก หรือการแทนที่ของลำดับเบสที่ไม่ใช่ลำดับเบสซ้ำ แล้วทำให้เกิดลำดับเบสซ้ำเรียงตัวกัน ซึ่งอาจจะเกิดจากการทำงานที่ผิดพลาดของเอนไซม์ DNA Polymerase ในบริเวณลำดับเบสซ้ำระหว่างกระบวนการจำลองดีเอ็นเอ ที่เรียกว่า DNA Replication (Levinson, et al., 1987) เกิดจาก Retrotransposition (Nadir, et al., 1996) หรือ Unequal Crossing Over (Richard & Paques, 2000) ไมโครแซทเทลไลท์จะกระจายอยู่ทั่วทั้งจีโนม โดยปกติพบในพืชทุกๆ 29 kb ถึง 50 kb (Morgante & Olivieri, 1993, Wang, et al., 1994) และไมโครแซทเทลไลท์แบบซ้ำที่มีสองเบส (Dinucleotide Repeat) จะพบได้บ่อยครั้งที่สุด (Varshney, et al., 2000) ในพืช Dinucleotide Repeat แบบ AT, GA และ GT พบมากที่สุด (Gupta, et al., 2000, Morgante, et al., 2002) ในขณะที่ Trinucleotide Repeat

แบบ AAG และ AAT Motifs พบมากที่สุด (Morgante & Olivieri, et al., 1993, Gupta, et al., 1996). นอกจากนี้จำนวนซ้ำของไมโครแซทเทลไลท์ที่ตำแหน่งเดียวกันของจีโนมนั้นทำให้เกิดความแตกต่าง (Polymorphism) ระหว่างจีโนไทป์ (Lagercrantz, et al., 1993) ซึ่งสามารถตรวจได้ด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไมโครแซทเทลไลท์นั้นอยู่ ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยอาศัยไพรเมอร์ชนิดไมโครแซทเทลไลท์ ที่ออกแบบจากบริเวณที่ครอบคลุมบริเวณส่วนหัวและท้ายของไมโครแซทเทลไลท์ ดังนั้นไพรเมอร์แต่ละคู่จะสามารถตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ในตำแหน่งที่จำเพาะ (Locus-Specific Marker)

จากลักษณะเฉพาะนี้สามารถนำมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลได้ โดยการออกแบบไพร์เมอร์ที่สามารถเข้าคู่กับเบสจำเพาะเหล่านี้ได้ ซึ่งเรียกว่า “ไมโครแซทเทลไลท์ไพร์เมอร์หรือเอสเอสอาร์-ไพร์เมอร์” ไพร์เมอร์เหล่านี้ จะใช้เป็นจำเริ่มต้นของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของส่วนที่เบสซ้ำต่อเนื่องที่อยู่ระหว่าง Unique Sequence ความหลากหลายของชิ้นดีเอ็นเอขนาดต่างๆ ซึ่งเป็นผลมาจากจำนวนครั้งของเบสซ้ำที่ไม่เท่ากันนี้ ใช้บ่งบอกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตได้ (Morgante & Oliveieri, 1993)

เอกลักษณ์และคุณสมบัติเด่น เฉพาะตัวที่ทำให้ไมโครแซทเทลไลท์กลายเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ดีที่สุดตัวหนึ่งในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ คือ

1. ลักษณะที่มีหลายอัลลีลในโลกัส (Multi-Allelic Nature) ทำให้ตรวจสอบความแตกต่างได้มากกว่า (High Informative Content) ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลอื่น โดยจะตรวจสอบความแตกต่างในระดับตำแหน่ง หรือ Locus

2. มีการถ่ายทอดลักษณะที่เป็นแบบข่มไม่สมบูรณ์ (Co-Dominant Transmission)

3. สามารถตรวจสอบได้ง่ายโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์และต้องการดีเอ็นเอที่ใช้ตรวจสอบเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (small amount of starting DNA)

4. พบได้มากมายและครอบคลุมทั้งจีโนม (High Abundant with Uniform Genome Coverage) โดยจะพบภายในยีนหรือระหว่างยีน

5. ไพร์เมอร์ที่สร้างขึ้นมาสำหรับพืชหนึ่งๆ นั้น มีความจำเพาะเจาะจงและสามารถแลกเปลี่ยนข้อมูลลำดับเบสของ ไมโครแซทเทลไลท์ไพร์เมอร์ระหว่างห้องปฏิบัติการที่ร่วมวิจัยได้สะดวก (Electronically Exchangeable Primer Sequences)

จากจุดเด่นดังกล่าว ทำให้มีผู้นิยมใช้ ไมโครแซทเทลไลท์ในการจำแนกสายพันธุ์พืชที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะพืชที่มีฐานพันธุกรรมแคบ จากการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมพบว่า ไมโครแซทเทลไลท์สามารถแยกความแตกต่าง (Polymorphisms) ของสิ่งมีชีวิตได้ดีกว่าการใช้เทคนิคอื่นๆ ทั้งนี้ เนื่องมาจากจำนวนและความถี่

ของอัลลีลที่ตรวจพบในตำแหน่ง (Logus) หนึ่งๆ นั่นเอง ถึงแม้ไมโครแซทเทลไลท์จะเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ข้อมูลทางพันธุกรรมได้มากมายแต่พบว่ามีข้อจำกัดที่สำคัญ คือ การพัฒนาหรือสร้างไมโครแซทเทลไลท์ไพร์เมอร์นั้น มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง ซึ่งจะเป็นอุปสรรคสำหรับพืชที่ไม่เคยมีข้อมูลลำดับเบสใน GENBANK มาก่อน นอกจากนี้แล้ว ปัญหาทางด้านเทคนิคที่พบอยู่บ่อย คือ การวิเคราะห์ผลค่อนข้างยากโดยเฉพาะในกรณีที่ต้องการรู้ขนาดอัลลีลที่แน่นอน ทั้งนี้เนื่องมาจากการเกิด “Stutter Band” ทำให้การอ่านแถบดีเอ็นเอผิดพลาดได้ (วรัญญา, 2554)

การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellite marker development)

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ หรือเครื่องหมาย SSR (SSR Marker) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบจำเพาะ ตรวจสอบดีเอ็นเอได้ครั้งละ 1 ตำแหน่ง (Single-Locus Marker) จากการที่ทราบว่าลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลท์ พบได้มากมาย กระจายตัวอยู่ทั่วจีโนม โดยลำดับเบสที่อยู่สองข้างของส่วนไมโครแซทเทลไลท์ มักเป็นลำดับเบสจำเพาะและเนื่องจากส่วนไมโครแซทเทลไลท์ เป็นส่วนที่มีการกลายพันธุ์โดยการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของจำนวนชุดซ้ำได้ง่าย การตรวจสอบดีเอ็นเอโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่งที่รวมเอาส่วนไมโครแซทเทลไลท์ไว้ภายใน จึงมีโอกาสได้ขนาดดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน เนื่องจากจำนวนชุดซ้ำที่ไม่เท่ากัน การตรวจสอบด้วย เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จึงพบพอลิมอร์ฟิซึมค่อนข้างสูง นอกจากนี้ยังแสดงแถบดีเอ็นเอแบบข่มร่วมกัน (Codominance) จึงสามารถแยกความแตกต่างระหว่างไฮโมไซโกตและเฮเทอโรไซโกตได้ ข้อเสียของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้ คือ ต้องทราบลำดับเบสที่อยู่ข้างเคียงตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ คือ ต้องมีข้อมูลลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จึงยุ่งยากและมีค่าใช้จ่ายสูง

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่นิยมใช้ในปัจจุบัน เป็นการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ชนิดใดชนิดหนึ่งที่ตำแหน่งจำเพาะ ครั้งละ 1 ตำแหน่ง (Single-Locus Marker) โดยเทคนิคพีซีอาร์ จึงต้องใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับลำดับเบสที่อยู่ขนาบข้างของไมโครแซทเทลไลท์ (Flanking DNA) ที่ตำแหน่งดังกล่าว และจำเป็นต้องมีข้อมูลลำดับเบสที่ต้องการ ดังนั้นจึงต้องพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์สำหรับสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษาก่อน (สุรินทร์, 2545) วิธีการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ แบบดั้งเดิมนั้น จะใช้เทคนิคทางด้านพันธุศาสตร์โมเลกุล เตรียมห้องสมุดจีโนม (Genome Library) โดยการตัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (Genomic DNA) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction Enzyme) แล้วเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวกับดีเอ็นเอพาหะ (DNA Vector) ถ่ายเข้าสู่แบคทีเรียเพื่อเพิ่มจำนวน จากนั้นคัดเลือกโคลนโดยการไฮบริไดซ์กับโพรบที่เป็นไมโครแซทเทลไลท์ (SSR Probe) แล้วแยกดีเอ็นเอออกจากแบคทีเรียเพื่อหาลำดับเบสที่อยู่ขนาบ

ข้างกับไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ และออกแบบไพรเมอร์ ซึ่งเป็นวิธีการที่ยุ่งยากและใช้เวลานาน (He, et al., 2003) ในปัจจุบันการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์นิยมใช้วิธี Enrichment โดยการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอร่วมกับการไฮบริไดเซชันชิ้นดีเอ็นเอกับโพรบที่เป็นไมโครแซทเทลไลท์ที่ติดปลายด้วยไบโอติน (Biotin) และแยกชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการด้วย Magnetic Bead ที่หุ้มด้วย Streptavidin ซึ่งหลังจากกำจัดดีเอ็นเอส่วนเกินออกไปแล้วจะมีชิ้นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลท์ 50-90 เปอร์เซ็นต์ ก่อนจะเชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะต่อไป (Butcher, et al., 2000) วิธีการ Enrichment นี้มีประสิทธิภาพสูง และการใช้เวลาในการพัฒนาน้อยกว่าวิธีดั้งเดิม (Billotte, et al., 2001) จากข้อดีของวิธี Enrichment จึงมีผู้ใช้วิธีนี้พัฒนาการหาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์เพื่อตรวจสอบสิ่งมีชีวิตกันอย่างกว้างขวาง อาทิเช่น การพัฒนาเครื่องหมาย SSR ของเมลอน โดยทำการโคลนลำดับเบสของไมโครแซลเทลไลท์ได้มากถึง 700 โคลน จาก Tsp-AG/TG Microsatellite Enriched Library และสามารถสร้างไพรเมอร์ได้ถึง 144 ไพรเมอร์ ในจำนวนนี้สามารถคัดเลือกไพรเมอร์ที่มีประสิทธิภาพได้ 67 ไพรเมอร์ ซึ่งถูกนำมาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับการจำแนกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในเมลอน (Ritschell, et al., 2004) สำหรับในกล้วยไม้ Dendrobium มีรายงานการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอด้วยวิธี Enrichment เช่นเดียวกัน และประสบความสำเร็จเป็นอย่างดี โดยสามารถสร้างเครื่องหมาย SSR ได้จำนวน 8 เครื่องหมาย (Boonsrangsom, et al., 2008) การพัฒนาเครื่องหมาย SSR จำนวน 4 เครื่องหมาย ในกล้วยไม้ Gymnadeniaconopsea (L.) R. Brown (Campbell, et al., 2002) การพัฒนาเครื่องหมาย SSR จำนวน 8 เครื่องหมายในกล้วยไม้ Ophrys fusca (Cotrim, et al., 2008)

ในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์นั้นโดยทั่วไปจะประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

1. การสร้าง Insert Genomic Libraries ซึ่งเริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอ ตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และสร้างห้องสมุดของดีเอ็นเอเหล่านั้นขึ้น

2. การคัดเลือกโคลนที่ต้องการ โดยมีไมโครแซทเทลไลท์หรือดีเอ็นเอแบสซ้ำต่อเนื่องที่ต้องการ) โดยใช้วิธี Colony Hhybridization (Library Screening by Hybridization)

3. การหาลำดับเบสของโคลนที่คัดเลือก (DNA Sequencing of Positive Clones)

4. การออกแบบไพร์เมอร์ (Primer Design and Locus Specific PCR Analysis)

5. การตรวจสอบหรือบ่งชี้ความแตกต่างของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ (Identification of Polymorphisms)

การวิเคราะห์การจัดกลุ่ม (Cluster Analysis)

เป็นวิธีการทางคณิตศาสตร์ที่ใช้ในการจำแนกหรือแบ่งข้อมูลหรือตัวอย่างที่ศึกษาออกเป็นกลุ่มย่อย ตั้งแต่ 2 กลุ่มขึ้นไป กลุ่มที่แบ่งออกจะแสดงให้เห็นว่าข้อมูลหรือตัวอย่างที่อยู่กลุ่มเดียวกันจะมีลักษณะคล้ายกันหรือมีความสัมพันธ์กันมาก ส่วนข้อมูลหรือตัวอย่างที่อยู่ต่างกลุ่มกันจะมีลักษณะที่ต่างกันหรือมีความสัมพันธ์กันน้อยหรือไม่มีความสัมพันธ์กันเลย ดังนั้นการพิจารณาเลือกลักษณะหรือตัวแปรที่จะมาใช้ในการแบ่งกลุ่มจึงมีความสำคัญมาก

งานวิจัยที่จำเป็นต้องมีการจัดกลุ่มข้อมูลหรือตัวอย่างที่ศึกษาจะนิยมใช้ตัวแปรเป็น Molecular Marker เป็นส่วนใหญ่ เช่น การใช้เทคนิค RAPD (Random-Amplified Polymorphic DNA) หรือ AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) เพื่อให้ได้ข้อมูลที่เป็นการปรากฏหรือไม่ปรากฏของแถบ DNA (DNA Banding) หรือข้อมูลที่เป็นลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA Sequencing) นอกจากนี้ตัวแปรชนิดอื่นก็สามารถนำมาใช้ในการจำแนกหรือแบ่งกลุ่มข้อมูลหรือตัวอย่างได้เช่นกัน เช่น ข้อมูลความถี่ของยีน (Gene Frequency) ที่ศึกษาในตัวอย่าง หรือข้อมูลของลักษณะที่แสดงออกมา (Phenotype) เช่น ผลผลิต ความสูง จำนวนผล การเกิดโรค เป็นต้น

วิธีในการจัดกลุ่มข้อมูลหรือตัวอย่าง

1. Distance Function เป็นการคำนวณหาระยะห่างจากตัวอย่างที่ต้องการจัดกลุ่มไปยังค่ากลางของกลุ่ม (Group Centroid) ถ้าระยะห่างของตัวอย่างนั้นห่างจากค่ากลางของกลุ่มใดต่ำที่สุดก็จัดตัวอย่างนั้นให้อยู่ในกลุ่มนั้น

2. Maximum Likelihood หรือ Probability Methods เป็นการคำนวณหาความน่าจะเป็นหรือโอกาสที่ตัวอย่างหรือข้อมูลนั้นจะอยู่ในกลุ่มที่ i, i = 1, 2, …, k แล้วนำมาเปรียบเทียบกันซึ่งก็คือการหาค่า Probability (P) ที่ตัวอย่างอยู่ในกลุ่มที่ i เช่นถ้ามี 2 กลุ่ม ค่า P ของตัวอย่างในกลุ่มที่ 1 มากกว่าค่า P ของตัวอย่างเดียวกันในกลุ่มที่ 2 ก็จะจัดตัวอย่างนั้นอยู่ในกลุ่มที่ 1

3. Maximum Parsimony เป็นวิธีการทาง Phylogeny ที่เป็นการค้นหา Tree ที่สั้นที่สุด เป็นวิธีการเหมาะสำหรับข้อมูลที่เกี่ยวกับวิวัฒนาการ เช่น ข้อมูลลักษณะที่ถ่ายทอดจากบรรพบุรุษ ข้อมูลที่เห็นลำดับเบส (Gene Sequence)

วิธีทั้ง 3 นั้น การนำไปใช้ในการวิเคราะห์ผลการจัดกลุ่มข้อมูลจะแตกต่างกัน โดยการจัดกลุ่มและแสดงความสัมพันธ์ของตัวอย่างหรือสิ่งมีชีวิตที่เราศึกษานั้นเป็นการประเมิน (Estimate) ความสัมพันธ์หรือประวัติการวิวัฒนาการ (Evolutionary Relationship) ที่แสดงออกมาในรูป Phylogenetic tree หรือ Phylogram แบบต่างๆ นั้นมีแนวทางการศึกษา 2 แนวทางคือ Cladistic และ Similarity หรือ Distance

1. Cladistic การศึกษาที่เน้นถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ มีการอ้างอิงถึงบรรพบุรุษร่วม (Ancestor) ภาพที่ใช้ในการแสดงความสัมพันธ์นั้นจะเรียกว่า Cladogram ที่จะแสดงเป็น Tree ที่สั้นที่สุด คือเป็นภาพความสัมพันธ์ที่มีวิวัฒนาการหรือมีการกลายพันธ์ของลักษณะนั้นน้อยที่สุด

Phylogenetic Tree ที่ใช้แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตตามวิธีการ Cladistics มีหลายแบบคือ Cladogram,Venndogram, Dendrogram หรือ Unroot Tree วิธีการจัดกลุ่มที่ใช้ในการวิเคราะห์แบบนี้ คือ Maximum Parsimony และ Maximum Likelihood โดยข้อมูลที่นำมาใช้ในการจัดกลุ่มนั้นเป็นการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ลักษณะนั้นจะต้องเป็น Homologous Feartures หรือ Homology ที่เป็นลักษณะที่มีการถ่ายทอดมาจากบรรพบุรุษร่วมกัน (Common Ancestor) มาใช้ในการคำนวณ เช่น ลักษณะนิ้วเท้าของ กวาง อูฐ วัวและหมู เป็นลักษณะที่เรียกว่า Homologous เพราะว่าเป็นเป็นลักษณะที่ถ่ายทอดมาจาก Paleodont ที่เป็นบรรพบุรุษร่วมกันส่วนการที่สองสิ่งมีชีวิตหรือมากกว่านั้นมีลักษณะที่เหมือนกันที่เกิดจาก Convergent Evolution เป็นลักษณะที่ต้องหลีกเลี่ยงในการนำมาคำนวณ เนื่องจากเป็นลักษณะการวิวัฒนาการที่ไม่ได้เกี่ยวข้องกับบรรพบุรุษร่วม เช่น ลักษณะร่างกายของสัตว์น้ำที่เพียวนั้นไม่ได้เกิดจากการถ่ายทอดมาจากบรรพบุรุษร่วม ที่เรียกลักษณะนี้ว่า Analogous Feature หรือ Homoplasy

นอกจากนี้การใช้ลักษณะที่เป็นลำดับเบสของสารพันธุกรรม (DNA Sequence) ยังสามารถนำมาคำนวณการจัดกลุ่มของสิ่งมีชีวิตตามหลัก Cladistics ได้เนื่องจาก Nucleotide แต่ละตัวที่ประกอบเป็นสาย DNA นั้นเป็นการถ่ายทอดหรือจำลองมาจาก พ่อ-แม่ เรื่อยไปถึงบรรพบุรุษของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น จึงเข้าหลักการของ Cladistics

2. Similarity หรือ Distance เป็นการประเมินความสัมพันธ์กันของตัวอย่างหรือสิ่งมีชีวิตที่ศึกษาโดยอาศัยค่าความสัมพันธ์ (Correlation) และความน่าจะเป็น (Probability) ในการจัดกลุ่ม โดยใช้วิธีการจัดกลุ่มแบบ Distance Function ที่จะคำนวณความเหมือน (Similarity) หรือความต่าง (Distance) ของตัวอย่างหรือสิ่งมีชีวิตที่ศึกษา แล้วนำค่าที่ได้มาจัดกลุ่มตัวอย่างที่มีค่าความคล้ายกันน้อยหรือมีความต่างกันมากจะจัดให้อยู่ต่างกลุ่มกัน วิธีการนี้เป็นการบอกได้เพียงว่าสิ่งมีชีวิตที่ศึกษามีความคล้ายคลึงหรือแตกต่างกันมากน้อยเท่าไร โดยไม่สามารถอ้างอิงเป็นวิวัฒนาการได้เลย เนื่องจากลักษณะที่ใช้ในการจำแนกนั้นไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นลักษณะที่เป็น Homologous หรือ Homoplasy ได้

ข้อมูลที่ใช้ในการจัดกลุ่มแบบนี้สามารถใช้ข้อมูลที่เป็นลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ผลผลิตต่อพื้นที่ จำนวนรวงต่อพื้นที่ จำนวนเมล็ดต่อรวง น้ำหนัก 100 เมล็ด ความสูงต้น น้ำหนักแห้งของต้นหรือลักษณะการต้านทานต่อโรคหรือแมลง เป็นต้น และข้อมูลลักษณะการปรากฏหรือไม่ปรากฏของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิคต่างๆ เช่น RAPD, AFLP หรือ RFLP เป็นต้น ก็

สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ได้เช่นกัน การแสดงผลความสัมพันธ์ของตัวอย่างที่จัดกลุ่ม สามารถแสดงโดยภาพ Dendrogram ที่จะมีค่า Similarity หรือ Distance บอกถึงระดับความคล้าย หรือความต่างกันของแต่ละตัวอย่าง

ค่าที่ใช้ในการตรวจสอบ Dendrogram

1. Cophenetic correlation

เป็นค่าที่บอกถึงว่าการจัดกลุ่มที่ได้ดีเพียงใดซึ่งดูได้จากค่า Goodness of Fit โดยคำนวณหาค่า Cophenetic Correlation (r) โดย

r มีค่ามากกว่า 0.9 ถือว่า การจัดกลุ่มได้ดีมาก

r มีค่าอยู่ระหว่าง 0.8 – 0.9 ถือว่า การจัดกลุ่มได้ดี

r มีค่าอยู่ระหว่าง 0.7-0.8 ถือว่า การจัดกลุ่มได้ปานกลาง

r มีค่าน้อยกว่า 0.7 ถือว่า การจัดกลุ่มได้ไม่ดี

2. Bootstrap

เป็นค่าความน่าเชื่อถือของกลุ่มที่จัดนั้นมีมากน้อยเท่าไร โดยบอกเป็น เปอร์เซ็นต์ (%) ของโอกาสที่จะมีการจัดกลุ่มเหมือนเดิมเท่าไร เมื่อมีการสุ่มเอาตัวแปร (Variable) ใดตัวแปรหนึ่งที่ใช้ในการคำนวณการจัดกลุ่มออกตามจำนวนครั้งที่ต้องการ กลุ่มตัวอย่างที่มีค่า Bootstrap มากแสดงให้เห็นว่ากลุ่มที่จัดได้มีความน่าเชื่อถือ โอกาสที่การจัดกลุ่มจะเปลี่ยนไปน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มีค่า Bootstrap น้อย ตัวอย่างที่แยกออกเป็นกลุ่มเดี่ยวจะไม่สามารถคำนวณค่า Bootstrap ได้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

ในงานวิจัยนี้มุ่งศึกษาการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์ของโลดทะนงแดงและศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของโลดทะนง เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์ ที่จำเพาะกับโลดทะนง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของสมุนไพรโลดทะนงที่จะนำมาใช้ในการผลิตยาสมุนไพรและเพื่อใช้ในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอสำหรับระบุเอกลักษณ์ของสมุนไพรโลดทะนง

โดยมีขั้นตอนตั้งแต่การสกัดใบโลดทะนงแดงที่ใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาสำหรับทำการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์ ไลท์ ขั้นตอนเริ่มตั้งแต่การทำ SDigestion และ DNA Purification การทำ Linker Ligation การทำ Hybridization (ทำปฏิกิริยาแบบ Double Hybridization) การทำ Amplification of Linker Ligated and Oligo DNA by Hybridized DNA การทำ Size Selection และ Gel Extraction Protocol การทำ Vector Ligation with pGEM®-T Easy Vector การทำ Bacterial Transformation of *E.coli* DH-5α Competent Cell by Heat Shock Method การทำ Size Screening และ Sequencing และขั้นตอนการทำ SSR Finding และ Primer Design จากนั้นเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่ได้ไปตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของโลดทะนงด้วยเทคนิคอิเล็คโตรโฟริซีสแบบเจลโพลีอะคริละไมด์ (Polyacrylamide Gel Electrophoresis: PAGE) แล้วนำข้อมูลรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (Pattern/Genotype) ที่ได้ มาทำการวิเคราะห์กลุ่ม (Cluster Analysis) ด้วยวิธี Unweighted Pair-Group Arithmetic Average (UPGAM) โดยใช้สัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม Simple Matching เพื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ภายในกลุ่ม จากนั้นนำมาวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYSpc Version 2.11T ซึ่งผู้วิจัยได้ดำเนินการศึกษารายละเอียดเกี่ยวกับวิธีดำเนินการวิจัยและได้ดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้

1. เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย
2. กลุ่มตัวอย่าง
3. วิธีดำเนินการวิจัย
4. วิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ชุดอุปกรณ์สำหรับประกอบเพื่อเตรียมแผ่นเจล (Clamp, Chamber, แผ่นกระจก, แถบคั่นกระจก (Spacer), หวีเสียบ (Comb), แผ่นฟองน้ำ, ฐานครอบสำหรับฉีดเจล)
2. กระดาษทิชชูแผ่นใหญ่
3. กระดาษ Kimwipes EX-L
4. กระบอกฉีด Alcohol
5. ไมโครปิเปตต์ (p1000, p200) พร้อม tips
6. หลอดทดลองมีฝาปิด ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
7. กระบอกฉีดยา ขนาด 50 มิลลิลิตร
8. บีกเกอร์
9. กระบอกตวง
10. เครื่องแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าแนวตั้ง
11. Power Supply
12. อ่างพลาสติกสำหรับย้อมสีเจล
13. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath)
14. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge)
15. ตู้เย็น 2-8 องศาเซลเซียส
16. ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส
17. เครื่องแยกขนาดสารพันธุกรรมโดยใช้กระแสไฟฟ้า
18. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermal Cycler)
19. Magnetic Stand
20. Hybridization Oven
21. Hot Plate
22. หลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตร
23. หลอดทดลองสำหรับทำ PCR
24. กรรไกรหรือของมีคม
25. ถุงพลาสติกและยางรัด
26. สำลี
27. กล่องโฟม

28. โกร่งบดตัวอย่าง
29. ไนโตรเจนเหลว
30. กรรไกร
31. กระดาษซับ
32. ถุงมือผ้า
33. Rack
34. อ่างน้ำแข็ง
35. ตู้ปลอดเชื้อ (Fume Hood)
36. Plate สำหรับใส่ Agar
37. Spatula สำหรับ Spade Plate

สารเคมี

1. 3X CTAB buffer
2. Chloroform:isoamyl (24:1)
3. RNaseA
4. TE Buffer (10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA (pH 8.0))
5. 3M Sodium Acetate
6. Lambda DNA Standard
7. Loading Dye
8. Agarose Gel
9. ร้อยละ 0.1 BSA (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
10. *Alu* I, *Hae* III, *Afa* I (*Rsa* I)
11. ชุดตรวจ DNA Purification ใช้ Wizard® SV Gel และ PCR Clean up System (Promega) Cat.#A9281
12. 10 µM ds-Linker
13. T4 DNA Ligase (3 ยูนิต/ไมโครลิตร)
14. Colorless GoTaq® Flexi buffer (Promega) Ref.M890A
15. $MgCl_2$ (25mM) (Promega) Ref. A351H
16. dNTPs (1mM) (Promega)
17. 2X Gotaq®green mastermix
18. Linker 1 (50 µM)

19. GoTaq®Flexi DNA Polymerase 5 ยูนิต/ไมโครลิตร (Promega) Ref. M829B
20. λ DNA/ *Hind* III Markers (25 นาโนกรัม/ ไมโครลิตร)
21. 100 bp Ladder Markers
22. 10 bp Ladder Markers
23. Biotinylated Oligo DNA $(AC)_{15}$, $(AAC)_8$, $(GT)_{15}$, $(AAC)_8$ (1 µM)
24. Hybridization Buffer (20X SSC, ร้อยละ10 SDS)
25. Formamide
26. 1X B&W Buffer
27. Dynabeads®M-280 Streptavidin Ref.11205D
28. ชุดสกัด Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit: Geneaid
29. 2X rapid ligation Buffer
30. pGEM-T or pGEM-T Easy Vector (50 นาโนกรัม)
31. Control Insert DNA
32. T4 DNA Ligase (3 unit/ไมโครลิตร)
33. T7 (2 µM), SP6 (2 µM)
34. Compitent cell (*E.coli* Strain DH-5α)
35. LB Medium
36. LB Agar Plate
37. X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) Solution, 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร X-gal
38. Dimethylformamide
39. SOC Medium
40. Ampicillin (100 ไมโครลิตร/100 มิลลิลิตร)
41. ร้อยละ50 Glycerol
42. ชุด Kit สำเร็จรูป “HiYield™ Plasmid Minikit”, RBC หรือ “GeneJET Plasmid Miniprep kit”, Thermo Sciencific
43. ชุด Kit สำเร็จรูป “GeneJET Plasmid Miniprep kit”, Thermo Sciencific
44. ร้อยละ95 Ethanol
45. Bind-Silane
46. Repel-Silane (น้ำยาเคลือบกระจก)

47. ร้อยละ 4.5 Denaturing Polyacrylamide Gel
48. TEMED
49. ร้อยละ10 Ammonium Persulphate (ร้อยละ10 APS)
50. Acetic Acid
51. Silver Nitrate ($AgNO_3$)
52. ร้อยละ37 Formaldehide
53. dH_2O

กลุ่มตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ

1. ตัวอย่างที่ใช้ในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์ โดยใช้ใบโลดทะนงแดง จำนวน 1 ตัวอย่าง ที่เพาะเลี้ยงในหน่วยปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ (อพ.สธ) สวนจิตรลดา พระราชวังดุสิต

2. ตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของโลดทะนงโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ โดยใช้ใบโลดทะนง จำนวน 22 ตัวอย่าง เก็บมาจาก 2 แหล่ง คือ อ่างเก็บน้ำห้วยยายลาว หมู่ 3 ต.สามพระยา จ.เพชรบุรี จำนวน 12 ตัวอย่าง และ อุทยานแห่งชาติเขาสอยดาว ต.ทับไทร จ.จันทบุรี จำนวน 10 ตัวอย่าง ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 1 ตัวอย่างโลดทะนงที่ใช้ในการศึกษา

ลำดับ	ชนิด	รหัส	สถานที่เก็บ
1	โลดทะนงดอกสีขาว	LT01PW	อ่างเก็บน้ำห้วยยายลาว หมู่3 ต.สามพระยา จ.เพชรบุรี
2	โลดทะนงดอกสีแดง	LT02P	อ่างเก็บน้ำห้วยยายลาว หมู่3 ต.สามพระยา จ.เพชรบุรี
3	โลดทะนงดอกสีแดง	LT03P	อ่างเก็บน้ำห้วยยายลาว หมู่3 ต.สามพระยา จ.เพชรบุรี
4	โลดทะนงดอกสีแดง	LT04P	อ่างเก็บน้ำห้วยยายลาว หมู่3 ต.สามพระยา จ.เพชรบุรี
5	โลดทะนงดอกสีแดง	LT05P	อ่างเก็บน้ำห้วยยายลาว หมู่3 ต.สามพระยา จ.เพชรบุรี
6	โลดทะนงดอกสีแดง	LT06P	อ่างเก็บน้ำห้วยยายลาว หมู่3 ต.สามพระยา จ.เพชรบุรี
7	โลดทะนงดอกสีแดง	LT07P	อ่างเก็บน้ำห้วยยายลาว หมู่3 ต.สามพระยา จ.เพชรบุรี
8	โลดทะนงดอกสีแดง	LT08P	อ่างเก็บน้ำห้วยยายลาว หมู่3 ต.สามพระยา จ.เพชรบุรี
9	โลดทะนงดอกสีแดง	LT09P	อ่างเก็บน้ำห้วยยายลาว หมู่3 ต.สามพระยา จ.เพชรบุรี

