

### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินการวิจัย

##### 1. อุปกรณ์

อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ ตัวอย่างใบสมุนไพรจำนวน 50 ตัวอย่าง สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมดีเอ็นเอ โปรแกรมคอมพิวเตอร์ในการสร้าง phylogenetic tree จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ได้แก่ โปรแกรม NTSYS pc version 2.0 (Rohlf, 1998)

##### 2. วิธีการ

เก็บตัวอย่างพืชสมุนไพรในป่าจำปีสิรินธรตามเส้นทางศึกษาธรรมชาติจำนวนทั้งหมด 50 ตัวอย่างคือ

ตารางที่ 1 ตัวอย่างพืชสมุนไพร

ตัวอย่าง ที่	ชื่อตัวอย่าง	ชื่อวิทยาศาสตร์
1	มะหาด	<i>Artocarpus lakoocha</i> Roxb
2	มะเกลือ	<i>Diospyros mollis</i> Griff
3	คำลิงตัวผู้	<i>Zeheria indica</i> Keraud Aym.
4	แกแล	<i>Maclura cochinchinensis</i> Corner
5	ชันทองพญาบาท	<i>Gelonium multiflorum</i> A. Juss.
6	สอยดาว	<i>Mallotus, paniculatus</i> (LMK) Muell Arg
7	นมสวรรค์	<i>Clerodendrum paniculatum</i> Linn.
8	ดั่งตั้ง	<i>Getonia floribunda</i> (Roxb.) Lam.
9	เถียงพ้านางแอ	<i>Carallia brachiata</i> (Lour.) Merr.
10	ขย้อมหลวง	<i>Rzuvolfia cambodiana</i> Pierre ex Pitard
11	เถากันปิด	<i>Stephania japonica</i> (Thunb.) Mier var. <i>discolor</i> (Bl.)

ตัวอย่าง ที่	ชื่อตัวอย่าง	ชื่อวิทยาศาสตร์
12	สวอง	<i>Vitex pubescens</i> Vahl.
13	องุ่นป่า	<i>Ampelocissus martinii</i> Planch.
14	ปะคำไก่อ	<i>Drypetes roxburghii</i> Wall.
15	กระทงหมาบ้า	<i>Dargea volubilis</i> Benth.ex Hook.
16	หญ้าไต้ใบ	<i>Phyllanthus urinaria</i> Linn.
17	กลิ้งกล่อม	<i>Polyalthia suberosa</i> (Roxb.) Thwaites
18	มะเดื่ออุทุมพร	<i>Ficus racemosa</i> Linn. หรือ <i>F. glomerata</i> Roxb.
19	คนทา	<i>Harrisonia perforata</i> Merr.
20	ตะไคร้	<i>Cymbopogon citratus</i> Stapf.
21	ก้างปลาขาว	<i>Hymenocardia wallichii</i> Tul.
22	บวบลม	<i>Dischidia rafflesiana</i> Wall.
23	พยามูติ	<i>Grangea maderaspatana</i> (Linn.) Poir.
24	เถาวัลย์เหล็ก	<i>Ventilago Calyculata</i> Ful.
25	ประดู่ส้ม	<i>Bischofia javavanica</i> Blume.
26	ปอสา	<i>Broussonetia papyrifera</i>
27	กรวยป่า	<i>Casearia grewiifolia</i> Vent. var. <i>grewiifolia</i> .
28	เจตพังคี	<i>Cladogynos orientalis</i> Zipp.ex.Span.
29	กระดังงาดั้น	<i>Cananga odorata</i> (Lamk.) Hook.f. et Th.
30	หว้าขี้นก	<i>Syzygium ripicola</i> (Craib) Merr. & L.M. Perry
31	หิรัญญิการ์	<i>Beaumontia brevityba</i> . Oliv.
32	ถอบแถบเตรีอ	<i>Connarus semidecandrus</i> Jack.
33	ขมิ้นเครือ	<i>Arcangelisia flava</i> (L.) Merr.
34	ราชพฤกษ์	<i>Cassia fistula</i> L.
35	หางนกยูงไทย	<i>Caesalpinia pulcherrima</i> , Swartz.
36	กระถินณรงค์	<i>Acacia auriculiformis</i> Cunn.
37	มะลิวัลย์ป่า	Jasminum
38	เถาน้ำนอง	<i>Thumbergia laurifolia</i> Lindl.
39	กระดังงाप้า	<i>Artabotrys siamensis</i> Miq.