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ลำดับ	ชนิด	รหัส	สถานที่เก็บ
10	โลดทะนงดอกสีแดง	LT10P	อ่างเก็บน้ำห้วยยายลาว หมู่3 ต.สามพระยา จ.เพชรบุรี
11	โลดทะนงดอกสีแดง	LT11P	อ่างเก็บน้ำห้วยยายลาว หมู่3 ต.สามพระยา จ.เพชรบุรี
12	โลดทะนงดอกสีแดง	LT12P	อ่างเก็บน้ำห้วยยายลาว หมู่3 ต.สามพระยา จ.เพชรบุรี
13	โลดทะนงดอกสีแดง	LT13J	อุทยานแห่งชาติเขาสอยดาว ต.ทับไทร จ.จันทบุรี
14	โลดทะนงดอกสีแดง	LT14J	อุทยานแห่งชาติเขาสอยดาว ต.ทับไทร จ.จันทบุรี
15	โลดทะนงดอกสีแดง	LT15J	อุทยานแห่งชาติเขาสอยดาว ต.ทับไทร จ.จันทบุรี
16	โลดทะนงดอกสีแดง	LT16J	อุทยานแห่งชาติเขาสอยดาว ต.ทับไทร จ.จันทบุรี
17	โลดทะนงดอกสีแดง	LT17J	อุทยานแห่งชาติเขาสอยดาว ต.ทับไทร จ.จันทบุรี
18	โลดทะนงดอกสีแดง	LT18J	อุทยานแห่งชาติเขาสอยดาว ต.ทับไทร จ.จันทบุรี
19	โลดทะนงดอกสีแดง	LT19J	อุทยานแห่งชาติเขาสอยดาว ต.ทับไทร จ.จันทบุรี
20	โลดทะนงดอกสีแดง	LT20J	อุทยานแห่งชาติเขาสอยดาว ต.ทับไทร จ.จันทบุรี
21	โลดทะนงดอกสีแดง	LT21J	อุทยานแห่งชาติเขาสอยดาว ต.ทับไทร จ.จันทบุรี
22	โลดทะนงดอกสีแดง	LT22J	อุทยานแห่งชาติเขาสอยดาว ต.ทับไทร จ.จันทบุรี

(ก)

(ข)

(ค)

(ง)

ภาพที่ 3 ตัวอย่างใบโลดทะนงที่ใช้ในการศึกษา (ก) ใบโลดทะนงดอกสีขาว LT01PW (ข) ใบโลดทะนงดอกสีแดง LT09P (ค) ใบโลดทะนงดอกสีแดง LT13J (ง) ใบโลดทะนงดอกสีแดง LT16J

วิธีดำเนินการวิจัย

การดำเนินการวิจัย แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ

1. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์
2. การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของโลดทะนงโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

1. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์

ขั้นตอนการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์มีทั้งหมด 10 ขั้นตอน คือ

1.1 การสกัดดีเอ็นเอตัวอย่างที่ใช้การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์

1.2 การทำ Digestion and DNA Purification

1.3 การทำ Linker Ligation

1.4 การทำ Hybridization

1.5 การทำ Amplification of Linker Ligated and Oligo DNA by Hybridized DNA

1.6 การทำ Size Selection and Gel Extraction Protocol

1.7 การทำ Vector Ligation with pGEM®-T easy Vector

1.8 การทำ Bacterial Transformation of *E.coli* DH-5α Competent Cell by Heat Shock method

1.9 การทำ Size Screening and Sequencing

1.10 การทำ SSR Finding and Primer Design

1.1 การสกัดดีเอ็นเอตัวอย่างที่ใช้การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์

ใช้ต้นพันธุ์โลดทะนงแดงที่เพาะเลี้ยง ในหน่วยปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ (อพ.สธ) สวนจิตรลดา พระราชวังดุสิต

ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ (Doyle & Doyle, 1987)

1. นำใบพืชประมาณ 0.5 กรัม บดในโกร่งด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด (คล้ายผงแป้ง) นำมาใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ประมาณครึ่งหลอด

2. เติม Extraction Buffer (3X CTAB Buffer) 650 ไมโครลิตร นำไป Incubate ที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง ใน Water Bath

3. นำมาสกัดด้วย Chloroform : Isoamyl (24:1) 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ย้ายสารละลายตอนบนใส่หลอดใหม่

4. ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย Isopropanol (หรือ Absolute Ethanol) ปริมาตร 750 ไมโครลิตร แช่เย็นไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

5. ล้างตะกอนดีเอ็นเอ โดยใช้ ร้อยละ70 Ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ประมาณ 2-3 ครั้ง นำตะกอนดีเอ็นเอมาตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

6. ละลายดีเอ็นเอในสายละลาย TE Buffer (10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA (pH 8.0)) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และเติม RNaseA 10 ไมโครลิตร

7. ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย 30 µl 3M Sodium Acetate และ 600 ไมโครลิตร ร้อยละ95 Ethanol ที่แช่เย็น

8. นำไปปั่นหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ล้างก้อนดีเอ็นเอด้วย ร้อยละ70 ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร 2 ถึง 3 ครั้ง ผึ่งให้แห้ง

9. ละลายดีเอ็นเอในสารละลาย TE 50 ไมโครลิตร เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ

ประเมินความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยเปรียบเทียบกับ DNA ที่ทราบความเข้มข้น (Lambda DNA) ด้วยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล ความเข้มข้น ร้อยละ0.8 จากนั้นปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ ให้มีความเข้มข้นที่ต้องการ (เจือจางดีเอ็นเอ ด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว) จากนั้นเก็บรักษาดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.2 การทำ Digestion and DNA purification

ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ การทำ Digestion และการทำ DNA Purification

1.2.1 การทำ Digestion

เป็นการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อให้ได้เป็น Fragment ที่สามารถนำไปทำปฏิกิริยา Ligation เชื่อมต่อกับ Linkger เพื่อเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสได้ โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ได้แก่ *Alu* I, *Hae* III และ *Rsa* I ต้องการความเข้มข้นของดีเอ็นเอเริ่มต้น 3 ไมโครกรัม ในแต่ละปฏิกิริยา (แยกแต่ละหลอด)

ขั้นตอนการทำ Digestion

ดูดส่วนประกอบลงในหลอดทดลอง ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ตามตารางที่ 2 (แยกทำแต่ละหลอด) จากนั้นนำแต่ละหลอดไป Incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำไป Incubate ต่อที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบในปฏิกิริยาการทำ Digestion

ส่วนประกอบ	***Alu* I**	***Hae* III**	***Afa* I (*Rsa* I)**
Genetic DNA	6 µl	6 µl	6 µl
10X Buffer	10 µl (B)	10 µl (C)	10 µl (C)
0.1% BSA (10 mg/ml)	-	-	10 µL
Alu I (10U/µl)	2 µl	-	-
Hae III (10U/µl)	-	2 µl	-
Afa I (*Rsa* I) (10U/µl)	-	-	2 µl
dH_2O	82 µl	82 µl	72 µl
รวม	**100 µl**	**100 µl**	**100 µl**

1.2.2 การทำ DNA Purification

ขั้นตอนการทำ DNA Purification

ใช้ Wizard® SV Gel และ PCR Clean up System (Promega) Cat.#A9281

1. ใช้ Digested DNA 100 ไมโครลิตร

2. จากนั้นนำไปเติม Membrane Binding Solution 100 ไมโครลิตรไมโครลิตร แล้ว Vortex Spindown

3. นำไปใส่ใน Column แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

4. เติม Wash Solution 650 ไมโครลิตร แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

5. เติม Wash Solution 500 ไมโครลิตร แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

6. ย้ายจาก Column ไปใส่ในหลอดทดลอง ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

7. เติม Warm DW 50 ไมโครลิตร แล้วตั้งที่ไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที จากนั้นนำไปปั่น 8,000 รอบต่อนาที เวลา 2 นาที

8. เติม Warm DW 50 ไมโครลิตร แล้วตั้งที่ไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที จากนั้นนำไปปั่น 8,000 รอบต่อนาที เวลา 2 นาที จะได้ Total Elution ปริมาตรเท่ากับ 100 ไมโครลิตร

9. เติม 3M Sodium Acetate (pH 5.2) 10 ไมโครลิตร และเติม Absolute Ethanol 240 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปแช่ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที (หรือ -80 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที) แล้วนำไปปั่น 12,000 รอบต่อนาที เวลา 2 นาที แล้วดูดส่วนใส (Supernatant) ทิ้ง

10.เติม ร้อยละ70 Ethanol ที่แช่เย็น 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่น 12,000 รอบต่อนาที เวลา 2 นาทีแล้วดูดส่วนใส (Supernatant) แล้วทิ้งให้แห้ง (Dry) ที่อุณหภูมิห้อง

11. Suspend ด้วย Warm DW 6 ไมโครลิตร โดยใช้ 1 ไมโครลิตร สำหรับ Load Agarose Gel และใช้ 5 ไมโครลิตร สำหรับ Linger Ligation จากนั้น เช็ค Purified DNA บน ร้อยละ 0.8 Agarose Gel

1.3 การทำ Linker Ligation

ประกอบไปด้วย 2 ขั้นตอน คือ การทำ Ligation และ การทำ PCR เช็ค Ligation Product

1.3.1 การทำ Ligation

ขั้นตอนการทำ Ligation

ปิเปตต์ ส่วนประกอบลงในหลอดทดลอง ขนาด 0.2 มิลลิลิตร ตามตารางที่ 3 (แยกทำแต่ละหลอด) จากนั้นพันด้วย Parafilm แล้วนำไป Incubate ในเครื่อง PCR โปรแกรม: L2 LINKER (Digested-Linker Ligated DNA) จากนั้นใช้ 1 ไมโครลิตร ไปทำ PCR เช็ค Ligation Product โปรแกรมดังตารางที่ 4 ส่วนที่เหลือย้ายไปเก็บไว้ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบในปฏิกิริยาการทำ Ligation

ส่วนประกอบ	**Fin.conc.**	***Alu* I**	***Hae* III**	***Afa* I (*Rsa* I)**
Purified DNA	≈ 4 µg	5 µl	5 µl	5 µl
2X Rapid Ligation Buffer		15 µl	15 µl	15 µl
10 µM ds-Linker	300 pmol	3 µl	3 µl	3 µl
T4 DNA lLigase (3U/µl)	6U	2 µl	2 µl	2 µl

ส่วนประกอบ	Fin.conc.	*Alu* I	*Hae* III	*Afa* I (*Rsa* I)
Xmn I (10U/µl)	10U	1 µl	1 µl	1 µl
Alu I (10U/µl)		1 µl	-	-
Hae III (10U/µl)		-	1 µl	-
Afa I (*Rsa* I) (10U/µl)		-	-	1 µl

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ส่วนประกอบ	Fin.conc.	*Alu* I	*Hae* III	*Afa* I (*Rsa* I)
dH_2O		3 µl	3 µl	3 µl
รวม		**30 µl**	**30 µl**	**30 µl**

ตารางที่ 4 โปรแกรมการทำ ligation (L2 LINKER)

กระบวนการ	อุณหภูมิ และเวลา
1	16 องศาเซลเซียส 30 นาที
2	37 องศาเซลเซียส 10 นาที
3	กลับไปที่กระบวนการ 1 ใหม่ รวมทั้งสิ้น 25 รอบ
4	16 องศาเซลเซียส (Hold)

1.3.2 การทำ PCR เช็ค Ligation Product

ขั้นตอนการทำ การทำ PCR เช็ค Ligation Product

ปิเปตต์ส่วนประกอบลงในหลอดทดลอง ขนาด 0.2 มิลลิลิตร ตามตารางที่ 5 จากนั้นนำไปทำ PCR ตาม PCR Program ดังตารางที่ 6 แล้วตรวจสอบผลผลิตที่ได้บนร้อยละ 1 Agarose Gel

ตารางที่ 5 ส่วนประกอบในปฏิกิริยาการทำ PCR เช็ค Ligation Product

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น Stock	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตรต่อหนึ่งปฏิกิริยา (1X)
Colorless GoTaq® Flexi buffer	5X	1X	3 µl
$MgCl_2$	25 mM	1.5 mM	0.9 µl

dNTPs	2 mM	200 µM	1.5 µl
Linker 1	50 µM	1 µM	0.3 µl
GoTaq®Flexi DNA Polymerase	5 U/µl	2.5 U	0.5 µl
dH_2O			7.8 µl
Ligated DNA			1 µl
รวม			**15 µl**

ตารางที่ 6 PCR Program สำหรับตรวจสอบ Ligation Product

กระบวนการ	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	
Predenaturation	94	5 นาที	
Denaturation	94	30 วินาที	รวมทั้งสิ้น 30 รอบ
Annealing	60	1 นาที	
Extension	68	1 นาที	
Final extension	68	7 นาที	
Hold	4	∞	

1.4 การทำ Hybridization

ขั้นตอนการทำ Hybridization

คัดเลือก Biotinylated Oligo DNA สำหรับทำปฏิกิริยา Double Hybridization ทั้งหมด 2 คู่ คือ $(AC)_{15}/(AAC)_8$ และ $(GT)_{15}/(AAC)_8$ คัดเลือกจาก Biotinylated Oligo DNA ที่ห้องปฏิบัติการมีอยู่

1.4.1 ปิเปตต์ส่วนประกอบลงในหลอดทดลอง ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ดังตารางที่ 7 แล้วนำไปบ่ม (Incubate) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที จากนั้นนำไปบ่มอีกครั้ง อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ข้ามคืน (Overnight) ใน Hybridization Oven (หมุนๆ)

ตารางที่ 7 ส่วนประกอบการทำ Hybridization ในปฏิกิริยา

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น Stock	ความเข้มข้นสุดท้าย	คู่ที่ 1 AC/AAC	คู่ที่ 2 GT/AAC

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น Stock	ความเข้มข้นสุดท้าย	คู่ที่ 1 AC/AAC	คู่ที่ 2 GT/AAC
Alu I digested-linker ligated DNA			2 µl	2 µl
Hae III digested-linker ligated DNA			2 µl	2 µl
Rsa I digested-linker ligated DNA			2 µl	2 µl
Biotinylated oligo DNA $(AC)_{15}$	1 µM	0.02 µM	4 µl	-
Biotinylated oligo DNA $(AAC)_8$	1 µM	0.02 µM	4 µl	-
Biotinylated oligo DNA $(GT)_{15}$	1 µM	0.02 µM	-	4 µl
Biotinylated oligo DNA $(AAC)_8$	1 µM	0.02 µM	-	4 µl

ตารางที่ 7 (ต่อ)

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น Stock	ความเข้มข้นสุดท้าย	คู่ที่ 1 AC/AAC	คู่ที่ 2 GT/AAC
20X SSC	20X	6X	61 µl	61 µl
10% SDS	10%	0.05%	1 µl	1 µl
Formamide	100%	50%	100 µl	100 µl
dH_2O			24 µl	24 µl
รวม			**200 µl**	**200 µl**

1.4.2 ย้าย Hybridized Solution ลงใน Dynal Bead โดยมีวิธีการเตรียม ดังต่อไปนี้

ดูด Dynal Bead 100 ไมโครลิตร ลงใน Tube 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นตั้งบน Magnetic Stand จากนั้นดูดส่วนใส (Supernatant) ทิ้ง แล้วเติม 1X B&W Buffer 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ด้วย Vortex Mixture and Spin Down แล้วนำไปวางบน Magnetic Stand แล้วดูดส่วนใส (Supernatant) ทิ้ง จากนั้นทำซ้ำตั้งแต่ขั้นตอนการเติม 1X B&W Buffer 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ด้วย Vortex Mixture and Spin Down แล้วนำไปวางบน Magnetic Stand แล้วดูดส่วนใส (Supernatant) ทิ้ง ทั้งหมด 3 ครั้ง

1.4.3 นำไป Incubate ที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส เวลา 2 ชั่วโมง ใน Hybridization Oven: หมุนด้วย แล้วนำไปวางลงบน Magnetic Stand จากนั้นดูดส่วนใสทิ้งด้วย Pipette

1.4.4 เติม 2X SCC/ร้อยละ0.1 SDS 400 ไมโครลิตร แล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เวลา 5 นาที แล้วดูดส่วนใสทิ้งโดยใช้ Pipette (ตั้งอยู่บน Magnetic Stand) ครั้งที่ 1

1.4.5 เติม 2X SCC/ร้อยละ0.1 SDS 400 ไมโครลิตร แล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เวลา 5 นาที แล้วดูดส่วนใสทิ้งโดยใช้ pipette (ตั้งอยู่บน Magnetic Stand) ครั้งที่ 2

1.4.6 เติม 1X SCC/ร้อยละ0.1 SDS 400 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (ใน Hybridization Oven) ดูดส่วนใสทิ้งโดยใช้ Pipette (On Stand) ครั้งที่ 1

1.4.7 เติม 1X SCC/ร้อยละ0.1 SDS 400 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (ใน Hybridization Oven) ดูดส่วนใสทิ้งโดยใช้ Pipette (On Stand) ครั้งที่ 2

1.4.8 เติม DW 120 ไมโครลิตร (Preheat 95 องศาเซลเซียส) Incubate ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที (ต้มน้ำแล้ววัดอุณภูมิ) จากนั้นนำมา Short Spin แล้วนำไปวางบน Magnetic Stand ดูดส่วนใส ≈ 110 ไมโครลิตร ลงไปในหลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปวางบน Magnetic Stand อีกครั้งดูด ≈ 110 ไมโครลิตร ลงไปในหลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตร

1.4.9 เติม 3M CH_3COONa (Sodium Acetate) pH 5.2 (1/10 vol.) 11 ไมโครลิตร เติม Absolute EtOH (x 2.2 vol.) 242 ไมโครลิตร Incubate ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (หรือ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที) จากนั้นำไปปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งส่วนใส (คว่ำหลอด แล้วซับ ห้ามใช้ Pipette)

1.4.10 เติมร้อยละ70 EtOH (=vol.) 363 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วทิ้งส่วนใส (คว่ำหลอด แล้วซับ ห้ามใช้ Pipette)

1.4.11 ทำให้ Pellet แห้ง โดยตากทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้น Suspend ด้วยการเติม preheat DW 20 ไมโครลิตร

1.5 การทำ Amplification of linker ligated and oligo DNA by hybridized DNA

ขั้นตอนการทำ Amplification of Linker Ligated and Oligo DNA

ปิเปตต์ส่วนประกอบลงในหลอดทดลอง ขนาด 0.2 มิลลิลิตร ดังตารางที่ 8 ทำคู่ละ 2 หลอด หลอดละ 50 ไมโครลิตร ให้ได้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปทำ PCR ด้วย PCR program ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 8 ส่วนประกอบในปฏิกิริยา Amplification of Linker Ligated and Oligo DNA by Hybridized DNA

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น	ความเข้มข้น	ปริมาตรต่อหนึ่ง

	Stock	สุดท้าย	ปฏิกิริยา (1X)
Colorless GoTaq® Flexi buffer	5X	1X	10 µl
$MgCl_2$	25 mM	1.5 mM	3 µl
dNTPs	2 mM	200 µM	5 µl
Linker 1	50 µM	0.8 µM	0.8 µl
GoTaq® Flexi DNA polymerase	5 U/µl	5 U	1 µl
dH_2O			25.2 µl
Hybridized DNA			5 µl
รวม			**50 µl**

ตารางที่ 9 PCR Program การทำ Amplification of Linker Ligated and Oligo DNA by hybridized DNA

กระบวนการ	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	
Predenaturation	94	5 นาที	
Denaturation	94	30 วินาที	รวมทั้งสิ้น 30 รอบ
Annealing	60	1 นาที	
Extension	68	1 นาที	
Final extension	68	7 นาที	
Hold	4	∞	

1.6 การทำ Size Selection and Gel Extraction Protocol

ขั้นตอนการทำ Gel Extraction Protocol

ใช้ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit: Geneaid

1.6.1 Excise Gel ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม DF Buffer (ต่อ 300 mg gel) 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไป Incubate ที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที (Invert Tube 2-3 ครั้ง) แล้วทำให้ DNA เย็น (cool)

1.6.2 ดูด 800 ไมโครลิตร ไปใส่ใน DF Column, Discard Flow-Through แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที

1.6.3 เติม W1 Buffer 400 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที

1.6.4 เติม Wash Buffer 600 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที

1.6.5 ย้ายจาก Column ไปใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Warm DW 20 ไมโครลิตร ใน Column ตั้งทิ้งไว้ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

1.6.5 เติม Warm DW 30 ไมโครลิตร ใน Column ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที Total 50 ไมโครลิตร

1.7 การทำ Vector Ligation with pGEM®-T Easy Vector

ขั้นตอนการทำ Vector Ligation Using the pGEM®-T Easy Vector

ปิเปตต์ส่วนประกอบในปฏิกิริยา Ligation with pGEM®-T Easy Vector ดังตารางที่ 10 ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นพันด้วย Parafilm แล้วนำไป Incubate ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ไว้หนึ่งคืน (Overnight) ที่ห้อง Cold Room แล้วเก็บรักษาไว้ที่ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส จากนั้นใช้ ligated DNA 1 ไมโครลิตร นำไปทำ PCR เช็ค Ligation with pGEM®-T Easy Vector (ใช้ Reagents ของ Promega) ด้วย Primer T7 และ SP6 โดยมีส่วนประกอบดังตารางที่ 11 และ PCR Program คือ Ligate Pgemt ดังตารางที่ 12

ตารางที่ 10 ส่วนประกอบในปฏิกิริยา Ligation with pGEM®-T Easy Vector

ส่วนประกอบ	Standard reaction	Positive control
2X Rapid ligation buffer	5 µl	5 µl
pGEM-T or pGEM-T Easy vector (50 ng)	1 µl	1 µl
PCR product (50 ng)	2 µl	-
Control Insert DNA	-	2 µl
T4 DNA Ligase (3 wiss unit/µl)	1 µl	1 µl
dH_2O	1 µl	1 µl
รวม	**10 µl**	**10 µl**

ตารางที่ 11 ส่วนประกอบในปฏิกิริยา PCR เช็ค Ligation with pGEM®-T Easy Vector

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น Stock	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตรต่อหนึ่งปฏิกิริยา (1X)
Colorless GoTaq®Flexi Buffer	5X	1X	3 µl
$MgCl_2$	25 mM	1.5 mM	0.9 µl
dNTPs	1 mM	200 µM	3 µl
T7	2 µM	-	1 µl
SP6	2 µM	-	1 µl
GoTaq®Flexi DNA Polymerase	5 U/µl	2.5U	0.5 µl

ตารางที่ 11 (ต่อ)

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น Stock	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตรต่อหนึ่งปฏิกิริยา (1X)
dH_2O			4.1 µl
Ligated DNA			1 µl
รวม			**15 µl**

ตารางที่ 12 PCR Program การทำ Ligation with pGEM®-T Easy Vector (Ligate Pgemt)

กระบวนการ	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	
Predenaturation	94	5 นาที	
Denaturation	94	45 วินาที	รวมทั้งสิ้น 35 รอบ
Annealing	55	45 วินาที	
Extension	72	45 วินาที	
Final extension	72	5 นาที	
Hold	4	∞	

1.8 การทำ Bacterial Transformation of *E.coli* DH-5α Competent Cell by Heat shock method

ขั้นตอนการทำ Bacterial Transformation of *E.coli* DH-5α Competent Cell by Heat Shock Method

1.8.1 Chill Competent Cell Tube บนน้ำแข็ง (50 ไมโครลิตร Competent Cell)

1.8.2 เติม DNA 5 ไมโครลิตร (25 นาโนกรัม) ลงใน Competent Cell Solution แล้วนำไปวางไว้ในอ่างน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที

1.8.3 ย้ายหลอดไปวางที่ Rack ใน Water Bath ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที (ห้ามเขย่าหลอด)

1.8.4 ย้ายหลอดไปวางที่อ่างน้ำแข็งทันที แล้วเติม SOC Medium 250 ไมโครลิตร ทันที

1.8.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที โดยเขย่าเครื่อง 225 รอบต่อนาที

1.8.6 เติม Ampicillin (100 ไมโครลิตร/100 มิลลิลิตร) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB แล้ว Spread ให้แห้ง

1.8.7 เติม X-Gal 80 ไมโครลิตร แล้ว Spread ให้แห้ง

1.8.8 หยด Culture 50, 50, 100 ละ 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละ Plate แล้ว Spread ให้แห้ง

1.8.9 คว่ำ Plate แล้วนำไป Incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน (Overnight)

1.8.10 เช็ค Efficiency ของ Transformation (นับจำนวน Blue/White Colony) แล้วคัดเอาเฉพาะ White Colony มาทำ Master Plate และสารละลายโคโลนี เพื่อตรวจสอบขนาดของ insert ที่ได้ต่อไป

1.8.11 ทำ Master Plate ในอาหาร LB ที่เติม Ampicillin เพื่อไปใช้ในการทำ Plasmid Extraction

1.8.12 ทำสารละลายโคโลนี โดยใช้ไม้จิ้มฟัน จิ้มที่ White Colony แล้วมาจุ่มที่ DW 10 ไมโครลิตร เพื่อไปใช้ในการทำ Size Screening

1.9 การทำ Size Screening and Sequencing

นำสารละลายโคโลนี มาทำ Colony PCR เพื่อคัดเลือกพลาสมิดที่มีขนาดของ Insert ที่อยู่ระหว่าง 500-1,000 bp

1.9.1 การทำ Colony PCR

ขั้นตอนการทำ Colony PCR (ใช้ Reagent ของ Thermo Scientific)

ปิเปตต์ส่วนประกอบในปฏิกิริยาการทำ Colony PCR ดังตารางที่ 13 ลงในหลอดหลอดทดลอง PCR แล้วนำไปทำ PCR โดยใช้ PCR Program: Ligate Pgemt ดังตารางที่ 14

จากนั้นคัดเฉพาะ Colony ที่มีขนาด Insert อยู่ระหว่าง 500-1,000 bp โดยใช้ไม้จิ้มฟัน Pick Colony จาก Master Plate มาเลี้ยงในอาหาร LB ที่เติม Ampicillin ปริมาตรหลอดละ 2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นจึงทำการสกัดพลาสมิด เตรียมส่งวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป

ตารางที่ 13 ส่วนประกอบในปฏิกิริยาการทำ Colony PCR

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น Stock	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตรต่อหนึ่งปฏิกิริยา (1X)
Taq buffer with $(NH_4)_2SO_4$	10X	1X	1.5 µl
$MgCl_2$	25 mM	1.5 mM	0.9 µl
dNTPs	1 mM	200 µM	3 µl
T7	2 µM	-	0.5 µl
SP6	2 µM	-	0.5 µl
Taq DNA polymerase	3 U/µl	1U	0.2 µl
dH_2O			6.4 µl
Clone colony			2 µl
รวม			**15 µl**

ตารางที่ 14 PCR program การทำ Colony PCR

กระบวนการ	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	
Predenaturation	94	2 นาที	
Denaturation	94	45 วินาที	รวมทั้งสิ้น 35 รอบ
Annealing	55	45 วินาที	
Extension	72	45 วินาที	
Final extension	72	5 นาที	
Hold	4	∞	

1.9.2 Plasmid Extraction

หลังจากที่เลี้ยงเชื้อข้ามคืน นำเชื้อที่เลี้ยงได้มาแบ่งเก็บ Stock ใน ร้อยละ50 Glycerol อัตราส่วน 1:1 (Cell Culture 500 ไมโครลิตร:ร้อยละ50 Glycerol 500 ไมโครลิตร) จากนั้นนำส่วนที่เหลือมาทำการสกัด พลาสมิดโดยใช้ชุด Kit สำเร็จรูป “HiYield™ Plasmid Minikit”, RBC หรือ “GeneJET Plasmid Miniprep kit”, Thermo Sciencific

ขั้นตอนการสกัดพลาสมิดโดยใช้ “HiYield™ Plasmid Minikit”, RBC

1. ใส่ Bacterial Cell ลงใน tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทส่วนใส (Supernatant) ทิ้ง

2. เติม PD1 Buffer 200 ไมโครลิตร + RNase 0.4 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้ Pipette หรือ Vortex

3. เติม PD2 Buffer 200 ไมโครลิตร แล้ว Mixed ทันทีด้วยการพลิกกลับไปมา 10 ครั้ง แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที จนกว่า Lysate Clear

4. เติม PD3 Buffer 300 ไมโครลิตร แล้ว Mixed ทันทีด้วยการพลิกกลับไปมา 10 ครั้ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

5. วาง PD Column ใน Collection Tube ขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วเติม Clear Lysate ลงใน PD Column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นดูดส่วนใสทิ้ง

6. เติม W1 Buffer 400 ไมโครลิตร ลงใน PD Column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นดูดส่วนใสทิ้ง

7. เติม Wash Buffer 600 ไมโครลิตร ลงใน PD Column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นดูดส่วนใสทิ้ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที

8. ย้าย Dry PD Column ไปใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร

9. เติม Warm DW 30 ไมโครลิตร วางไว้ที่ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที เวลา 2 นาทีที่อุณหภูมิห้อง (Elute1)

10.เติม Warm DW 20 ไมโครลิตร วางไว้ที่ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที เวลา 2 นาทีที่อุณหภูมิห้อง (Elute2)

11.จะได้ Plasmid DNA และคัดเลือกเอาเฉพาะพลาสมิดที่มีความเข้มข้นมากกว่า 20 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ไปส่งวิเคราะห์หาลำดับเบส

ขั้นตอนการสกัดพลาสมิดโดยใช้ “GeneJET Plasmid Miniprep Kit”, Thermo Sciencific

1. ใส่ Bactrial Cell ลงใน Tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2. เติม Resuspension Solution 250 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้ Pipette หรือ Vortex จน No Cell Clumps Remain (หลังเติม RNase A แล้วให้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส)

3. เติม Lysis Solution 250 ไมโครลิตร แล้ว Mixed ทันทีด้วยการพลิกกลับไปมา 4-6 ครั้งจน Solution Clear

4. เติม Neutralization 350 ไมโครลิตร แล้ว Mixed ทันทีด้วยการพลิกกลับไปมา 4-6 ครั้ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

5. จากนั้นย้ายส่วนใส (Supernatant) ลงใน Spin Column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วทิ้งส่วนใส

6. เติม Wash Solution 500 ไมโครลิตร ลงใน Spin Column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที แล้วทิ้งส่วนใส

7. เติม Wash Solution 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที แล้วทิ้งส่วนใส จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

8. ย้าย Spin Column ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร

9. เติม Warm DW 30 ไมโครลิตร วางไว้ที่ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที เวลา 2 นาทีที่อุณหภูมิห้อง (Elute1)

10.เติม Warm DW 20 ไมโครลิตร วางไว้ที่ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที เวลา 2 นาทีที่อุณหภูมิห้อง (Elute2)

11. จะได้ Plasmid DNA และคัดเลือกเอาเฉพาะพลาสมิดที่มีความเข้มข้นมากกว่า 20 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ไปส่งวิเคราะห์หาลำดับเบส

1.10 การทำ SSR Finding and Primer Design

1.10.1 การทำ SSR Finding

เมื่อได้ผลการวิเคราะห์ลำดับเบส ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้โดยใช้โปรแกรม CLC Sequence Viewer 7.0.2

เริ่มต้นจากการหาจุดเริ่มและจุดปลายของ Sequence ที่ต้องการ (ดูจาก Sequence ของ MS Primer หรือ Linker1) ในกรณีที่ไม่พบจุดเริ่มต้น หรือจุดปลายของลำดับเบสที่ต้องการให้ใช้การหาจุดตัดของเอนไซม์ (Enzyme) ที่ใช้ในขั้นตอน Digestion จากนั้นจัดให้เป็น FASTA Format เพื่อนำไปค้นหาตำแหน่งที่เป็นไมโครแซทเทลไลท์ต่อไป

การค้นหาตำแหน่งที่เป็นไมโครแซทเทลไลท์ ทำได้โดยนำ Sequence ที่ได้จากขั้นตอนก่อนหน้านี้มาหาจำนวนซ้ำของเบสที่เป็น Microsatellite ในโปรแกรมออนไลน์ SSRIT - Simple sequence repeat identification tool ที่เวปไซต์ http://www.gramene.org/db/markers/ssrtool มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. เลือกจำนวนเบสมากที่สุดที่ต้องการหาจำนวนซ้ำ เช่น Dimers คือมีเบสซ้ำ 2 เบส (CT, AT เป็นต้น) Trimers คือ มีเบสซ้ำ 3 เบส (GAG, CAT เป็นต้น)

2. ใส่จำนวนซ้ำที่น้อยที่สุดของลำดับเบสที่เป็น Microsatellite/SSRs ที่ต้องการ เช่น “5” คือต้องการจำนวนซ้ำตั้งแต่ 5 ซ้ำ หรือมากกว่า (เช่น AGAGAGAGAG)

3. ใส่ลำดับ Sequence ในรูปแบบ FASTA Format (หมายเหตุ: สามารถใส่ Sequence ได้หลาย Sequence โดยการใส่ต่อกันไปเป็นลำดับ

4. กดปุ่ม Find SSRs

5. หลังจากกดปุ่ม Find SSRs แล้ว จะได้จำนวนซ้ำของเบสที่เป็น Microsattellite แสดงผลเป็นตาราง

1.10.2 การทำ Primer Design

เมื่อได้จำนวนซ้ำและตำแหน่งของเบสที่เป็น Microsattellite แล้วนำข้อมูลดังกล่าวมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ในโปรแกรมออนไลน์ Primer3 ที่เวปไซต์ http://frodo.wi.mit.edu/ มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. Copy Sequence ที่มีลำดับเบสซ้ำมา จากนั้นใส่เครื่องหมาย [ ] ตรงตำแหน่งที่มีลำดับเบสซ้ำทุกตำแหน่ง แล้วทำเครื่องหมายถูกตรงช่องที่เขียนว่า Pick Left Primer และ Pick Right Primer ตัวอย่างการใส่เครื่องหมาย [ ] เช่น [AGAGAGAGAGAG]

2. กดปุ่ม Pick Primers จะได้ LEFT PRIMER และ RIGHT PRIMER ที่ต้องการ (โดยค่า Tm ไม่ควรต่างกันเกิน 5 องศาเซลเซียส)

เมื่อได้ Sequence ของไพรเมอร์ที่ต้องการแล้ว นำ Sequence ดังกล่าวมาตรวจสอบ Primer-Dimer ในโปรแกรมออนไลน์ OligoCalc: Oligonucleotide Properties Calculator ที่เว็บไซต์ http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html โดยมีลำดับขั้นตอน ดังนี้

1. ใส่ลำดับเบสของไพรเมอร์

2. กดปุ่ม Calculate

3. กดปุ่ม Check Self-Complementarity หากผลที่ได้แสดงคำว่า None นั่นคือ Primer ที่ออกแบบได้ ไม่มี Primer-Dimer

จากนั้นส่งลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ ไปทำการสังเคราะห์ไพรเมอร์ต่อไป

2. การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของโลดทะนงโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

ขั้นตอนการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์มีทั้งหมด 5 ขั้นตอน คือ

2.1 การสกัดดีเอ็นเอตัวอย่างโลดทะนงที่ใช้ในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของโลดทะนงโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

2.2 การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ

2.3 การทำ PCR protocol

2.4 การทำ PCR program

2.5 การทำอิเล็คโตรโฟริซีสแบบเจลโพลีอะคริละไมด์ (Polyacrylamide Gel Electrophoresis: PAGE)

2.1 การสกัดดีเอ็นเอตัวอย่างโลดทะนงที่ใช้ในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของโลดทะนงโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ

2.1.1 นำใบพืชประมาณ 0.5 กรัม บดในโกร่งด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด (คล้ายผงแป้ง) นำมาใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ประมาณครึ่งหลอด

2.1.2 เติม Extraction Buffer (3X CTAB Buffer) 650 ไมโครลิตร นำไป Incubate ที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง (ใน Water Bath)

2.1.3 นำมาสกัดด้วย Chloroform:Isoamyl (24:1) 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ย้ายสารละลายตอนบนใส่หลอดใหม่

2.1.4 ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย Isopropanol (หรือ Absolute Ethanol) ปริมาตร 750 ไมโครลิตร แช่เย็นไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

2.1.5 ล้างตะกอนดีเอ็นเอ โดยใช้ ร้อยละ70 Ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ประมาณ 2-3 ครั้ง นำตะกอนดีเอ็นเอมาตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

2.1.6 ละลายดีเอ็นเอในสายละลาย TE Buffer (10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA (pH 8.0)) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และเติม RNaseA 10 ไมโครลิตร

2.1.7 ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย 30 ไมโครลิตร 3M Sodium Acetate และ 600 ไมโครลิตร ร้อยละ95 Ethanol ที่แช่เย็น นำไปปั่นหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ล้างก้อนดีเอ็นเอด้วย ร้อยละ70 Ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร 2 ถึง 3 ครั้ง ผึ่งให้แห้ง

2.1.8 ละลายดีเอ็นเอในสารละลาย TE 50 ไมโครลิตร เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

2.2 การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ

ประเมินความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยเปรียบเทียบกับ DNA ที่ทราบความเข้มข้น (lambda DNA) ด้วยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล ความเข้มข้น ร้อยละ0.8 จากนั้นปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ ให้มีความเข้มข้นที่ต้องการ (เจือจางดีเอ็นเอ ด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว) จากนั้นเก็นรักษาดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.3 การทำ PCR Protocol

ปิเปตต์ส่วนประกอบในการทดสอบไพรเมอร์ที่ได้ ดังตารางที่ 15 ลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร แล้วนำไปทำ PCR โดยใช้ PCR Program ดังตาราง 16 (Fu, 2016) แต่อุณหภูมิในขั้นตอน Annealing จะแตกต่างกันในแต่ละ Primer จากขั้นตอนของการทำ Primer Design จากนั้นนำไปทำขั้นตอนของโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซีส

ตารางที่ 15 ส่วนประกอบในการทดสอบไพรเมอร์ที่ได้

ส่วนประกอบ	ปริมาตรต่อหนึ่งปฏิกิริยา (1X)
Forword primer	0.3 µl
Reverse primer	0.3 µl
2X Gotaq®Green Mastermix	8.4 µl
DNA	1 µl

ส่วนประกอบ	ปริมาตรต่อหนึ่งปฏิกิริยา (1X)
รวม	**10 µl**

2.4 การทำ PCR program

ตารางที่ 16 PCR Programในการทดสอบไพรเมอร์

กระบวนการ	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลาที่ใช้	
Predenaturation	95	10 นาที	
Denaturation	94	45 วินาที	รวมทั้งสิ้น 35 รอบ
Annealing	58-60	1 นาที	
Extension	72	1 นาที	
Final extension	72	10 นาที	
Hold	4	∞	

2.5 การทำอิเล็คโตรโฟริซีสแบบเจลโพลีอะคริละไมด์ (Polyacrylamide Gel Electrophoresis: PAGE)

ประกอบด้วย 4 ขั้นตอน ดังต่อไปนี้

2.5.1 การเตรียมกระจกสำหรับเทเจล

ขั้นตอนการเช็ดกระจก (เพื่อให้เจลเกาะติดกับกระจก)

1. ร้อยละ95 Ethanol 3 ครั้ง

2. ร้อยละ0.5 Acetic Acid 1 มิลลิลิตร + bind-silane 1.5 ไมโครลิตร (เช็ดด้วยกระดาษ Kimwipes EX-L)

3. ร้อยละ95 ethanol 3 ครั้ง

ขั้นตอนการเช็ดฐานกระจกหรือกระจกแผ่นหน้า(เพื่อไม่ให้เจลเกาะติดฐานกระจก)

1. ร้อยละ95 Ethanol 3 ครั้ง

2. Repel-Silane (น้ำยาเคลือบกระจก) 2 มิลลิลิตร 1 ครั้ง

2.5.2 ขั้นตอนการประกอบกระจก

1. วางแผ่นคั่นกระจก (Spacer) ลงบนฐานกระจกให้ชิดขอบทั้งสองด้าน จากนั้นวางแผ่นกระจก โดยคว่ำด้านที่มี Bind-Silane เข้าหาฐานกระจก

2. ใช้ Clamp หนีบกระจกทั้งสองแผ่นให้แน่น หันด้านที่เป็นขั้วอิเล็กโทรดขึ้นด้านบน จัดให้ขอบกระจกด้านล่างทั้งสองแผ่นเสมอกัน

3. วางแผ่นฟองน้ำในฐานครอบสำหรับฉีดเจล แล้วประกอบเข้ากันชุดกระจกล็อคฐานครอบแล้วตรวจสอบว่าเห็นช่องสำหรับฉีดเจลเข้าในกระจกได้หรือไม่

4. ฉีดเจลที่เตรียมไว้ จากนั้นเสียบหวีด้านบนโดยหันด้านเรียบเข้าไป เพื่อทำเป็นฐานสำหรับ load ตัวอย่าง ในขั้นตอนนี้ต้องระวังอย่าให้มีฟองอากาศเกิดขึ้น เสร็จแล้วตั้งทิ้งไว้รอให้เจลแข็งตัว (ประมาณ 2 ชั่วโมง)

2.5.3 การวิเคราะห์แยกแถบดีเอ็นเอโดยการผ่าน ร้อยละ 4.5 Denatured Polyacrylamide Gel Electrophoresis

1. เมื่อเจลเซ็ทตัวดีแล้ว ประกอบ Cassette เข้ากับ tank เติม 1X TBE Buffer ลงในช่องว่างหลังฐานกระจกและใน Tank ให้บัฟเฟอร์ท่วมถึงเจลด้านล่าง ปิดฝาให้สนิท ต่อสายไฟเข้ากับ Power Supply ทำการอุ่นเจล (Pre-Run) ก่อน โดยให้กระแสไฟ 50 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 30 นาที (ให้เจลมีอุณหภูมิประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส)

2. นำผลผลิต PCR ที่ได้ ไปทำการ Denature ที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำมาวางบนน้ำแข็งทันที (เพื่อให้ DNA คงสภาพเป็น Single Stand) ก่อนนำไปแยกขนาดบน Polyacrylamide Gel ที่ Pre-Run เอาไว้แล้ว

3. แยกขนาดดีเอ็นเอ โดยใช้กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ จนกระทั่งสีของ Xylene Cyanol (สีฟ้าอ่อน) เคลื่อนที่ได้ระยะทาง 15-20 เซนติเมตร จึงปิดสวิตท์ Power Supply จากนั้นถอดอุปกรณ์ออก แล้วแกะแยกแผ่นกระจกไปทำการย้อมสีด้วยเทคนิค Silver Staining ต่อไป

2.5.4 การย้อมสีแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Silver Staining

1. นำกระจกที่มีเจลอยู่มา Fix ใน ร้อยละ10 Acetic Acid 20 นาที (เมื่อใช้เสร็จแล้วเก็บ ร้อยละ10 Acetic Acid ไว้ก่อน)

2. ล้างด้วยน้ำเปล่า 3 ครั้งๆ ละ 2 นาที

3. เขย่าเบาๆ ในสารละลาย Silver Staining (1 กรัม Silver Nitrate และ 1.5 มิลลิลิตร ร้อยละ 37 Formaldehyde ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร) เป็นเวลา 30 นาที แล้วยกกระจกออก

4. นำแผ่นกระจกมาย้อมให้เกิดแถบสีด้วย Developer Solution (30 กรัม Na_2CO_3, 1.5 มิลลิลิตร ร้อยละ 37 Formaldehyde, 2 มิลลิกรัม $Na_2S_2O_3.5H_2O$ ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร) ที่แช่เย็น

5. เขย่าจนปรากฏแถบดีเอ็นเอชัดเจน

6. หยุดปฏิกิริยาด้วย ร้อยละ 10 acetic acid ที่เก็บไว้ในปริมาตรที่เท่ากัน

7. ล้างด้วยน้ำเปล่า 2 นาที

8. ตั้งทิ้งไว้จนเจลแห้ง

การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้

นำข้อมูลรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (Pattern/Genotype) ที่ได้มาทำการวิเคราะห์กลุ่ม (Cluster Analysis) ด้วยวิธีUnweighted Pair-Group Arithmetic Average(UPGAM) โดยใช้สัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม Simple Matching เพื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ภายในกลุ่ม จากนั้นนำมาวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYSpc Version 2.11T (Exeter Software, Setanket, NY)

การวิเคราะห์ข้อมูลความหลายหลายทางพันธุกรรม โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc Version 2.11T (Exeter Software, Setanket, NY) มีลำดับขั้นตอน ดังนี้

1. ทำการอ่านแถบดีเอ็นเอที่ได้โดยให้คะแนนเป็น:1 แทนแถบที่ปรากฏในตำแหน่ง (Loci) นั้นๆ และ 0 แทนตำแหน่งที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ กรอกข้อมูลในตาราง (Data Sheet) ก่อน จากนั้นจึงป้อนข้อมูลของแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน (Polymorphic Bands) ในโปรแกรม MS Excel โดยให้ตัวอย่างอยู่ในแนวนอน และแถบดีเอ็นเอแต่ละ Loci อยู่ในแนวตั้ง และเว้นแถวแรกไว้ เพื่อป้อนคำสั่ง สำหรับเปิดไฟล์ด้วยโปรแกร NTEdit ต่อไป แล้วทำการ Save File ตามปกติ

2. เปิดโปรแกรม NTSYS

3. การวิเคราะห์ค่าความแตกต่างหรือความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม (Dissimilarity/ Similarity) เนื่องจากข้อมูลที่มีอยู่เป็นข้อมูลที่เรียกว่า ข้อมูลสองตัวแปร (Binary Data) ซึ่งจะต้องใช้โรแกรมที่วิเคราะห์เป็นลักษณะเชิงคุณภาพ นั่นคือโปรแกรม SimQuat โดยเลือกโปรแกรม Similarity จากนั้นเลือกโปรแกรมย่อย Qualitative Data แล้วทำการป้อนข้อมูลไปยังช่องว่างหลัง Parameter แล้ว Double Click

Input File: เลือกไฟล์จากโปรแกรม NTEdit

Coefficient: เลือกใช้ตามความเหมาะสม เช่น SM (Simple Matching) : SSR

Output File: Save File ในชื่อที่จะทำให้เราจำได้ว่าเป็นไฟล์ค่า Simirality

เมื่อเสร็จแล้วให้กด Compute หลังจากนั้นจึงปิดหน้าต่างของโปรแกรมนี้

4. วิเคราะห์กลุ่ม (Cluster Analysis) ให้เลือกไปที่โปรแกรม Clusterจากนั้นเลือกโปรแกรมย่อย SAHN แล้วจะปรากฏหน้าต่างโปรแกรม SAHN แล้วทำการป้อนข้อมูลตามลำดับ ดังนี้

Input File: เลือก Output File จากโปรแกรม SimQual

Output Tree File : Save File ในชื่อที่จะทำเราจำได้ว่าเป็นไฟล์ Dendrogram or Phylogenetic Tree ของข้อมูลชุดนี้

เลือก Clustering Method ซึ่งโดยมากจะใช้ UPGMA Method

In Case of Ties: ให้เลือก FIND

Maximum No. Tied Tree: เลือกจำนวน Tree ที่ต้องการให้โปรแกรมคำนวณให้

เมื่อเสร็จแล้วให้กด Compute เมื่อโปรแกรม Run เสร็จแล้ว เราสามารถดู Tree ได้

5. หลังจากได้ Tree แล้ว ขั้นตอนต่อไปคือ การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการจัดกลุ่ม เพื่อดูว่า Tree ที่ได้ มีความเหมาะสมมากน้อยเพียงใด โดยการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการจัดกลุ่มทำได้โดยการเลือกไปที่โปรแกรม Cluster โปรแกรมย่อย Cophenetic Values จะปรากฏหน้าต่างโปรแกรม Coph แล้วป้อนข้อมูลตามลำดับ ดังนี้

Input Tree File: เลือก Output Tree File จากโปรแกรม SAHN

Output Coph. File: Save File ในชื่อที่จะทำให้เราจำได้ว่าเป็นไฟล์ Cophenetic Value ของข้อมูลชุดนี้

เมื่อเสร็จแล้วให้กด Compute

การดูค่า Cophenetic ทำได้โดยเปิดโปรแกรม Graphic โปรแกรมย่อย Matrix Comparison Plot เมื่อทำตามขั้นตอนข้างต้น จะปรากฏหน้าต่างโปรแกรม MxComp แล้วทำการป้อนข้อมูล ดังนี้

Input File 1(X): เปิด Output File จากโปรแกรม SimQual

Input File 2(Y): เปิด Output File จากโปรแกรม Coph

เมื่อเสร็จแล้วให้กด Compute

ในการดูค่าประสิทธิภาพการจัดกลุ่มที่คำนวณได้นั้น สามารถดูได้จากค่า Matrix Correlation ซึ่งมีรายงานไว้ใน Report Listing ซึ่งจะปรากฏให้เห็นทุกครั้งหลังจากการวิเคราะห์แต่ละโปแกรมเสร็จสิ้นลง

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

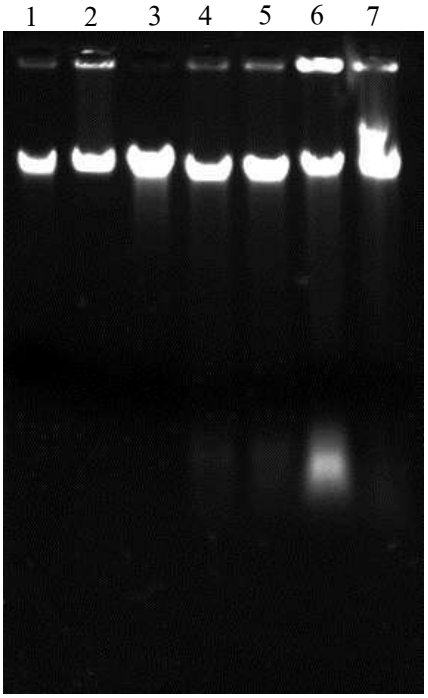
งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์ของโลดทะนงแดง ประกอบไปด้วย 4 ขั้นตอนหลักๆ คือ

1. การสกัดดีเอ็นเอของตัวอย่างที่ใช้การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์
2. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์
3. การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของโลดทะนงโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ด้วยตัวอย่างโลดทะนง
4. การวิเคราะห์ข้อมูล

โดยผลการทดลองในแต่ละขั้นตอน มีดังต่อไปนี้

ผลการสกัดดีเอ็นเอตัวอย่างที่ใช้การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์

ผลการตรวจสอบปริมาณ DNA ด้วย ร้อยละ 0.8 Agarose Gel Electrophoresis ได้ดังภาพที่ 4



Lane 1 λ-DNA 100 ng/ µl

Lane 2 λ-DNA 300 ng/ µl

Lane 3 λ-DNA 500 ng/ µl

Lane 4 DNA Extraction ต้นที่โครงการ อพ.สธ. (เพาะชำนอก) Elute ครั้งที่ 1

Lane 5 DNA extraction ต้นที่โครงการ อพ.สธ. (เพาะชำนอก) Elute ครั้งที่ 2

Lane 6 DNA extraction เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (เขื่อนศรีนครินทร์) Elute ครั้งที่ 1

Lane 7 DNA extraction เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (เขื่อนศรีนครินทร์) Elute ครั้งที่ 2

ภาพที่ 4 แสดงการสกัด DNA จากใบโลดทะนงแดง

จากภาพที่ 4 พบว่าความเข้มข้นของปริมาณการสกัด DNA ทั้ง 4 ตัวอย่าง คือ DNA Extraction ต้นที่โครงการ อพ.สธ. (เพาะชำนอก) Elute ครั้งที่ 1, DNA Extraction ต้นที่โครงการ อพ.สธ. (เพาะชำนอก) Elute ครั้งที่ 2, DNA extraction เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (เขื่อนศรีนครินทร์) Elute ครั้งที่ 1, DNA Extraction เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (เขื่อนศรีนครินทร์) Elute ครั้งที่ 2 มีความเข้มข้น 500 นาโนกรัม/ไมโครลิตร สามารถนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไปได้ทั้ง 4 ตัวอย่าง ทางผู้วิจัยได้เลือกตัวอย่าง DNA Extraction เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (เขื่อนศรีนครินทร์) Elute ครั้งที่ 1 ไปใช้ในขั้นตอน Digestion DNA ต่อไป

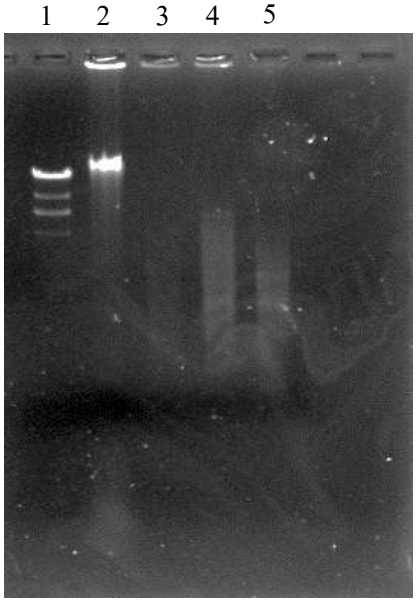
ผลการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์

ได้ผลดังแสดงตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. ผลการทำขั้นตอน Digestion and DNA Purification

1.1 ผลการทำ Digestion

ผลการตรวจสอบปริมาณ Digested Product ด้วย ร้อยละ 0.8 Agarose Gel ดังเห็นในภาพที่ 5



Lane 1 λ DNA/ *Hind* III Markers (25 ng/ µl)

Lane 2 uncut gDNA โลดทะนง

Lane 3 *Alu* I

Lane 4 *Hae* III

Lane 5 *Rsa* I

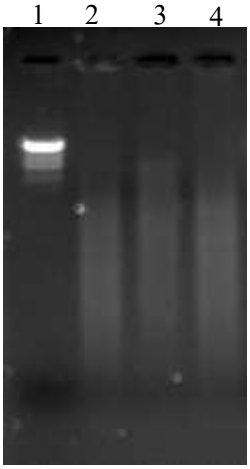
ภาพที่ 5 แสดงการตรวจสอบปริมาณ Digested Product ด้วย ร้อยละ0.8 Agarose Gel

พบแถบ Smear จางๆ ของ *Alu* I, *Hae* III และ *Rsa* I เมื่อเทียบกับ Uncut gDNA โลดทะนง ที่เกิดลักษณะเป็น Band แสดงว่า เกิดการตัดอย่างสมบูรณ์ในการทำขั้นตอนของ Digestion สามารถทำต่อในขั้นตอน DNA Purification ได้ ดังภาพที่ 5

1.2 ผลการทำ DNA Purification

ผลการตรวจสอบปริมาณ Digested Product ด้วยร้อยละ 0.8 Agarose Gel ดังเห็นในภาพที่ 6

จากภาพที่ 6 พบแถบ Smear จางๆ Alu I, Hae III และ Rsa I แสดงว่าในขั้นตอนการทำ DNA Purification นี้ เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์สามารถทำต่อในขั้นตอน Ligation ด้วย linker 1+2 ได้



Lane 1 λ DNA/ *Hind* III markers (25 ng/µl)

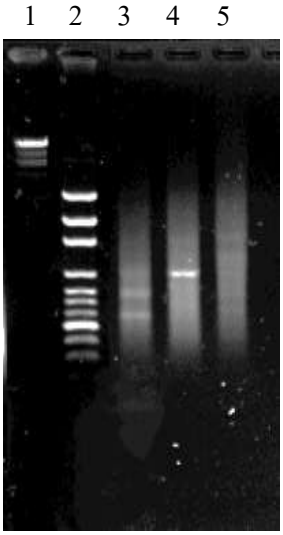
Lane 2 *Alu* I

Lane 3 *Hae* III

Lane 4 *Rsa* I

ภาพที่ 6 แสดงการตรวจสอบปริมาณ DNA Purification ด้วยร้อยละ 0.8 Agarose Gel

2. ผลการทำ Ligation



Lane 1 λ DNA/ *Hind* III Markers (25 ng/µl)

Lane 2 100 bp ladder

Lane 3 *Alu* I + linker

Lane 4 *Hae* III + linker

Lane 5 *Rsa* I + linker

ภาพที่ 7 แสดงการตรวจสอบปริมาณ PCR ligation ด้วยร้อยละ 0.8 Agarose Gel

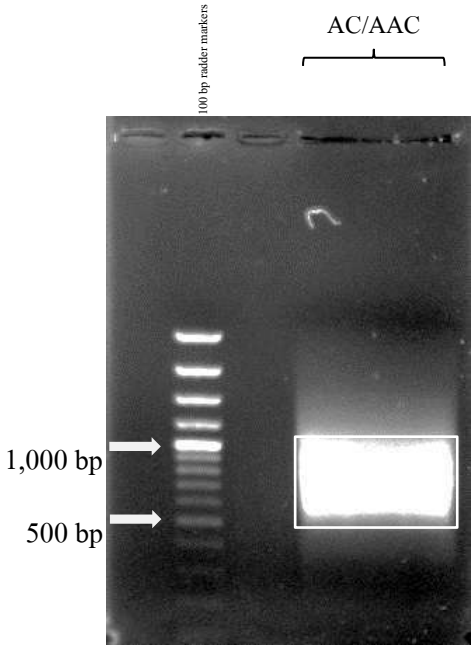
จากภาพที่ 7 Linker สามารถเข้าจับกับ Fragment ของ *Alu* I, *Hae* III และ *Rsa* I ได้ค่อนข้างสมบูรณ์ สามารถเพิ่มปริมาณขึ้น Fragment ได้เป็นจำนวนมากและหลากหลายขนาด โดยสามารถมองเห็นเป็นแถบ Smear ที่ชัดเจน สามารถทำต่อในขั้นตอน Hybridization ได้

3. Hybridization

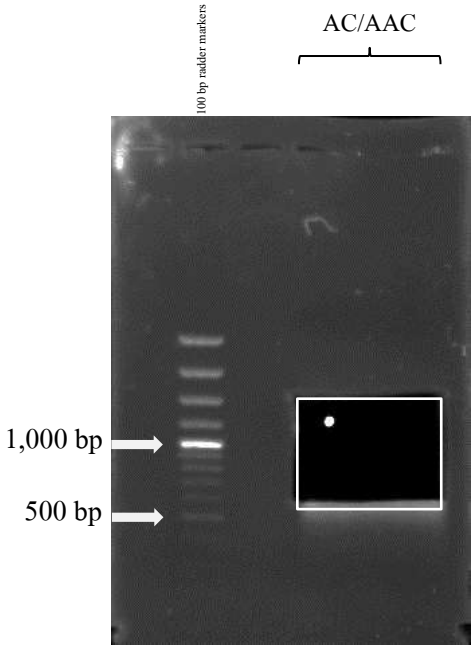
ทำการ Hybridization ทั้งหมด 2 คู่ คือ AC/AAC และ GT/AAC จากนั้นทำต่อในขั้นตอน Amplification of Linker Ligated and Oligo DNA by Hybridized DNA

4. ผลการทำ Amplification of Linker Ligated and Oligo DNA by Hybridized DNA

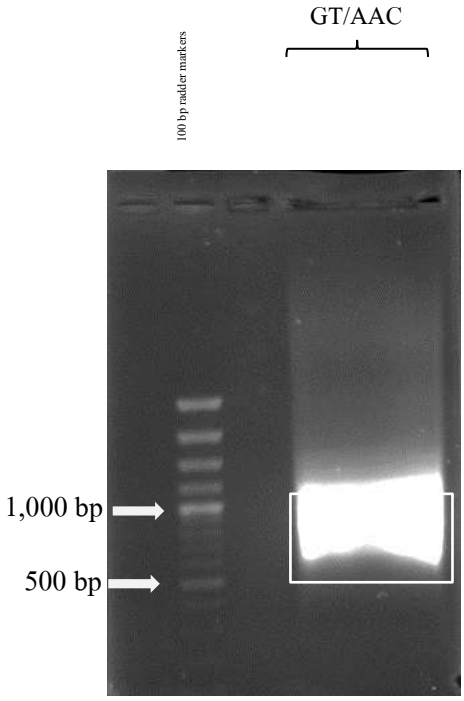
ผลการเช็ค Amplification of Linker Ligated and Oligo DNA by Hybridized DNA และเลือกตัดเจล (Size Selection) ในช่วงขนาด 500-1,000 bp มีทั้งหมด 2 คู่ คือ AC/AAC และ GT/AAC ดังภาพที่ 8-11



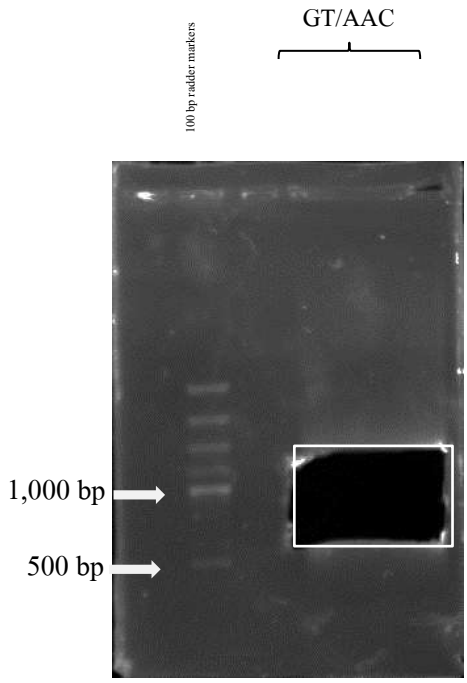
ภาพที่ 8 เช็ค Amplification of Linker Ligated and Oligo DNA by Hybridized DNA (AC/AAC)



ภาพที่ 9 ตัดเจลในช่วงขนาด 500-1,000 bp (AC/AAC)



ภาพที่ 10 เช็ค Amplification of Linker Ligated and Oligo DNA by Hybridized DNA (GT/AAC)

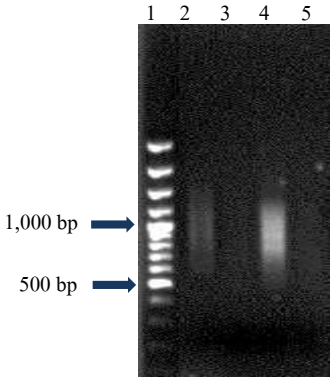


ภาพที่ 11 ตัดเจลในช่วงขนาด 500-1,000 bp (GT/AAC)

จากภาพที่ 8 และ 9 ทำการ เช็ค Amplification of Linker Ligated and Oligo DNA by Hybridized DNA เกิดแถบ Smear เห็นได้ชัดเจนในช่วงขนาด 500-1,000 bp และทำการเลือกตัดเจลในช่วงขนาด 500-1,000 bp ดังภาพที่ 10 และ 11 เพื่อใช้ในการทำขั้นตอน Gel Extraction Protocol ต่อไป

5. ผลการทำ Gel Extraction Protocol

ผลการตรวจสอบปริมาณ Gel Extraction DNA ด้วยร้อยละ 1 Agarose Gel Electrophoresis

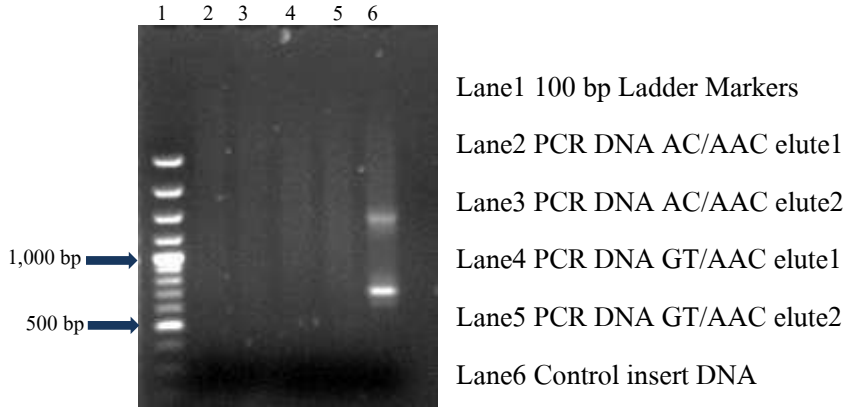


Lane1 100 bp Ladder Markers
Lane2 Elute DNA AC/AAC 1
Lane3 Elute DNA AC/AAC 2
Lane4 Elute DNA GT/AAC 1
Lane5 Elute DNA GT/AAC 2