ตัวอย่าง ที่	ชื่อตัวอย่าง	ชื่อวิทยาศาสตร์
40	ขี้แรด	<i>Streblus ilicifolius</i> Corner
41	หญ้าครุน	<i>Panicum repens</i> L.
42	หนุมาน	<i>Jatropha podagrica</i>
43	ช้าเป็น	<i>Salanum verbascifolium</i> Linn.
44	เต้าร้าง	<i>Caryota mitis</i> Lour.
45	เถาวัลย์เปรียง	<i>Derris scandens</i> (Roxb.) Benth.
46	หญ้าดอกขาว	<i>Leptochloa chinensis</i> (L.) Nees.
47	พกากรอง	<i>Lantana camara</i> Linn.
48	ก้นกระรา	<i>Fagraea fragrans</i> Roxb.
49	เถาตุศหมา	<i>Pacderia tomentosa</i> Blume Var glalar
50	จันทร์หอม	<i>Mansonia gagei</i> Drumm.

### 3. การเตรียมดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างพืชมาสกัด DNA โดยใช้วิธีที่ประยุกต์จาก agrawal และคณะ (1992) ดังนี้

- 1). นำใบอ่อนของสมุนไพรรประมาณ 2 กรัม มาตัดก้านใบออกแล้วตัดแผ่นใบเป็นชิ้นเล็กๆ บดในไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด
- 2). นำตัวอย่างที่บดละเอียดแล้วใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มี Extraction buffer 800 ไมโครลิตร และ 2-mercaptoethanol 70 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยกลับหลอดไปมาเบาๆ
- 3). นำไปปั่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที กลับหลอดไปมา ทุกๆ 10 นาที
- 5). นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที
- 6). ใช้ไมโครปิเปต คูดสารละลายที่อยู่ส่วนบนใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ใหม่ เติมสารละลาย chorofrom isoamyl 500 ไมโครลิตร ทำซ้ำกัน 2 ครั้ง
- 7). นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เพื่อแยกชั้นน้ำและ chlorofrom ออกจากกัน
- 8). ใช้ไมโครปิเปต คูดสารละลายที่อยู่ส่วนบนใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ใหม่เติม

isopropanol ที่เข้มข้น 2 ใน 3 เท่าของปริมาตรของสารละลายทั้งหมดที่มีอยู่

- 9). นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
- 10). นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที
- 11). เทส่วนใสทิ้ง เติม Alcohol 70% 200 ไมโครลิตร
- 12). นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที
- 13). เทสารละลายออก ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที หรือจนกว่าไม่มีกลิ่น Alcohol
- 14). ละลายตะกอน DNA โดยการเติม TE buffer
- 15). ใส่ RNase A 3 ไมโครลิตร บ่มไว้ข้ามคืนที่ 37 องศาเซลเซียส
- 16). นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที
- 17). ทำซ้ำตั้งแต่ข้อ 7-13
- 18). เก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ต่อไป

### 3.1 การวิเคราะห์สารละลายดีเอ็นเอ

#### 3.1.1 การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดค่า optical density (OD) ซึ่งเป็นค่าการดูดแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 260 นาโนเมตร และช่วงคลื่น 280 นาโนเมตร โดยใช้ spectrophotometer สูตรในการคำนวณมีดังนี้

$$\text{ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ } (\mu\text{g/ml}) = \text{OD}_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{dilution factor}$$

การวัดค่าการดูดแสงของดีเอ็นเอจะวัดที่ความยาวช่วงคลื่น 280 นาโนเมตร ( $\text{OD}_{280}$ ) ด้วยเพื่อใช้ในการคำนวณอัตราส่วนความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ถ้าค่า  $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$  อยู่ระหว่าง 1.7-1.8 แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้บริสุทธิ์ถ้าอัตราส่วนสูงกว่า 1.8 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอเจือปน

3.1.2 แยกขนาดดีเอ็นเอและตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอโดยวัดการเรืองแสงของดีเอ็นเอร่วมกับ เอธิเดียม โบรไมด์มีวิธีการดังนี้

เตรียมอะกาโรสเจล 0.8% โดยชั่งผงอะกาโรส 0.8 กรัม ใส่ TAE buffer 100 มิลลิลิตร (4.84 g Tris-base, 1.15 ml glacial acetic acid, 2 ml 0.5 M EDTA pH 8.0) ละลายผงอะกาโรสโดยใช้ความร้อนต้มจนเดือด เพื่อให้อะกาโรสหลอมละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วปล่อยให้สารละลายสมุนไพรอะกาโรสเย็นลงจนอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส เทลงในพิมพ์ให้เจลมีความหนาประมาณ 3-5 มิลลิเมตร ระวังอย่าให้มีฟองอากาศวางหิวเสียบลงที่ปลายด้านบนของแผ่นเจลปล่อยให้อะกาโรสเจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง แล้วดึงหิวออกจะได้ช่องสำหรับใส่ตัวอย่างสารละลายดีเอ็นเอ นำเจลออกจากถาดแล้วนำไปใส่ในเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส ให้ด้านที่มีช่องอยู่ใกล้ขั้วลบ และเติม TAE buffer ให้ท่วมแผ่นเจลพอสมควร ผิวเจลควรอยู่ใต้สารละลายประมาณ 1-2 มิลลิเมตร จากนั้นผสมสารละลายดีเอ็นเอกับ 6X loading buffer (0.25% bromphenol blue, 0.25% xylene cyanol, 30% glycerol) ในอัตราส่วนดีเอ็นเอ 5 ต่อโพลคิงบัฟเฟอร์ 1 แล้วนำไปใส่ในช่องตรงร่องหิวด้วยไมโครปิเปตและใส่สารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 Kb DNA ladder marker) ที่ทราบขนาดและความเข้มข้น เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอลงในช่องหิวเช่นกัน ปิดฝาเครื่องและเปิดกระแสไฟฟ้าให้วิ่งผ่าน จากขั้วลบไปขั้วบวกโดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ ปิดกระแสไฟฟ้า เมื่อสีของโพลคิงบัฟเฟอร์เคลื่อนที่ไปได้ระยะทางที่ต้องการใช้เวลาประมาณ 30-45 นาที นำแผ่นเจลไปย้อมในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide 0.5 µg/ml) ประมาณ 10 นาทีแล้วนำแผ่นเจลไปล้างด้วยน้ำประปาประมาณ 5 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลไปส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต โดยใช้ UV transilluminator บันทึกภาพโดยใช้กล้องถ่ายภาพโพลาไรซ์ที่มีแผ่นกรองแสงสีแดงอยู่ด้วย เปรียบเทียบความเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

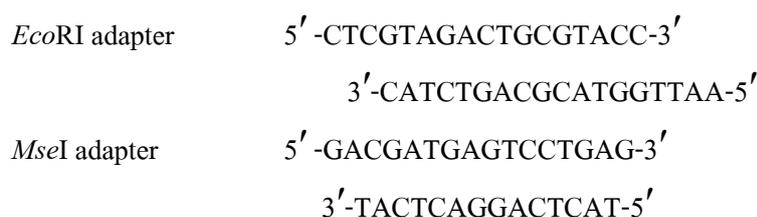
### 3.2 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคเอเอฟแอลพี

#### 3.2.1 การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและการเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ

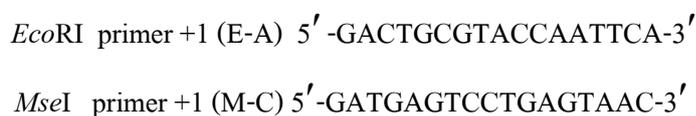
adapter

นำสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่าง มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร โดยใช้ปริมาตรของสารในการทำปฏิกิริยาประกอบด้วยสารละลายดีเอ็นเอ (100 ng/µl) 2.50 ไมโครลิตร 5X Reaction buffer 5.0 ไมโครลิตร *EcoRI* (10U/µl) 0.25 ไมโครลิตร *MseI* (5U/µl) 0.25 ไมโครลิตร รวมปริมาตรทั้งหมด 25.00 ไมโครลิตร นำมาบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (1X reaction buffer ประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM magnesium acetate และ 50 mM potassium acetate) จากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มาเติมสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter ซึ่งประกอบด้วยสารละลายดีเอ็นเอ

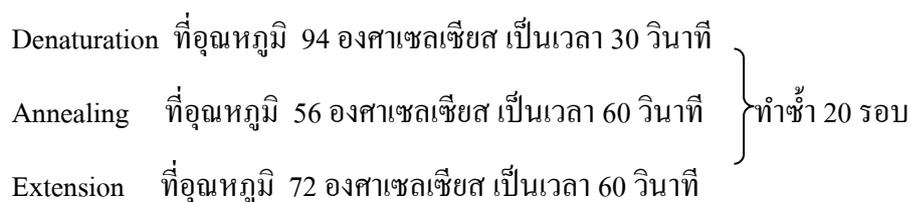
25 ไมโครลิตร *EcoRI* adapter (5 pmole/ $\mu$ l) 1 ไมโครลิตร *MseI* adapter (25 pmole/ $\mu$ l) 2 ไมโครลิตร 5x T4 ligase buffer 10 ไมโครลิตร T4 DNA ligase (1U/ $\mu$ l) 1 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 11 ไมโครลิตร ปริมาตรรวมทั้งหมด 50 ไมโครลิตร นำมาบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงและบ่มต่อที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ลำดับเบสของ adapter แต่ละชนิดมีดังนี้



3.2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์มี 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกคือ preselective amplification ขั้นตอนนี้จะใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์ 1 ตัวที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์เพื่อลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้และมีความเฉพาะในขั้นหนึ่งก่อน ไพรเมอร์ที่ใช้มีดังนี้



สารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาประกอบด้วย สารละลายดีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตร primer E-A (5 pmole/ $\mu$ l) 1 ไมโครลิตร primer M-C (5 pmole/ $\mu$ l) 1 ไมโครลิตร dNTP mix (2mM) 2.5 ไมโครลิตร 10X PCR buffer 2.5 ไมโครลิตร MgCl<sub>2</sub> (50mM) 0.75 ไมโครลิตร *Taq* polymerase (5 U/ $\mu$ l) 0.1 ไมโคร ลิตร น้ำกลั่น 15.15 ไมโครลิตร ปริมาตรรวมทั้งหมด 25 ไมโครลิตร จากนั้นนำสารละลายที่เตรียมแล้วเข้าเครื่องพีซีอาร์โดยใช้อุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยา คือ



เมื่อพีซีอาร์ในขั้น preselective amplification แล้ว แบ่งสารละลายดีเอ็นเอมาทำให้เจือจาง 20 เท่าด้วย สารละลาย TE สำหรับเป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณขั้นต่อไป ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ในขั้นที่สองคือ selective amplification ขั้นตอนนี้จะเพิ่มนิวคลีโอไทด์ 3 ตัวที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ เพื่อให้เกิดการคัดเลือกการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอบางส่วน กลุ่มสมของไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิดที่คัดเลือกแล้ว มีจำนวน 11 คู่ ดังนี้