ภาพที่ 12 ผลการตรวจสอบปริมาณ Gel Extraction DNA ด้วยร้อยละ 1 Agarose Gel Electrophoresis

จากภาพที่ 12 elute DNA ทั้ง AC/AAC และ GT/AAC ของครั้งที่ 1 พบแถบ Smear ที่มีความสว่างชัดเจน ใน Lane ที่ 2 และ 4 และเกิดขึ้นช่วงความเข้มข้น 500 – 1,000 bp ส่วน Elute DNA AC/AAC ครั้งที่ 2 พบแถบ Smear ที่จางมาก ใน Lane ที่ 3 และ 5 จึงเลือก Elute DNA ของการทำ Gel Extraction ครั้งที่ 1 ของ AC/AAC และ GT/AAC ไปทำในขั้นตอน Ligation with pGEM®-T Easy Vector ต่อไป

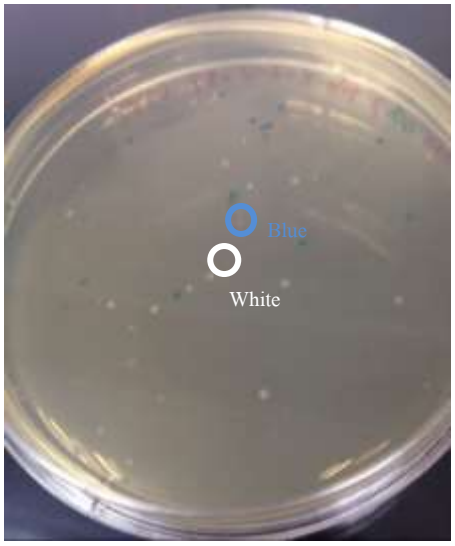
6. ผลการทำ Ligation with pGEM®-T easy Vector



ภาพที่ 13 ผลการตรวจสอบปริมาณ PCR เช็ค Ligation with pGEM®-T Easy Vector ด้วยร้อยละ 1 Agarose Gel Electrophoresis

จากภาพที่ 13 พบแถบ Smear ที่มีความสว่างชัดเจนของ PCR Ligation with pGEM®-T Easy Vector แสดงว่า พลาสมิดที่มี Insert สามารถเชื่อมต่อได้อย่างสมบูรณ์

7. ผลการทำ Transformation of *E.coli* DH-5α Competent cell by heat shock method



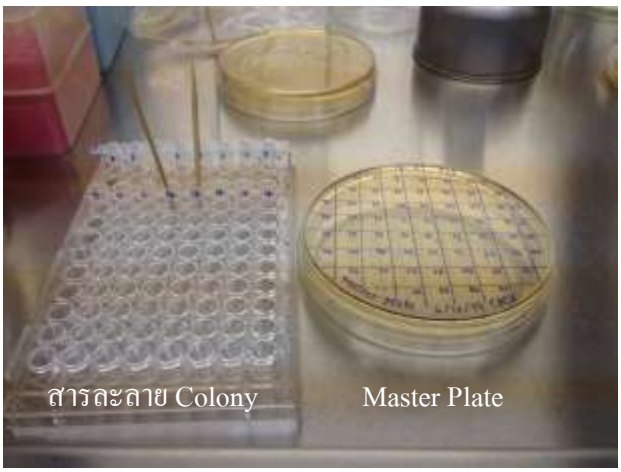
ภาพที่ 14 แสดง Blue-White Colony ของ AC/AAC

ตารางที่ 17 ประสิทธิภาพการทำ Bacterial Transformation ด้วยเทคนิค Heat Shock Method

Biotinylated Oligo DNA	Blue (Colony)	White (Colony)	Efficiency (%)
AC/AAC	426	198	46.48
GT/AAC	663	296	44.65

จากการทดสอบประสิทธิภาพการทำ Bacterial Transformation ด้วยเทคนิค Heat Shock Method พบว่าประสิทธิภาพของ Biotinylated Oligo DNA AC/AAC และ GT/AAC มีประสิทธิภาพเท่ากับ ร้อยละ 46.48 และ ร้อยละ 44.65 คัดเลือกเฉพาะ White Colony การที่เห็น Colony เป็นสีขาว เนื่องจากแบคทีเรีย *E.coli* DH-5α Competent Cell ไม่สามารถผลิตเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสได้ เนื่องจากตรงตำแหน่งที่ใช้ผลิตเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสนั้นถูกแทรกด้วย DNA ที่เราสนใจไว้ จึงไม่เกิดการย่อยในบริเวณนั้น เมื่อเติม X-Gal ซึ่งเป็นตัว Substrate ลงไปจึงทำให้ไม่เกิดสี ทำให้เห็นโคโลนีเป็นสีขาว แต่ถ้าในทางกลับกัน ถ้าแบคทีเรีย *E.coli* DH-5α Competent Cell ที่ได้รับเฉพาะพลาสมิดเปล่าๆ จะยังคงสามารถผลิตเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสได้ X-Gal ก็สามารถทำงานได้ โคโลนีที่เห็นจึงเป็นสีฟ้า

นับจำนวนเฉพาะ White Colony ได้ทั้งหมด 494 Colonies แบ่งเป็น AC/AAC จำนวน 198 Colonies และ GT/AAC จำนวน 296 Colonies จากนั้นจัดทำ Master Plate และ สารละลาย Colony เพื่อตรวจสอบขนาดของ Insert ต่อไป



ภาพที่ 15 แสดง Master Plate และ สารละลาย Colony

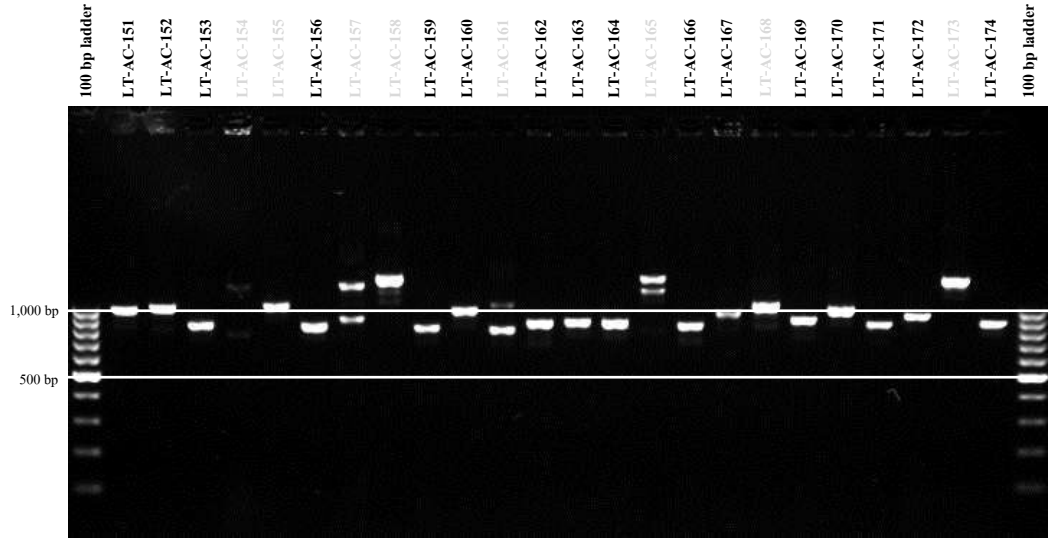
8. ผลการทำ Size Screening and Sequencing

ประกอบไปด้วย 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนการทำ Colony PCR และ Plasmid Extraction

8.1 Colony PCR

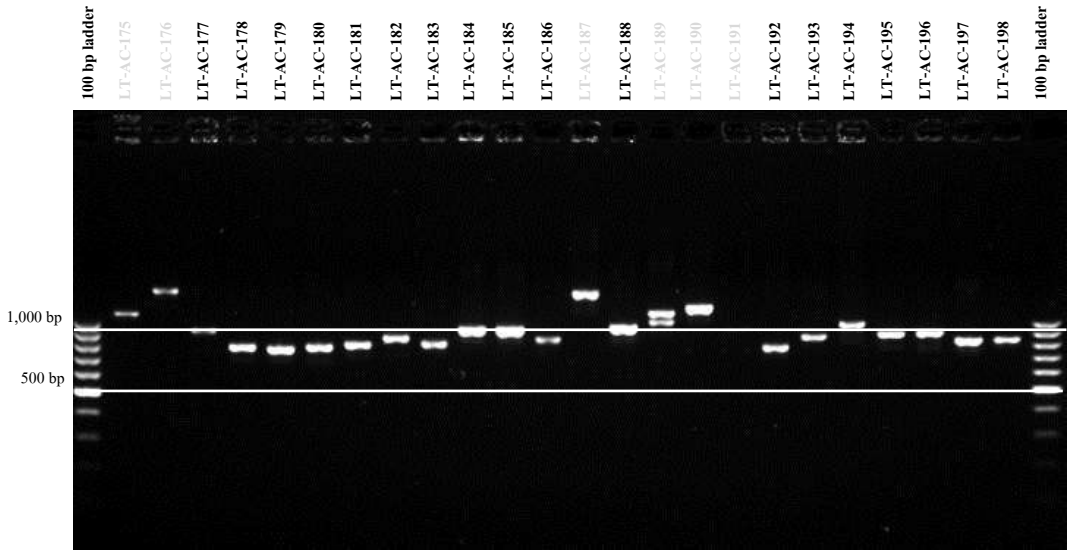
คัดเฉพาะ Colony ที่มีขนาด Insert อยู่ระหว่าง 500-1,000 bp โดยใช้ไม้จิ้มฟัน Pick Colony จาก Master Plate มาเลี้ยงในอาหาร LB ที่เติม Ampicillin ปริมาตรหลอดละ 2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ซึ่งมีตัวอย่างผลการตรวจสอบปริมาณ colony PCR ของพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนที่เป็นไมโครแซทเทลไลท์ ด้วย ร้อยละ 1 Agarose Gel Electrophoresis ดังภาพที่ 16 และ 17 จากนั้นจึงทำการสกัดพลาสมิด เพื่อส่งวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป

จากภาพที่ 15 Colony PCR ที่อยู่ในช่วง 500 - 1,000 bp คือ No. LT-AC 151, 152, 153, 156, 159, 160, 162, 163, 164, 166, 167, 169, 170, 171, 172 และ 174 สามารถนำไปใช้ในขั้นตอนการทำ Plasmid Extraction ได้



ภาพที่ 16 Colony PCR No. LT-AC 151 - 174

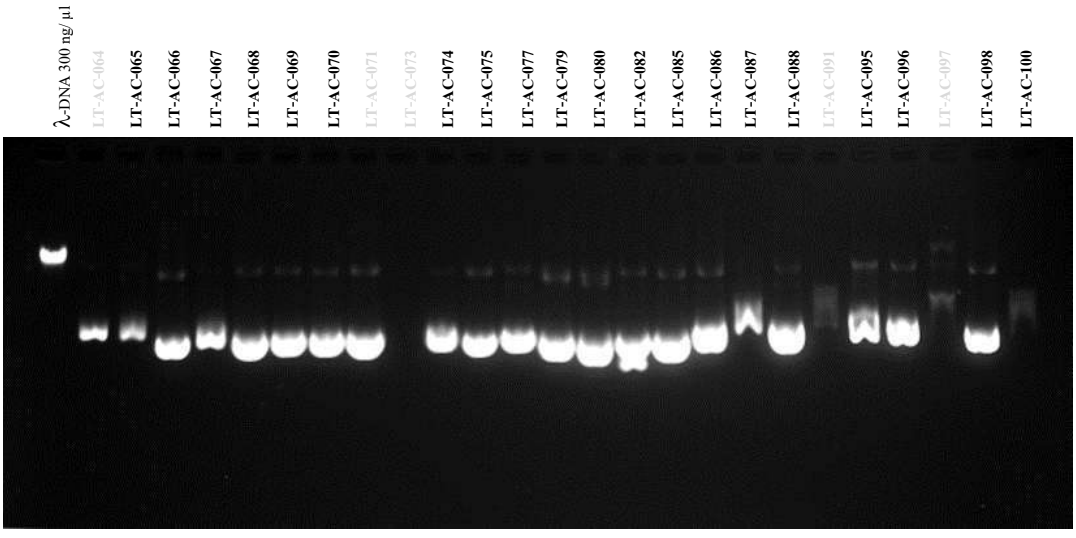
จากภาพที่ 16 Colony PCR ที่อยู่ในช่วง 500 - 1,000 bp คือ No. LT-AC 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 188, 192, 193, 194, 195, 196, 197 และ 198 สามารถนำไปใช้ในขั้นตอนการทำ Plasmid Extraction ได้



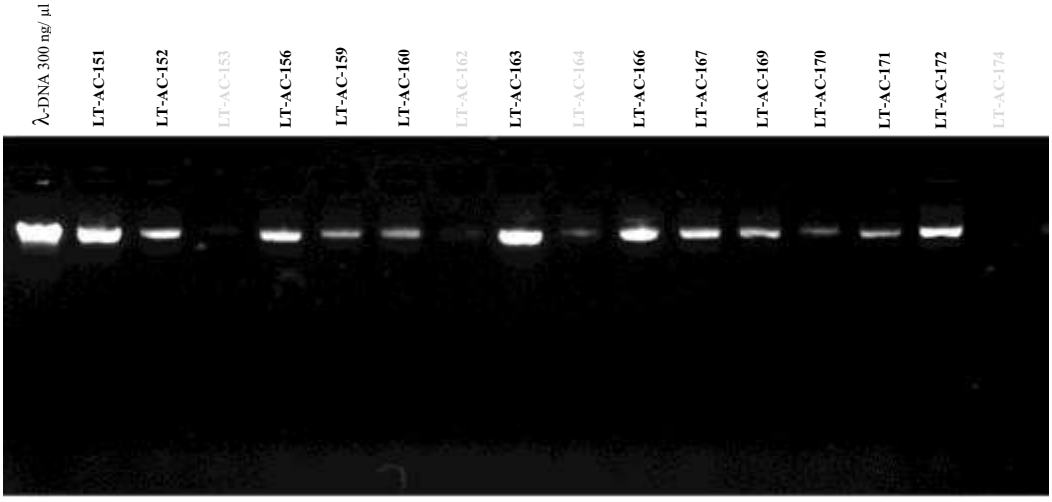
ภาพที่ 17 Colony PCR No. LT-AC 175 - 198

8.2 Plasmid Extraction

หลังจากที่เลี้ยงเชื้อข้ามคืน นำเชื้อที่เลี้ยงได้มาแบ่งเก็บ Stock ใน ร้อยละ 50 Glycerol อัตราส่วน 1:1 (Cell Culture 500 ไมโครลิตร: ร้อยละ 50 Glycerol 500 ไมโครลิตร) จากนั้นนำส่วนที่เหลือมาทำการสกัด พลาสมิดโดยใช้ชุด Kit สำเร็จรูป จากนั้นเช็คพลาสมิดที่สกัดได้บน ร้อยละ 1 Agarose Gel Electrophoresis แล้วคัดเลือกเฉพาะพลาสมิดที่มีความเข้มข้นมากกว่า 20 นาโนกรัมต่อ ไมโครลิตร ไปส่งวิเคราะห์หาลำดับเบส



ภาพที่ 18 Plasmid DNA No. LT-AC 064-100



ภาพที่ 19 Plasmid DNA No. LT-AC 151-177

สรุป Clone Plasmid DNA ที่ได้มาจาก Biotinylated Oligo DNA $(AC)_{15}/(AAC)_8$ และ $(GT)_{15}/(AAC)_8$ ที่สามารถนำไปวิเคราะห์หาลำดับเบส มีจำนวนทั้งหมด 192 Clones

8.3 DNA Sequencing

ส่งตัวอย่างพลาสมิดเพื่อวิเคราะห์ลำดับเบส จำนวนทั้งสิ้น 192 Clones กับทางบริษัท First BASE Laboratories Sdn Bhd

9. SSR Finding and Primer Design

จากที่ส่ง DNA Sequencing แล้ว จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์เพื่อทำการ Design Primer ผลปรากฏว่าได้ Primer ที่สามารถส่งไปทำการสังเคราะห์ Primer ทั้งหมด 558 คู่ ทางผู้วิจัยจึงเลือกโดยวิธีการสุ่มทั้งหมด 25 คู่ เพื่อไปทำการสังเคราะห์ Primer ได้ดังตารางที่ 18

ตารางที่ 18 แสดงคุณลักษณะเฉพาะของ Primer

Oligo name	Sequence (5'→ 3')	Length	Tm
LT_AC_006_L	AAGAAAAGGGGATCCTTCCTC	21	59.90
LT_AC_006_R	GGCTCTGATTCCCATTCAAA	20	60.01
LT_AC_018_L	AGGTAAGCGAAAGGGAAAGG	20	59.72
LT_AC_018_R	GAAATCTCAATACTCATCCAAAGGA	25	59.87
LT_AC_031_L	CCCTAATGTGGCTCTTCCTG	20	59.69
LT_AC_031_R	ACCCTGTGGTGAATTTGAGC	20	59.97

ตารางที่ 18 (ต่อ)

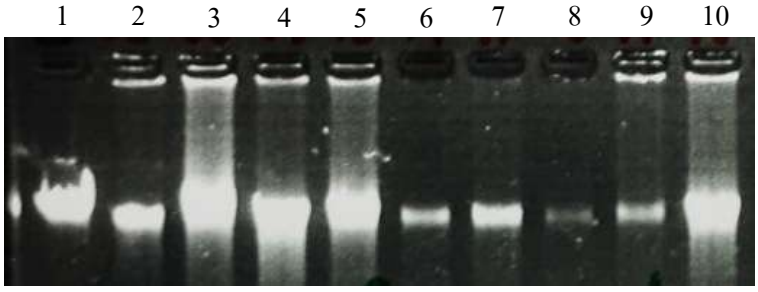
Oligo name	Sequence (5'→ 3')	Length	Tm
LT_AC_068_L	TGTCACACCCCAATTTCTGA	20	59.94
LT_AC_068_R	TTCAGATTGTGTAGGAATTTTATGAGA	27	59.91
LT_AC_100_L	CCCCGACTACACATCATCAA	20	59.37
LT_AC_100_R	TGTGCCCATAGTTTTCAGAGG	21	60.12
LT_AC_120_L	TCCGCAAAATCGTAATCCTC	20	60.04
LT_AC_120_R	GAAGCAGCCGAGTCAAAAAG	20	60.13
LT_AC_151_L	TTTGCCACTGCTAAAAACCA	20	59.34
LT_AC_151_R	CGGAAGATTGCCCACTAGAA	20	60.21
LT_AC_159_L	TGCTCCTGCAAACCTTTTCT	20	59.99
LT_AC_159_R	TTGAGCTTGGGAGGTAGCAT	20	59.84
LT_AC_172_L	AATTCTAAAAATGCAAATGCAAA	23	57.97
LT_AC_172_R	GCTTCGACTCACATTGAGGA	20	58.96
LT_AC_182_L	CCAAAATGTTCATAAGATAGGAGTTG	26	59.40
LT_AC_182_R	TCACACTAAGTTCATCATTTTCACA	25	58.73
LT_AC_193_L	GTGTCTCCTCGATTGCCTCT	20	59.41
LT_AC_193_R	ACCATCCTGCATCACCTTGT	20	60.39
LT_GT_004_L	TTGATTTATGGGGGTTGGTG	20	60.42
LT_GT_004_R	GGCCGTCCATTCTTGACTT	19	60.07
LT_GT_065_L	TAAGGGGATGGATGGTTCTG	20	59.74
LT_GT_065_R	GAAAAAGGCGCGAATAAACT	20	58.52
LT_GT_083_L	GCCTGGGGCCTATAATTTCT	20	59.42
LT_GT_083_R	TAAGCCCTCTGTAGCGCAGT	20	60.18
LT_GT_089_L	ATATGTGTTGCGCTCACTGC	20	59.90
LT_GT_089_R	ACGGGGTGTTGATACGCTAA	20	60.39
LT_GT_101_L	TTGCAGGTAGGGAGTTTTGG	20	60.10
LT_GT_101_R	CACCAAACAACCCCTCAATC	20	60.21
LT_GT_102_L	CCGGTGTCGTTCATCATTTA	20	59.40
LT_GT_102_R	TTCTATCGCTAATCCGTCGT	20	57.48
LT_GT_155_L	GAAAAACGGCACACGAAAAC	20	60.52
LT_GT_155_R	GCTTCTATAGTTGTTGTAAGGAGTGC	26	59.05
LT_GT_169_L	TGGAGTACAACTAGCGTGTTTTATG	25	59.68

ตารางที่ 18 (ต่อ)

Oligo name	Sequence (5'→ 3')	Length	Tm
LT_GT_169_R	CAGCCTTTGGTGACTCTTCC	20	59.84
LT_GT_170_L	TAGGGTGGAATTGGAAGTGC	20	59.53
LT_GT_170_R	CCCATTAACTTGCCCTATTTTT	22	58.51
LT_GT_196_L	CGGCTTCAGCTACAAGGCTA	20	60.67
LT_GT_196_R	CGCTCTATGTCGTGGGAAAT	20	60.10
LT_GT_222_L	ATTCGGCAGGAGGTAGAGGT	20	60.10
LT_GT_222_R	TCAGATCTGGTGCTGGTGAG	20	59.98
LT_GT_257_L	GCACAGTTGAGCAAACCAAG	20	59.49
LT_GT_257_R	CCAAACACCAAAGCCTCATT	20	59.97
LT_GT_287_L	ACAGTCGGGCAGCTGATTAT	20	59.72
LT_GT_287_R	TATTTTTCGGCTGCTGTCCT	20	59.85
LT_GT_296_L	ATACGAGCCGGAAGCATAAA	20	60.26
LT_GT_296_R	GAGTCAGTGAGCGAGGAAGC	20	60.21

ผลการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของโลดทะนงโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

1. ผลการสกัดดีเอ็นเอของตัวอย่างโลดทะนงที่ใช้ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของโลดทะนงโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

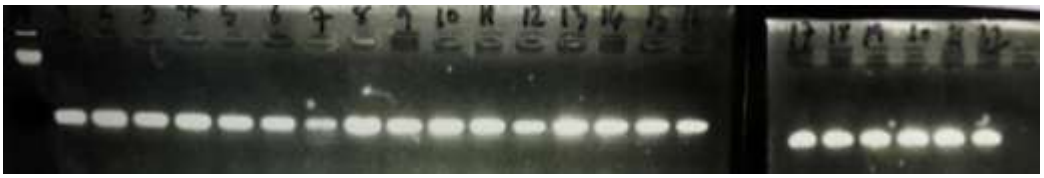


Lane 1 λ-DNA 100 ng/ µl
Lane 2 ตัวอย่าง LT03P
Lane 3 ตัวอย่าง LT06P
Lane 4 ตัวอย่าง LT08P
Lane 5 ตัวอย่าง LT13J
Lane 6 ตัวอย่าง LT14J
Lane 7 ตัวอย่าง LT15J
Lane 8 ตัวอย่าง LT16J
Lane 9 ตัวอย่าง L17J
Lane 10 ตัวอย่าง LT18J

ภาพที่ 20 แสดงผลการสกัด DNA จากตัวอย่างใบโลดทะนงที่ใช้ในโครงการ

จากภาพที่ 20 พบว่าความเข้มข้นของปริมาณการสกัด DNA ทั้ง 9 ตัวอย่าง มีความเข้มข้นมากกว่า 20 นาโนกรัม/ไมโครลิตร สามารถนำไปใช้ในขั้นตอน PCR Protocol ต่อไปได้

2. ผลการทำ PCR Protocol



ภาพที่ 21 แสดงตัวอย่างผลการทำ PCR Protocol ของตัวอย่างทั้งหมด 22 ตัวอย่าง โดยใช้ Primer ชื่อ LT_GT_083

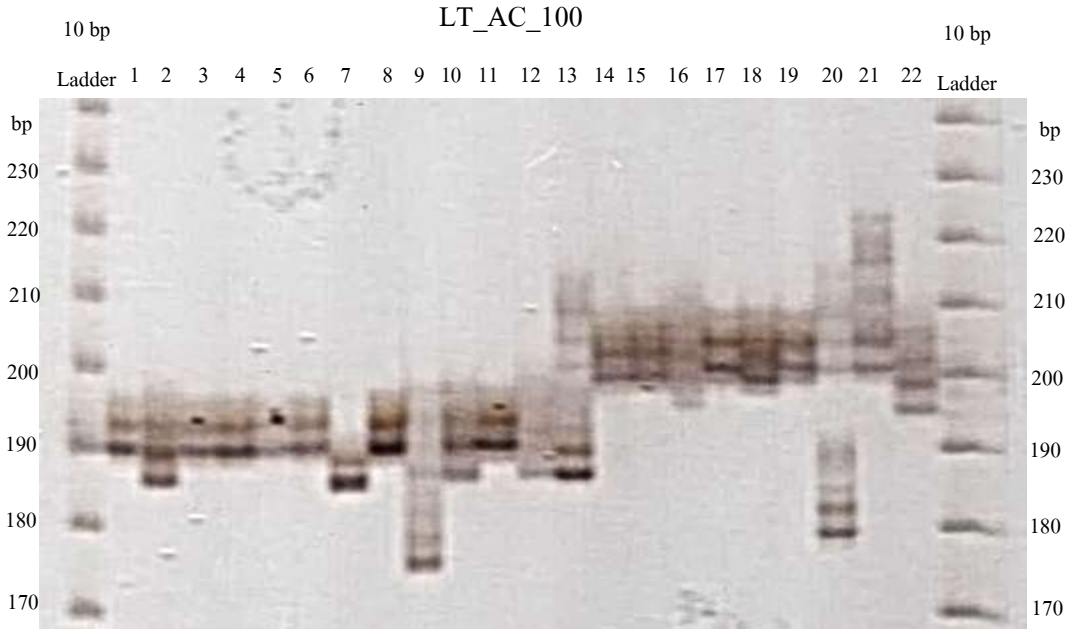
จากภาพที่ 21 พบว่า Primer ชื่อ LT_GT_083 สามารถทำให้ตัวอย่างทั้ง 22 ตัวอย่างเกิด Band ได้อย่างชัดเจน สามารถนำ DNA ที่ได้ไปใช้ในขั้นตอนการทำอิเล็คโตรโฟริซีสแบบเจลโพลีอะคริละไมด์ (Polyacrylamide Gel Electrophoresis: PAGE) ได้

3. ผลกากรทำการทำอิเล็คโตรโฟริซีสแบบเจลโพลีอะคริละไมด์ (Polyacrylamide Gel Electrophoresis: PAGE)

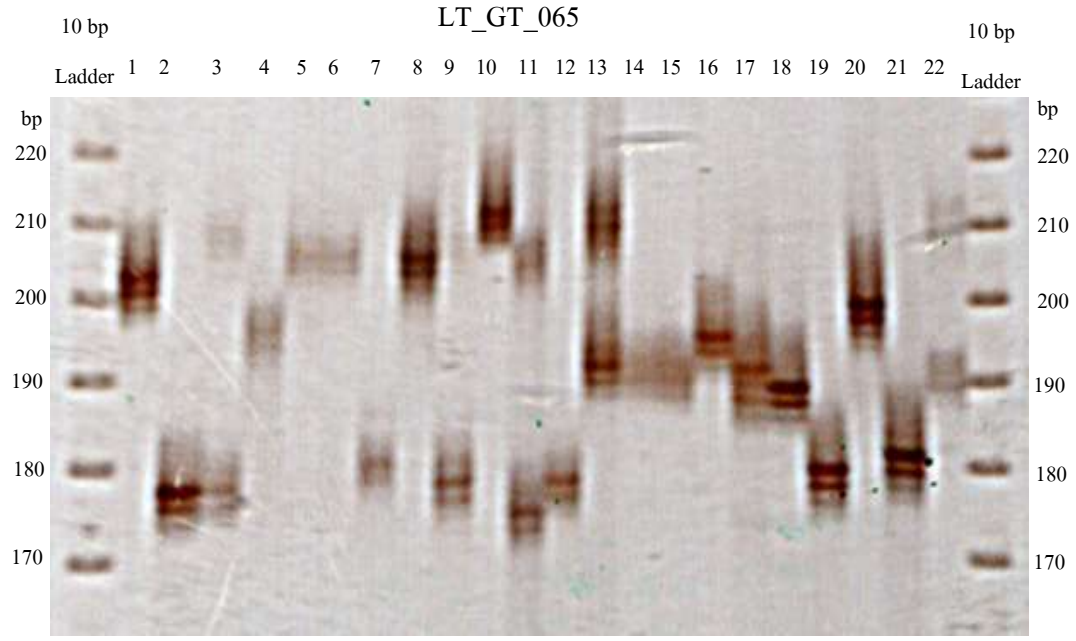
ทำการคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ จำนวน 13 คู่ (จาก 25 คู่) ได้แก่

1. ไพรเมอร์ที่ให้ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอเป็น Polymorphic Pattern จำนวน 3 คู่ ได้แก่ LT_AC_100, LT_GT_065 และ LT_GT_169

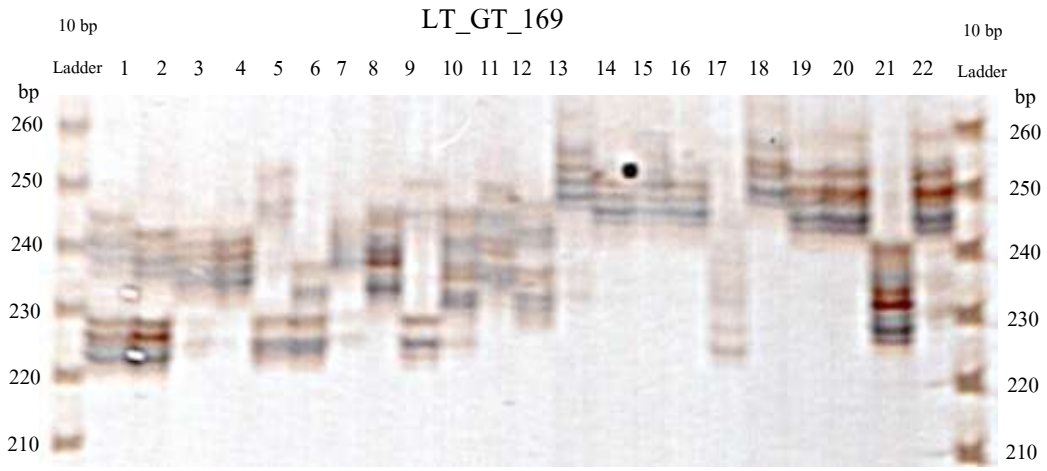
2. ไพรเมอร์ที่ให้ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอเป็น Monomorphic Pattern จำนวน 10 คู่ ได้แก่ LT_AC_006, LT_AC_018, LT_AC_068, LT_AC_120, LT_AC_172, LT_AC_182, LT_GT_083, LT_GT_170, LT_GT_222 และ LT_GT_257



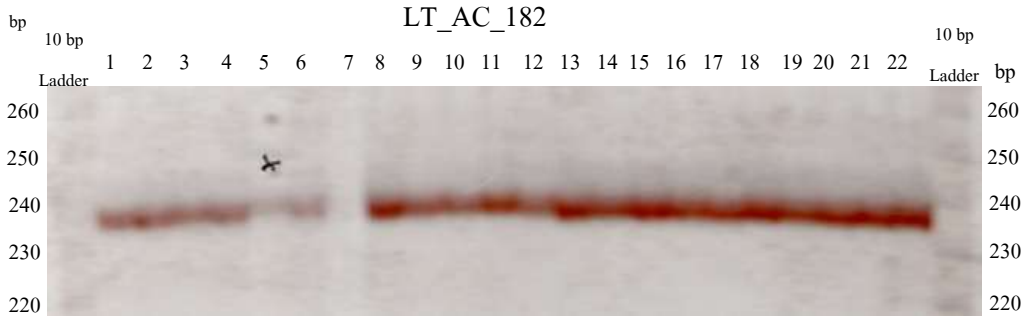
ภาพที่ 22 ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอของโลดทะนงของ primer LT_AC_100