M-CAC / E-AAC

M-CTT / E-AGC

M-CAA / E-AAC

M-CTC / E-ACC

M-CAC / E-AGG

M-CTT / E-ACA

M-CAT / E-AAC

M-CTC / E-AAC

M-CAC / E-ACG

M-CTT / E-AGG

M-CTC / E-AGG

สารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาประกอบด้วยสารละลายดีเอ็นเอที่ผ่านขั้น preselective amplification 5 ไมโครลิตร primer E-ANN (5 pmole/ $\mu$ l) 1 ไมโครลิตร primer M-CNN (5 pmole/ $\mu$ l) 1 ไมโครลิตร dNTP mix (2mM) 2 ไมโครลิตร 10X PCR buffer 2 ไมโครลิตร  $MgCl_2$  (50mM) 0.6 ไมโครลิตร *Taq* polymerase (5 U/ $\mu$ l) 0.1 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 8.3 ไมโครลิตร ปริมาตรรวมทั้งหมด 20 ไมโครลิตร เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยโปรแกรม touch down ซึ่งใช้อุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยาคือ

Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

Annealing ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 1 รอบ

Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที

โดยจะลดอุณหภูมิในขั้น annealing (65 องศาเซลเซียส) ลงรอบละ 0.7 องศาเซลเซียส จำนวน 12 รอบ และทำปฏิกิริยาต่อคือ

Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที	} 23 รอบ
Annealing	ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที	

จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ผ่านขั้นตอน selective amplification แล้วไปวิเคราะห์

### 3.2.3 การวิเคราะห์สารละลายดีเอ็นเอโดย denaturing polyacrylamide gel

3.2.3.1 การเตรียมกระจกสำหรับเทเจล นำแผ่นกระจกสำหรับเตรียมเจลมาล้างให้สะอาด แล้วเช็ดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ให้สะอาดทั้ง 2 แผ่น เช็ดกระจกแผ่นหลังด้วย bind silane (bind silane 1 ไมโครลิตร glacial acetic acid 2.5 ไมโครลิตร และเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 500 ไมโครลิตร) เพื่อให้เจลเกาะติดกระจก กระจกแผ่นหน้าที่มีลักษณะเป็นหูกระต่าย เช็ดให้ทั่วด้วย repel silane เพื่อไม่ให้เจลเกาะติดกระจก ปล่อยให้แห้งประมาณ 5-10 นาที จากนั้นนำกระจกทั้ง 2 แผ่นมาประกอบเข้าชุด โดยวาง spacer ไว้ทั้งสองข้างเพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างกระจกทั้งสอง โดยหันด้านที่ทา bind silane และ repel silane เข้าหากัน ใช้คลิปหนีบยึดให้อยู่คงที่ ใช้เทปกาวติดกระจก 3 ด้านเพื่อกันไม่ให้เจลรั่วซึม

3.2.3.2 การเตรียม polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ มีส่วนผสมประกอบด้วย 30% acrylamide (acrylamide : bisacrylamide 19:1) 6 มิลลิลิตร ยูเรีย (7.5 โมลาร์) 13.5 กรัม น้ำกลั่น 7.5 มิลลิลิตร 10% APS (ammonium persulfate) 300 ไมโครลิตร TEMED (N, N',N'- tetramethylethylenediamine) 15 ไมโครลิตร สำหรับวิธีการเตรียมโดยผสม acrylamide บัฟเฟอร์ TBE น้ำ และยูเรียในบีกเกอร์เขย่าเบา ๆ ในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส ให้อุณหภูมิละลายหมด รอจนอุณหภูมิลดลงประมาณอุณหภูมิห้อง แล้วเติม 10% APS และ TEMED เขย่าให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกันอย่างรวดเร็วระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ เทเจลใส่ลงในช่องระหว่างกระจกจนเต็ม ใส่หวีลงไปด้านบน วางกระจกให้ด้านบนเอียงทำมุมกับแนวระดับประมาณ 30 องศา เพื่อป้องกันการไหลซึมของเจล ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 2 ชั่วโมง ถ้าจะปล่อยเจลไว้ข้ามคืน ควรใช้แผ่นใสห่ออาหารปิดด้านบนของเจลไว้เพื่อให้ความชื้น