ภาพที่ 23 ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอของโลดทะนงของ Primer LT_GT_065



ภาพที่ 24 ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอของโลดทะนงของ primer LT_GT_169



ภาพที่ 25 ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอของโลดทะนงของ primer LT_AC_182

สรุปผลการวิเคราะห์ข้อมูล

มีไพรเมอร์เพียง 3 คู่ ที่สามารถนำมาวิเคราะห์ข้อมูลได้ ดังตารางที่ 19 จากนั้นนำข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอโลดทะนงแดงที่ได้ มาวิเคราะห์กลุ่ม (Cluster Analysis) ด้วยวิธี UPGMA โดยใช้สัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม Simple Matching เพื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ภายในกลุ่มของโลดทะนงแดงที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ จากนั้นนำมาวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYSpc Version 2.11T (Exeter Software, Setanket, NY)

จากข้อมูลความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์จำนวนทั้งสิ้น 3 เครื่องหมาย พบจำนวนอัลลีลทั้งหมด 58 อัลลีล (เฉลี่ย 19.33 อัลลีลต่อไพรเมอร์) ค่า Tm อยู่ระหว่าง 58-60 องศาเซลเซียส ขนาดของอัลลีล อยู่ระหว่าง 170-260 bp ดังแสดงในตารางที่ 19

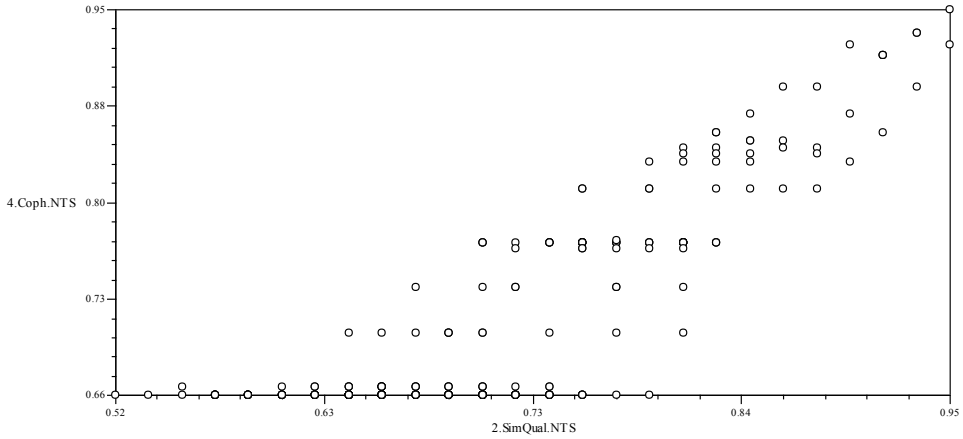
ตารางที่ 19 ไพรเมอร์ที่ใช้, จำนวนอัลลีล, ขนาดอัลลีล และ PIC ที่ได้จากการตรวจสอบในโลดทะนงแดง *(Trigonostemon reidioides* (Kurz) Craib) จำนวน 22 ตัวอย่าง

Locus	Motif	Allele size range (bp)	Sequence 5'→3'	TM	No.of alleles	PICs
LT_AC_100	$(TC)_4$ $(AC)_{12}$ $(TCA)_3$ $(GCA)_3$	170-230	F: CCCCGACTACACATCATCAA R: TGTGCCCATAGTTTTCAGAGG	59.37 60.12	19	0.82
LT_GT_065	$(AG)_{26}$ $(AG)_{21}$ $(AG)_3$ $(TG)_{10}$ $(ATT)_6$ $(TA)_3$ $(TTA)_3$	170-210	F: TAAGGGGATGGATGGTTCTG R: GAAAAAGGCGCGAATAAACT	59.74 58.52	21	0.90
LT_GT_169	$(AC)_{12}$ $(AT)_5$ $(AT)_8$ $(CA)_3$ $(CA)_4$ $(CA)_5$ $(TTA)_3$	220-260	F: TGGAGTACAACTAGCGTGTTTTATG R: CAGCCTTTGGTGACTCTTCC	59.68 59.84	18	0.88
Average					**19.33**	**0.87**

สำหรับค่า Polymorphism Information Contents (PICs) ที่ใช้ในการระบุความสามารถในการจำแนกความแตกต่างของไพรเมอร์ทั้ง 3 เครื่องหมาย ดังแสดงในตารางที่ 19 มีค่า 0.82 (LT_AC_100) 0.90 (LT_GT_065) และ 0.88 (LT_GT_16) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.87 แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ทั้ง 3 ชนิดมีความสามารถในการจำแนกความแตกต่างในระดับสูง (Yu, et al., 2012) โดยมีการระบุว่าค่า PICs จากไพรเมอร์ที่ให้ความสามารถในการจำแนกความแตกต่างในระดับสูงจะมีค่า

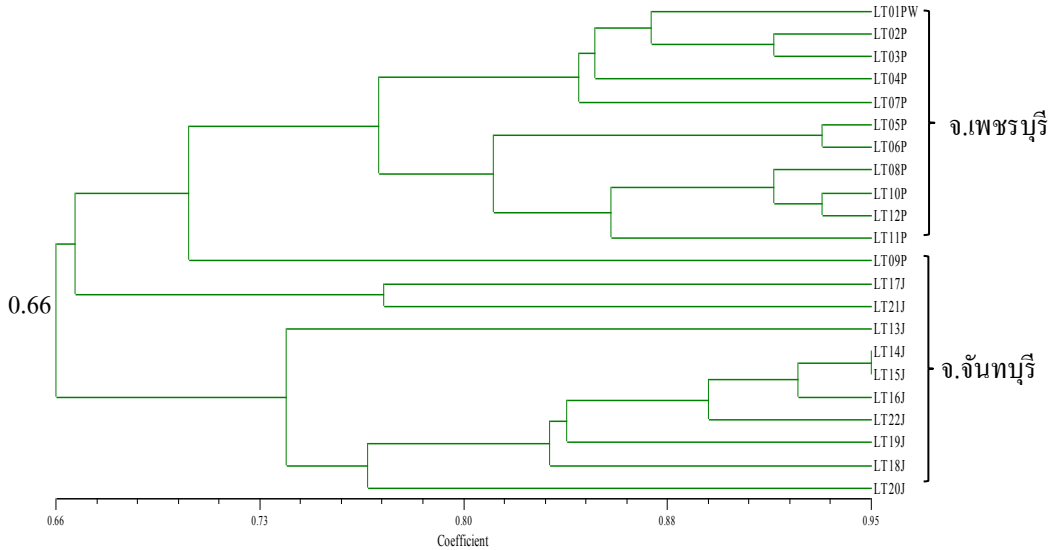
PICs>0.50 ให้ความสามารถในการจำแนกความแตกต่างระดับปานกลางเมื่อมีค่าอยู่ระหว่าง 0.25<PICs<0.50 และให้ความสามารถในการจำแนกความแตกต่างน้อยเมื่อมีค่า PICs<0.25

การจัดกลุ่มจากข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์ มีค่าสัมประสิทธ์ความเหมือน (ความคล้าย) ทางพันธุกรรม ระหว่างทุกจีโนไทป์ โดยเปรียบเทียบทีละคู่ โดยมีค่าประสิทธิภาพการจัดกลุ่มอยู่ระหว่าง 0.52 -1 ดังตารางที่ 15 และมีค่า Cophenetic Correlation Coefficient (r) ดังภาพที่ 26 มีหลักการวิเคราะห์ดังต่อไปนี้ คือค่า r จะมีค่าอยู่ในช่วง $-1 \leq r \leq 1$ ไม่มีหน่วย โดยที่แกน X คือค่า Similarity Coefficient แกน Y คือค่า Correlation Coefficient ถ้าค่า r มีค่าเป็นลบหมายความว่าค่า Similarity Coefficient และค่า Correlation Coefficient มีความสัมพันธ์แบบผกผันนั้นคือ ถ้าค่า Similarity Coefficient เพิ่มขึ้น ค่า Correlation Coefficient จะลดลงหรือถ้าค่า Similarity Coefficient ลดลง ค่า Correlation Coefficient จะเพิ่มขึ้นนั่นเอง และถ้าค่า r = -1 หมายความว่าค่า Correlation Coefficient และค่า Similarity Coefficient มีความผกผันกันอย่างสมบูรณ์ ถ้าค่า r มีค่าเป็นบวกหมายความว่าค่า Correlation Coefficient และค่า Similarity Coefficient มีความสัมพันธ์แบบทางเดียวกันและค่า r = 1 แสดงว่าตัวแปลทั้งสองมีความสัมพันธ์แบบทางเดียวกันอย่างสมบูรณ์ และถ้าค่า r = 0 หมายความว่าค่า Correlation Coefficient และค่า Similarity Coefficient ไม่มีความสัมพันธ์กันหรืออาจมีความสัมพันธ์กันในรูปแบบอื่น (ชัชวาล, 2543) และค่า Cophenetic Correlation Coefficient (r) สามารถดูได้จากค่า Matrix Correlation ซึ่งเป็นค่าที่บอกถึงผลการจัดกลุ่มว่าดีเพียงใด ซึ่งดูได้จากองศาของความเหมาะสม โดยที่ถ้า $r \geq 0.9$ ถือว่าเหมาะสมมาก ค่า $0.8 \leq r < 0.9$ ถือว่าเหมาะสม ค่า $0.7 \leq r < 0.8$ ถือว่าเหมาะสมน้อยและ $r < 0.7$ ถือว่าเหมาะสมน้อยมาก (Rohlf, 1992) ซึ่งการศึกษาครั้งนี้มีค่า Cophenetic Correlation Coefficient (r) มีค่าเท่ากับ 0.79 ซึ่งมีค่าเป็นบวกหมายความว่าค่า Correlation Coefficient และค่า Similarity Coefficient มีความสัมพันธ์กันแบบทางเดียวกันและแสดงให้เห็นว่ามีความสัมพันธ์กันแบบทางเดียวอย่างสมบูรณ์ แต่ถือได้ว่ามีความเหมาะสมน้อยสำหรับการวิเคราะห์ที่ศึกษาครั้งนี้ เนื่องมาจากจำนวนไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษามีน้อยเกินไป คือ คัดเลือกสังเคราะห์ได้เพียง 25 คู่ จาก 558 คู่ ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 4.5 และไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ 25 คู่ มีไพรเมอร์เพียง 3 คู่ ที่สามารถนำมาวิเคราะห์ข้อมูลได้ ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 12 ด้วยมีข้อจำกัดเรื่องค่าใช้จ่ายในการดำเนินการ ซึ่งสอดคล้องกับที่การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง



ภาพที่ 26 วิเคราะห์ค่า cophenetic correlation coefficient (r) โดยแผนภาพการกระจาย

จากข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการคำนวณแบบ Simple Matching และการจัดกลุ่มแบบ UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYS ของประชากรโลดทะนงจำนวน 22 ตัวอย่าง ดังภาพที่ 27 พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างที่มีความคล้ายกันน้อยที่สุด ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ ตัวอย่างรหัส LT01PW LT02P LT03P LT04P LT05P LT06P LT07P LT08P LT09P LT10 LT11P LT12P ซึ่งเป็นกลุ่มตัวอย่างที่เก็บมาจากพื้นที่อ่างเก็บน้ำห้วยยายลาว หมู่3 ต.สามพระยา จ.เพชรบุรี กับตัวอย่างรหัส LT13J LT14J LT15J LT16J LT17J LT18J LT19J LT20J LT21J LT22J ซึ่งเป็นกลุ่มตัวอย่างที่เก็บมาจากพื้นที่อุทยานแห่งชาติเขาสอยดาว ต.ทรายขาว จ.จันทบุรี โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายเท่ากับ 0.66 ทำให้สามารถแปลผลได้ว่า พื้นที่ที่เพาะปลูกต้นโลดทะนงที่แตกต่างกันทำให้มีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างชัดเจน



ภาพที่ 27 แผนภูมิต้นไม้จำลองที่ได้จากการคำนวณแบบ Simple Matching และการจัดกลุ่มแบบ UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYS ของประชากรโลดทะนงจำนวน 22 ตัวอย่าง

ตารางที่ 20 แสดงค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายที่ได้จากการคำนวณด้วยวิธี Simple Maching ของแต่ละคู่

	LT01PW	LT02P	LT03P	LT04P	LT05P	LT06P	LT07P	LT08P	LT09P	LT10P	LT11P	LT12P	LT13J	LT14J	LT15J	LT16J	LT17J	LT18J	LT19J	LT20J	LT21J	LT22J
LT01PW	1.00																					
LT02P	0.90	1.00																				
LT03P	0.84	0.91	1.00																			
LT04P	0.84	0.84	0.86	1.00																		
LT05P	0.79	0.76	0.74	0.78	1.00																	
LT06P	0.83	0.79	0.78	0.81	0.93	1.00																
LT07P	0.81	0.88	0.86	0.83	0.71	0.74	1.00															
LT08P	0.81	0.78	0.76	0.83	0.88	0.84	0.72	1.00														
LT09P	0.64	0.71	0.69	0.66	0.81	0.74	0.69	0.69	1.00													
LT10P	0.76	0.76	0.81	0.81	0.79	0.76	0.71	0.91	0.71	1.00												
LT11P	0.79	0.76	0.74	0.81	0.86	0.83	0.71	0.91	0.67	0.83	1.00											
LT12P	0.76	0.83	0.81	0.81	0.79	0.76	0.74	0.91	0.78	0.93	0.83	1.00										
LT13J	0.59	0.59	0.60	0.64	0.69	0.66	0.53	0.64	0.60	0.69	0.66	0.66	1.00									
LT14J	0.64	0.64	0.62	0.69	0.78	0.71	0.66	0.72	0.72	0.71	0.74	0.71	0.78	1.00								
LT15J	0.62	0.62	0.60	0.74	0.76	0.69	0.64	0.71	0.71	0.69	0.72	0.69	0.72	0.95	1.00							
LT16J	0.64	0.64	0.62	0.76	0.74	0.67	0.66	0.72	0.69	0.71	0.74	0.71	0.67	0.90	0.95	1.00						
LT17J	0.67	0.67	0.66	0.66	0.71	0.74	0.69	0.72	0.66	0.71	0.64	0.71	0.64	0.76	0.71	0.66	1.00					
LT18J	0.60	0.60	0.59	0.66	0.71	0.67	0.62	0.66	0.66	0.64	0.67	0.64	0.78	0.90	0.84	0.79	0.79	1.00				
LT19J	0.62	0.66	0.64	0.67	0.76	0.69	0.71	0.71	0.74	0.69	0.72	0.72	0.72	0.88	0.83	0.81	0.74	0.81	1.00			
LT20J	0.57	0.60	0.55	0.66	0.71	0.64	0.59	0.66	0.69	0.64	0.67	0.64	0.71	0.79	0.78	0.76	0.66	0.72	0.81	1.00		
LT21J	0.66	0.69	0.67	0.64	0.62	0.69	0.74	0.64	0.60	0.62	0.55	0.66	0.52	0.60	0.59	0.57	0.78	0.57	0.72	0.57	1.00	
LT22J	0.57	0.57	0.59	0.62	0.71	0.64	0.59	0.66	0.66	0.67	0.67	0.64	0.81	0.93	0.88	0.86	0.72	0.83	0.84	0.76	0.57	1.00

บทที่ 5
สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาวิจัยนี้ เป็นการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์และศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของโลดทะนงแดง เพื่อใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอสำหรับขึ้นทะเบียนพันธุ์ และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของโลดทะนงแดงที่นำมาใช้ในการผลิตยาสมุนไพร

โดยมีขั้นตอนตั้งแต่การสกัดใบโลดทะนงแดงที่ใช้เป็นต้นแบบในการศึกษา ทำการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์ ขั้นตอนเริ่มตั้งแต่การทำ Digestion และ DNA Purification การทำ Linker Ligation การทำ Hybridization (ทำปฏิกิริยาแบบ Double Hybridization) การทำ Amplification of Linker Ligated and Oligo DNA by Hybridized DNA การทำ Size Selection และ Gel Extraction Protocol การทำ Vector Ligation with pGEM®-T Easy Vector การทำ Bacterial Transformation of *E.coli* DH-5α Competent cell by Heat Shock Method การทำ Size Screening และ Sequencing และขั้นตอนการทำ SSR Finding และ Primer Design จากนั้นเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่ได้ไปตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของโลดทะนง ด้วยเทคนิคอิเล็คโตรโฟริซีสแบบเจลโพลีอะคริละไมด์ (Polyacrylamide Gel Electrophoresis: PAGE) แล้วนำข้อมูลรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (Pattern/Genotype) ที่ได้ มาทำการวิเคราะห์กลุ่ม (Cluster aAnalysis) ด้วยวิธี Unweighted Pair-Group Arithmetic Average (UPGAM) โดยใช้สัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม Simple Matching เพื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ภายในกลุ่ม จากนั้นนำมาวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYSpc Version 2.11T

พบว่า ได้ความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์ 3 เครื่องหมาย มีจำนวนอัลลีลทั้งหมด 58 อัลลีล ที่สามารถนำมาวิเคราะห์ข้อมูลได้ ได้แก่ LT_AC_100, LT_GT_065 และ LT_GT_169 โดยในแต่ละไพรเมอร์ให้อัลลีลแตกต่างกันตั้งแต่ 18-21 อัลลีล หรือเฉลี่ย 19.33 อัลลีลต่อไพรเมอร์ ค่า Tm (Melting Temperature) อยู่ระหว่าง 58-60 องศาเซลเซียส ขนาดของอัลลีล อยู่ระหว่าง 170-260 bp

สำหรับค่า PICs (Polymorphism Information Content) ที่ใช้ในการระบุความสามารถในการจำแนกความแตกต่างของไพรเมอร์ทั้ง 3 เครื่องหมาย มีค่า 0.82 (LT_AC_100) 0.90 (LT_GT_065) และ 0.88 (LT_GT_16) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.87 แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ทั้ง 3 ชนิดมีความสามารถในการจำแนกความแตกต่างในระดับสูง

ค่า Cophenetic Correlation Coefficient (r) มีค่าเท่ากับ 0.794 ซึ่งมีค่าเป็นบวกหมายความว่าค่า Correlation Coefficient และค่า Similarity Coefficient มีความสัมพันธ์กันแบบทางเดียวกันและแสดงให้เห็นว่ามีความสัมพันธ์กันแบบทางเดียวอย่างสมบูรณ์ แต่ถือได้ว่ามีความเหมาะสมน้อยสำหรับการวิเคราะห์ที่ศึกษาครั้งนี้

และการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการคำนวณแบบ Simple Matching และการจัดกลุ่มแบบ UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYS ของประชากรโลดทะนงจำนวน 22 ตัวอย่าง พบว่า

สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างที่มีความคล้ายกันน้อยที่สุด ออกเป็น 2 กลุ่มอย่างชัดเจน คือ ตัวอย่างรหัส LT01PW LT02P LT03P LT04P LT05P LT06P LT07P LT08P LT09P LT10 LT11P LT12P ซึ่งเป็นกลุ่มตัวอย่างที่เก็บมาจากพื้นที่อ่างเก็บน้ำห้วยยายลาว หมู่3 ต.สามพระยา จ.เพชรบุรี กับตัวอย่างรหัส LT13J LT14J LT15J LT16J LT17J LT18J LT19J LT20J LT21J LT22J ซึ่งเป็นกลุ่มตัวอย่างที่เก็บมาจากพื้นที่อุทยานแห่งชาติเขาสอยดาว ต.ทับไทร จ.จันทบุรี โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้าย (Similarity Coeffient) เท่ากับ 0.66

การอภิปรายผล

มีไพรเมอร์เพียง 3 คู่ ที่สามารถนำมาวิเคราะห์ข้อมูล โดยมีค่า Polymorphism Information Contents (PICs) ที่ใช้ในการระบุความสามารถในการจำแนกความแตกต่างของไพรเมอร์ทั้ง 3 เครื่องหมาย มีค่า 0.82 (LT_AC_100) 0.90 (LT_GT_065) และ 0.88 (LT_GT_16) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.87 แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ทั้ง 3 ชนิดมีความสามารถในการจำแนกความแตกต่างในระดับสูง (Yu, et al., 2012) โดยมีการระบุว่าค่า PICs จากไพรเมอร์ที่ให้ความสามารถในการจำแนกความแตกต่างในระดับสูงจะมีค่า PICs>0.50 ให้ความสามารถในการจำแนกความแตกต่างระดับปานกลางเมื่อมีค่าอยู่ระหว่าง 0.25<PICs<0.50 และให้ความสามารถในการจำแนกความแตกต่างน้อยเมื่อมีค่า PICs<0.25

มีค่า Cophenetic Correlation Coefficient (r) เท่ากับ 0.79 ซึ่งมีค่าเป็นบวกหมายความว่าค่า Correlation Coefficient และค่า Similarity Coefficient มีความสัมพันธ์กันแบบทางเดียวกัน และแสดงให้เห็นว่ามีความสัมพันธ์กันแบบทางเดียวอย่างสมบูรณ์ แต่ถือได้ว่ามีความเหมาะสมน้อยสำหรับการวิเคราะห์ที่ศึกษาครั้งนี้ โดยหลักการวิเคราะห์ดังต่อไปนี้ คือค่า r จะมีค่าอยู่ในช่วง $-1 \leq r$

≤ 1 ไม่มีหน่วย โดยที่แกน X คือค่า Similarity Coefficient แกน Y คือค่า Correlation Coefficient ถ้าค่า r มีค่าเป็นลบหมายความว่าค่า Similarity Coefficient และค่า Correlation Coefficient มีความสัมพันธ์แบบผกผันนั้นคือ ถ้าค่า Similarity Coefficient เพิ่มขึ้น ค่า Correlation Coefficient จะลดลงหรือถ้าค่า Cimilarity Coefficient ลดลง ค่า Correlation Coefficient จะเพิ่มขึ้นนั่นเองและถ้าค่า $r = -1$ หมายความว่าค่า Correlation Coefficient และค่า Cimilarity Coefficient มีความผกผันกันอย่างสมบูรณ์ ถ้าค่า r มีค่าเป็นบวกหมายความว่าค่า Correlation Coefficient และค่า Similarity Coefficient มีความสัมพันธ์แบบทางเดียวกันและค่า $r = 1$ แสดงว่าตัวแปลทั้งสองมีความสัมพันธ์แบบทางเดียวกันอย่างสมบูรณ์ และถ้าค่า $r = 0$ หมายความว่าค่า Correlation Coefficient และค่า Similarity Coefficient ไม่มีความสัมพันธ์กันหรืออาจมีความสัมพันธ์กันในรูปแบบอื่น (ชัชวาล, 2543) และค่า Cophenetic Correlation Coefficient (r) สามารถดูได้จากค่า Matrix Correlation ซึ่งเป็นค่าที่บอกถึงผลการจัดกลุ่มว่าดีเพียงใด ซึ่งดูได้จากองศาของความเหมาะสม โดยที่ถ้า $r \geq 0.9$ ถือว่าเหมาะสมมาก ค่า $0.8 \leq r < 0.9$ ถือว่าเหมาะสม ค่า $0.7 \leq r < 0.8$ ถือว่าเหมาะสมน้อย และ $r < 0.7$ ถือว่าเหมาะสมน้อยมาก (Rohlf, 1992) เนื่องมาจากจำนวนไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษามีน้อยเกินไป คือ คัดเลือกสังเคราะห์ได้เพียง 25 คู่ จาก 558 คู่ ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 4.5 และไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ 25 คู่ มีไพรเมอร์เพียง 3 คู่ ที่สามารถนำมาวิเคราะห์ข้อมูลได้ ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 12 ด้วยมีข้อจำกัดเรื่องค่าใช้จ่ายในการดำเนินการ ซึ่งสอดคล้องกับที่การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการคำนวณแบบ Simple Matching และการจัดกลุ่มแบบ UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYS ของประชากรโลดทะนงจำนวน 22 ตัวอย่าง สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างที่มีความคล้ายกันน้อยที่สุด ออกเป็น 2 กลุ่มอย่างชัดเจน โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้าย (Similarity Coeffient) เท่ากับ 0.66 ทำให้สามารถแปลผลได้ว่า พื้นที่ที่เพาะปลูกต้นโลดทะนงที่แตกต่างกันทำให้มีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างชัดเจน

จากการสรุปผลการศึกษาวิจัยที่กล่าวมาข้างต้น ได้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 3 เครื่องหมาย ซึ่งถือว่าเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการศึกษาลักษณะทางโมเลกุลพืชในวงศ์ Euphorbiaceae ถือว่าบรรลุวัตถุประสงค์สามารถใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอสำหรับขึ้นทะเบียนพันธุ์ และนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของโลดทะนงแดงที่นำมาใช้ในการผลิตยาสมุนไพรได้

ข้อเสนอแนะ

1. จากการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์ของโลดทะนงแดง ในการวิจัยครั้งนี้ถือว่ามีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นเครื่องหมายในการจำแนกและศึกษาความหลายหลายทางพันธุกรรมได้ แต่ยังพบว่ามีไพรเมอร์ที่เหมาะสมสามารถนำไปสังเคราะห์ได้อีก 533 คู่ ที่สามารถใช้ในการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อทำให้ค่าทางสถิติดีขึ้นและได้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์เพิ่มมากขึ้นด้วยเช่นกัน

2. สำหรับตัวอย่าง ควรมีการเก็บตัวอย่างที่มีความหลายหลาย ทั้งสายพันธุ์ของโลดทะนงและพื้นที่ในแต่ละแหล่งที่ทำการเก็บตัวอย่าง ให้ชัดเจนและเหมาะสม เนื่องจากผลการทดลองพบว่าพื้นที่มีผลต่อการจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรม

บรรณานุกรม

คเณศ เต็มไตรรัตน์ และโอภา วัชระคุปต์. (2541). **ผลของสารสกัดจากรากต้นโลดทะนงต่อพิษงูเห่าไทย**. ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

ชัชวาลย์ เรืองประพันธ์. (2543). **สถิติพื้นฐาน (ฉบับปรับปรุง ครั้งที่ 5)**. ขอนแก่น:คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ฐานข้อมูลเครื่องยาสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. (ม.ป.ป.).**โลดทะนงแดง**. ค้นเมื่อวันที่ 14 มีนาคม 2559.
จาก http://www.thaicrudedrug.com/ main.php?action=viewpage&pid=123

ฐิติกา กิจพิพิธและภูวดล ธนะเกียรติไกร. (2556). การตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอเพื่อระบุชนิดของสัตว์ป่าในงานนิติวิทยาศาสตร์. **วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ**, 23(3), 727-740.

นุชจรี วัชรวงษ์ไพบูลย์. (2550). **การพัฒนาและจำแนกลักษณะดีเอ็นเอ เครื่องหมายชนิด Microsatellite ในแตงกวา [Cucumis sativus L.] และการวิเคราะห์เปรียบเทียบต้นทุนการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม**. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พิสสวรรณ เจียมสมบัติ. (2531). **อิเลคโตรโฟรีซีส.** ในเอกสารประกอบการฝึกอบรมทางวิชาการ **“เทคนิคทางอิเลคโตรโฟรีซีสในการจำแนกพันธุ์พืช”. ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม, 18-22 กรกฎาคม 2531.**

ฤทธิ์ วัฒนชัยยิ่งเจริญ. (2553). **การวิเคราะห์ความหลากหลายของพืชด้วยวิธีอณูชีววิทยา**. กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล.(2545).ในปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี.(น.22-38) **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ**. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อมรรัตน์ มงคลพร.(2548).**เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการปรับปรุงพันธ์พืช**.กรุงเทพฯ: จรัญสนิทวงศ์ การพิมพ์.

Billotte, N., Risterucci, A.M., Barcelos, E., Noyer, J.L., Amblard, P., Baurens, F.C. (2001). Development, characterisation, and across-taxa utility of oil palm (Elaeis guineensis Jacq.) microsatellite markers. **Genome**. 44: 413–425.

Boonsrangsom, T., Pongtongkam, P., Masuthon, S. & Peyachoknagull, S. (2008). Development of microsatellite markers for Dendrobium orchids. **Thai J. Genet.** 1:47-56.

Burns, M.J., Edwards, K.J., Newbury, H.J., Ford-Lloyd, B.V., Baggott, C.D. (2001). Development of simple sequence repeat (SSR) markers for the assessment of gene flow and genetic diversity in pigeonpea (Cajanuscajan). **Molecular Ecology Notes**. 1(4):283-285.

Butcher, P.A., Decroocq, S., Gray, Y., Moran, G.F. (2000). Development inheritance and cross-species amplification of microsatellite markers from Acacia mangium. **Theoretical and Applied Genetics**. 101:1282-1290.

Campbell, J. R., Hlavka,D. L., Welton,E. J., Flynn,C. J., Turner, D. D., Spinhirne, J. D., Scott, V. S., Hwang, I. H. (2002). Full-time, eye-safe cloud and aerosol lidar observation at Atmospheric Radiation Measurement Program sites: Instruments and data processing, **J. Atmos. Oceanic Technol.** 19: 431 – 442.

Cotrim, H. C., F. A. Monteiro, E. S. Sousa, M. F. Fay, M. W. Chase & M. S. Pais. (2008). Isolation and characterization of novel polymorphic nuclear microsatellite markers from Ophrys fusca (Orchidaceae) and cross-species amplification, **Conserv Genet**. 10: 739-742.

Doyle JJ, Doyle JL. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue.**Phytochem Bull.** 19:11-15.

Gupta, P.K., Balyan, H.S., Sharma, P.C., Ramesh, B. (1996). Microsatellites in plants: A new class of molecular markers. **Curr Sci**. 70: 45-54.

Gupta, P.K., Varshney, R.K. (2000). The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. **Euphytica.** 113(3): 163-185.

He, G., Meng, R., Newman, M., Gao, G., Pittman, R.N., Prakash, C.S. (2003). Microsatellites as DNA markers in cultivated peanut (Arachis hypogaea L.). **BMC Plant Biol**. 3: 3–9.

Hubert, S., Hedgecock, D. (2004). Linkage Maps of Microsatellite DNA Markers for the Pacific Oyster Crassostreagigas. **Genetics.** 168(1): 351-362.

Lagercrantz, U., Ellegren, H., Andersson, L. (1993). The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. **Nucleic Acids Research**. 21(5): 1111-1115.

Levinson, G., Gutman, G.A. (1987). Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. **MolBiolEvol.** 4: 203-221.

Martins, W.S., Lucas, D.C,, Neves, K.F,, Bertioli, D.J. (2009). WebSat a web software for microsatellite marker development. **Bioinformation.** *3*(6):282-283.

Morgante, M., Hanafey, M., Powell, W. (2002). Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Nat Genet.** 30: 194-200.

Morgante, M., Olivieri, A.M. (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal.** 3(1): 175-182.

Nadir, E., Margalit, H., Gallily, T., Ben-Sasson, S.A. (1996). Microsatellite spreading in the human genome: evolutionary mechanisms and structural implications. **Proc Natl Acad Sci USA**. 93: 6470-6475.

Newton, C. R. and Graham, A. (1997). **PR 2. BIOS Scientific Publishers Limited.** UK. 192p.

Nunome, T., Negoro, S., Miyatake, K., Yamaguchi, H., Fukuoka, H. (2006). A Protocol for the Construction of Microsatellite Enriched Genomic Library. **Plant Molecular Biology Reporter.** 24: 305-12.

Richard, G.F., Paques, F. (2000). Mini and microsatellite expansions: the recombination connection. **EMBO Rep**. *1*(2): 122-6.

Rohlf, F. (1992). **NTSYS-pc-Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. version 2.0.** New York:Exeter Software.

Sekino, M., Hara, M. (2007). Linkage maps for the Pacific abalone (genus Haliotis) based on microsatellite DNA markers. **Genetics**. *175*(2): 945-958.

Semagn, K., Bjørnstad, Å., Ndjiondjop, M.N. (2006). An overview of molecular marker methods for plants. **African Journal of Biotechnology.** 5: 2540-2568.

Squirrell, J., Hollingsworth, P.M., Woodhead, M., Russell, J., Lowe, A.J., Gibby., M, et al. (2003). How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants?. **Molecular Ecology.** *12*(6): 1339-1348.

Tautz, D., Trick, M., Dover, G.A. (1986). Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. **Nature.** 322(6080): 652-656.

Tangphatsornruang, S., Sraphet, S., Singh, R., Okogbenin, E., Fregene, M., Triwitayakorn, K. (2008). Development of polymorphic markers from expressed sequence tags of *Manihotesculenta* Crantz. **Molecular Ecology Resources.** 8(3): 682-685.

Tempeam, A., Thasana, N., Thavornkitcharat, A., et al. (2002). ln vitro cytotoxicity of some thai medicinal plants and daphnane diterpenoid from Trigonostemon redioides. **Mahidol University Journal of Pharmaceutical Science.** 29(3-4): 25-31.

Tempeam, A., Thasana, N., Pavaro, C., et al. (2005). A newcytotoxic daphnane diterpenoid, rediocide G, from Trigonostemon reidioides. **Chem. Pharm. Bull.** 53(10): 1321-1323.

Varshney, R.K., Kumar, A., Balyan, H.S., Roy, J.K., Prasad, M., Gupta, P.K. (2000). Characterization of microsatellites and development of chromosome specific STMS markers in bread wheat. **Plant Molecular Biology Reporter.** 18(3): 299-301.

Varshney, R.K., Sigmund, R., Brner, A., Korzun, V., Stein, N., Sorrells, M.E., et al. (2005). Interspecific transferability and comparative mapping of barley EST-SSR markers in wheat, rye and rice. **Plant Science.** 168(1): 195-202.

Wang, Z., Weber, J.L., Zhong, G., Tanksley, S.D. (1994). Survey of plant short tandem DNA repeats. **Theoretical and Applied Genetics.** 88(1): 1-6.

Yu, J. Z., Fang, D. D., Kohel, R. J., Ulloa, M., Hinze, L. L., Percy, R. G., and Jones, D. C. (2012).

Development of a core set of SSR markers for the characterization of Gossypium germplasm. **Euphytica.** 187: 203-213.

Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**. 11(1):1-16.

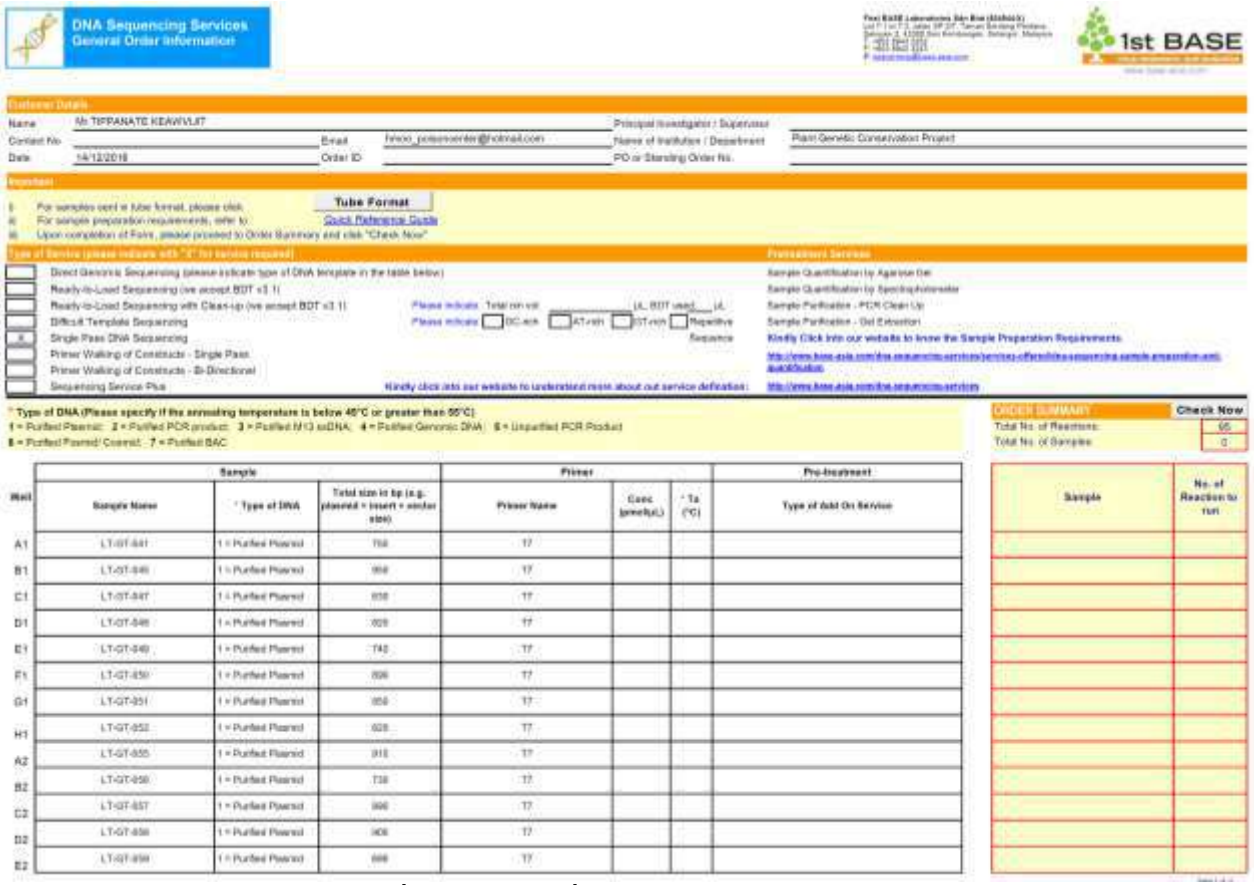
Zeng H, Hawrot E. (2002) NMR - based binding screen and structural analysis of the complex formed between α 1 - cobratoxin and an 18-Mer cognate peptide derived from the α 1subunit of the nicotinic acetylcholine receptor from Torpedo californica. **J Bio Chem.** (277): 37439-37445.

Zhan, A., Bao, Z., Hu, X., Lu, W., Hu, J. (2009). Methods comparison for microsatellite marker development: Different isolation methods, different yield efficiency. **Journal of Ocean University of China (English Edition).** 8(2): 161-5.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
แบบฟอร์มที่ใช้ในการส่ง DNA sequencing

แบบฟอร์มที่ใช้ในการส่ง DNA Sequencing


DNA Sequencing Services
General Order Information

1st BASE

Customer Details

Name: Mr TIPPANATE KEAWVILIT
Contact No.:
Date: 14/12/2018
E-mail: hhoo_poisonwriter@hotmail.com
Order ID:
Principal Investigator / Supervisor:
Name of Institution / Department: Plant Genetic Conservation Project
PO or Standing Order No.:

Instruction

i. For samples sent in tube format, please click: Tube Format
ii. For sample preparation requirements, refer to: Quick Reference Guide
iii. Upon completion of Form, please proceed to Order Summary and click "Check Now"

Type of Service (please indicate with "X" for service required)

- Direct Genomic Sequencing (please indicate type of DNA template in the table below)
- Ready-to-Load Sequencing (we accept BDT v3.1)
- Ready-to-Load Sequencing with Clean-up (we accept BDT v3.1)
- Difficult Template Sequencing
- X Single Pass DNA Sequencing
- Primer Walking of Constructs - Single Pass
- Primer Walking of Constructs - Bi-Directional
- Sequencing Service Plus

Please indicate Total rxn vol: ____ (dL BDT used: ____ dL
Please indicate GC-rich AT-rich GT-rich Repetitive Sequence
Kindly click onto our website to understand more about our service definition:

Purification Services

Sample Quantification by Agarose Gel
Sample Quantification by Spectrophotometer
Sample Purification - PCR Clean Up
Sample Purification - Gel Extraction
Kindly Click into our website to know the Sample Preparation Requirements

* Type of DNA (Please specify if the annealing temperature is below 46°C or greater than 55°C)
1 = Purified Plasmid; 2 = Purified PCR product; 3 = Purified M13 ssDNA; 4 = Purified Genomic DNA; 5 = Unpurified PCR Product
6 = Purified Plasmid Cosmid; 7 = Purified BAC

ORDER SUMMARY — Check Now
Total No. of Reactions: 95
Total No. of Samples: 0

Well	Sample Name	* Type of DNA	Total size in bp (e.g. plasmid + insert + vector size)	Primer Name	Conc. (pmol/µL)	* Ta (°C)	Pre-treatment Type of Add On Service
A1	LT-GT-841	1 = Purified Plasmid	758	T7			
B1	LT-GT-846	1 = Purified Plasmid	958	T7			
C1	LT-GT-847	1 = Purified Plasmid	858	T7			
D1	LT-GT-848	1 = Purified Plasmid	809	T7			
E1	LT-GT-849	1 = Purified Plasmid	740	T7			
F1	LT-GT-850	1 = Purified Plasmid	896	T7			
G1	LT-GT-851	1 = Purified Plasmid	858	T7			
H1	LT-GT-852	1 = Purified Plasmid	828	T7			
A2	LT-GT-855	1 = Purified Plasmid	918	T7			
B2	LT-GT-856	1 = Purified Plasmid	738	T7			
C2	LT-GT-857	1 = Purified Plasmid	886	T7			
D2	LT-GT-858	1 = Purified Plasmid	908	T7			
E2	LT-GT-859	1 = Purified Plasmid	888	T7			

Sample	No. of Reaction to run

ภาพที่ 1 แบบฟอร์มที่ใช้ในการส่ง DNA Sequencing

ภาคผนวก ข
วิธีการเก็บตัวอย่างใบโลดทะนง

วิธีการเก็บตัวอย่างใบโลดทะนง

1. ใช้กรรไกรหรือของมีคม ตัดใบอ่อนที่คลี่กางเต็มใบ หรืออาจตัดกิ่งที่มีใบอ่อนอยู่ปลายกิ่ง แล้วใช้สำลีชุบน้ำพันรอบโคนใบหรือโคนกิ่งที่ถูกตัด เพื่อรักษาความสดไว้

2. นำตัวอย่างใบพืชที่ตัดมาใส่ในถุงพลาสติก พับปิดปากถุงระวังอย่าให้น้ำเข้าในถุงได้

3. เก็บตัวอย่างใส่กล่องโฟม โดยเทน้ำแข็งรองพื้นกล่องไว้แล้ววางตัวอย่างไว้บนน้ำแข็ง จากนั้นเทน้ำแข็งที่เหลือคลุมปิดทับตัวอย่าง เพื่อให้ความเย็นกระจายได้ทั่วกัน ซึ่งจะช่วยรักษาความสดของตัวอย่างไว้ และต้องระวังอย่าให้มีน้ำหนักกดทับมาก เพราะจะทำให้ตัวอย่างช้ำเสียหายได้

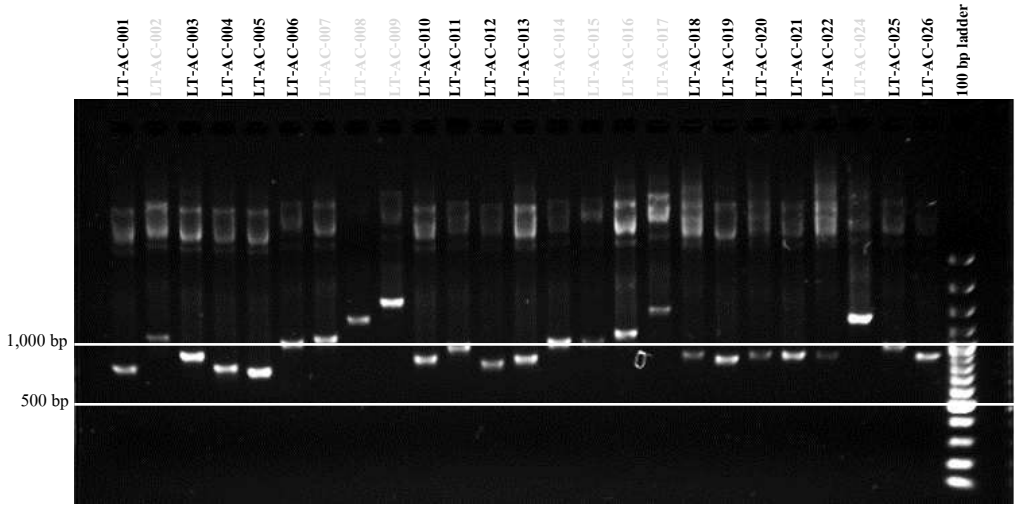
4. ตัวอย่างใบที่เก็บมาแช่ไว้ในน้ำแข็งสามารถรักษาความสดได้ประมาณ 1-2 วัน ควรรีบนำตัวอย่างส่งห้องปฏิบัติการโดยเร็ว

ภาคผนวก ค

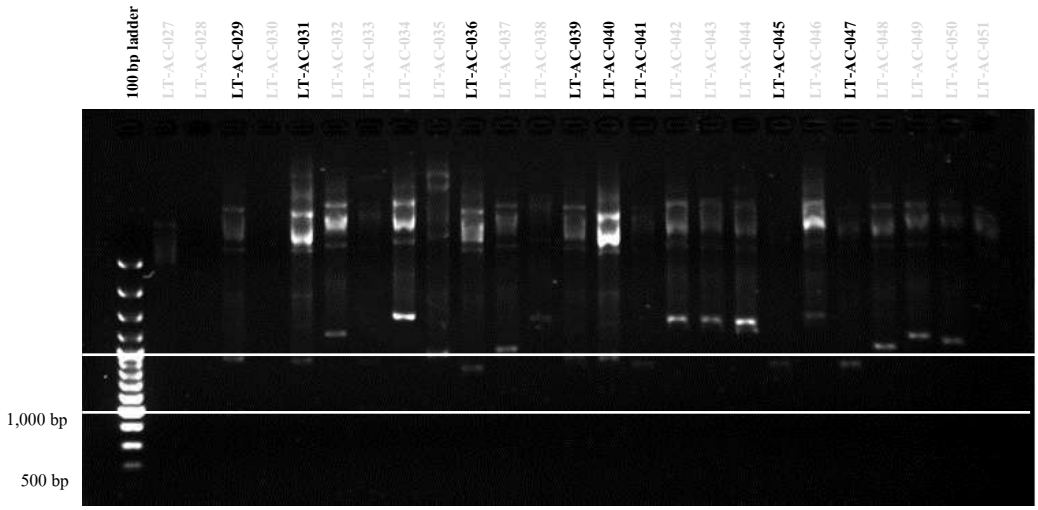
ผลการทำ Colony PCR

และผลการเช็คความเข้มข้นของ Plasmid ที่สกัดได้

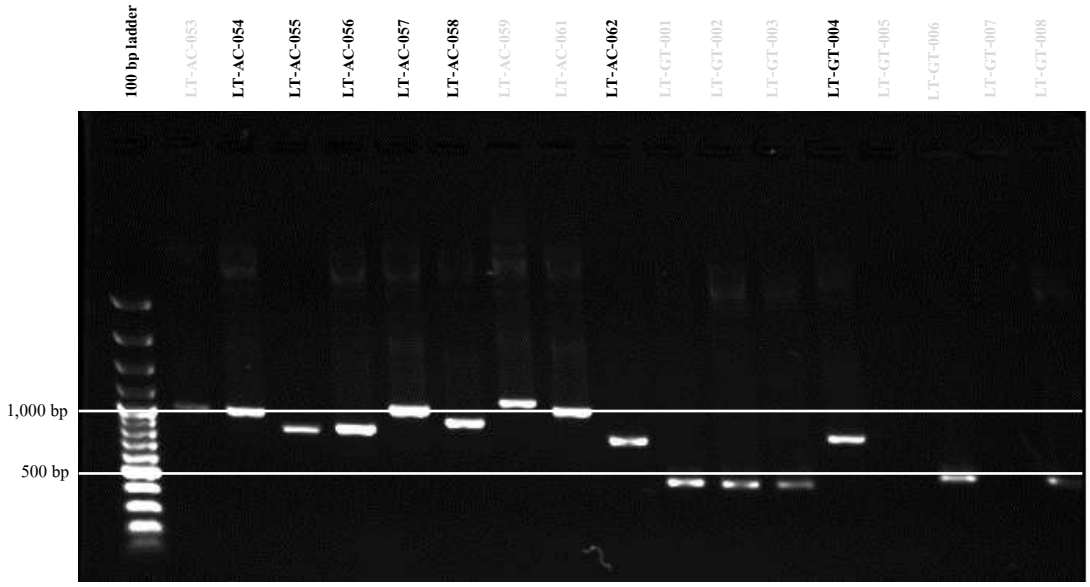
ผลการทำ Colony PCR



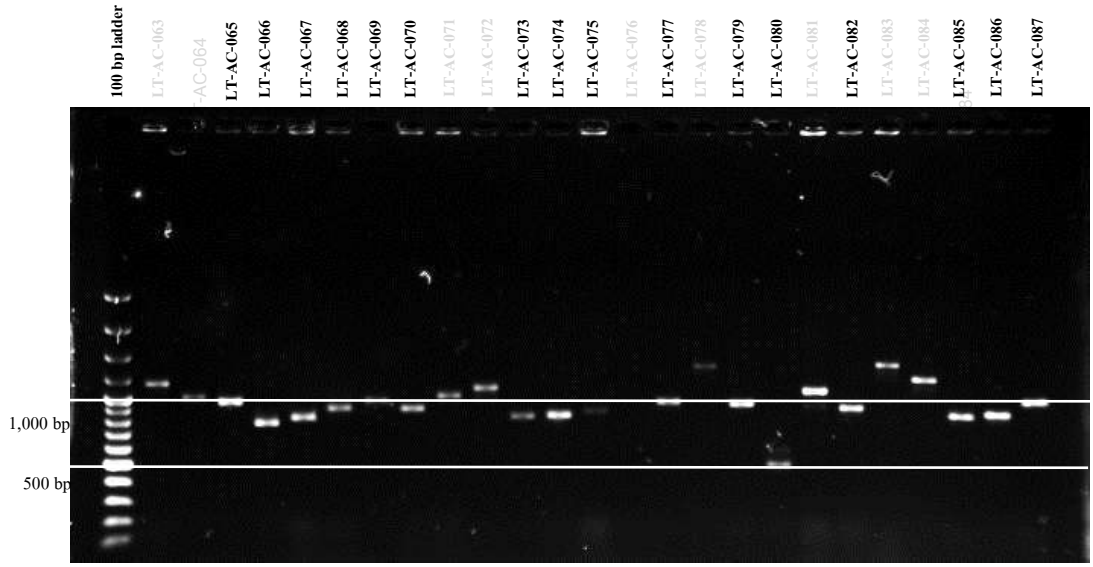
ภาพที่ 2 Colony PCR No. LT-AC-001 – 026



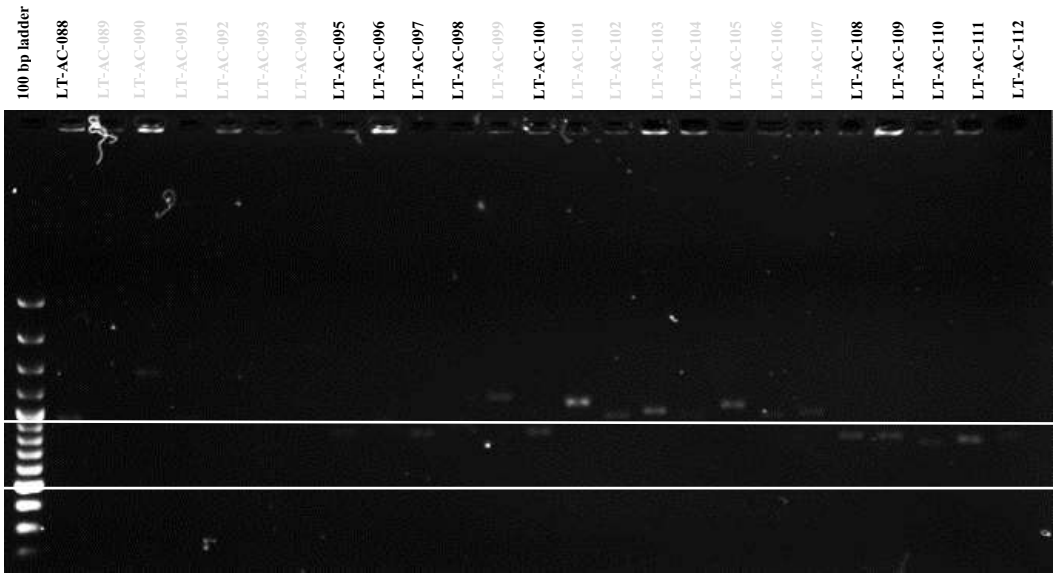
ภาพที่ 3 Colony PCR No. LT-AC-027 - 051



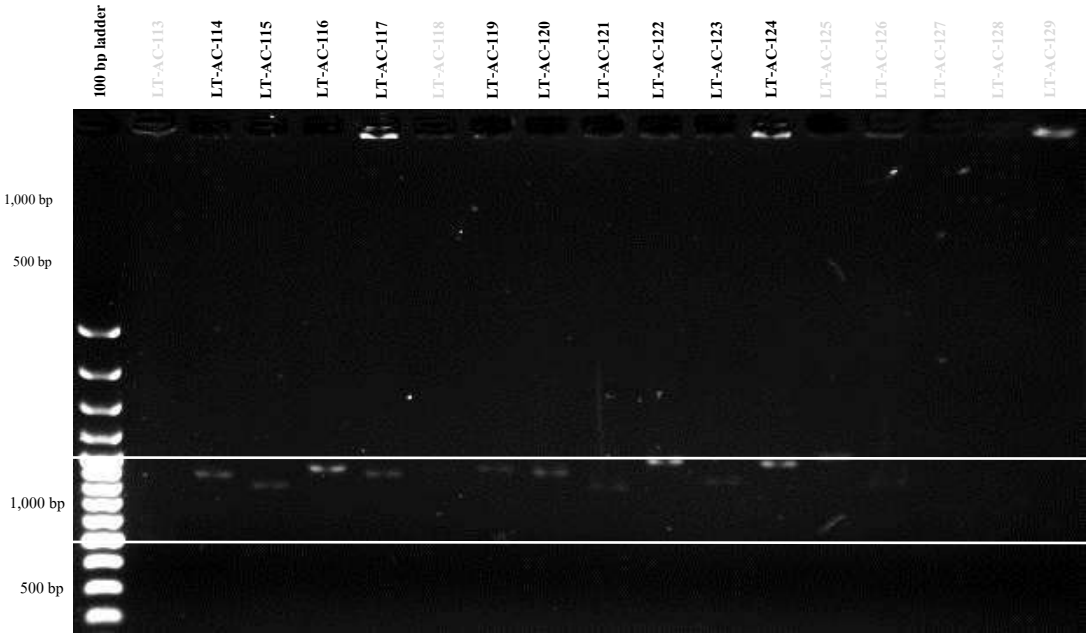
ภาพที่ 4 Colony PCR No. LT-AC 053 - 062และ LT-GT 001 – 008



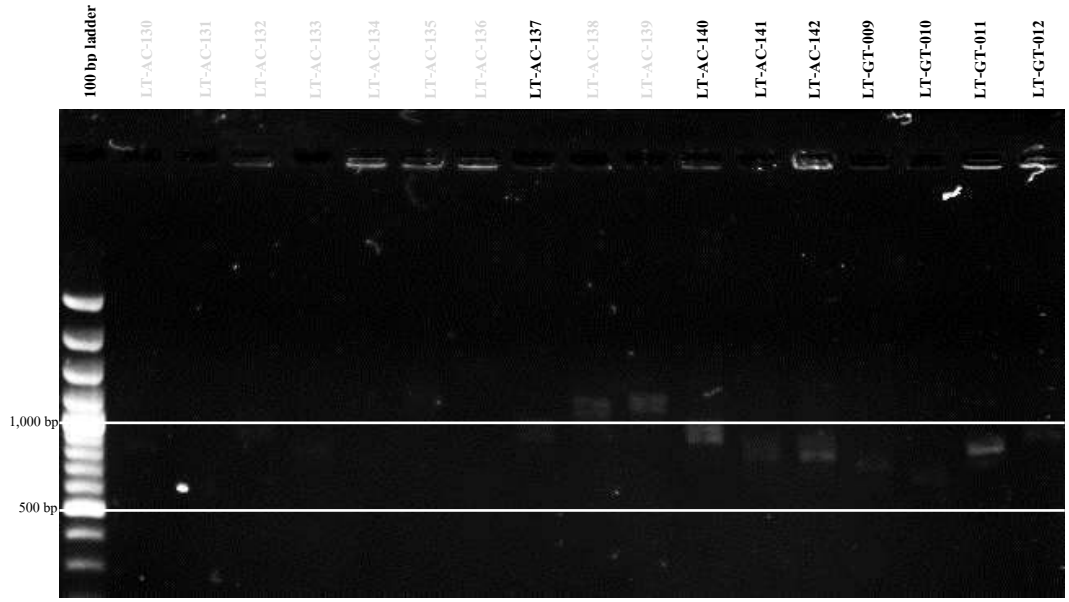
ภาพที่ 5 Colony PCR No. LT-AC 063 - 087



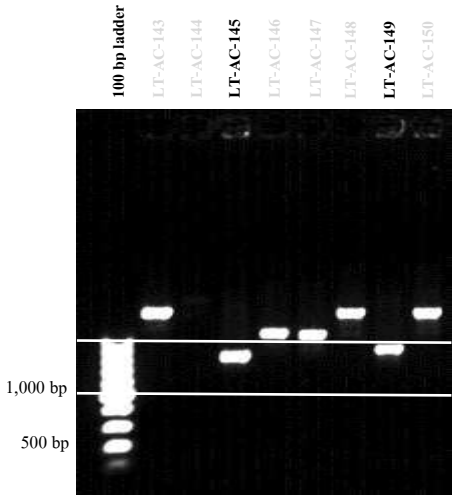
ภาพที่ 6 Colony PCR No. LT-AC 088 – 112



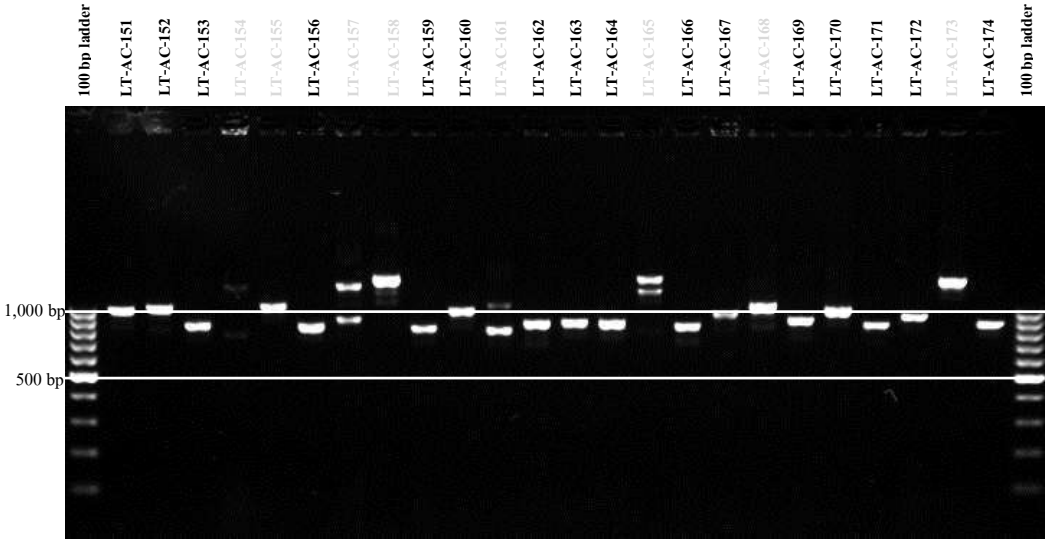
ภาพที่ 7 Colony PCR No. LT-AC 113 - 129



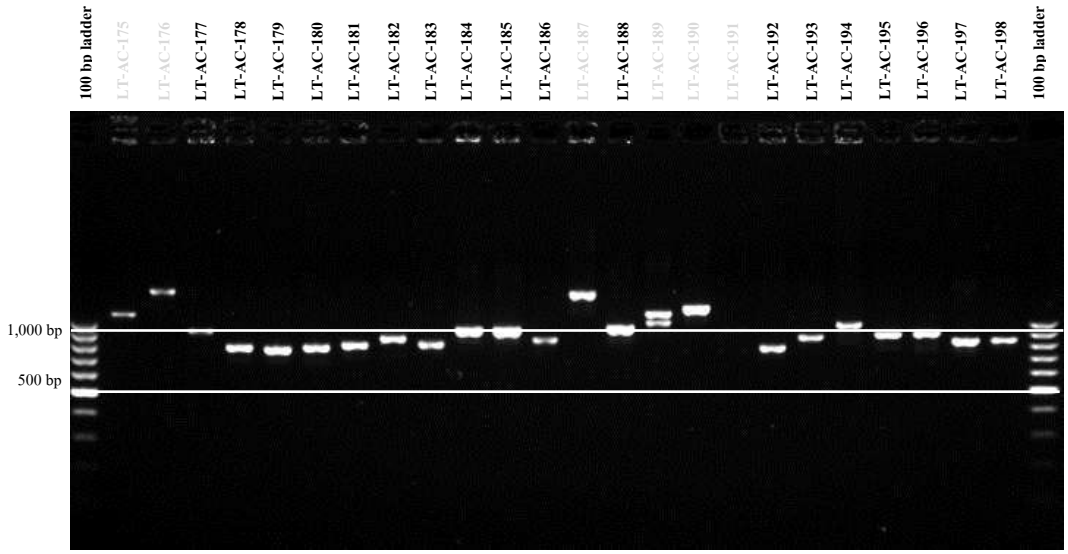
ภาพที่ 8 Colony PCR No. LT-AC 130 - 142 และ LT-GT 009 -012



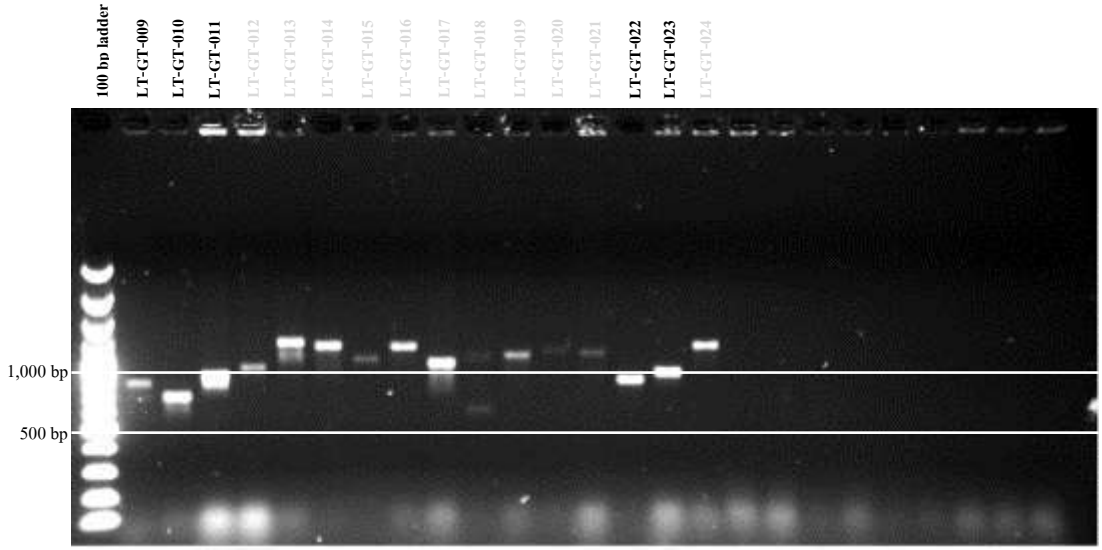
ภาพที่ 9 Colony PCR No. LT-AC 143 - 150



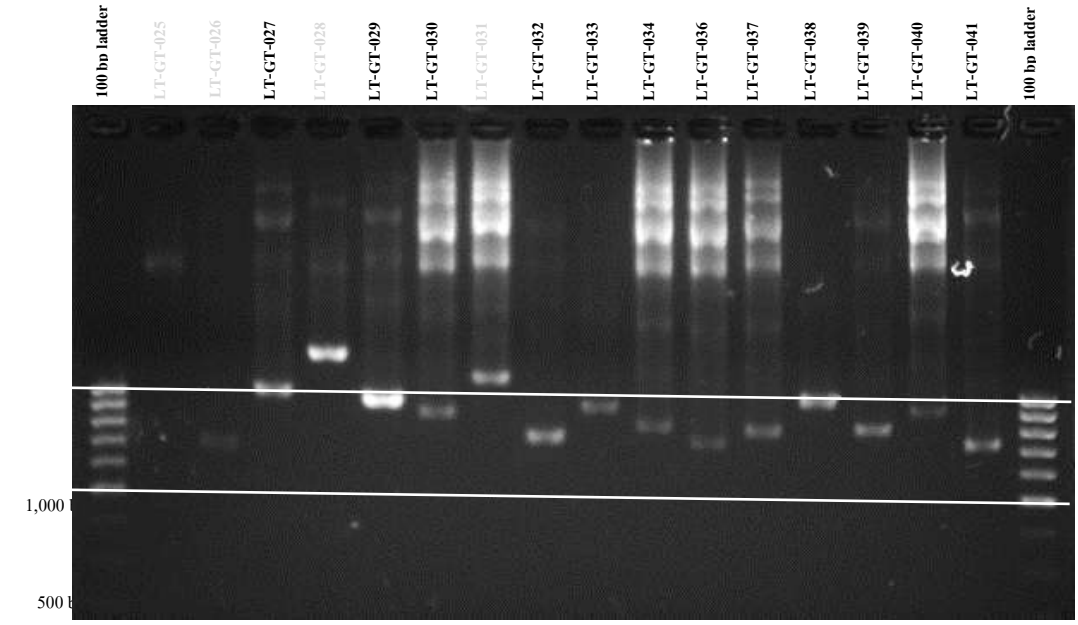
ภาพที่ 10 Colony PCR No. LT-AC 151 – 174