3.2.3.3 นำดีเอ็นเอที่ผ่านขั้นตอน selective amplification ไปแยกขนาดโดย electrophoresis และย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรท โดยมีขั้นตอนคือ

- 1) ล้างน้ำกลั่น 5 นาที
- 2) CTAB (0.4 g ในน้ำ 400 ml
- 3) แอมโมเนีย (4ml / 400ml) 15 นาที
- 4) silver nitrate (0.64g / น้ำ 400 ml + NaOH 533 ml + Ammonia 453 ml นาน 20 นาที
- 5) ไล่ NaOH ก่อนแล้วจึงเติม Ammonia สุดท้ายจนสีขุ่นหายไป
- 6) Developer ใช้  $\text{NaCO}_3$  8 g (แช่ให้เย็นจัดก่อนใช้) + formaldehyde 250 ml formaldehyde จะไล่ก่อนย้อม gel
- 7) ถ้าได้แถบสีตามต้องการแล้วให้นำไปล้างน้ำ หรืออาจจะผสม Glycerine

สารที่ใช้ในการเตรียม gel

Urea	9	กรัม	
น้ำกลั่น	5.0	ml	
5X TBE	4.0	ml	
30% gel	4.0	ml	
10%APS	200	ul	
TEMED	0.1	g	(ชั่งใน tube 1.5 หุ้มด้วย foil)

#### 4. การวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

นำสายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอเอฟแอลพี และเทคนิคเอสอาร์เอพีของทั้งสอง การทดลองมาวิเคราะห์หาความหลากหลาย โดยเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันของแต่ละตัวอย่างถ้ามีแถบดีเอ็นเอให้สัญลักษณ์ “1” ถ้าไม่มีแถบดีเอ็นเอให้สัญลักษณ์ “0” แล้วนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างโดยใช้โปรแกรม NTSYS pc version 2.0e (Rohlf, 1997) จากนั้นคำนวณหาดัชนีความเหมือนและจัดกลุ่มตัวอย่างด้วยวิธี unweighted pair group method of average (UPGMA) แสดงผลในรูปแบบของ phylogenetic tree และหาค่า Bootstrap ด้วยโปรแกรม PUAP\* pc Version 4 (Swofford, 2002)

#### 5. สูตรที่ใช้ในการวิเคราะห์ผล

1). สูตรในการคำนวณหาดัชนีความเหมือนของ Nei and Lei (1979) คือ

$$S_{ij} = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$$

เมื่อ  $S_{ij}$  = ดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรม

$N_i$  = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเหมือนกันทั้งตัวอย่างที่  $i$  และ  $j$

$N_j$  = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเฉพาะที่ตัวอย่าง  $j$

2). สูตรในการคำนวณหาค่า Polymorphic Information Content: PIC (Ott, 1991) คือ

$$H = 1 - \sum P_i^2$$

เมื่อ  $P_i$  = ความถี่ของแอลลีล (allele) ที่  $i$  ซึ่ง  $P_i$  ประกอบด้วย  $P_A$  และ  $P_p$

$P_A$  = ความถี่ของแอลลีลที่ไม่ปรากฏ (absent allele)

$P_p$  = ความถี่ของแอลลีลที่ปรากฏ (present allele) ณ ตำแหน่งเดียวกัน

**สถานที่ทำการศึกษา**

ห้องปฏิบัติการศูนย์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี จังหวัดลพบุรี

**ระยะเวลาในการศึกษา**

เดือนตุลาคม พ.ศ. 2550 – กันยายน 2551