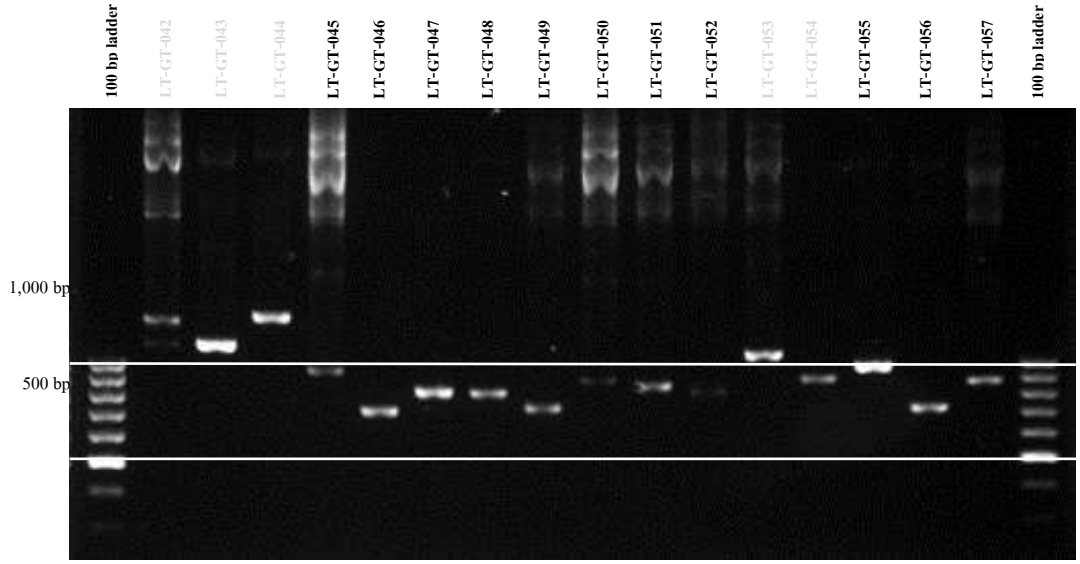
ภาพที่ 11 Colony PCR No. LT-AC 175 - 198



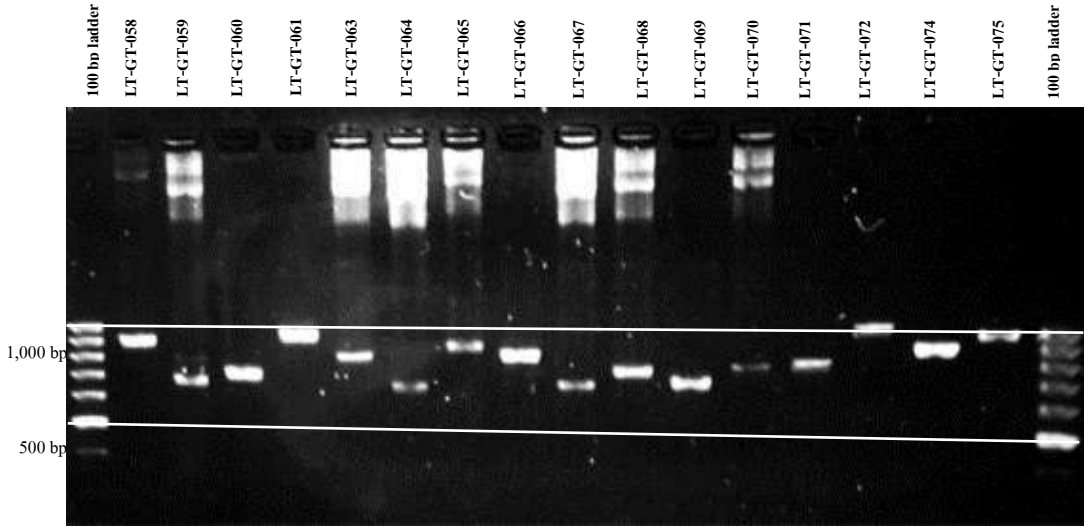
ภาพที่ 12 Colony PCR No. LT-GT 009 – 024



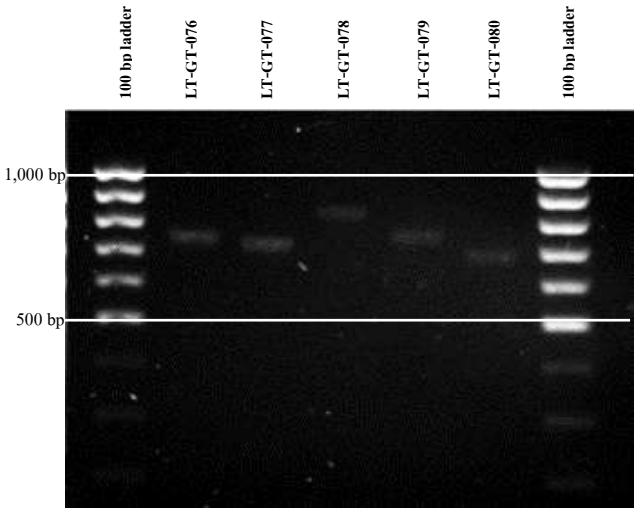
ภาพที่ 13 Colony PCR No. LT-GT 025 – 041



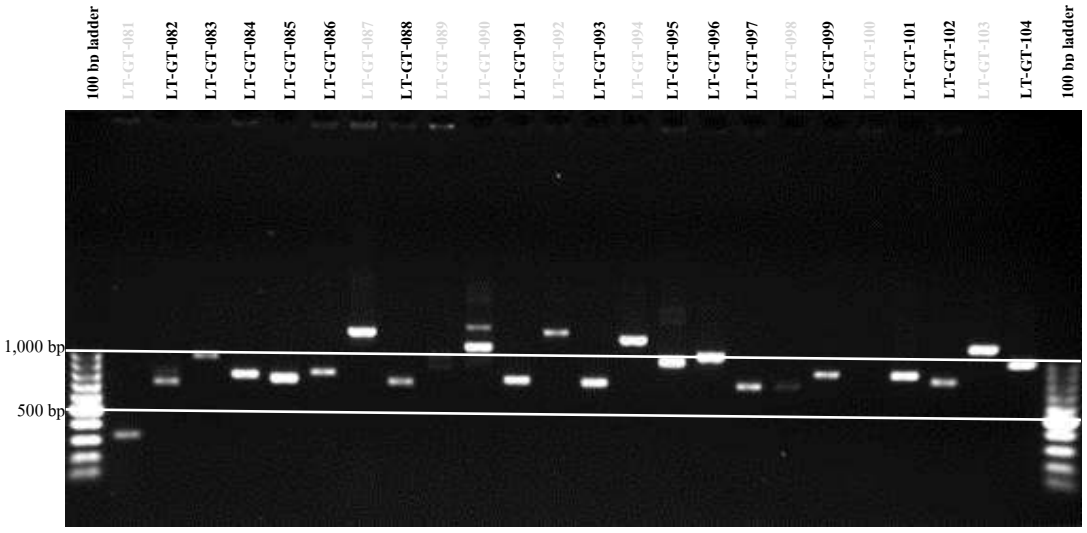
ภาพที่ 14 Colony PCR No. LT-GT 042 – 057



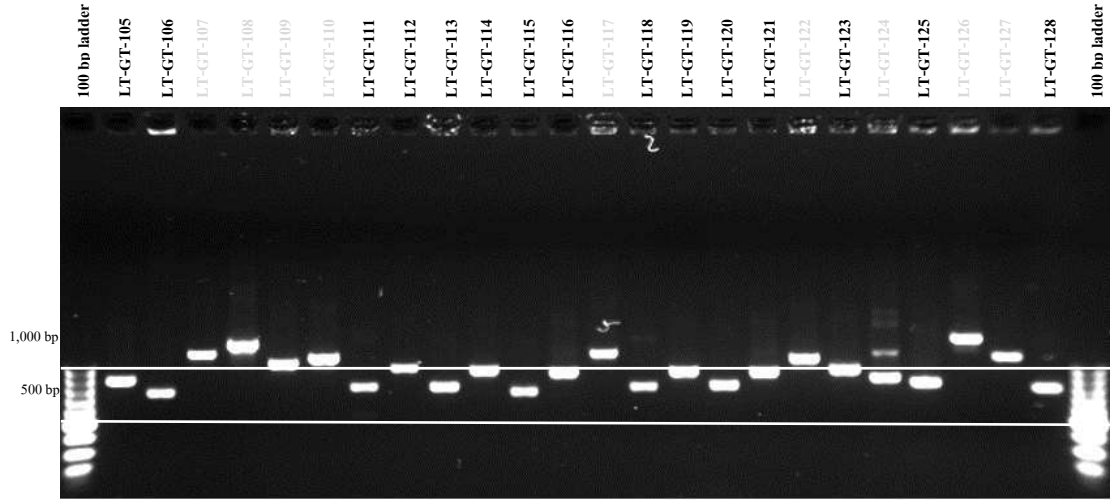
ภาพที่ 15 Colony PCR No. LT-GT 058 - 075



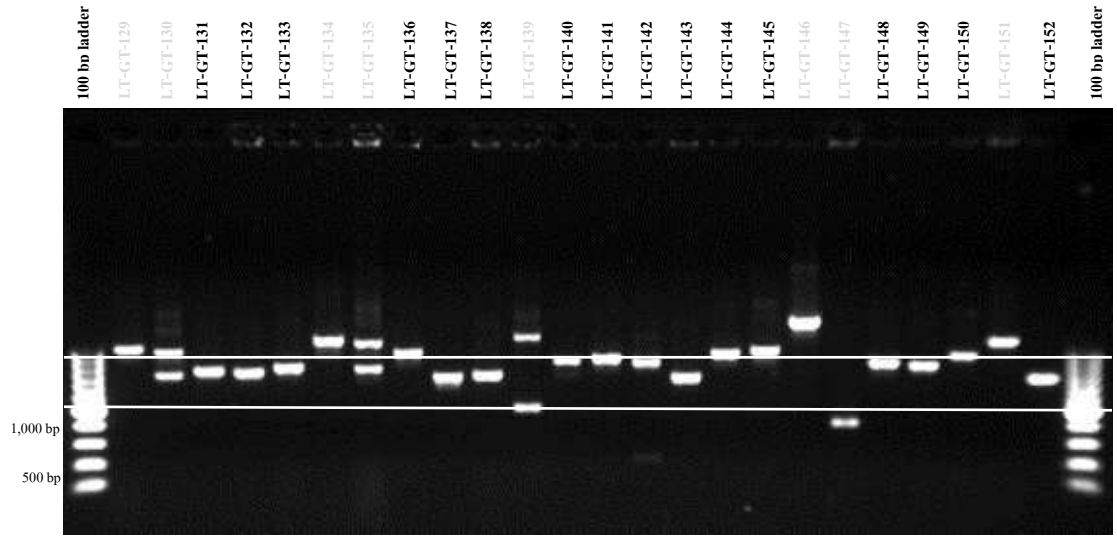
ภาพที่ 16 Colony PCR No. LT-GT 076 – 080



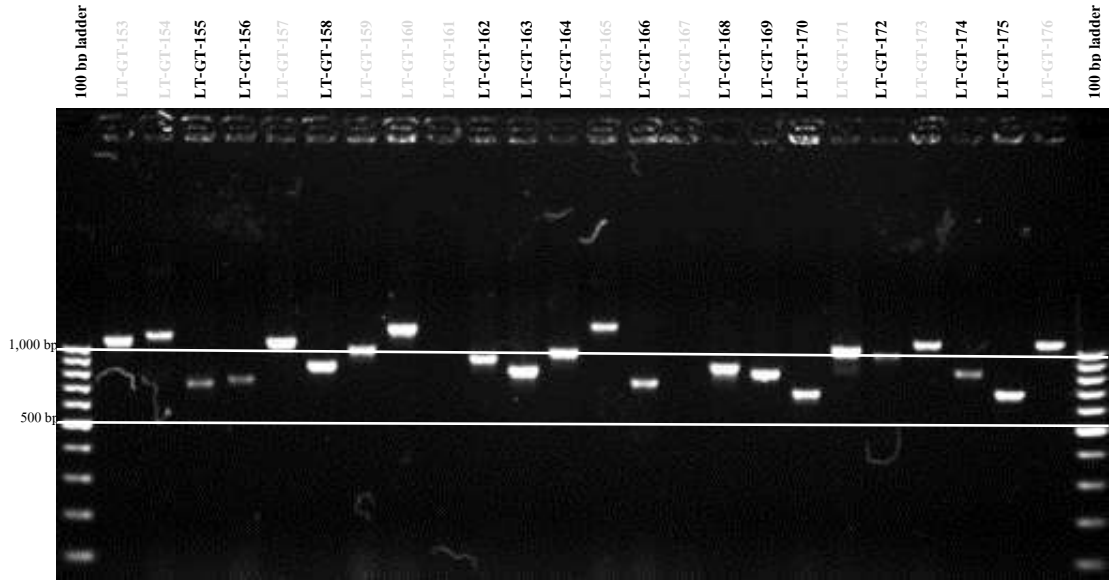
ภาพที่ 17 Colony PCR No. LT-GT 081 - 104



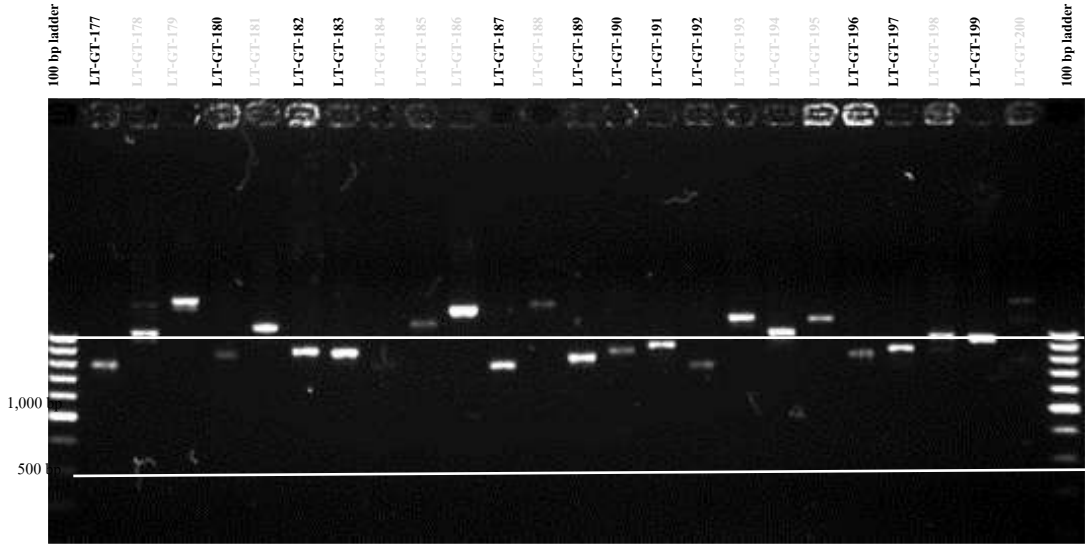
ภาพที่ 18 Colony PCR No. LT-GT 105 - 128



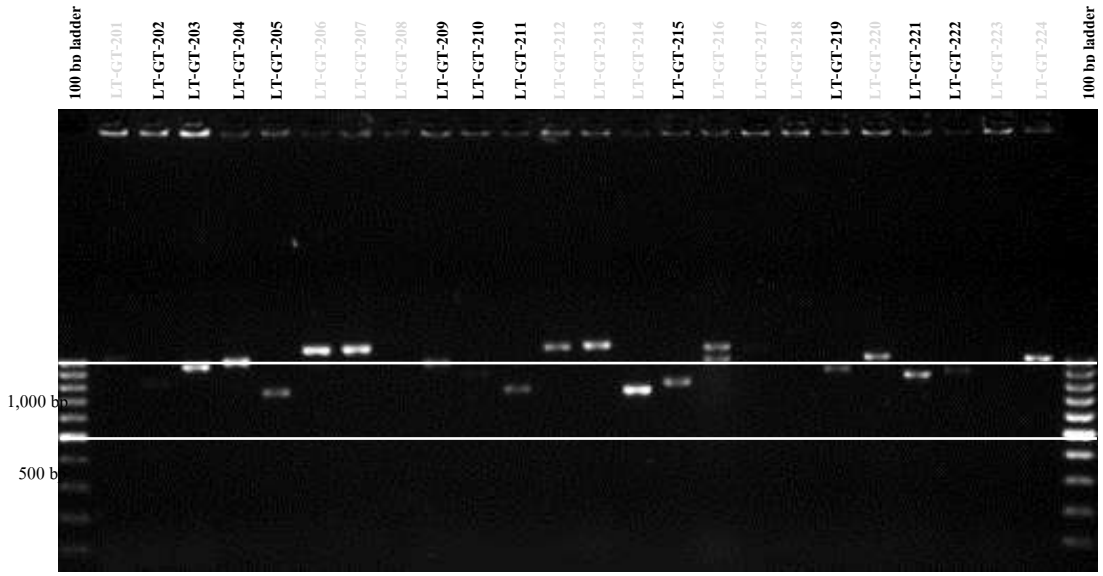
ภาพที่ 19 Colony PCR No. LT-GT 129 - 152



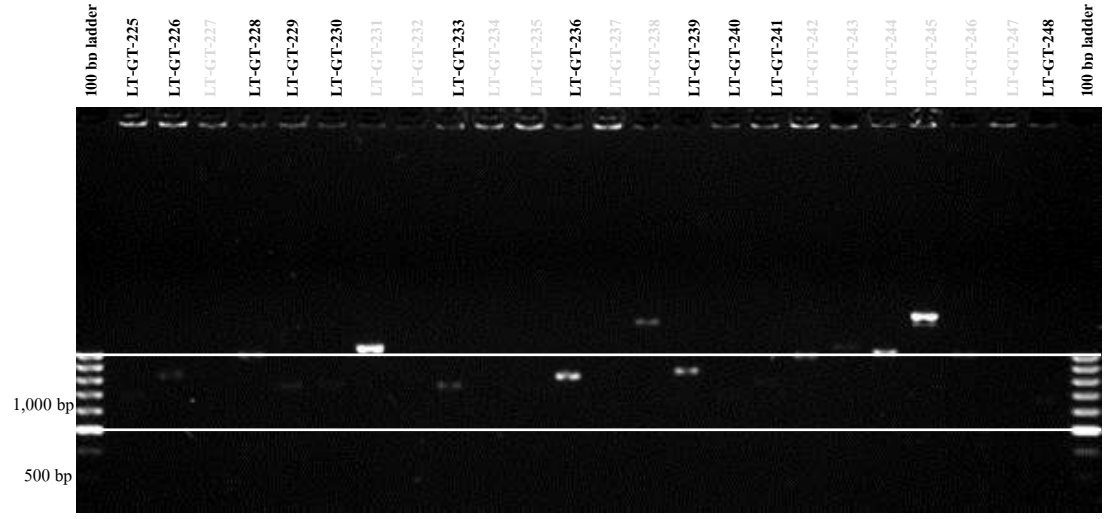
ภาพที่ 20 Colony PCR No. LT-GT 153 – 176



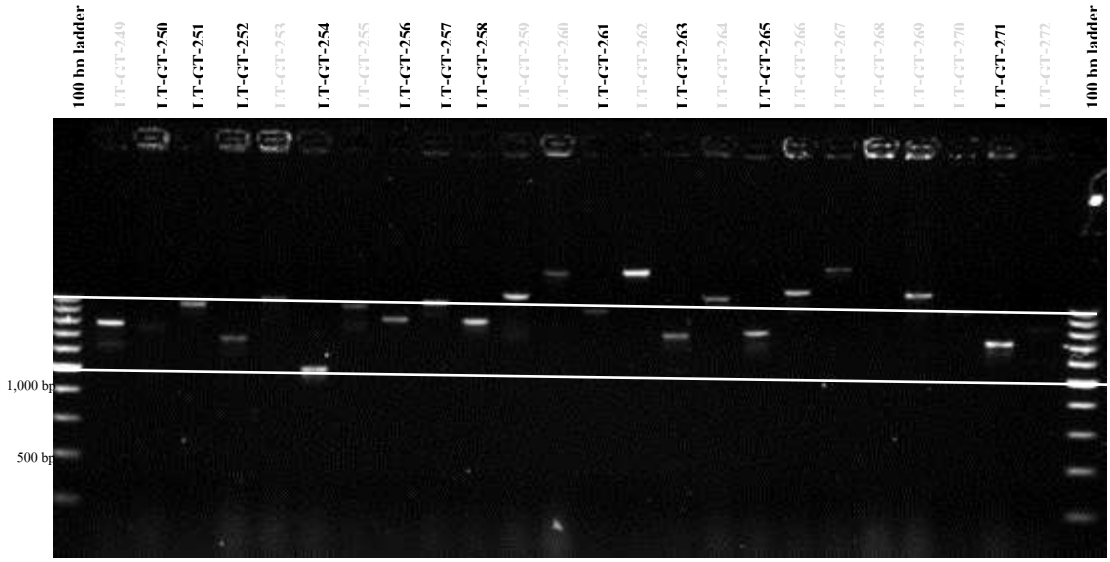
ภาพที่ 21 Colony PCR No. LT-GT 177 - 200



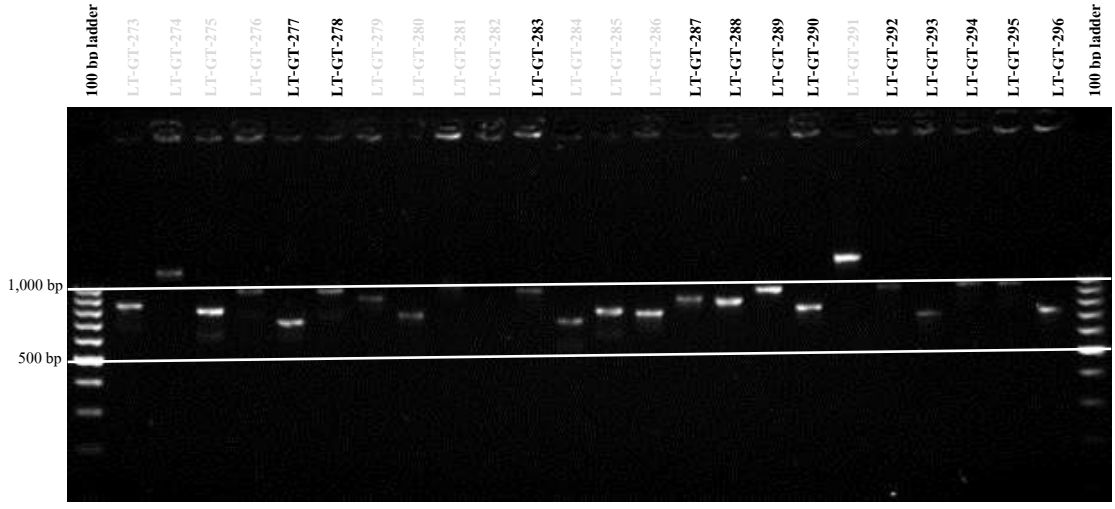
ภาพที่ 22 Colony PCR No. LT-GT 201 – 224



ภาพที่ 23 Colony PCR No. LT-GT 225 - 248

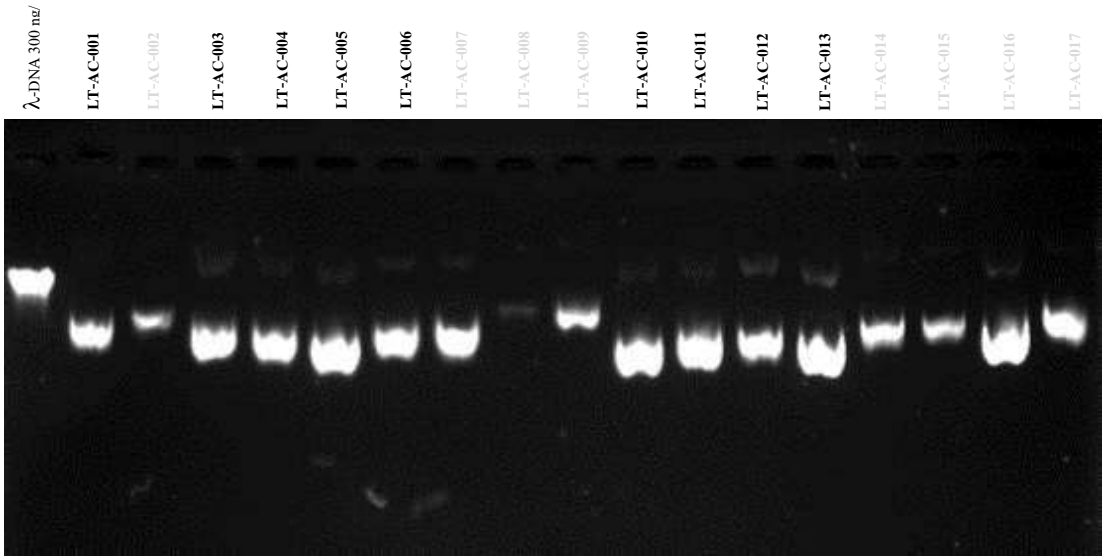


ภาพที่ 24 Colony PCR No. LT-GT 249 – 272

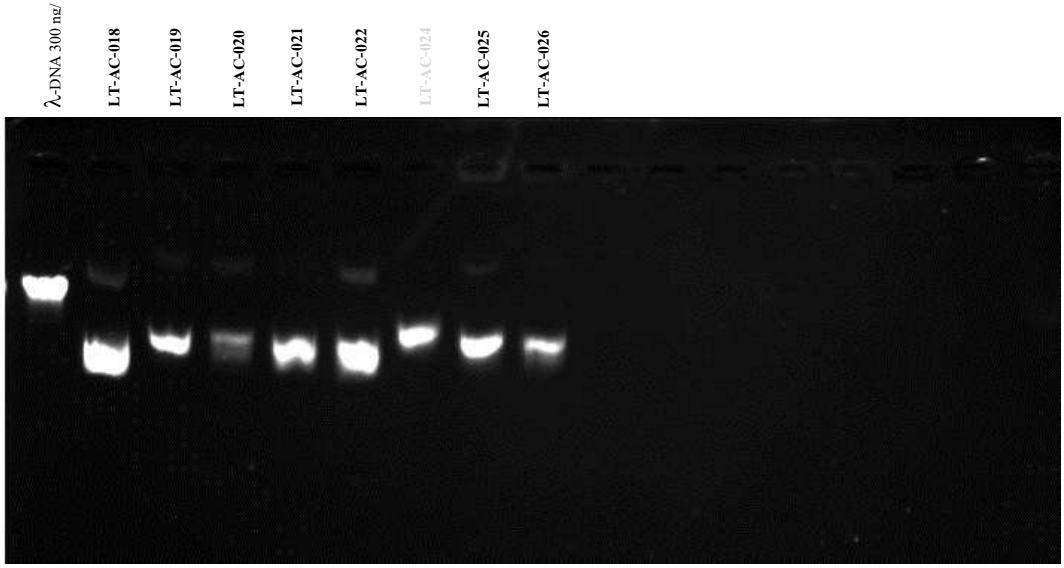


ภาพที่ 25 Colony PCR No. LT-GT 273 - 296

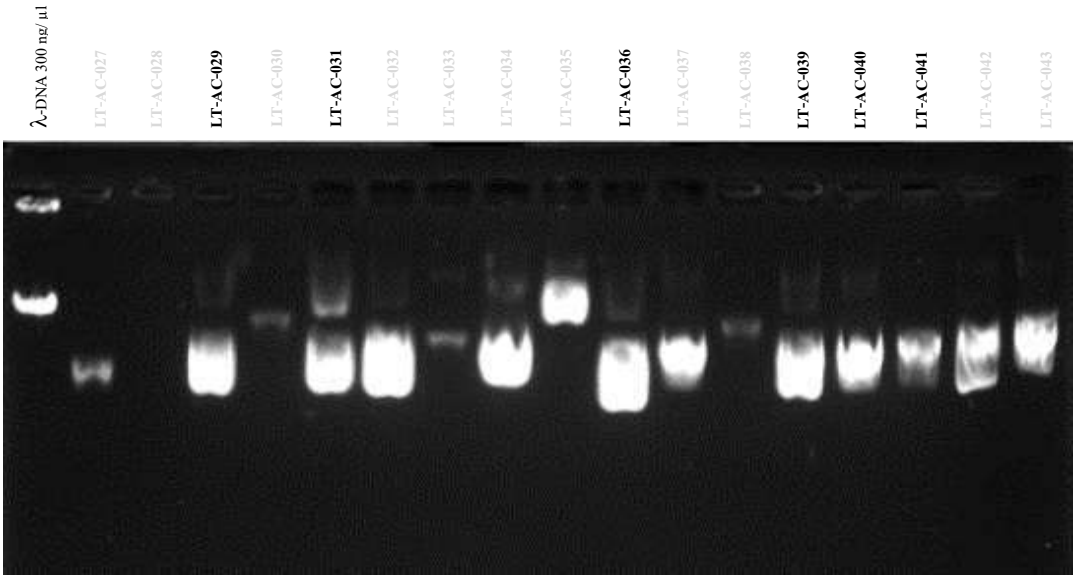
ผลการเช็คความเข้มข้นของ Plasmid ที่สกัดได้



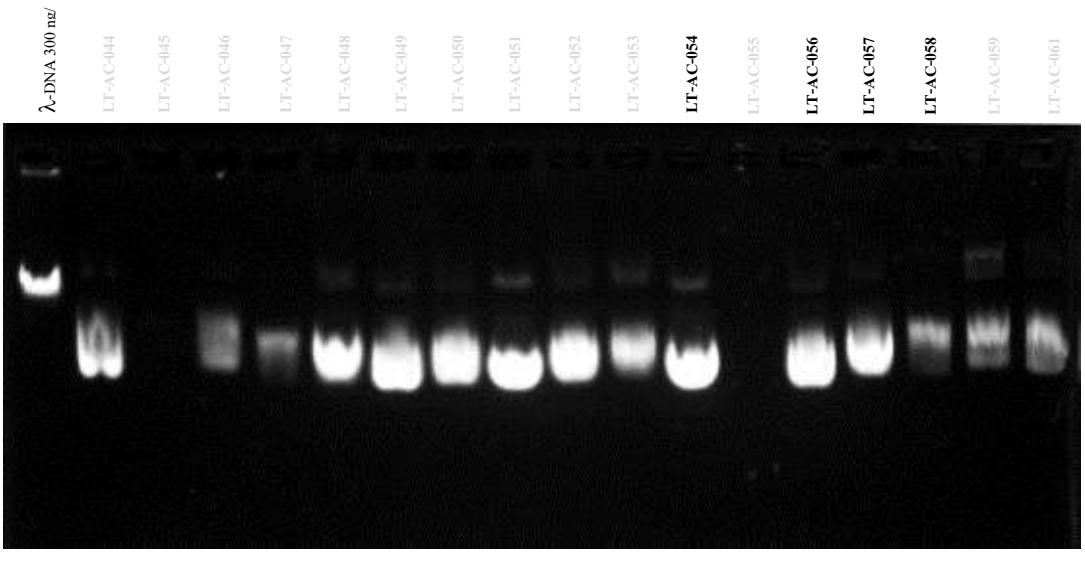
ภาพที่ 26 Plasmid DNA No. LT-AC 001-017



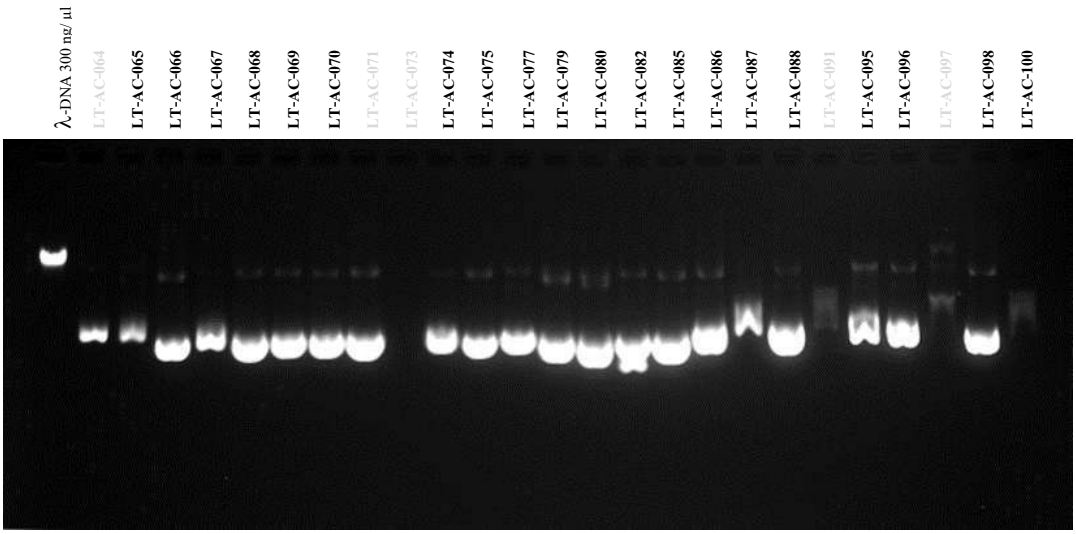
ภาพที่ 27 Plasmid DNA No. LT-AC 018-026



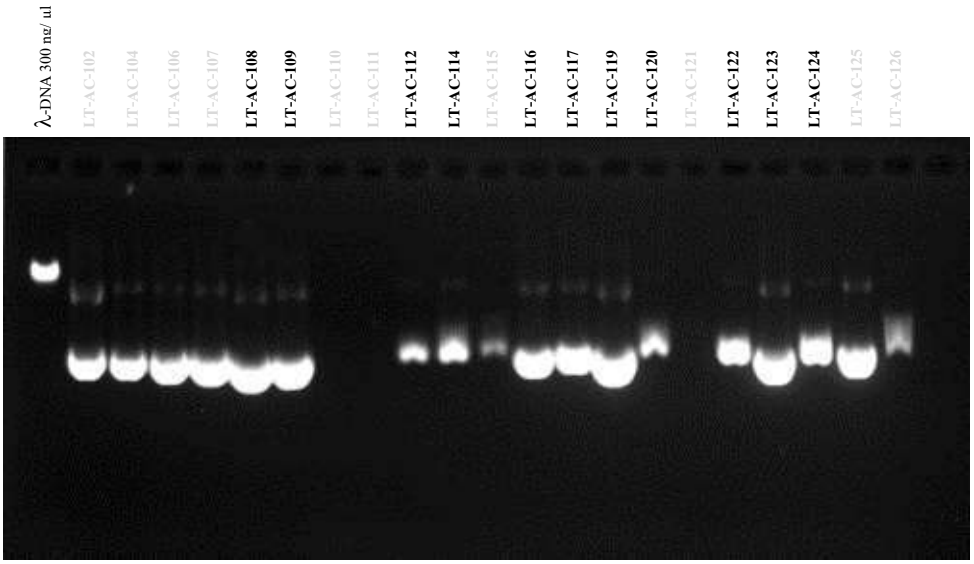
ภาพที่ 28 Plasmid DNA No. LT-AC 027-043



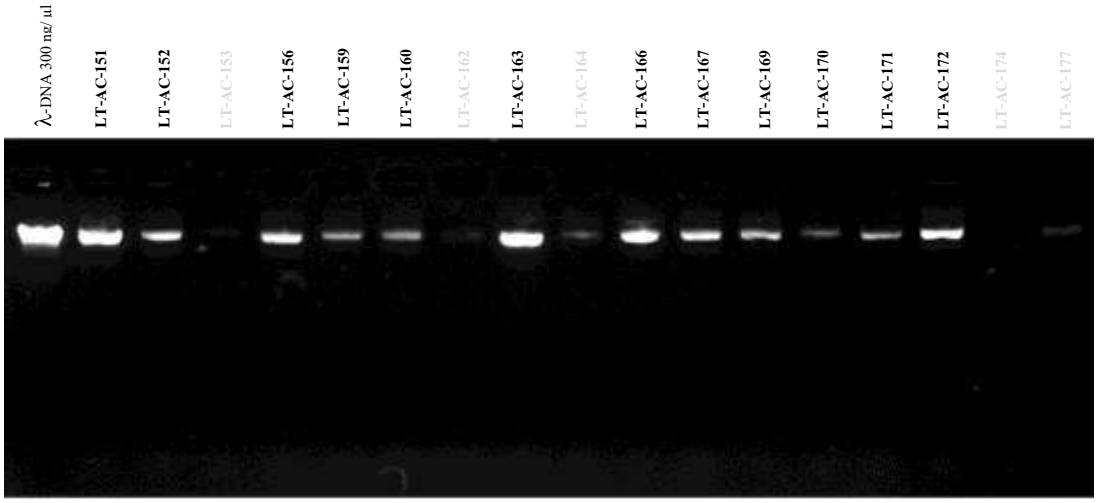
ภาพที่ 29 Plasmid DNA No. LT-AC 044-061



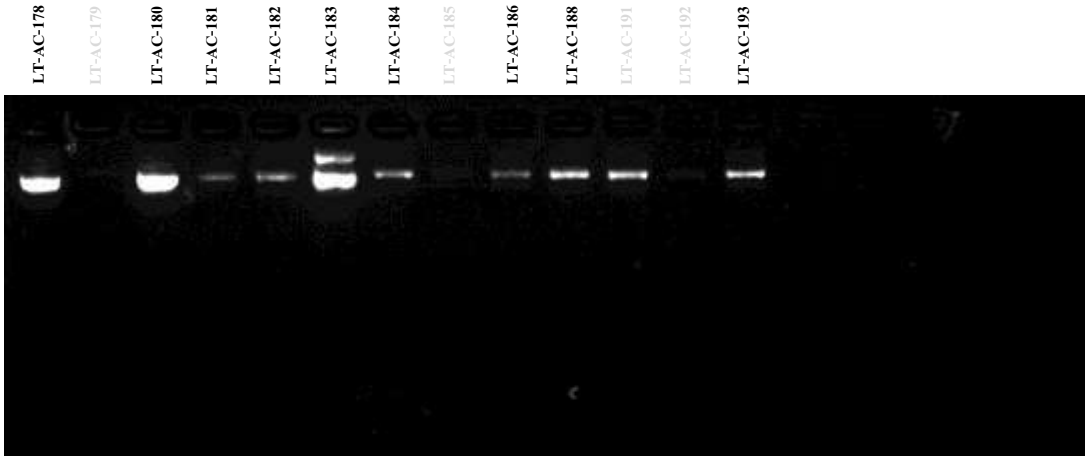
ภาพที่ 30 Plasmid DNA No. LT-AC 064-100



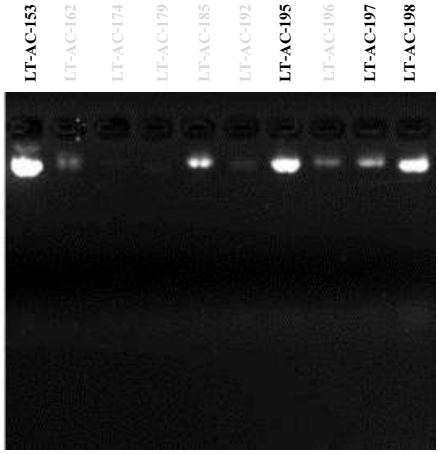
ภาพที่ 31 Plasmid DNA No. LT-AC 102-126



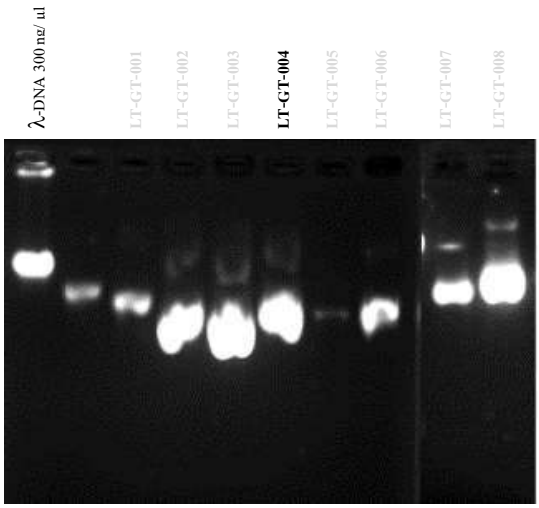
ภาพที่ 32 Plasmid DNA No. LT-AC 151-177



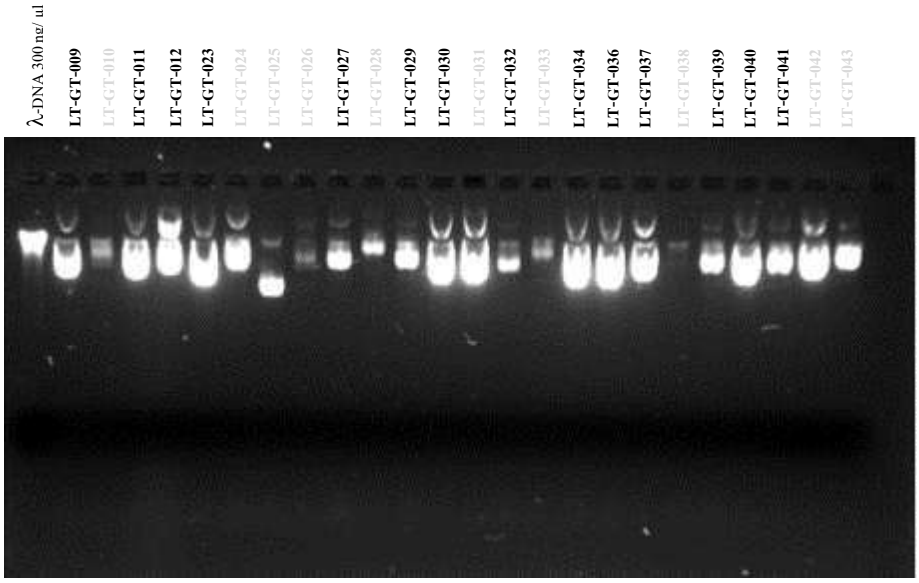
ภาพที่ 33 Plasmid DNA No. LT-AC 178-193



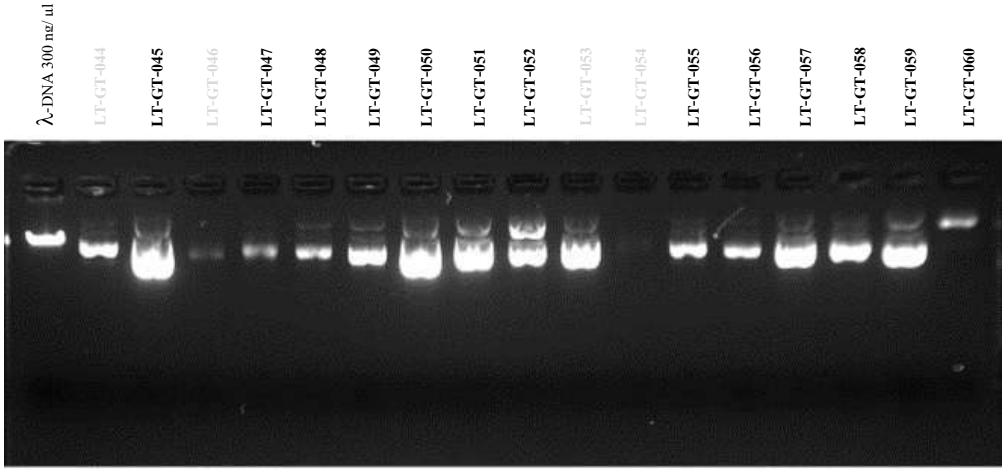
ภาพที่ 34 Plasmid DNA No. LT-AC 153 - 198 (ซ่อม)



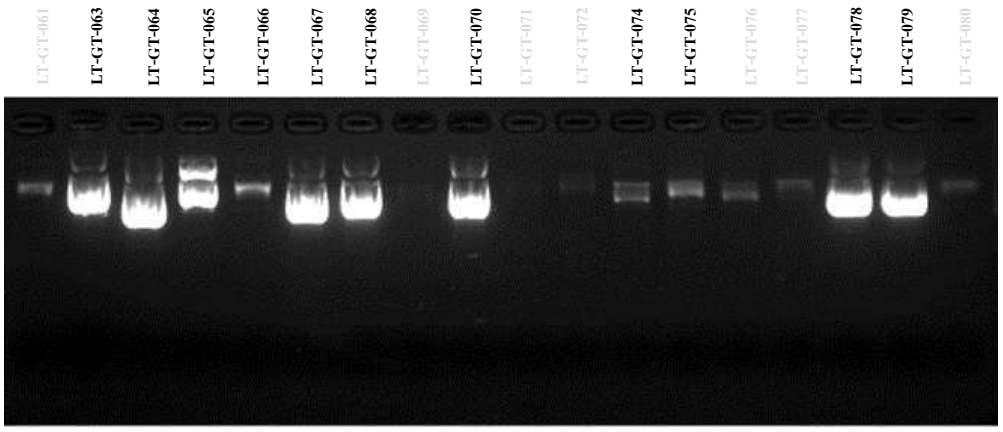
ภาพที่ 35 Plasmid DNA No. LT-GT 001-008



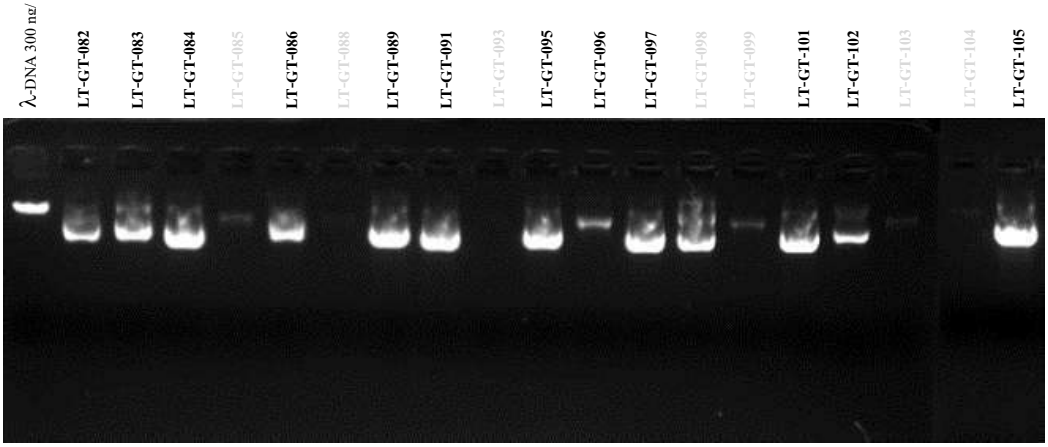
ภาพที่ 36 Plasmid DNA No. LT-GT 009-043



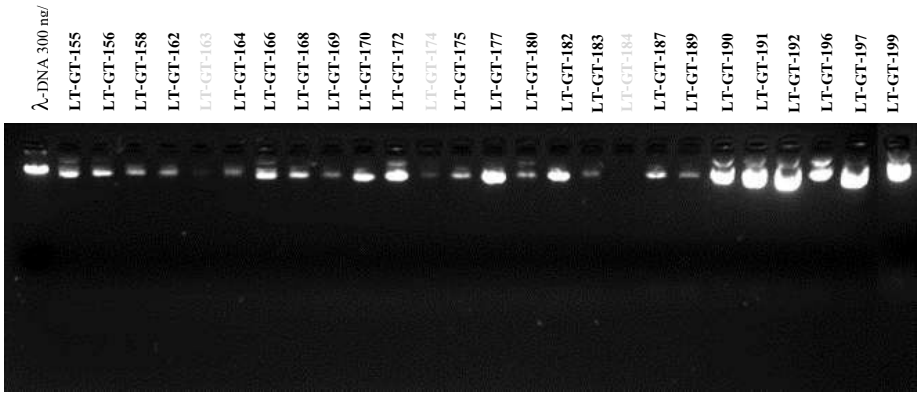
ภาพที่ 37 Plasmid DNA No. LT-GT 044-060



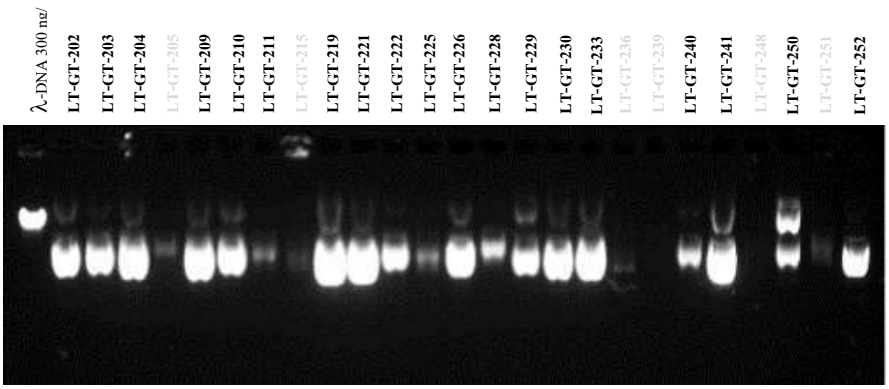
ภาพที่ 38 Plasmid DNA No. LT-GT 061- 080



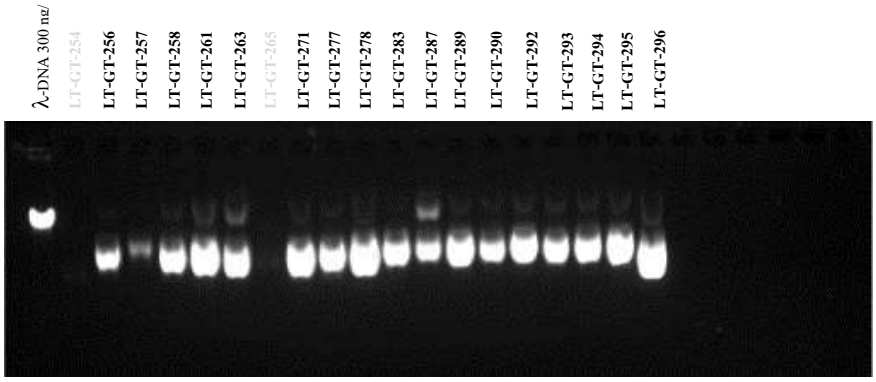
ภาพที่ 39 Plasmid DNA No. LT-GT 082-105



ภาพที่ 40 Plasmid DNA No. LT-GT 155 – 199



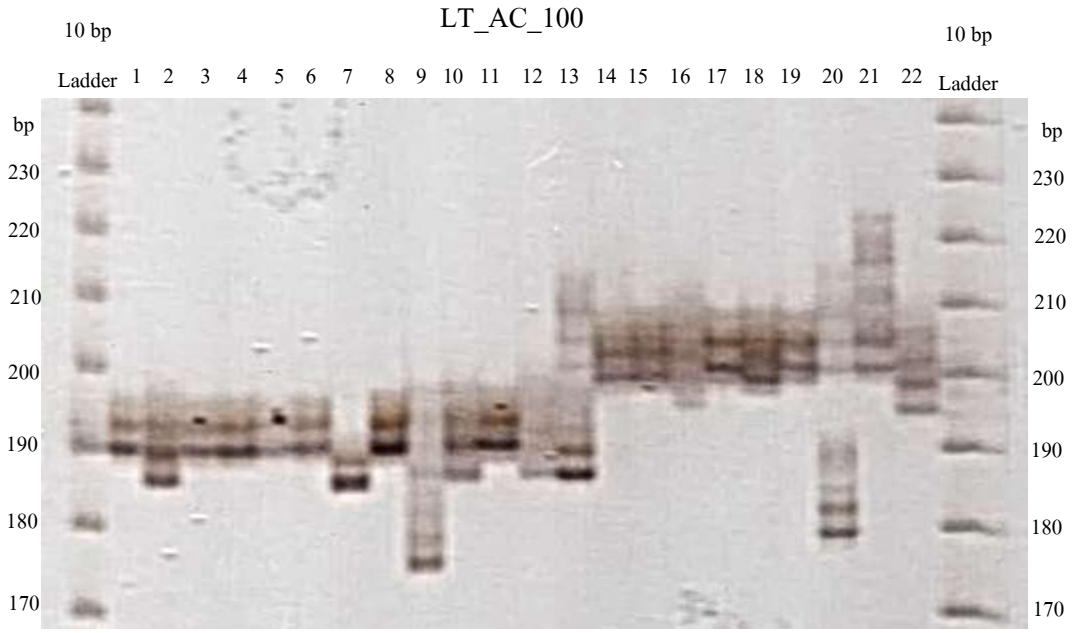
ภาพที่ 41 Plasmid DNA No. LT-GT 202 - 252



ภาพที่ 42 Plasmid DNA No. LT-GT 254-296

ภาคผนวก ง

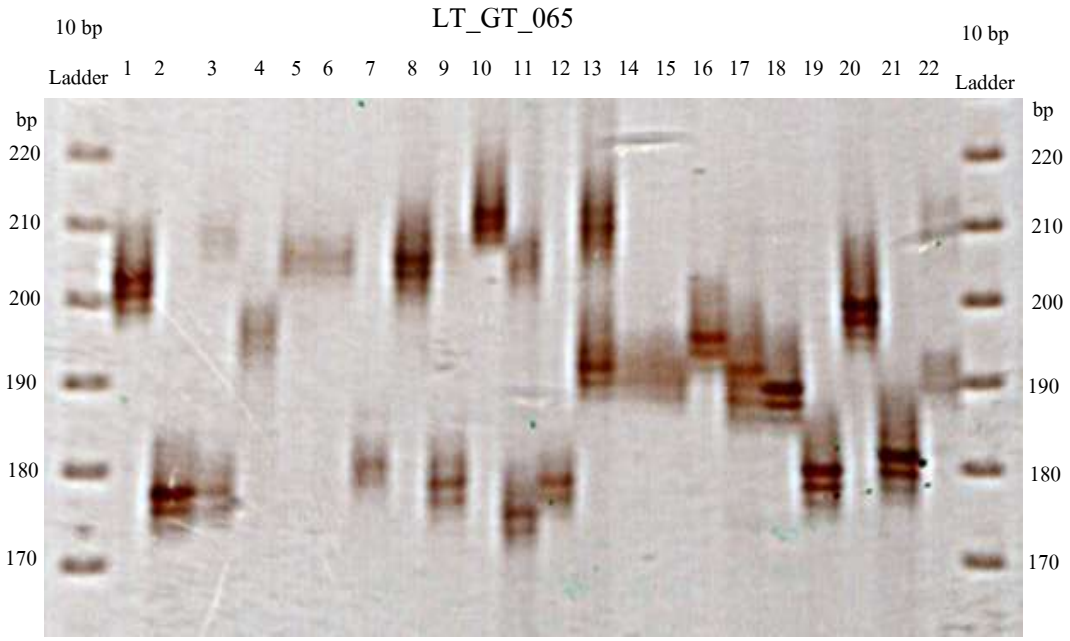
ผลการกำหนด Genotyping Data
เพื่อนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของโลดทะนง



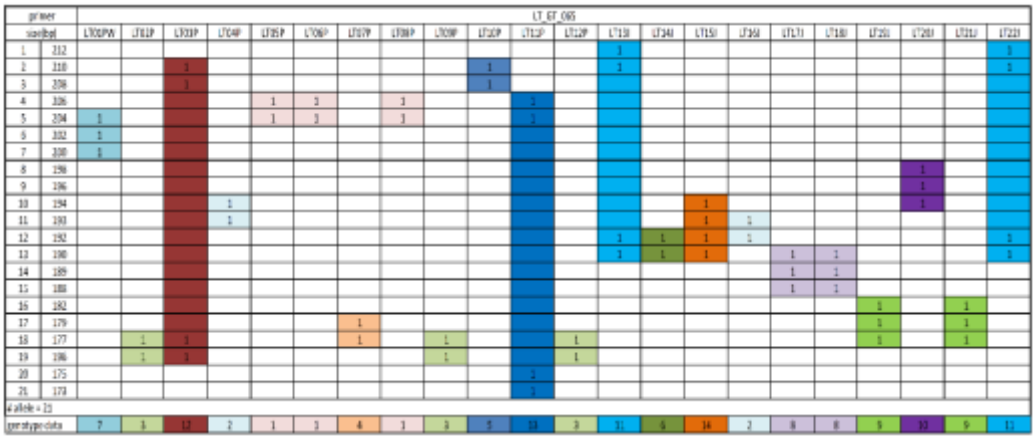
ภาพที่ 43 ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอของโลดทะนงของ Primer LT_AC_100

Primer		LT_AC_100																			
size (bp)		LT01PW	LT02P	LT03P	LT04P	LT05P	LT06P	LT07P	LT08P	LT09P	LT10P	LT11P	LT12P	LT13H	LT14L	LT15L	LT16H	LT17L	LT18H	LT19H	LT20H	LT21H	LT22H
1	225																					1	
2	220																					1	
3	215													1							1	1	
4	212													1							1	1	
5	210													1	1			1	1	1	1		1
6	205													1							1		
7	202													1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8	199													1			1	1		1	1	1	1
9	197														1	1	1		1		1		1
10	195																1				1		1
11	193	1	1	1	1	1	1		1		1	1	1	1							1		
12	190	1	1	1	1	1	1		1		1	1	1	1							1		
13	189		1					1			1		1	1							1		
14	188		1					1		1	1		1	1							1		
15	186		1					1													1		
16	184									1											1		
17	182									1											1		
18	179									1											1		
19	175									1													
# alleles = 13																							
genotype data		1	3	1	1	1	1	4	1	5	2	1	2	11	7	6	5	8	7	8	15	13	11

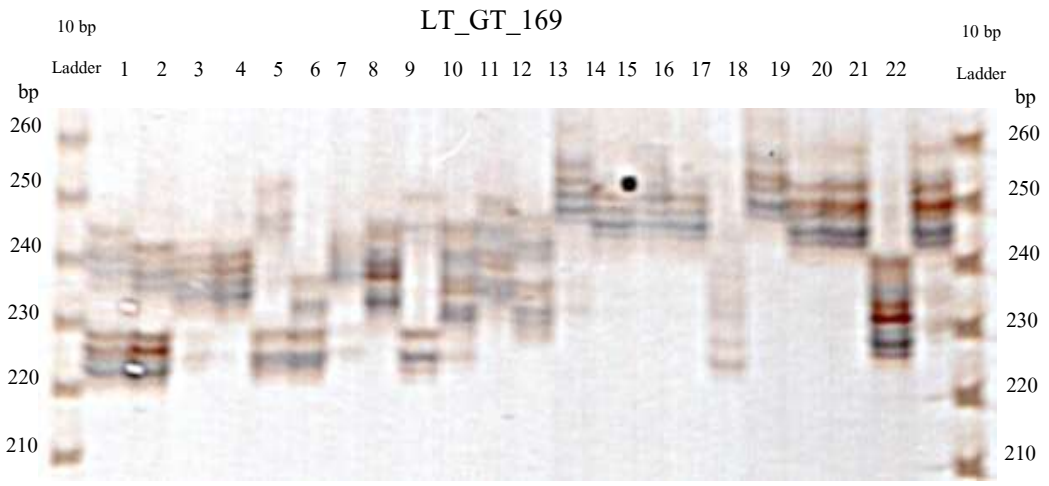
ตารางที่ 44 แสดง genotype ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอโลดทะนงของ primer LT_AC_100



ภาพที่ 45 ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอของโลดทะนงของ primer LT_GT_065



ตารางที่ 46 แสดง genotype ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอโลดทะนงของ primer LT_GT_065



ภาพที่ 47 ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอของโลดทะนงของ Primer LT_GT_169

Primer	LT_GT_169																				
size (bp)																					
1	250													3					1			
2	251													3					1			
3	250					1				1				3	1	1	3		1	3	1	3
4	248											1		3	1	1	3		1	3	1	3
5	246											1		3	1	1	3		1	3	1	3
6	244					1			1	1	3	1	1		1	1	3			3	1	3
7	243	1	1	1	1			1	1		3	1	1									
8	241	1	1	1	1			1				1										
9	238	1	1	1	1			1	1		3	1	1				3					
10	236	1	1	1	1		1	1														
11	235			1	1			1														
12	234								1		3		1					1				
13	233						1											1				
14	232								1		3		1					1				
15	230	1	1	1		1	1	1		1								1				
16	229	1	1	1				1										1				
17	224					1	1			1												
18	222	1	1																			
Total allele = 55																						
genotype data		1	1	2	7	6	8	2	9	6	3	10	3	5	4	4	11	12	5	4	4	13	4

ตารางที่ 48 genotype ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอโลดทะนงของ Primer LT_GT_169

ภาคผนวก จ
หนังสือตอบรับลงบทความวิจัย

Ref. No. 0564.14/**380**

Bansomdejchaopraya Rajabhat University
1061 Isarapap 15 Hirunrujee
Thonburi Bangkok 10600

6 July 2017

Subject Notification of Results of BSRU Conference 2017 Full Paper and Invitation to the Conference

Attention Tippanate Keawvijit & the others

Attachment A set of schedule of paper presentation

We are pleased to inform you that your full paper entitled, **"A study on DNA fingerprint of *Trigonostemon reidioides* (Kurz) Craib"** was accepted for a poster presentation at the 1st National and International Conference 2017 on Education for Sustainable Locality Development organized by Bansomdejchaopraya Rajabhat University in Bangkok, Thailand on the 29th of July, 2017.

Also, you are invited to participate in the opening ceremony. After the plenary session in the morning, your presentation is scheduled in the afternoon according to the attachments informing the venue, time and room monitors. Your poster will be instantly designed and set at the venue of presentation by Graduate School and you are expected to stand by your poster in case of visitors' queries.

Please feel free to contact us regarding any questions you may have. All of us at BSRU Conference 2017 are doing our best to make this year event fruitful and memorable, and we look forward to welcoming you.

Cordially yours,

Areewan

(Assistant Professor Dr.Areewan Iamsa-ard)
Dean
Graduate School of BSRU

Graduate School
Tel.+662-473-7000 Ext.1810, 1813

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ – สกุล	นายทิพเนตร เขียววิจิตร
วัน เดือน ปี เกิด	4 พฤศจิกายน 2524
สถานที่เกิด	จังหวัดนครนายก
ที่อยู่ปัจจุบัน	499/271 ถนนศรีอยุธยา แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400
ประวัติการศึกษา	
ปริญญาตรี	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาสุขศึกษา มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา
ประสบการณ์การทำงาน	นักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล