# การพิสูจน์อัตลักษณ์ของพืชสมุนไพรไทยที่ใช้ชื่อพ้อง “โคคลาน” โดยแถบรหัสดีเอ็นเอร่วมกับเทคนิคการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง

1. นางสาววิภาวี พิเชฐกุล 5736567633
2. นางสาวสุธาทิพย์ แก้วทองเลี่ยม 5736574033

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

โครงการปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
เภสัชศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา เภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2561

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

# Authentication of the Thai medicinal plants sharing the same common name “Kho Khlan” by DNA barcoding coupled with high resolution melting (Bar-HRM) analysis


1. Miss Vipawee Pichetkun 5736567633
2. Miss Suthathip Gaewtongliam 5736574033



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University


A Senior Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Bachelor of Science Program in Pharmacy

Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany

Chulalongkorn University

2018


บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

| | |
|---|---|
| หัวข้อโครงการปริญญานิพนธ์ | การพิสูจน์อัตลักษณ์ของพืชสมุนไพรไทยที่ใช้ชื่อพ้อง “โคคลาน” โดยแถบรหัสดีเอ็นเอร่วมกับเทคนิคการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง |
| นิสิตผู้ดำเนินโครงการ | นางสาววิภาวี พิเชฐกุล<br>นางสาวสุธาทิพย์ แก้วทองเลี่ยม |
| สาขาวิชา/ภาควิชา | การค้นพบและพัฒนายา / ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ |
| อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ | รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ร.ต.อ.หญิง ดร.สุชาดา สุขหร่อง |
| อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.ทักษิณา ชวนอาษา |

---

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้โครงการปริญญานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต

..... คณบดี
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.รุ่งเพ็ชร สกุลบำรุงศิลป์)

..... ประธานสาขาการค้นพบและพัฒนายา
(รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.สุรีย์ เจียรณ์มงคล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์
(รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ร.ต.อ.หญิง ดร.สุชาดา สุขหร่อง)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.ทักษิณา ชวนอาษา)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

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

# บทคัดย่อปริญญานิพนธ์

**ชื่อโครงการ** : การพิสูจน์อัตลักษณ์ของพืชสมุนไพรไทยที่ใช้ชื่อพ้อง "โคคลาน" โดยแถบรหัสดีเอ็นเอร่วมกับเทคนิคการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง
**หัวหน้าโครงการ** : นางสาววิภาวี พิเชฐกุล 5736567633
**ผู้ร่วมโครงการ** : นางสาวสุธาทิพย์ แก้วทองเลี่ยม 5736574033
**อาจารย์ที่ปรึกษา** : รศ. ภญ. ร.ต.อ.หญิง ดร.สุชาดา สุขหร่อง, ผศ. ภญ. ดร.ทักษิณา ชวนอาษา
**สาขา/ภาควิชา** : การค้นพบและพัฒนายา/ ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์

"โคคลาน" เป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณแก้อาการปวดเมื่อย พบในรูปแบบที่เป็นเครื่องยาสมุนไพรที่ถูกลดขนาดเป็นชิ้นเล็กหรือเป็นผง หรืออาจพบเป็นส่วนประกอบในตำรับยา อย่างไรก็ตามมีสมุนไพรสามชนิดที่ใช้ชื่อว่า "โคคลาน" ได้แก่ *Croton caudatus* Geiseler และ *Mallotus repandus* (Rottler) Mull. Arg. ซึ่งเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae อีกชนิดหนึ่งเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Menispermaceae คือ *Anamirta cocculus* (L.) Wight & Arn. ซึ่งมีสาร picrotoxin เป็นองค์ประกอบทางเคมีที่เป็นพิษ ทำให้ทางเดินหายใจอุดตันและมีอาการทางระบบประสาท ในตำรายาไทยนิยมใช้สมุนไพรโคคลานชนิด *C. caudatus* และ *M. repandus* เป็นสมุนไพรแก้ปวดเมื่อย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องตรวจพิสูจน์อัตลักษณ์พืชสมุนไพร "โคคลาน" เพื่อใช้ให้ถูกต้นและเกิดความปลอดภัยแก่ผู้ใช้ ในการศึกษานี้จึงใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมชนิดแถบรหัสดีเอ็นเอในการตรวจระบุเอกลักษณ์ โดยประสบความสำเร็จในการอ่านแถบรหัสดีเอ็นเอบาร์โค้ด 4 บริเวณ ได้แก่ *mat*K, *rbc*L, *trn*H-*psb*A intergenic spacer และ Internal transcribed spacer (ITS) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ *mat*K, *rbc*L, *trn*H-*psb*A intergenic spacer และ ITS ของ *C. caudatus* เท่ากับ 1521, 1428, 445 และ 627 คู่เบส สมุนไพร *M. repandus* มีลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 1521, 1428, 783 และ 635 คู่เบส และ *A. cocculus* มีลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 1536, 1428, 640 และ 548 คู่เบส ตามลำดับ เพื่อความสะดวก รวดเร็ว และถูกต้องมากยิ่งขึ้น จึงพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดแถบรหัสดีเอ็นเอร่วมกับเทคนิคการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง (DNA Barcode - High Resolution Melting, Bar-HRM) ซึ่งเป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณแถบรหัสดีเอ็นเอร่วมกับเทคนิคการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง ในการศึกษานี้ ได้เลือกศึกษาบริเวณยีน *rbc*L ตำแหน่งที่ 890 - 998 ซึ่งมีจำนวน 109 คู่เบส ผลการศึกษาคือสามารถแยกความแตกต่างของพืชทั้งสามชนิดได้โดยการตรวจวิเคราะห์เส้นโค้งการหลอมเหลว (melting curve analysis) โดยสังเกตค่าการหลอมเหลว (melting temperature, $T_m$) ที่แตกต่างกัน โดยค่าเฉลี่ยของ $T_m$ ของ *C. caudatus*, *M. repandus* และ *A.cocculus* เท่ากับ 78.80 ± 0.10, 79.60 ± 0.10 และ 79.25 ± 0.15 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ดังนั้นการใช้แถบรหัสดีเอ็นเอร่วมกับเทคนิคการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูงจึงสามารถพิสูจน์อัตลักษณ์และแยกความแตกต่างของพืชสมุนไพรที่มีชื่อพ้องว่า "โคคลาน" ทั้งสามชนิดได้ รวมทั้งสามารถประยุกต์ใช้เทคนิคนี้ในการตรวจสอบและควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์สมุนไพรชนิดอื่นได้ต่อไป

คณะเภสัชศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลายมือชื่อนิสิต .....วิภาวี พิเชฐกุล.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

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

Project no. 3.17
Academic year 2018

# Abstract


**Senior project title** : Authentication of the Thai medicinal plants sharing the same common name "Kho Khlan" by DNA barcoding coupled with high resolution melting (Bar-HRM) analysis

**Student's name** : Miss Vipawee Pichetkun 5736567633
Miss Suthathip Gaewtongliam 5736574033

**Advisor/Co-advisor** : Assoc. Prof. Suchada Sukrong, Ph.D., Asst. Prof. Taksina Chuanasa, Ph.D.

**Field/Department** : Drug Discovery and Development/ Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany



"Kho Khlan" is a herb which is used for pain relieving. It is normally found as crude drug that has been reduced in size or processed into powder form. Besides, it is used as a component in many Thai herbal formulations. However, in Thailand, there are three species which have been known as 'Kho Khlan'. The first two species, *Croton caudatus* Geiseler and *Mallotus repandus* (Rottler) Mull. Arg. Which belong to Euphorbiaceae family whereas the third species, *Anamirta cocculus* (L.) Wight & Arn., is a member in Menispermaceae family. The issue is that *A. cocculus* contains picrotoxin which causes respiratory obstruction and toxicity to nervous system. Normally, *C. caudatus* and *M. repandus* are the two herbs used as a main component in Thai herbal formulations for pain relieving. So, it is important to authenticate Thai medicinal plants sharing the same common name "Kho Khlan" to use the right herb(s) and ultimately ensure the consumer safety. In this study, DNA barcoding was used to authenticate the three species of 'Kho Khlan' in Thailand. The nucleotide sequence readings of the 4 regions, including *mat*K, *rbc*L, *trn*H-*psb*A intergenic spacer and internal transcribed spacer (ITS), were successful for DNA barcode creation. The sizes of the 4 regions of *C. caudatus* were 1521, 1428, 445 and 627 base pairs, corresponding. Nucleotide sequences of *M. repandus* were 1521, 1428, 783 and 635 base pairs and that of 1536, 1428, 640 and 548 base pairs in *A. cocculus*. For more convenience, rapidity and accuracy, obtained DNA barcodes of the three species were further developed into the DNA Barcode-High Resolution Melting (Bar-HRM). This technique is to analyze a segment of interested DNA by multiplication of DNA coupled with melting curve analysis. In this study, a part of *rbc*L gene at nucleotide position from 890th to 998th (109 base pairs) was used for Bar-HRM. The results showed that there was a difference in melting temperature ($T_m$) among the three species called "Kho Khlan" by melting curve analysis. The mean of melting temperature ($T_m$) of *C. caudatus*, *M. repandus* and *A. cocculus* were 78.80 ± 0.20, 79.80 ± 0.10 and 79.33 ± 0.13°C, respectively. Therefore, using of DNA barcode coupled with melting curve analysis can confidently authenticate and differentiate Thai medicinal plants sharing the same common name "Kho Khlan". In the Future, these complied methods are potentially applied for controlling and investigation of Thai herb products.



Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University

Student's signature Vipawee Pichetkun
Advisor's signature



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

# คำนำ

โครงการปริญญานิพนธ์เรื่องการพิสูจน์อัตลักษณ์ของพืชสมุนไพรไทยที่ใช้ชื่อพ้อง “โคคลาน” โดยแถบรหัสดีเอ็นเอร่วมกับเทคนิคการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรเภสัชศาสตร์บัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปีการศึกษา 2561 ซึ่งจัดทำขึ้นเพื่อค้นหาแนวทางในการตรวจพิสูจน์อัตลักษณ์ของพืชที่ใช้ชื่อพ้อง "โคคลาน" เนื่องจากยังไม่มีผู้ศึกษาการพิสูจน์อัตลักษณ์ของพืชที่ใช้ชื่อพ้อง "โคคลาน” โดยการใช้แถบรหัสดีเอ็นเอและนำมาประยุกต์ใช้ด้วยเทคนิคการสร้างแถบรหัสดีเอ็นเอร่วมกับเทคนิคการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูงมาก่อน ทางผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาการตรวจพิสูจน์อัตลักษณ์ของพืชที่ใช้ชื่อพ้อง “โคคลาน”

ผู้วิจัยหวังไว้เป็นอย่างยิ่งว่าปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจในการศึกษาหาข้อมูล และหากมีข้อผิดพลาดประการใด ผู้วิจัยต้องขออภัยไว้ ณ ที่นี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

คณะผู้วิจัย

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

# กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาปริญญานิพนธ์นี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ร.ต.อ. หญิง ดร.สุชาดา สุขหร่อง อาจารย์ที่ปรึกษา และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.ทักษิณา ชวนอาษา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของโครงการนี้ ตลอดจนให้ความรู้และให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการดำเนินการในการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ เภสัชกร ดร.ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ สำหรับตัวอย่างพืชที่ใช้ในโครงการปริญญานิพนธ์

ขอขอบคุณ ภก. ชัยพล ตั้งพัฒน์ทอง และ ดร. กรรณิกา ทองขาว สำหรับความช่วยเหลือและการเอื้อเฟื้อทางด้านต่างๆ

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยแถบรหัสดีเอ็นเอของพืชสมุนไพรไทย สำหรับการอำนวยความสะดวกสถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมีในการดำเนินงาน

ขอขอบคุณฝ่ายวิชาการ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับเงินทุนในการดำเนินโครงการ

ขอขอบคุณภาควิชาเภสัชเวทและพฤกษศาสตร์ที่กรุณาให้ความสะดวกในการดำเนินในการทำโครงการนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

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

# สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ช
สารบัญ.....ซ
สารบัญตาราง.....ฎ
สารบัญภาพ.....ฐ
บทที่
1. บทนำ.....1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....2
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....3
2.1 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวกับพืชสมุนไพรไทยที่ใช้ชื่อพ้อง “โคคลาน”.....3
2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวกับสาร picrotoxin.....4
2.3 แนวคิดและทฤษฎีที่เกี่ยวกับการพิสูจน์อัตลักษณ์ของพืช.....4
2.4 แนวคิดและทฤษฎีที่เกี่ยวกับแถบรหัสดีเอ็นเอหลัก.....5
2.5 แนวคิดและทฤษฎีที่เกี่ยวกับปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส.....8
2.6 แนวคิดและทฤษฎีเกี่ยวกับการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธีของแซงเกอร์.....9
2.7 แนวคิดและทฤษฎีเกี่ยวกับเทคนิคการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง..10
3. วิธีดำเนินการวิจัย.....12
3.1 การสร้างแถบรหัสดีเอ็นเอ.....12
3.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสร้างแถบรหัสดีเอ็นเอ.....12
3.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา.....12
3.1.3 ตัวอย่างของพืชที่ใช้ในการสร้างแถบรหัสดีเอ็นเอ.....13
3.1.4 การจัดทำแถบรหัสดีเอ็นเอ.....14
3.2 การสร้างแถบรหัสดีเอ็นเอร่วมกับเทคนิคการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง (Bar-HRM analysis).....17

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

3.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสร้างแถบรหัสดีเอ็นเอร่วมกับเทคนิคการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง....17
3.2.2 สารเคมีที่ในการสร้างแถบรหัสดีเอ็นเอร่วมกับเทคนิคการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง....18
3.2.3 ตัวอย่างของพืช....18
3.2.4 การจัดทำแถบรหัสดีเอ็นเอร่วมกับเทคนิคการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง (Bar-HRM analysis)....18
3.3 การนำ Bar-HRM analysis มาประยุกต์ใช้ในการพิสูจน์อัตลักษณ์ของพืชสมุนไพรที่ใช้ชื่อพ้อง “โคคลาน” รวมถึงในรูปแบบของ crude drug....19
3.3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการพิสูจน์อัตลักษณ์ของพืชสมุนไพรที่ใช้ชื่อพ้อง “โคคลาน”....19
3.3.2 สารเคมีที่ใช้ในการพิสูจน์อัตลักษณ์ของพืชสมุนไพรที่ใช้ชื่อพ้อง “โคคลาน”....20
3.3.3 ตัวอย่างของพืชที่ใช้ในการสร้างแถบรหัสดีเอ็นเอ....21
3.3.4 วิธีการนำ Bar-HRM analysis มาประยุกต์ใช้ในการพิสูจน์อัตลักษณ์ของพืชที่ใช้ชื่อพ้อง “โคคลาน” รวมถึงในรูปแบบของ crude drug....22
4. ผลการศึกษาและการอภิปรายผลการวิจัย....25
4.1 ผลการสร้างแถบรหัสดีเอ็นเอ....25
4.1.1 ผลการเลือกใช้ universal primer หรือการออกแบบไพร์เมอร์....25
4.1.2 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ....29
4.1.3 ผลการจัดทำแถบรหัสดีเอ็นเอ....43
4.2 ผลการสร้างแถบรหัสดีเอ็นเอร่วมกับเทคนิคการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง....46
4.2.1 การเลือก primer....46
4.2.2 ผลการสร้างแถบรหัสดีเอ็นเอร่วมกับเทคนิคการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง....47
4.3 ผลการสร้างแถบรหัสดีเอ็นเอร่วมกับเทคนิคการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง....49
5. สรุปผล และข้อเสนอแนะ....51
5.1 สรุปผลการวิจัย....51
5.2 ข้อเสนอแนะ....51

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

รายการอ้างอิง.....52
ภาคผนวก.....55
ภาคผนวก ก.....55
ภาคผนวก ข.....56

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

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

# สารบัญตาราง

ตารางที่


1. ตัวอย่างของพืชที่ใช้ชื่อพ้อง “โคคลาน” ที่ใช้ในการสร้างแถบรหัสดีเอ็นเอ.....13
2. สารที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ.....16
3. สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส.....16
4. สารที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง...18
5. ตัวอย่างของพืชที่ใช้ชื่อพ้อง “โคคลาน” ที่จะนำมาพิสูจน์อัตลักษณ์.....21
6. แหล่งอ้างอิงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L ที่พบใน Genbank®.....25
7. ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L.....26
8. แหล่งอ้างอิงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ที่พบใน Genbank®.....26
9. ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K.....27
10. แหล่งอ้างอิงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *psb*A-*trn*H intergenic spacer ที่พบใน Genbank®.....27
11. ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *psb*A-*trn*H intergenic spacer.....28
12. แหล่งอ้างอิงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS ที่พบใน Genbank®.....28
13. ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS.....28
14. สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน *rbc*La ของ *Croton caudatis* และ *Mallotus repandus*.....29
15. สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน *rbc*L ของ *Croton caudatis* และ *Mallotus repandus*.....31
16. สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน *rbc*L ของ *Anamirta cocculus*.....32
17. สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน *mat*K ของ *Croton caudatus*.....33
18. อุณหภูมิในแต่ละหลุมปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน *mat*K ของ *Croton caudatus*.....33
19. สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน *mat*K ของ *mallotus repandus*.....35


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

20. สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน *mat*K ของ *Anamirta coculus*.....36
21. สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน *psb*A-*trn*H intergenic spacer ของ *Croton caudatus* และ *Mallotus repandus*.....38
22. อุณหภูมิในแต่ละหลุมปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน *psb*A-*trn*H intergenic spacer ของ *Croton caudatus* และ *Mallotus repandus*.....38
23. สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน *psb*A-*trn*H intergenic spacer ของ *Anamirta cocculus*.....40
24. สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน ITS ของ *Mallotus repandus*.....41
25. สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน ITS ของ *Anamirta cocculus*.....42
26. ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการสร้างแถบรหัสดีเอ็นเอร่วมกับเทคนิคการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง.....47
27. ค่าอุณหภูมิหลอมเหลว ($T_m$) ของพืชทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ชื่อพ้อง “โคคลาน”.....49
28. ค่าอุณหภูมิหลอมเหลว ($T_m$) และการพิสูจน์อัตลักษณ์ของพืชตัวอย่าง.....50

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

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

# สารบัญภาพ

ภาพที่

1. โครงสร้างของสาร picrotoxin....4
2. ตำแหน่งของยีน *rbc*L....6
3. ตำแหน่งของยีน *mat*K....6
4. ตำแหน่งของ *psb*A-*trn*H intergenic spacer....7
5. ตำแหน่งของ ITS....7
6. โครงสร้างของ Dideoxynucleotidetriphosphate (ddNTPs) และ Deoxynucleotidetriphosphate (dNTPs) ....9
7. สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสและการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง....19
8. ตัวอย่างของพืชที่นำมาพิสูจน์อัตลักษณ์....22
9. ผลการตรวจสอบ PCR product บริเวณ *rbc*La ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสของ *Croton caudatus* และ *Mallotus repandus*....30
10. ผลการตรวจสอบ PCR product บริเวณ *rbc*L ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสของ *Croton caudatus* และ *Mallotus repandus*....31
11. ผลการตรวจสอบ PCR product บริเวณ *rbc*L ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสของ *Anamirta cocculus*....32
12. ผลการตรวจสอบ PCR product บริเวณ *mat*K ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสของ *Croton caudatus*....34
13. ผลการตรวจสอบ PCR product บริเวณ *mat*K ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสของ *Mallotus repandus*....35
14. ผลการตรวจสอบ PCR product บริเวณ *mat*K ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสของ *Anamirta cocculus*....37
15. ผลการตรวจสอบ PCR product บริเวณ psbA-trnH intergenic spacer ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสของ *Croton caudatus* และ *Mallotus repandus*....39
16. ผลการตรวจสอบ PCR product บริเวณ psbA-trnH intergenic spacer ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสของ *Anamirta cocculus*....40

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

17. ผลการตรวจสอบ PCR product บริเวณ ITS ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสของ *Mallotus repandus*.....41
18. ผลการตรวจสอบ PCR product บริเวณ ITS ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสของ *Anamirta cocculus*.....42
19. แถบรหัสดีเอ็นเอของยีน *rbc*L ของพืชที่ใช้ชื่อพ้อง “โคคลาน” ในรูปแบบ FASTA.....43
20. แถบรหัสดีเอ็นเอของยีน *mat*K ของพืชที่ใช้ชื่อพ้อง “โคคลาน” ในรูปแบบ FASTA.....44
21. แถบรหัสดีเอ็นเอของ psbA-trnH intergenic spacer ของพืชที่ใช้ชื่อพ้อง “โคคลาน” ในรูปแบบFASTA.....45
22. แถบรหัสดีเอ็นเอของ ITS ของพืชที่ใช้ชื่อพ้อง “โคคลาน” ในรูปแบบ FASTA.....46
23. เส้นโค้งการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูงที่ผ่านการปรับให้เป็นมาตรฐานของพืชสมุนไพรที่ใช้ชื่อพ้อง “โคคลาน”.....48
24. เส้นโค้งแสดงความแตกต่างของเอชอาร์เอ็มของพืชสมุนไพรที่ใช้ชื่อพ้อง “โคคลาน” .....48

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

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

# บทที่ 1
# บทนำ

## 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

หลังจากที่ได้มีการประกาศใช้แผนแม่บทว่าด้วยการพัฒนาสมุนไพรไทย ฉบับที่ 1 พุทธศักราช 2560 – 2564 ส่งผลให้วงการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือกมีการพัฒนาสมุนไพรมากยิ่งขึ้นเพื่อตอบสนองต่อวัตถุประสงค์ของแผนแม่บทในข้อที่ 1 ซึ่งเป็นการพัฒนาสมุนไพรต่อยอดทั้งด้านการรักษาและผลิตภัณฑ์ประเภทอื่น[1] ในการใช้สมุนไพรเพื่อให้ได้ผลดีที่สุดจะต้องยึดหลักดังต่อไปนี้คือ 1. ใช้ให้ถูกต้น 2. ใช้ให้ถูกส่วน 3. ใช้ให้ถูกขนาด 4. ใช้ให้ถูกวิธี และ 5. ใช้ให้ถูกโรค โดยที่การปฏิบัติตามหลักการเพื่อให้เกิดประสิทธิผลสูงสุดคือการเริ่มต้นด้วยการใช้สมุนไพรที่ถูกต้อง อย่างไรก็ดีสมุนไพรที่มีชื่อพ้องหรือชื่อเรียกที่เหมือนกันอาจเป็นปัญหาที่ทำให้เกิดความสับสนและความผิดพลาดในการใช้สมุนไพรชนิดนั้น เนื่องจากการขาดความรู้ในด้านอนุกรมวิธาน (taxonomy) และการใช้สมุนไพรที่ผิดชนิดนี้อาจส่งผลเสียต่อสุขภาพของผู้ที่ใช้สมุนไพรหรืออาจทำให้ไม่ได้ผลการรักษาตามที่คาดหวัง

จากที่กล่าวมาข้างต้นว่าการใช้สมุนไพรที่ผิดชนิดนั้นสามารถส่งผลต่อผลของการรักษา นอกจากนั้นยังอาจทำให้เกิดพิษต่อผู้ที่ใช้สมุนไพรได้ ดังนั้นการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสมุนไพรนี้จึงเป็นส่วนสำคัญในการตรวจความถูกต้องของสมุนไพรก่อนที่จะมีการนำมาใช้ซึ่งจะสามารถช่วยลดอุบัติการณ์การเกิดการใช้สมุนไพรที่ไม่ถูกต้องได้

วิธีที่ใช้ในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ของสมุนไพรมีหลายวิธี ได้แก่ การตรวจทางเภสัชเวท ซึ่งประกอบด้วยวิธีทางมหทรรศน์และจุลทรรศน์ การตรวจทางเคมี และการใช้ข้อมูลทางพันธุกรรม โดยวิธีทางมหทรรศน์หรือการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นวิธีที่ไม่ต้องใช้เครื่องมือหรืออุปกรณ์พิเศษ แต่มีข้อจำกัดในเรื่องของความเหมือนกันของลักษณะสมุนไพรบางชนิด และสามารถเปลี่ยนแปลงไปได้ตามสภาพแวดล้อมจึงต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญ วิธีทางจุลทรรศน์เป็นวิธีส่องดูเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ วิธีวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเป็นวิธีตรวจสารเคมีของสมุนไพร เนื่องจากสมุนไพรแต่ละชนิดมีสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบแตกต่างกัน แต่มีข้อจำกัดคือปริมาณสารสำคัญขึ้นอยู่กับสิ่งแวดล้อม และการใช้ข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น ใช้ดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่ขึ้นกับสิ่งแวดล้อม โดยดีเอ็นเอสามารถแสดงเอกลักษณ์ของแต่ละสิ่งมีชีวิตและจะถูกเก็บข้อมูลในรูปของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ[2]

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

ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันมีการนำสมุนไพรมาใช้ในการรักษาแก้ปวดเมื่อยอยู่หลายชนิด ซึ่ง โคคลานเป็นพืชชนิดหนึ่งในนั้น แต่อย่างไรก็ดีในประเทศไทย มีพืชที่ใช้ชื่อว่าโคคลานอยู่ด้วยกัน 3 สปีชีส์ ได้แก่ *Croton caudatus* Geiseler, *Mallotus repandus* (Rottler) Mull. Arg. และ *Anamirta cocculus* (L.) Wight & Arn. โดย *Croton caudatus* Geiseler เป็นพืชชนิดหนึ่งที่อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae โดยมีชื่อไทยว่า โคคลานใบขน และในจังหวัดนครราชสีมาได้เรียกชื่อพืชชนิดนี้ว่าโคคลาน[3] พืชชนิดนี้มีสรรพคุณในการใช้แก้ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อและแก้ปวดข้อโดยการใช้ใบในการรักษา และสำหรับรากนั้นจะใช้เป็นยาระบายและลดไข้[4] สำหรับ *Mallotus repandus* (Rottler) Mull. Arg. เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae เช่นเดียวกัน โดยมีชื่อไทยว่าโพคานและโคคลาน[3] สรรพคุณของพืชนี้คือการใช้ลำต้นแก้ปวดเมื่อยตามร่างกายและปวดกระดูก[5] ในขณะที่ *Anamirta cocculus* (L.) Wight & Arn. เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Menispermaceae ซึ่งในภาคกลางได้เรียกชื่อพืชชนิดนี้ว่าโคคลาน[3] โดยพืชชนิดนี้มีข้อบ่งใช้ในการนำมาเบื่อปลา[6] และใช้ในการรักษาผู้ที่รับประทานยานอนหลับจำพวก barbiturate ที่รับประทานเกินขนาด[7] เนื่องจากมีสาร picrotoxin ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้ง GABA receptor[8] โดยปัญหาชื่อไทยที่พ้องกันว่าโคคลานนี้และข้อบ่งใช้ที่แตกต่างกันนี้ อาจส่งผลทำให้เกิดการนำสมุนไพรผิดชนิดไปใช้เป็นวัตถุดิบของผลิตภัณฑ์ที่มีการจำหน่ายในท้องตลาด

งานวิจัยนี้จึงได้ทำการการพิสูจน์อัตลักษณ์ของพืชสมุนไพรไทยที่ใช้ชื่อคล้ายกันนี้ โดยการใช้แถบรหัสดีเอ็นเอ เพื่อที่ในอนาคตจะสามารถนำมาพัฒนาสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA Signature) ซึ่งใช้ในการตรวจความถูกต้องของวัตถุดิบที่นำมาใช้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ชื่อว่าโคคลานได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อสร้างแถบรหัสของพืชสมุนไพรไทยที่ใช้ชื่อพ้อง “โคคลาน” ซึ่งใช้ในการพิสูจน์อัตลักษณ์ได้ทั้ง 3 สปีชีส์ ได้แก่ *Croton caudatus* Geiseler, *Mallotus repandus* (Rottler) Mull. Arg. และ *Anamirta cocculus* (L.) Wight & Arn.

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

# บทที่ 2
# เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการจัดทำโครงการปริญญานิพนธ์เรื่องการพิสูจน์อัตลักษณ์ของพืชสมุนไพรไทยที่ใช้ชื่อพ้อง “โคคลาน” โดยแถบรหัสดีเอ็นเอร่วมกับเทคนิคการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง คณะผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้นำเสนอตามหัวข้อเรียงตามลำดับ ดังนี้

## 2.1 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวกับพืชสมุนไพรไทยที่ใช้ชื่อพ้อง “โคคลาน”

ในประเทศไทยมีพืชสมุนไพรไทยที่ใช้ชื่อพ้อง “โคคลาน” อยู่ 3 ชนิดได้แก่ *Croton caudatus* Geiseler, *Mallotus repandus* (Rottler) Mull. Arg. และ *Anamirta cocculus* (L.) Wight & Arn. โดยมีรายละเอียดดังนี้

2.1.1 *Croton caudatus* Geiseler มีชื่อสามัญว่าโคคลานใบขน เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae ถูกจัดเป็นพืชประเภทไม้พุ่ม (shrub) มีความสูงประมาณ 2-3 เมตร พบในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ พม่า ไทย กัมพูชา ลาว เวียดนาม มาเลเซีย อินโดนีเซีย และฟิลิปปินส์ ส่วนเถายาวได้ถึง 27 เมตร มีฤทธิ์ในการเป็นยาระบายและลดไข้ ส่วนรากพบว่ามีการนำไปใช้เป็นยารักษาโรคกันอย่างแพร่หลาย มีฤทธิ์ในการบรรเทาอาการปวดเมื่อยตามตัวและปวดกระดูก[9]

2.1.2 *Mallotus repandus* (Rottler) Mull. Arg. มีชื่อสามัญว่าโคคลานและโพคาน อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae เป็นไม้พุ่ม (shrub) พบมากในประเทศบังกลาเทศและประเทศอื่นๆ ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น พม่า กัมพูชา จีน อินเดีย ลาว มาเลเซีย ศรีลังกา ไทย และเวียดนาม พืชชนิดนี้ประกอบด้วยสารประเภท terpenoids, polyphenols และ benzopyrans ซึ่งในประเทศไทยได้มีการนำใบของพืชชนิดนี้มาใช้ในการบรรเทาอาการปวดกล้ามเนื้อ[10]

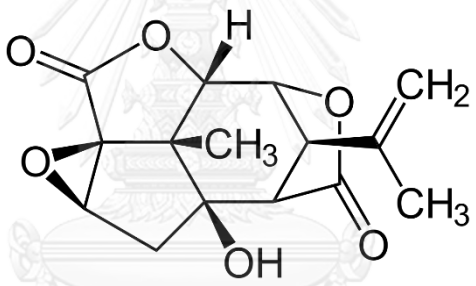
2.1.3 *Anamirta cocculus* (L.) Wight & Arn. มีชื่อสามัญว่าโคคลาน อยู่ในวงศ์ Menispermaceae เป็นไม้เถา (Climber) เถามีลักษณะกลม ยาว และเลื้อยตามพื้นดินหรือตามต้นไม้ชนิดอื่น มีความยาวได้ถึง 15 เมตร สีผิวของเถาจะเป็นสีดำแดงคร่ำ ปลายใบแหลมยาวประมาณ 7-10 เซนติเมตร ผลของพืชชนิดนี้มีชื่อเรียกว่า “Poison berry” เนื่องจากประกอบด้วยสาร picrotoxin ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้ง GABA receptor ส่งผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง ทำให้พืชชนิดนี้ถูกจัดเป็นพืชพิษอยู่ในฐานข้อมูล FDA Poisonous Plant Database แต่อย่างไรก็ตาม

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

ได้มีการพืชชนิดนี้มาใช้ประโยชน์โดยการนำมารักษาพิษในคนที่รับประทานยาจำพวก Barbiturate เกินขนาด[11]

## 2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวกับสาร picrotoxin

สาร picrotoxin เป็นสารที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม sesquiterpene glycoside มีชื่อเรียกอื่นว่า Cocculus, Indian berry และ Fish berry มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{30}H_{34}O_{13}$ และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 602.589 กรัมต่อโมล พบสารชนิดนี้ในใบและผลของ *Anamirta cocculus* มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ $GABA_A$ receptor แบบ non-competitive ซึ่งส่งผลให้ระบบประสาทถูกกระตุ้น ในปัจจุบันได้มีการนำเมล็ด *Anamirta cocculus* มาใช้เป็นยาเบื่อปลาและในทางการแพทย์ถูกนำมาใช้เป็น CNS stimulant และเป็น antidote ในผู้ป่วยที่รับประทานยา barbiturate เกินขนาด[8,12-13]




**ภาพที่ 1** โครงสร้างของสาร picrotoxin[8]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

## 2.3 แนวคิดและทฤษฎีที่เกี่ยวกับการพิสูจน์อัตลักษณ์ของพืช

ในปัจจุบันประเทศไทยมีการนำพืชและสมุนไพรมาใช้ในอุตสาหกรรม ทั้งเป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์อาหารเสริม หรือเป็นสารสำคัญในยาบางตำรับ ทั้งนี้จึงมีความจำเป็นต้องมีการพิสูจน์อัตลักษณ์ของพืชและสมุนไพรที่นำมาใช้เพื่อให้เกิดการนำมาใช้ผิดต้นจนนำไปการเกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้ โดยทั่วไปแล้วการพิสูจน์อัตลักษณ์ของพืชนั้นมีอยู่หลายวิธี ซึ่งแต่ละวิธีก็มีข้อดีและข้อเสียที่แตกต่างกันไป เพื่อการพิสูจน์อัตลักษณ์พืชได้อย่างแม่นยำจำเป็นต้องใช้ข้อมูลจากหลายๆ วิธีมาประกอบกัน สำหรับกระบวนการที่เป็นมาตรฐานที่สามารถใช้จำแนกชนิดของพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพและปลอดภัยประกอบไปด้วยวิธีดังต่อไปนี้[14-17]

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

1. วิธีทางมหทรรศน์ (Macroscopic method) เป็นเทคนิคในการพิสูจน์อัตลักษณ์ของพืชที่ต้องใช้ความรู้ความชำนาญทางด้านอนุกรมวิธาน (Taxonomy) โดยต้องมีการวิเคราะห์ลักษณะภายนอกของพืช (Morphological features)[18] โดยการใช้ประสาทสัมผัสทั้งห้าในการประเมิน (Organoleptic evaluation)[19] เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการพิสูจน์อัตลักษณ์ของพิช โดยการนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลของการถูกจัดจำแนกสายพันธุ์ของพืช (Classification)

2. วิธีทางจุลทรรศน์ (Microscopic method) เป็นการวิเคราะห์องค์ประกอบภายในเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ อาจต้องมีการการย้อมสีตัวอย่าง (straining reagents) เช่น สีซาฟรานิน (safranin) หรือสีฟาสต์กรีน (fast green) ในการส่องดูตัวอย่าง นอกจากนั้นการใช้กล้องจุลทรรศน์เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ครบถ้วนจำเป็นต้องดูทั้งแบบภาพตัดขวางและภาพตัดตามยาว[19]

3. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี (Chemical constituent investigation) เป็นเทคนิคการวิเคราะห์สารสำคัญที่อยู่ในพืช โดยพืชที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกันอาจจะมีสารตัวเดียวกัน[2] แต่อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้มีข้อจำกัดในเรื่องสิ่งแวดล้อม เนื่องจากปริมาณสารสำคัญขึ้นอยู่กับสิ่งแวดล้อมทำให้อาจเกิดความคลาดเคลื่อนในจัดหมวดหมู่พืชได้

4. การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ (Physio-chemical analysis) เป็นการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของพืช โดยดูปริมาณความชื้น (moisture content) ปริมาณเถ้า (Total ash) และปริมาณของสารสกัดด้วยตัวทำละลายที่กำหนด (Extractive value)[2,20]

5. การใช้ข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น ใช้ดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่ขึ้นกับสิ่งแวดล้อม โดยดีเอ็นเอสามารถแสดงเอกลักษณ์ของแต่ละสิ่งมีชีวิตและจะถูกเก็บข้อมูลในรูปของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ[2]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

## 2.4 แนวคิดและทฤษฎีที่เกี่ยวกับแถบรหัสดีเอ็นเอหลัก

สำหรับพืชบก มีดีเอ็นเอ 4 บริเวณที่เหมาะสมในการใช้เป็นแถบรหัสดีเอ็นเอหลัก ได้แก่ *rbc*L, *mat*K, *psb*A-*trn*H intergenic spacer, internal transcribed spacer (ITS)

### 2.4.1 ยีน *rbc*L

เป็นยีนชนิดนึ่งที่บรรจุอยู่ในคลอโรพลาสต์ มีขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์ 1431 คู่เบส อาจมีขนาดมากหรือน้อยกว่านี้ขึ้นกับการเกิด Indel (Insertions/deletions) ในยีน จะมีหน้าที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์รูบิสโกหน่วยย่อยขนาดใหญ่ โดยปกติการแปลรหัสจากยีนที่มาจากคลอโรพลาสต์มักเกิดการรบกวน

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

จากส่วนที่เรียกว่าอินทรอน (Intron)[21] แต่จะไม่เกิดกับยีน *rbc*L มีบางงานวิจัยกล่าวว่ายีน *rbc*L มีอัตราการเกิดวิวัฒนาการช้า (*rbc*L Genes Evolve at a Slow Rate) ทำให้มีความสามารถในการนำมาใช้ประโยชน์ในการแยกสปีชีส์ (discrimination power) ของพืชได้น้อยเนื่องจากยีนส่วนนี้เกิดความแตกต่างของยีนน้อยในพืชดอก (Flowering plant taxa) เป็นส่วนใหญ่ แต่ข้อดีของการใช้ประโยชน์ของยีน *rbc*L นั้นมีประโยชน์อยู่ 2 ประเด็นหลัก คือ สามารถนำมาใช้ในการทำ phylogeny และสามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ครบทั้งยีนด้วย Sanger sequencing[22]

**ภาพที่ 2** ตำแหน่งของยีน *rbc*L

2.4.2 ยีน *mat*K

ยีน *mat*K (maturaseK gene) เป็นยีนที่บรรจุอยู่ในคลอโรพลาสต์ มีส่วนที่เป็นบริเวณอนุรักษ์(highly conserved seguence) มีขนาดความยาวของยีน 1500 คู่เบส มีตำแหน่งที่บริเวณ *trn*K[23] ยีนส่วนนี้เป็นตัวเลือกที่ดีที่จะนำมาใช้ในการศึกษาความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด[24] เนื่องจากยีน *mat*K มีขนาดตามอุดมคติ มีอัตราการแทนที่สูง มีความแปรผันของระดับกรดนิวคลีอิกที่โคดอนตำแหน่งที่หนึ่งและสองสูง มีอัตราการเกิด transition/transversion ที่ค่อนข้างต่ำ.นอกจากนั้นการเกิด Polymorphism ที่บริเวณ *trn*K, *mat*K และ intergenic *trn*L - *trn*F ทำให้มีการนำยีน *mat*K มาศึกษาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการ (study the phylogeny of various plants)[25]

**ภาพที่ 3** ตำแหน่งของยีน *mat*K

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

2.4.3 *psb*A-*trn*H intergenic spacer

เป็นส่วนที่บรรจุอยู่ในคลอโรพลาสต์ ที่ไม่ได้มีการถอดรหัส ขนาดของดีเอ็นเอมีความแตกต่างกันสูงขึ้นกับชนิดของพืช ช่วงความยาวของดีเอ็นเอมีตั้งแต่ 100 คู่เบส ไปจนถึงมากกว่า 1000 คู่เบส เป็นส่วนของดีเอ็นเอที่สามารถนำมาศึกษาพืชดอกได้แทบจะทั้งหมด เนื่องจากมีนิวคลีไทด์อนุรักษ์ขนาบข้างคือ *trn*H และ *psb*A ทำให้ง่ายในการออกแบบไพร์เมอร์มาเกาะเพื่อเพิ่มปริมาณของดีเอ็น ข้อจำกัดของดีเอ็นเอส่วนนี้คือ เป็นส่วนของดีเอ็นเอที่มีความแปรผันสูงภายในสปีชีส์เพราะมีการเกิด Indel (Insertion and deletion)ทำให้ความสามารถในการแยกชนิดของสิ่งมีชีวิตได้ไม่ค่อยดี และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำกันทำให้ได้นิวคลีโอไทด์สายสั้นกว่าที่ควรจะเป็น จึงต้องแก้ปัญหาด้วยการใช้ไพร์เมอร์หลายเส้นอ่านไปกลับเพื่อไม่ให้เกิดปัญหาดังกล่าว[2]

**ภาพที่ 4** ตำแหน่งของ *psb*A-*trn*H intergenic spacer

2.4.4 Internal transcribed spacer (ITS)

ดีเอ็นเอส่วนนี้จะมีอยู่ 2 บริเวณ คือ ITS1 และ ITS2 จากรูปที่แสดงจะเห็นว่าส่วน ITS1 จะอยู่ระหว่าง 18s กับ 5.8s สำหรับบริเวณ ITS2 จะมีตำแหน่งอยู่ระหว่าง 5.8s กับ 28s เป็นดีเอ็นเอที่อยู่ในนิวเคลียส จากหลายๆงานวิจัยมีการนำดีเอ็นส่วนนี้มาใช้ประโยชน์การอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ทั่วไป และใช้แยกความแตกตางของสิ่งมีชีวิตที่มีความยาวของงนิวคลีโอไทด์ไม่มาก[26]

**ภาพที่ 5** ตำแหน่งของ ITS

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

## 2.5 แนวคิดและทฤษฎีที่เกี่ยวกับปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) เป็นเทคนิคที่ถูกคิดค้นโดย Kary Mullis โดยอาศัยหลักการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ในการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ ซึ่งเทคนิคนี้ได้ถูกนำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอในหลอดทดลองจากปริมาณน้อยจนได้ผลผลิตเป็นพันล้านโมเลกุล[27]

ขั้นตอนการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในหนึ่งรอบของการทำงานของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจะประกอบไปด้วย 3 ขั้นตอน[2,27] ได้แก่

1) การแยกของสายดีเอ็นต้นแบบ (denaturing) ในขั้นตอนนี้ดีเอ็นเอต้นแบบที่เป็นสายคู่จะถูกทำลายพันธะและแยกออกเป็นสายเดี่ยว อุณหภูมิที่อยู่ขั้นตอนนี้อยู่ที่ประมาณ 94-96 องศาเซลเซียส ใช้ระยะเวลานาน 30-60 วินาที
2) การจับของไพร์เมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing) เป็นขั้นตอนที่ไพร์เมอร์เข้าจับกับเบสคู่สมบนดีเอ็นเอ โดยทั่วไปจะใช้อุณหภูมิประมาณ 50-65 องศาเซลเซียส ใช้ระยะเวลา 30-60 วินาที
3) การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ (Extension) ในขั้นตอนนี้ DNA polymerase จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเติมเบสที่ปลาย 3’ ของไพร์เมอร์ที่เข้าคู่กับดีเอ็นเอต้นแบบ อุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอนนี้อยู่ที่ 72 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะกับการกำงานของเอนไซม์ ใช้ระยะเวลา 30-120 นาที ซึ่งขึ้นอยู่กับความยาวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ

องค์ประกอบในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส[2,27]

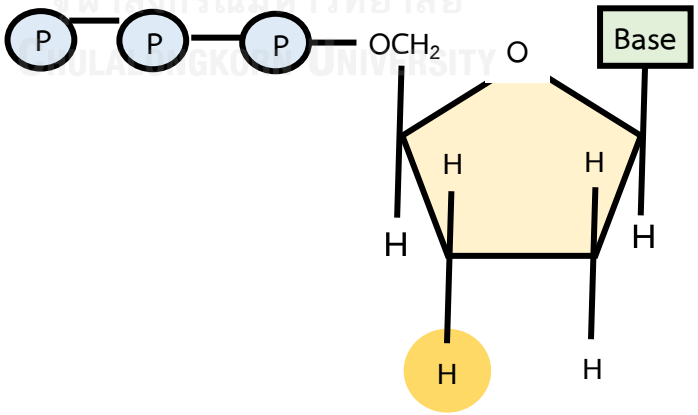
1) ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) เป็นสายต้นแบบที่มี target sequence ที่ต้องการอยู่ ปกติจะใช้ 10-50 นาโนกรัม ในการทำปฏิกิริยา
2) เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส (DNA polymerase) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่
3) ไพร์เมอร์ (Primer) เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์สายสั้น ขนาด 18-25 เบส ซึ่งจะมีอยู่สองแบบ คือ ไพร์เมอร์ไปข้างหน้า (Forward Primer) กับไพร์เมอร์ผันกลับ (Reverse Primer) ไพร์เมอร์คู่นี้จะทำหน้าที่จับกับตำแหน่งขนาบข้าง (Flanking region) กับส่วนที่ต้องการเพิ่มจำนวน

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

4) ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไทรฟอสเฟต (dNTPs) ประกอบไปด้วย 4 ชนิด ดังนี้ ดีออกซีอะดีโนซีนไทรฟอสเฟต (dATP) ดีออกซีกัวนิดีนไทรฟอสเฟต (dGTP) ดีออกซีไทมิดีนไทรฟอสเฟต (dTTP) และเบสไซโทซีนไทรฟอสเฟต (dCTP)
5) สารละลายบัฟเฟอร์ (Buffer) ปรับสภาวะความเป็นกรด-ด่างให้เหมาะสม
6) น้ำ ($H_2O$) ใช้ในการปรับปริมาตรในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา
7) แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

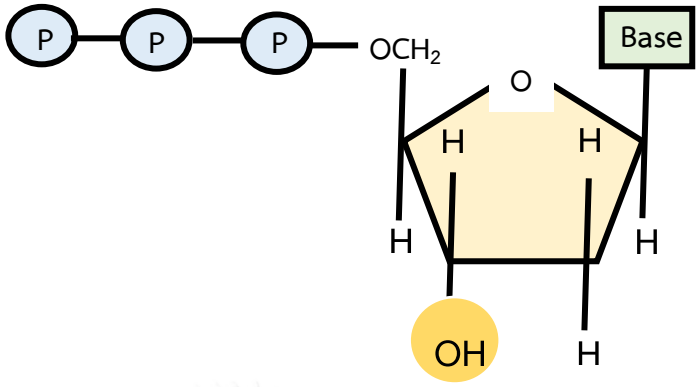
## 2.6 แนวคิดและทฤษฎีเกี่ยวกับการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธีของแซงเกอร์ (Sanger sequencing)

การอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธีของแซงเกอร์ (Sanger sequencing) หรือที่เรียกว่า “chain termination method” ถูกพัฒนาขึ้นโดย Fred Sanger และคณะในปีคริสตศักราช 1977 ซึ่งวิธีนี้จะใช้ เอนไซม์ DNA polymerase ไพร์เมอร์ ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไทรฟอสเฟต (dNTPs) ดีเอ็นเอต้นแบบ และ ไดดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไทรฟอสเฟต (ddNTPs) ที่ติดฉลากสารเรืองแสง ซึ่งทำให้หยุดการต่อสายของนิวคลีโอไทด์โดยไดดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไทรฟอสเฟตมีความแตกต่างจากดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไทรฟอสเฟตดังภาพที่ 2




ddNTPs

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




dNTPs

**ภาพที่ 6** โครงสร้างของ Dideoxynucleotidetriphosphate (ddNTPs) และ Deoxynucleotidetriphosphate (dNTPs)

ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะดำเนินต่อไปจนกระทั่งไดดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไทรฟอสเฟตเข้ามาต่อ ทำให้การสร้างสายดีเอ็นเอหยุดลง ดังนั้นสายดีเอ็นเอที่ได้จึงมีความยาวที่แตกต่างกัน เมื่อนำไปแยกนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องอัตโนมัติ สายดีเอ็นเอที่มีสารเรืองแสงจะถูกอ่านตามเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอในรูปของ Electropherogram[2,28]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

**2.7 แนวคิดและทฤษฎีเกี่ยวกับเทคนิคการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง**

เทคนิคการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง เป็นเทคนิคที่ใช้แยกความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ในขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาพีซีอาร์ สีไซเบอร์กรีนจะเข้าไปแทรกตัวอยู่ในดีเอ็นเอสายคู่และเกิดการเปล่งแสง หลังจากปฏิกิริยาพีซีอาร์เสร็จสิ้นลง จะเข้าสู่ขั้นตอนของการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง โดยการเพิ่มอุณหภูมิขึ้น 0.1 องศาเซียลเซียสต่อนาที อุณหภูมิที่สูงขึ้นจะทำให้ดีเอ็นเอสายเกลียวคู่คลายตัว ส่งผลให้สีหลุดออก การเปล่งแสงจึงลดลง ผลการทดลองที่ได้จะอยู่ในรูปของเส้นโค้งการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูงที่ผ่านการปรับให้เป็นมาตรฐาน (normalized HRM curve) และเส้นโค้งแสดงความแตกต่างของเอชอาร์เอ็ม (Difference HRM curve) รวมถึงค่าอุณหภูมิหลอมเหลว (Melting temperature: $T_m$) ซึ่งคืออุณหภูมิที่

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

อัตราการลดลงของการเรืองแสงมากที่สุด โดยเมื่อออกแบบไพร์เมอร์ให้ได้ชิ้นส่วนของผลผลิตพีซีอาร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันของพืชแต่ละชนิด จากนั้นนำมาตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง จะทำให้สามารถพิสูจน์อัตลักษณ์ของพืชได้ โดยสังเกตได้จากเส้นโค้งและค่าอุณหภูมิหลอมเหลวที่แตกต่างกัน[2,29]

การใช้แถบรหัสดีเอ็นเอร่วมกับเทคนิคการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูงนี้มีข้อดี คือ เป็นเทคนิคที่ง่ายและรวดเร็ว ใช้สารน้อย และมีความคุ้มค่าเมื่อเปรียบเทียบระหว่างต้นทุนและประสิทธิภาพของการทดลองที่ได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

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

# บทที่ 3
# วิธีดำเนินการวิจัย

## 3.1 การสร้างแถบรหัสดีเอ็นเอ

### 3.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสร้างแถบรหัสดีเอ็นเอ

3.1.1.1 อุปกรณ์สำหรับการสกัด วัดคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

- โกร่งกระเบื้องและลูกโกร่ง
- ถุงมือปราศจากแป้ง
- ภาชนะเก็บความเย็น
- เครื่องชั่งน้ำหนักแบบดิจิตอล
- Micropipette และ Micropipette tube
- ถาดแม่พิมพ์เจล (Tray) และหวี (Comb)
- ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuge, Denville 260D)
- Microwave
- เครื่องแยกขนาดดีเอ็นเอ (Gel electrophoresis)
- อุปกรณ์ฉายแสงยูวีและถ่ายภาพเจล (GelDoc$^{TM}$XR, Biorad)

3.1.1.2 อุปกรณ์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์

- เครื่องพีซีอาร์ (C1000$^{TM}$ Thermal cycler cycler, Biorad)
- PCR Tube (strip)

3.1.1.3 โปรแกรมที่ใช้ในการวิเคราะห์

### 3.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา

3.1.2.1 สารเคมีที่ในการสกัด และตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

- Liquid nitrogen
- ผง Agarose
- Ultrapure water
- 50x Tris-Acetate-EDTA (TAE) buffer, pH 8.0 (Invitrogen)

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

- Ethidium bromide solution
- 10X loading dye
- VC 100 bp plus ladder
- Genomic DNA Mini Kit

3.1.2.2 สารเคมีในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์

- PCR buffer
- Ultrapure water
- 50 mM MgCl2
- 10 mM dNTPs
- Taq DNA polymerase (5 U/microliter)
- Forward primer
- Reverse primer

**3.1.3 ตัวอย่างของพืชที่ใช้ในการสร้างแถบรหัสดีเอ็นเอ**

ตัวอย่างของพืชที่ใช้ในการสร้างแถบรหัสดีเอ็นเอในการทดลองนี้คือพืชสมุนไพรไทยที่ใช้ชื่อพ้อง “โคคลาน” ดังตารางที่ 1

**ตารางที่ 1** ตัวอย่างของพืชที่ใช้ชื่อพ้อง “โคคลาน” ที่ใช้ในการสร้างแถบรหัสดีเอ็นเอ

| ชื่อวิทยาศาสตร์ | ชื่อทั่วไป | สถานที่เก็บตัวอย่าง |
|---|---|---|
| *Croton caudatus* | โคคลานใบขน | จังหวัดฉะเชิงเทรา |
| *Mallotus repandus* | โคคลาน, โพคาน | จังหวัดฉะเชิงเทรา |
| | | จังหวัดปราจีนบุรี |
| | | จังหวัดกรุงเทพมหานคร |
| | | จังหวัดนนทบุรี |
| *Anamirta cocculus* | โคคลาน | จังหวัดอุบลราชธานี |
| | | จังหวัดนครนายก |
| | | จังหวัดจันทบุรี |

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

**3.1.4 การจัดทำแถบรหัสดีเอ็นเอ**

การจัดทำแถบรหัสดีเอ็นเอมีขั้นตอน ดังนี้

3.1.4.1 เก็บตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างใบอ่อนของพืชสมุนไพรไทยที่ใช้ชื่อพ้อง “โคคลาน” ที่สมบูรณ์ ไม่มีแมลงหรือโรคพืชรบกวน ไว้ในถุงพลาสติก จากนั้นพรมน้ำเล็กน้อย มัดถุงให้แน่น และเก็บรักษาในตู้เย็น จนกระทั่งถึงเวลาทำการสกัดดีเอ็นเอ ทำการบันทึกชื่อสปีชีส์ของพืช รหัส วันที่ และสถานที่เก็บเพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิง

3.1.4.2 สกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอโดยการใช้ QIAgen Kit ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ บดเนื้อเยื่อพืชที่มีน้ำหนักเปียก (wet weight) ไม่มากกว่า 100 มิลลิกรัมด้วย TissueRuptor® หรือโกร่งและลูกโกร่งบดยา จากนั้นเติม buffer AP1 400 ไมโครลิตร และ RNase A 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex และบ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 10 นาที โดยพลิกกลับหลอดไปมา 2-3 ครั้งระหว่างที่มีการบ่ม จากนั้นเติม buffer P3 130 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 20,000 xg เป็นเวลา 5 นาที ปิเปตสารละลายที่ได้ใส่ลงใน QIAshredder spin column ที่วางใน collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 20,000 xg เป็นเวลา 2 นาที ปิเปตสารละลายที่ผ่านลงมาใน collection tube ลงยังหลอดใหม่ และเติม buffer AW1 ปริมาตร 1.5 เท่าของสารละลาย ผสมให้เข้ากันโดยการใช้ปิเปต ปิเปตสารละลายผสมนี้ 650 ไมโครลิตรลงใน DNeasy Mini spin column ที่วางใน collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 xg เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งสารละลายที่ผ่านมาใน collection tube ย้าย spin column เดิมนี้ใน collection tube หลอดใหม่ จากนั้นเติม buffer AW2 500 ไมโครลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 xg เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งสารละลายที่ผ่านมาใน collection tube จากนั้นเติม buffer AW2 อีก 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 20,000 xg เป็นเวลา 2 นาที ย้าย spin column ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 หรือ 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติม buffer AE 100 ไมโครลิตร เพื่อใช้ในการชะสาร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 xg เป็นเวลา 1 นาที และทำในขั้นตอนตั้งแต่เติม buffer AE 100 ไมโครลิตร ใหม่อีกครั้ง[30]

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

3.1.4.3 ทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์มากขึ้น

เติม NaI ปริมาตร 3 เท่าของปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการ จากนั้นเติม GLASSMILK suspension 5 ไมโครลิตรในสารละลายที่มีดีเอ็นเอเข้มข้น 5 ไมโครกรัม หรือน้อยกว่า ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที ผสมทุกๆ 1-2 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 5 วินาทีเพื่อตกตะกอน ดูดสารละลายส่วนบนออก เติม NEW Wash ประมาณ 500 ไมโครมิตร เพื่อกระจาย pellet ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 5 วินาที ดูดสาระลายส่วนบนทิ้ง ล้าง pellet ด้วย NEW Wash ประมาณ 200-700 ไมโครลิตร อีก 2 ครั้ง ปล่อยให้แห้ง จากนั้นชะด้วย TE ประมาณ 20 ไมโครลิตร โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 30 วินาที เพื่อให้ pellet ตกตะกอนแข็ง ปิเปตดูดสารละลายส่วนบนซึ่งเป็นสารละลายดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์มากขึ้น[3]

3.1.4.4 ตรวจสอบผลผลิตจากการสกัดดีเอ็นเอ โดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส

ชั่งอะกาโรสสำหรับเตรียมเจลใสในฟลาสก์ที่แห้ง เติมบัฟเฟอร์ TBE ลงไป เขย่าฟลาสก์เบาๆ มักเตรียมให้อยู่ในความเข้มข้น 0.5% - 2% w/v นำไปหลอมในตู้ไมโครเวฟ ปล่อยให้เย็นลง 5-10 นาที เติมสีย้อมเรืองแสงเอธิเดียมโบรไมด์ 2 ไมโครลิตร เทลงในถาดที่เตรียมไว้ นำตัวอย่างดีเอ็นเอมาผสมกับ loading dye หยอดดีเอ็นเอลงในหลุมอย่างช้าๆ ผ่านกระแสไฟฟ้าเข้าสู่เจล นำเจลออกจากถาด จากนั้นตรวจสอบด้วยการย้อมเอธิเลียมโบรไมด์ บันทึกแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลตด้วยเครื่องบันทึกภาพเจล[31]

3.1.4.5 คัดเลือกบริเวณแถบรหัสดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาและออกแบบไพร์เมอร์

เลือกทำการศึกษาแถบรหัสดีเอ็นเอบริเวณ *rbc*L, *mat*K, trnH-psbA spacer และ internal transcribed spacer (ITS) จากนั้นเลือกใช้ universal primer ที่มีอยู่หรือออกแบบไพร์เมอร์ที่จำเพาะขึ้นมา

3.1.4.6 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ PCR (Polymerase Chain Reaction)

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสหรือที่เรียกว่า PCR (Polymerase Chain Reaction) ซึ่งมีขั้นตอนหลัก 3 ขั้นตอนในการทำงานพีซีอาร์แต่ละรอบคือ การแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบ การจับของสารไพร์เมอร์ และการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยการต่อสายไพร์เมอร์ โดยสารที่ใช้ในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมีดังตารางที่ 2

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

**ตารางที่ 2** สารที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

| สารที่ใช้ | ปริมาณสารที่เติม (µl) |
|---|---|
| PCR buffer, 10x | 2.5 |
| Forward primer | 0.25 |
| Reverse primer | 0.25 |
| 2 mM DNTPs | 0.6 |
| 50 mM $MgCl_2$ | 0.75 |
| Platinum Taq DNA Polymerase | 0.1 |
| Deionized water | 19.55 |
| Template DNA | 1 |
| Total volume | 25 |

เติมสารดังกล่าวลงใน PCR tube และผสมให้เข้ากัน จากนั้นให้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยการนำ PCR tube ที่ได้ใส่ในเครื่องพีซีอาร์ (C1000$^{TM}$ Thermal cycler cycler, Biorad) โดยในแต่ละการทดลองจะมีการปรับอุณหภูมิและเวลาให้เหมาะสมกับ primer และขนาดของยีนที่ต้องการเพิ่มปริมาณ

**ตารางที่ 3** สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส

| ขั้นตอน | จำนวนรอบ | อุณหภูมิ (°C) | เวลา (นาที : วินาที) |
|---|---|---|---|
| Pre-denaturation | 1 | 94 | 3 : 00 |
| Denaturation | 29 x | 94 | 0 : 30 |
| Annealing | | ... | 0 : 30 |
| Extension | | 72 | ... |
| Final Extension | 1 | 72 | 5 : 00 |
| Hold | | 12 | ∞ |

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

3.1.4.7 ตรวจสอบผลผลิตที่ได้โดยใช้เจลอิเล็กโทรโฟรีซีส

ชั่งอะกาโรสสำหรับเตรียมเจลใสในฟลาสก์ที่แห้ง เติมบัฟเฟอร์ TBE ลงไป เขย่าฟลาสก์เบาๆ มักเตรียมให้อยู่ในความเข้มข้น 0.5% - 2% w/v แล้วแต่ความเหมาะสมของขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ นำไปหลอมในตู้ไมโครเวฟ ปล่อยให้เย็นลง 5-10 นาที เติมสีย้อมเรืองแสงเอธิเดียมโบรไมด์ 2 ไมโครลิตร เทลงในถาดที่เตรียมไว้ นำตัวอย่างดีเอ็นเอมาผสมกับ loading dye หยอดดีเอ็นเอลงในหลุมอย่างช้าๆ ผ่านกระแสไฟฟ้าเข้าสู่เจล นำเจลออกจากถาด จากนั้นตรวจสอบด้วยการย้อมเอธิเลียมโบรไมด์ บันทึกแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลตด้วยเครื่องบันทึกภาพเจล[31]

3.1.4.8 หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการใช้เครื่องหาลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติ ซึ่งจะอ่านออกเป็นลำดับเบสของสายดีเอ็นเอนั้นๆ

3.1.4.9 การจัดทำแถบรหัสดีเอ็นเอ

เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ จากนั้นแสดงผลเป็นลำดับเบสในรูปแบบ FASTA โดยมีการจัดทำในโปรแกรม Bioedit ซึ่งมีการแสดงลักษณะสีที่แตกต่างกันดังนี้ Adenine สีแดง Thymine สีน้ำเงิน Guanine สีเหลือง และ Cytosine สีเขียว จากนั้นนำลำดับเบสฝากไว้ในฐานข้อมูล Genbank

**3.2 การสร้างแถบรหัสดีเอ็นเอร่วมกับเทคนิคการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง (Bar-HRM analysis)**

**3.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสร้างแถบรหัสดีเอ็นเอร่วมกับเทคนิคการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง**

- ถุงมือปราศจากแป้ง
- ภาชนะเก็บความเย็น
- Micropipette และ Micropipette tube
- ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuge, Denville 260D)
- เครื่องพีซีอาร์ (C1000$^{TM}$ Thermal cycler cycler, Biorad)
- PCR Tube (strip)
- โปรแกรมที่ใช้ในการวิเคราะห์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

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

**3.2.2 สารเคมีที่ในการสร้างแถบรหัสดีเอ็นเอร่วมกับเทคนิคการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง**

- SsoFast™ EvaGreen Supermix, Biorad
- Forward primer
- Reverse primer
- Deionized water

**3.2.3 ตัวอย่างของพืช**

ตัวอย่างของพืชที่ใช้ในการสร้างแถบรหัสดีเอ็นเอในการทดลองนี้คือพืชสมุนไพรไทยที่ใช้ชื่อพ้องโคคลาน ดังตารางที่ 1

**3.2.4 การจัดทำแถบรหัสดีเอ็นเอร่วมกับเทคนิคการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง (Bar-HRM analysis)**

3.2.4.1 คัดเลือกบริเวณแถบรหัสดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาและออกแบบไพร์เมอร์

เลือกทำการศึกษาแถบรหัสดีเอ็นเอบริเวณ *rbc*L ของพืชทั้ง 3 ชนิด จากนั้นออกแบบไพร์เมอร์ที่จำเพาะขึ้นมา

3.2.4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ PCR (Polymerase Chain Reaction) และตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง (Bar-HRM analysis)

สารที่ใช้ในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ PCR (Polymerase Chain Reaction) และตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง (Bar-HRM analysis) มีดังตารางที่ 4

Chulalongkorn University

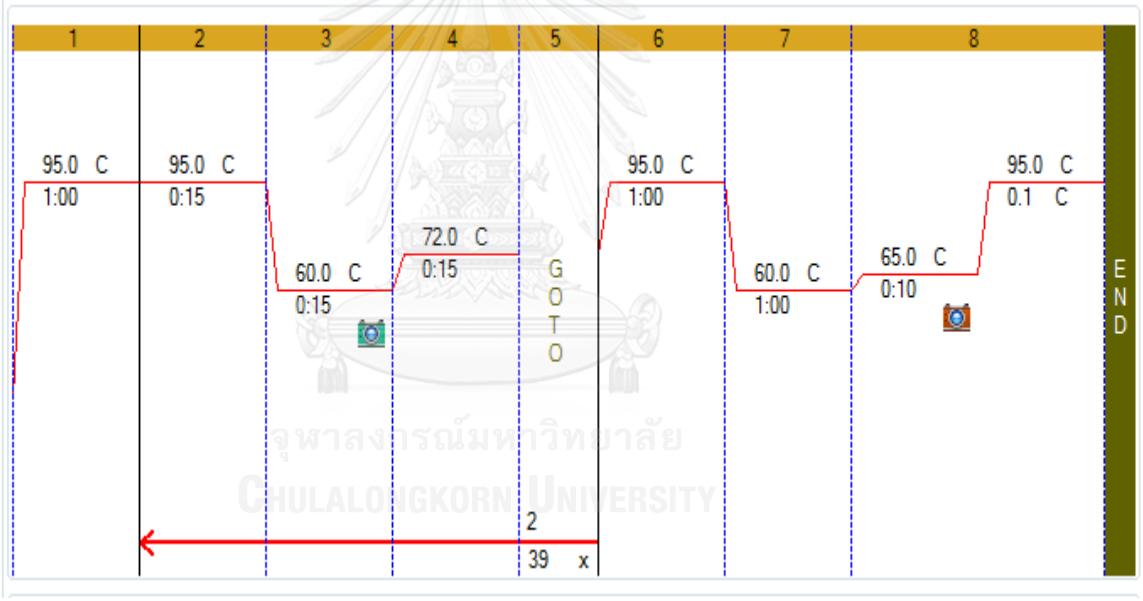
**ตารางที่ 4** สารที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง

| สารที่ใช้ | ปริมาณสารที่เติม (µl) |
|---|---|
| SsoFast™ EvaGreen Supermix, Biorad | 5 |
| Forward primer | 0.5 |
| Reverse primer | 0.5 |
| Deionized water | 3 |
| Template DNA | 1 |
| Total volume | 10 |

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

เติมสารดังกล่าวลงใน PCR tube และผสมให้เข้ากัน จากนั้นให้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยการนำ PCR tube ที่ได้ใส่ในเครื่องพีซีอาร์ (C1000$^{TM}$ Thermal cycler cycler, Biorad) โดยในการทำงานหนึ่งรอบจะประกอบไปด้วย ขั้นตอนในส่วนแรกคือการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ PCR (Polymerase Chain Reaction) และขั้นตอนในส่วนที่สองตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง (Bar-HRM analysis) โดยการเพิ่มอุณหภูมิจาก 65 องศาเซลเซียสจนถึง 95 องศาเซลเซียส เมื่อให้ได้ผลออกมาเป็น melting curve

**ภาพที่ 7** สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอณีเรสและการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง




**3.3 การนำ Bar-HRM analysis มาประยุกต์ใช้ในการพิสูจน์อัตลักษณ์ของพืชสมุนไพรที่ใช้ชื่อพ้อง “โคคลาน” รวมถึงในรูปแบบของ crude drug**

**3.3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการพิสูจน์อัตลักษณ์ของพืชสมุนไพรที่ใช้ชื่อพ้อง “โคคลาน” รวมถึงในรูปแบบของ crude drug**

3.3.1.1 อุปกรณ์สำหรับการสกัด วัดคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

- โกร่งกระเบื้องและลูกโกร่ง

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

- ถุงมือปราศจากแป้ง
- ภาชนะเก็บความเย็น
- เครื่องชั่งน้ำหนักแบบดิจิตอล
- Micropipette และ Micropipette tube
- ถาดแม่พิมพ์เจล (Tray) และหวี (Comb)
- ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuge, Denville 260D)
- Microwave
- เครื่องแยกขนาดดีเอ็นเอ (Gel electrophoresis)
- อุปกรณ์ฉายแสงยูวีและถ่ายภาพเจล (GelDoc$^{TM}$XR, Biorad)

3.3.1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสร้างแถบรหัสดีเอ็นเอร่วมกับเทคนิคการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง

- ถุงมือปราศจากแป้ง
- ภาชนะเก็บความเย็น
- Micropipette และ Micropipette tube
- ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuge, Denville 260D)
- เครื่องพีซีอาร์ (C1000$^{TM}$ Thermal cycler cycler, Biorad)
- PCR Tube (strip)

3.3.1.3 โปรแกรมที่ใช้ในการวิเคราะห์

**3.3.2 สารเคมีที่ใช้ในการพิสูจน์อัตลักษณ์ของพืชสมุนไพรที่ใช้ชื่อพ้อง “โคคลาน”**

3.3.2.1 สารเคมีที่ในการสกัด และตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

- Liquid nitrogen
- ผง Agarose
- Ultrapure water
- 50x Tris-Acetate-EDTA (TAE) buffer, pH 8.0 (Invitrogen)
- Ethidium bromide solution
- 10X loading dye
- VC 100 bp plus ladder

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

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

- Genomic DNA Mini Kit

3.3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการสร้างแถบรหัสดีเอ็นเอร่วมกับเทคนิคการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง

- SsoFast™ EvaGreen Supermix, Biorad
- Forward primer
- Reverse primer
- DI water

**3.3.3 ตัวอย่างของพืชที่ใช้ในการสร้างแถบรหัสดีเอ็นเอ**

ตัวอย่างของพืชที่ใช้ในการสร้างแถบรหัสดีเอ็นเอในการทดลองนี้คือพืชสมุนไพรไทยที่ใช้ชื่อพ้องโคคลาน ดังตารางที่ 5

**ตารางที่ 5** ตัวอย่างของพืชที่ใช้ชื่อพ้อง “โคคลาน” ที่จะนำมาพิสูจน์อัตลักษณ์

| ตัวอย่าง | สถานที่เก็บตัวอย่าง | ชนิดของพืชที่ได้มีการระบุไว้ |
|---|---|---|
| ตัวอย่างที่ 1 | จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย | *Croton caudatus* |
| ตัวอย่างที่ 2 | มุกดาหาร | โคคลาน |
| ตัวอย่างที่ 3 | เวชพงศ์โอสถ | โคคลาน |
| ตัวอย่างที่ 4 | ปราจีนบุรี | โคคลาน |

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

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

ตัวอย่างที่ 1

ตัวอย่างที่ 2

ตัวอย่างที่ 3

ตัวอย่างที่ 4

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

**ภาพที่ 8** ตัวอย่างของพืชที่ที่นำมาพิสูจน์อัตลักษณ์

**3.3.4 วิธีการนำ Bar-HRM analysis มาประยุกต์ใช้ในการพิสูจน์อัตลักษณ์ของพืชที่ใช้ชื่อพ้อง “โคคลาน” รวมถึงในรูปแบบของ crude drug**

3.3.4.1 เก็บตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างใบอ่อนของพืชสมุนไพรไทยที่ใช้ชื่อพ้อง “โคคลาน” ที่สมบูรณ์ ไม่มีแมลงหรือโรคพืชรบกวน ไว้ในถุงพลาสติก จากนั้นพรมน้ำเล็กน้อย มัดถุงให้แน่น และเก็บรักษาในตู้เย็น จนกระทั่งถึงเวลาทำการสกัดดีเอ็นเอ ทำการบันทึกชื่อสปีชีส์ของพืช รหัส วันที่ และสถานที่เก็บเพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิง หรือหากอยู่ในรูปเครื่องยาให้เก็บไว้

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

ถุงพลาสติก และทำการบันทึกชื่อสปีชีส์ของพืช รหัส วันที่ และสถานที่เก็บเพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงเช่นเดียวกับใบอ่อน

3.3.4.2 สกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอโดยการใช้ QIAgen Kit ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ บดเนื้อเยื่อพืชที่มีน้ำหนักเปียก (wet weight) ไม่มากกว่า 100 มิลลิกรัมด้วย TissueRuptor® หรือโกร่งและลูกโกร่งบดยา จากนั้นเติม buffer AP1 400 ไมโครลิตร และ RNase A 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex และบ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 10 นาที โดยพลิกกลับหลอดไปมา 2-3 ครั้งระหว่างที่มีการบ่ม จากนั้นเติม buffer P3 130 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 20,000 xg เป็นเวลา 5 นาที ปิเปตสารละลายที่ได้ใส่ลงใน QIAshredder spin column ที่วางใน collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 20,000 xg เป็นเวลา 2 นาที ปิเปตสารละลายที่ผ่านลงมาใน collection tube ลงยังหลอดใหม่ และเติม buffer AW1 ปริมาตร 1.5 เท่าของสารละลาย ผสมให้เข้ากันโดยการใช้ปิเปต ปิเปตสารละลายผสมนี้ 650 ไมโครลิตรลงใน DNeasy Mini spin column ที่วางใน collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 xg เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งสารละลายที่ผ่านมาใน collection tube ย้าย spin column เดิมนี้ใน collection tube หลอดใหม่ จากนั้นเติม buffer AW2 500 ไมโครลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 xg เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งสารละลายที่ผ่านมาใน collection tube จากนั้นเติม buffer AW2 อีก 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 20,000 xg เป็นเวลา 2 นาที ย้าย spin column ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 หรือ 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติม buffer AE 100 ไมโครลิตร เพื่อใช้ในการชะสาร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 xg เป็นเวลา 1 นาที และทำในขั้นตอนตั้งแต่เติม buffer AE 100 ไมโครลิตร ใหม่อีกครั้ง[30]

3.3.4.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ PCR (Polymerase Chain Reaction) และตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง (Bar-HRM analysis)

สารที่ใช้ในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ PCR (Polymerase Chain Reaction) และตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง (Bar-HRM analysis) เหมือนกับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นและตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง ตารางที่ 4

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

จากนั้นเติมสารดังกล่าวลงใน PCR tube และผสมให้เข้ากัน จากนั้นให้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยการนำ PCR tube ที่ได้ใส่ในเครื่องพีซีอาร์ (C1000$^{TM}$ Thermal cycler cycler, Biorad) โดยในการทำงานหนึ่งรอบจะประกอบไปด้วย ขั้นตอนในส่วนแรกคือการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ PCR (Polymerase Chain Reaction) และขั้นตอนในส่วนที่สองตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง (Bar-HRM analysis) โดยการเพิ่มอุณหภูมิจาก 65 องศาเซลเซียสจนถึง 95 องศาเซลเซียส เมื่อให้ได้ผลออกมาเป็น melting curve ซึ่งสภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสและการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูงเหมือนดังภาพที่ 7

3.3.4.4 การตรวจสอบ melting temperature ($T_m$) ของตัวอย่าง

ตรวจสอบ melting temperature ที่ได้จากตัวอย่าง 1 2 3 และ 4 ว่าอยู่ในช่วง melting temperature ของพืชที่มีใช้ชื่อพ้องว่า “โคคลาน” ชนิดใดใน 3 ชนิด ซึ่งได้จากการสร้างแถบรหัสดีเอ็นเอร่วมกับเทคนิคการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง (Bar-HRM analysis) ของการศึกษาก่อนหน้าที่ได้ใช้พืชที่ทราบชนิดอย่างแน่ชัด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

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

# บทที่ 4
# ผลการศึกษาและการอภิปรายผลการวิจัย

## 4.1 ผลการสร้างแถบรหัสดีเอ็นเอ

### 4.1.1 ผลการเลือกใช้ universal primer หรือการออกแบบไพร์เมอร์

4.1.1.1 ยีน *rbc*L

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน *rbc*L ของพืชสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด ที่มีอยู่ใน GenBank® พบข้อมูลดังตารางที่ 6

**ตารางที่ 6** แหล่งอ้างอิงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L ที่พบใน GenBank®

| ชนิด | GenBank Accession | แหล่งอ้างอิง |
|---|---|---|
| *Croton caudatus* | KP789662.1<br>KP789661.1 | Osathanunkul M, 2015 |
| *Mallotus repandus* | GU441787.1<br>KU564820.1<br>KP094979.1 | Chen S, Pang X, 2016<br>Howard et al., 2016<br>Liu et al., 2015 |
| *Anamirta cocculus* | EU526983.1<br>FJ626591.1<br>FJ026461.1 | Jacques F, Bertolino P, 2016<br>Wang et al., 2016<br>Hoot et al., 2016 |

จากนั้นจึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่กล่าวมานี้ใช้ในการเลือก universal primer หรือการออกแบบไพร์เมอร์ เพื่อให้ได้ยีน *rbc*L ที่ครบถ้วนและสมบูรณ์ โดยรายละเอียดของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษาแสดงในตารางที่ 7

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

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

**ตารางที่ 7** ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L

| ไพร์เมอร์ | ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5’ – 3’) |
|---|---|
| rbcL_aF | ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC |
| rbcL_aR | GTAAAATCAAGTCCACCR(G/A)CG |
| rbcL-Uro-569F | ATGAATGTCTTCGCGGTGGAC |
| rbcL_R23 | TTTTAGTAAAAGATTGGGCCG |

4.1.1.2 ยีน *mat*K

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน *matK* ของพืชสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดที่มีอยู่ใน GenBank® พบข้อมูลดังตารางที่ 8

**ตารางที่ 8** แหล่งอ้างอิงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ที่พบใน GenBank®

| ชนิด | GenBank Accession | แหล่งอ้างอิง |
|---|---|---|
| *Croton caudatus* | MG816884 | Amandita et al., 2019 |
| *Mallotus repandus* | EF582678 | Kulju K, Sierra S, 2016 |
| *Anamirta cocculus* | EF143856.1<br>KC494022.1 | Wang et al., 2016<br>Wefferling K, 2013 |

จากนั้นจึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่กล่าวมานี้ใช้ในการเลือก universal primer หรือการออกแบบไพร์เมอร์ เพื่อให้ได้ยีน *matK* ที่ครบถ้วนและสมบูรณ์ โดยรายละเอียดของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษาแสดงในตารางที่ 9

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

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

**ตารางที่ 9** ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K

| ไพร์เมอร์ | ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5’ – 3’) |
|---|---|
| matK_390F | CGATCTATTCATTCAATATTTC |
| matK_MALPR | ACAAGAAAGTCGAAGTAT |
| trnK72_F | TCCGAGGTATCTACTCTTTT |
| trnK1895_F | CGCTCAATCCTTACTCGTAT |
| matK52_F | GGGAGGATGGAAATCCGTTG |
| matK701_F | CGCTATTGGGTGAAAGATCCCT |
| matK1253_R | GCATTTGACTCCGTACCAACA |
| matK1920_R | CCCAGTTCCCTTCCTAGACG |
| trnK_3914F | TGGGTTGCTAACTCAATGG |
| matK_aF | CTATATCCACTTATCTTTCAGGAGT |
| matK_8R | AAAGTTCTAGCACAAGAAAGTCGA |
| trnK_2R | AACTAGTCGGATGGAGTAG |

4.1.1.3 *psb*A-*trn*H intergenic spacer

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ *psb*A-*trn*H intergenic spacer ของพืชสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดที่มีอยู่ใน GenBank® พบข้อมูลดังตารางที่ 10

**ตารางที่ 10** แหล่งอ้างอิงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *psb*A-*trn*H intergenic spacer ที่พบใน GenBank®

| ชนิด | GenBank Accession | แหล่งอ้างอิง |
|---|---|---|
| *Mallotus repandus* | KP095645.1 | Liu et al., 2015 |

จากนั้นจึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่กล่าวมานี้ใช้ในการเลือก universal primer หรือการออกแบบไพร์เมอร์ เพื่อให้ได้ *psb*A-*trn*H intergenic spacer ที่ครบถ้วนและสมบูรณ์ โดยรายละเอียดของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษาแสดงในตารางที่ 11

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

**ตารางที่ 11** ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการหกลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *psb*A-*trn*H intergenic spacer

| ไพร์เมอร์ | ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5’ – 3’) |
|---|---|
| psbA-trnHF | GTTATGCATGAACGTAATGCTC |
| psbA-trnHR | CGCGCATGGTGGATTCACAATC |

4.1.1.4 ITS

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ ITS ของพืชสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดที่มีอยู่ใน GenBank® พบข้อมูลดังตารางต่อที่ 12

**ตารางที่ 12** แหล่งอ้างอิงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS ที่พบใน GenBank®

| ชนิด | GenBank Accession | แหล่งอ้างอิง |
|---|---|---|
| *Croton caudatus* | AY971192.1<br>KP878329.1 | Berry et al., 2011<br>Van ee et al., 2015 |
| *Mallotus repandus* | DQ866617.1<br>DQ813305.1<br>KP092940.1 | Kulju K, Van welzen P, 2007<br>Hsieh et al, 2006<br>Liu et al, 2015 |
| *Anamirta cocculus* | FN870379.1 | Mati E, Boer HJ, 2010 |

จากนั้นจึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่กล่าวมานี้ใช้ในการเลือก universal primer หรือการออกแบบไพร์เมอร์ เพื่อให้ได้ส่วนของ ITS ที่ครบถ้วนและสมบูรณ์ โดยรายละเอียดของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษาแสดงในตารางที่ 13

**ตารางที่ 13** ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS

| ไพร์เมอร์ | ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5’ – 3’) |
|---|---|
| ITS1 | TCCGTAGGTGAACCTGCGG |
| ITS4 | TCCTCCGCTTATTGATATGC |
| ITS5 | GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG |

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

**4.1.2 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ**

4.1.2.1 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ *rbc*L

4.1.2.1.1 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน *rbc*La ของ *Croton caudatus* และ *Mallotus repandus*

ไพร์เมอร์ที่ใช้ : *rbcL_aF* กับ *rbc*L_aR

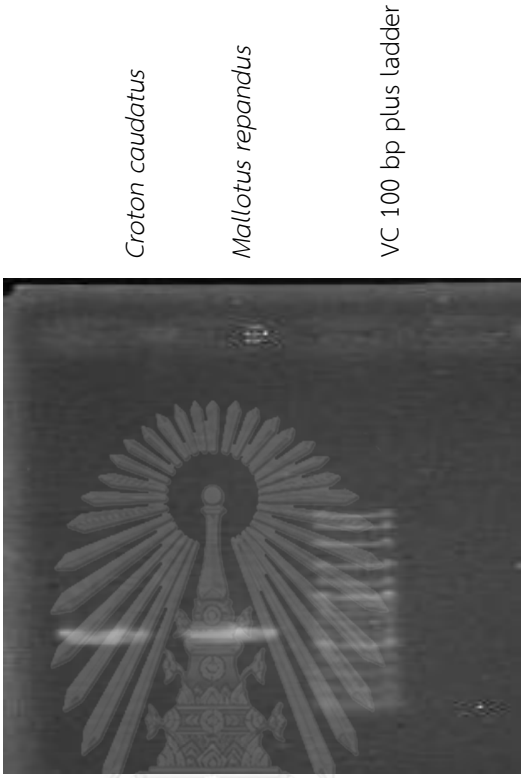
ปฏิกิริยา PCR ใช้รอบอุณหภูมิดังนี้

**ตารางที่ 14** สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน *rbc*La ของ *Croton caudatus* และ *Mallotus repandus*

| ขั้นตอน | จำนวนรอบ | อุณหภูมิ (°C) | เวลา (นาที : วินาที) |
|---|---|---|---|
| Pre-denaturation | 1 | 94 | 3 : 00 |
| Denaturation | 29 x | 94 | 0 : 30 |
| Annealing | | 55 | 0 : 30 |
| Extension | | 72 | 1 : 00 |
| Final Extension | 1 | 72 | 5 : 00 |
| Hold | | 12 | ∞ |

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

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




**ภาพที่ 9** ผลการตรวจสอบ PCR product บริเวณ *rbc*La ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสของ *Croton caudatus* และ *Mallotus repandus*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.1.2.1.2 ผลการเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วน *rbc*L ตั้งแต่ตำแหน่งที่ 569 ของ *Croton caudatus* และ *Mallotus repandus*

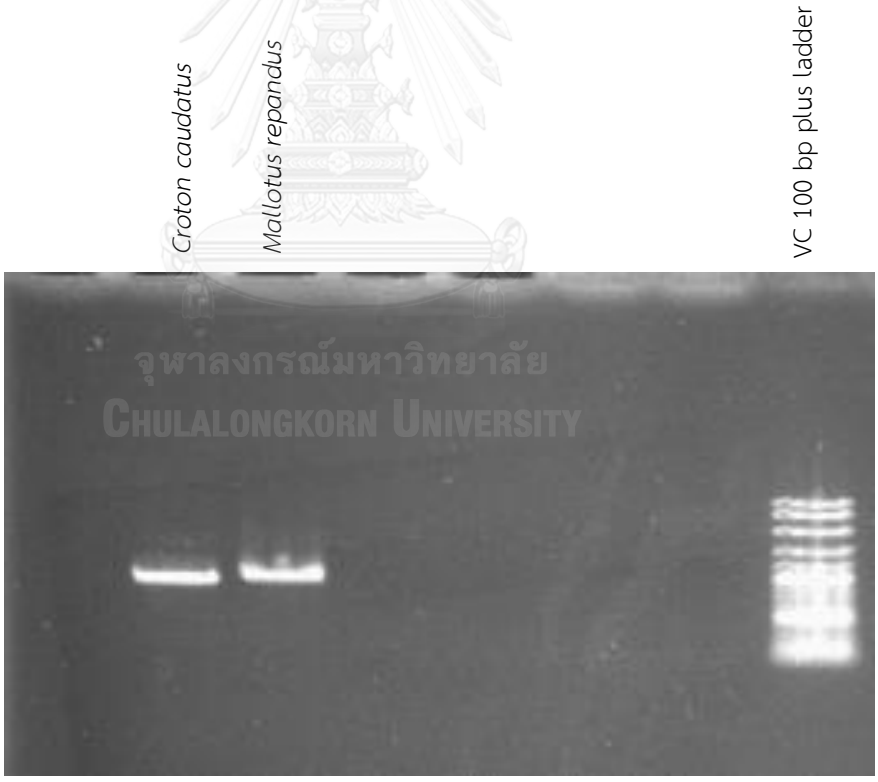
ไพร์เมอร์ที่ใช้ : *rbcL*_569F กับ *rbcL*_R23

ปฏิกิริยา PCR ใช้รอบอุณหภูมิดังนี้

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

**ตารางที่ 15** สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน *rbc*L ของ *Croton caudatus* และ *Mallotus repandus* (Rottler)

| ขั้นตอน | จำนวนรอบ | อุณหภูมิ (°C) | เวลา (นาที : วินาที) |
|---|---|---|---|
| Pre-denaturation | 1 | 94 | 3 : 00 |
| Denaturation | 29 x | 94 | 0 : 30 |
| Annealing | | 58 | 0 : 30 |
| Extension | | 72 | 1 : 30 |
| Final Extension | 1 | 72 | 5 : 00 |
| Hold | | 12 | ∞ |




**ภาพที่ 10** ผลการตรวจสอบ PCR product บริเวณ *rbc*L ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสของ *Croton caudatus* และ *Mallotus repandus*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

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

4.1.2.1.3 ผลการเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วน *rbc*L ของ *Anamirta cocculus*

ไพร์เมอร์ที่ใช้ : *rbc*L_aF และ *rbc*L_R23 Primer

ปฏิกิริยา PCR ใช้รอบอุณหภูมิดังนี้

**ตารางที่ 16** สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน *rbc*L ของ *Anamirta cocculus*

| ขั้นตอน | จำนวนรอบ | อุณหภูมิ (°C) | เวลา (นาที : วินาที) |
|---|---|---|---|
| Pre-denaturation | 1 | 94 | 3 : 00 |
| Denaturation | 29 x | 94 | 0 : 30 |
| Annealing | | 56 | 0 : 30 |
| Extension | | 72 | 1 : 30 |
| Final Extension | 1 | 72 | 5 : 00 |
| Hold | | 12 | ∞ |

**ภาพที่ 11** ผลการตรวจสอบ PCR product บริเวณ *rbc*L ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสของ *Anamirta cocculus*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

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

4.1.2.2 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ *matk*

4.1.2.2.1 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ *matk* ของ *Croton caudatus*

ไพร์เมอร์ที่ใช้ : *mat*K_390F กับ *mat*K _MALPR

ปฏิกิริยา PCR ใช้รอบอุณหภูมิดังนี้

**ตารางที่ 17** สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน *mat*K ของ *Croton caudatus*

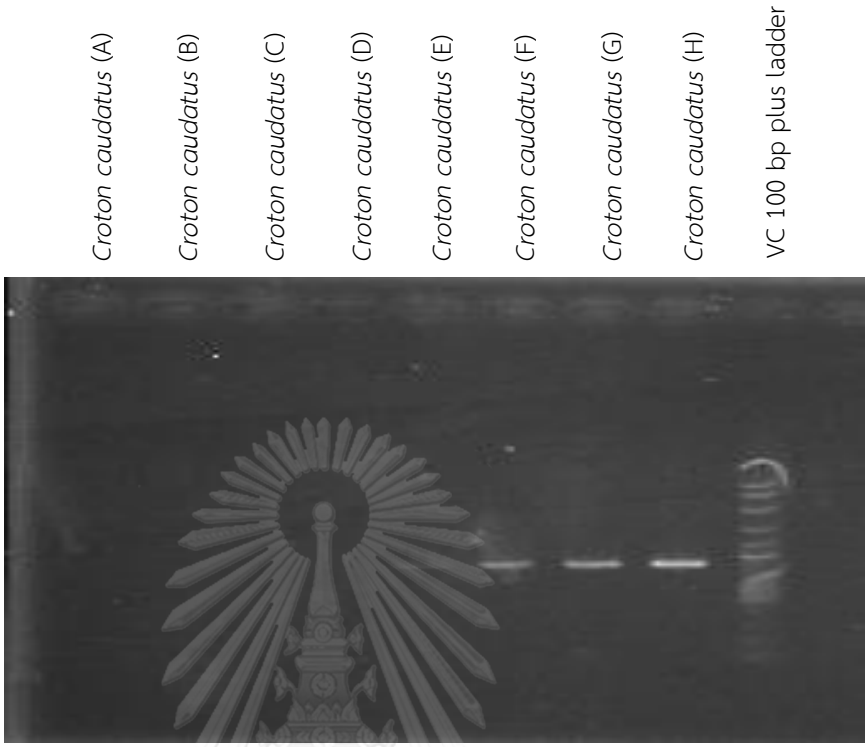
| ขั้นตอน | จำนวนรอบ | อุณหภูมิ (°C) | เวลา (นาที : วินาที) |
|---|---|---|---|
| Pre-denaturation | 1 | 94 | 3 : 00 |
| Denaturation | 29 x | 94 | 0 : 30 |
| Annealing | | 55 - 65 | 0 : 30 |
| Extension | | 72 | 1 : 00 |
| Final Extension | 1 | 72 | 5 : 00 |
| Hold | | 12 | ∞ |

**ตารางที่ 18** อุณหภูมิในแต่ละหลุมปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน *mat*K ของ *Croton caudatus*

| หลุม | อุณหภูมิ |
|---|---|
| A | 65.0 °C |
| B | 64.3 °C |
| C | 63.0 °C |
| D | 61.1 °C |
| E | 58.8 °C |
| F | 56.9 °C |
| G | 55.7 °C |
| H | 55.0 °C |

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

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




**ภาพที่ 12** ผลการตรวจสอบ PCR product บริเวณ *mat*K ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสของ *Croton caudatus*

4.1.2.2.2 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ *mat*k ของ *Mallotus repandus*

ไพร์เมอร์ที่ใช้ : matK52_F กับ matK1253_R

matK701_F กับ matK1920_R

matK701_F กับ matK1253_R

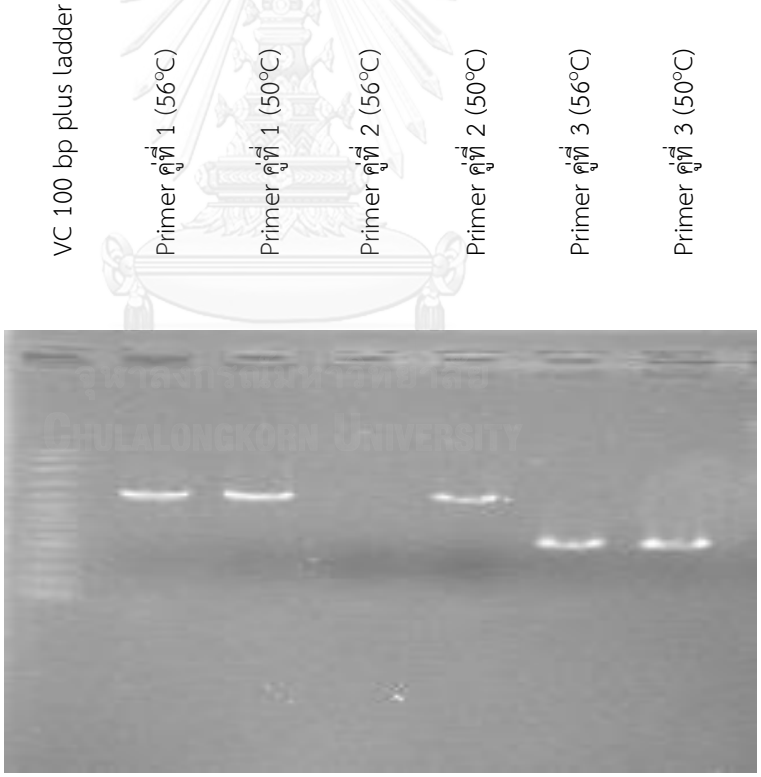
ปฏิกิริยา PCR ใช้รอบอุณหภูมิดังนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

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

**ตารางที่ 19** สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน *mat*K ของ *Mallotus repandus*

| ขั้นตอน | จำนวนรอบ | อุณหภูมิ (°C) | เวลา (นาที : วินาที) |
|---|---|---|---|
| Pre-denaturation | 1 | 94 | 3 : 00 |
| Denaturation | 29 x | 94 | 0 : 30 |
| Annealing | | 50, 56 | 0 : 30 |
| Extension | | 72 | 1 : 30 |
| Final Extension | 1 | 72 | 5 : 00 |
| Hold | | 12 | ∞ |




**ภาพที่ 13** ผลการตรวจสอบ PCR product บริเวณ *mat*K ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสของ *Mallotus repandus*

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

4.1.2.2.2 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ *mat*k ของ *Anamirta cocculus*

ไพร์เมอร์ที่ใช้ : trnK_3914F กับ matK_8R

matK_aF กับ trnK_2R

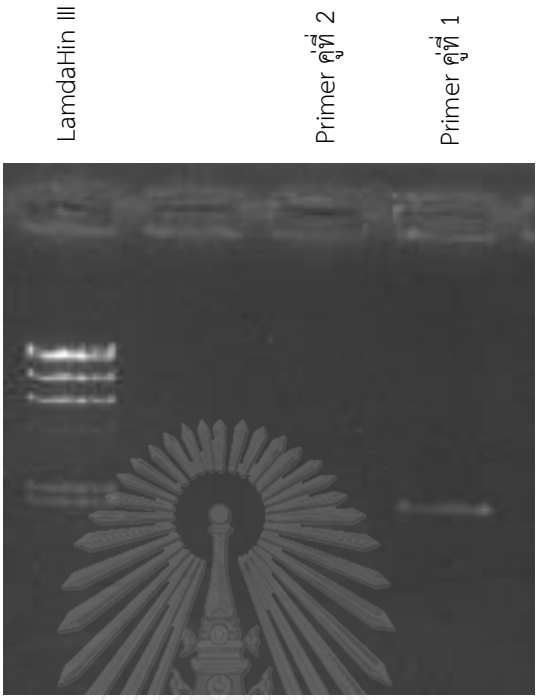
ปฏิกิริยา PCR ใช้รอบอุณหภูมิดังนี้

**ตารางที่ 20** สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน *mat*K ของ *Anamirta cocculus*

| ขั้นตอน | จำนวนรอบ | อุณหภูมิ (°C) | เวลา (นาที : วินาที) |
|---|---|---|---|
| Pre-denaturation | 1 | 94 | 3 : 00 |
| Denaturation | 29 x | 94 | 0 : 30 |
| Annealing | | 55 | 0 : 30 |
| Extension | | 72 | 1 : 30 |
| Final Extension | 1 | 72 | 5 : 00 |
| Hold | | 12 | ∞ |

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

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




**ภาพที่ 14** ผลการตรวจสอบ PCR product บริเวณ *mat*K ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสของ *Anamirta cocculus*

4.1.2.3 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ *psb*A-*trn*H intergenic spacer

4.1.2.3.1 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ *psb*A-*trn*H intergenic spacer ของ *Croton caudatus* และ *Mallotus repandus*

ไพร์เมอร์ที่ใช้ : *psb*A-*trn*H_F กับ *psb*A-*trn*H_R

ปฏิกิริยา PCR ใช้รอบอุณหภูมิดังนี้

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

**ตารางที่ 21** สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน *psb*A-*trn*H intergenic spacer ของ *Croton caudatus* และ *Mallotus repandus*

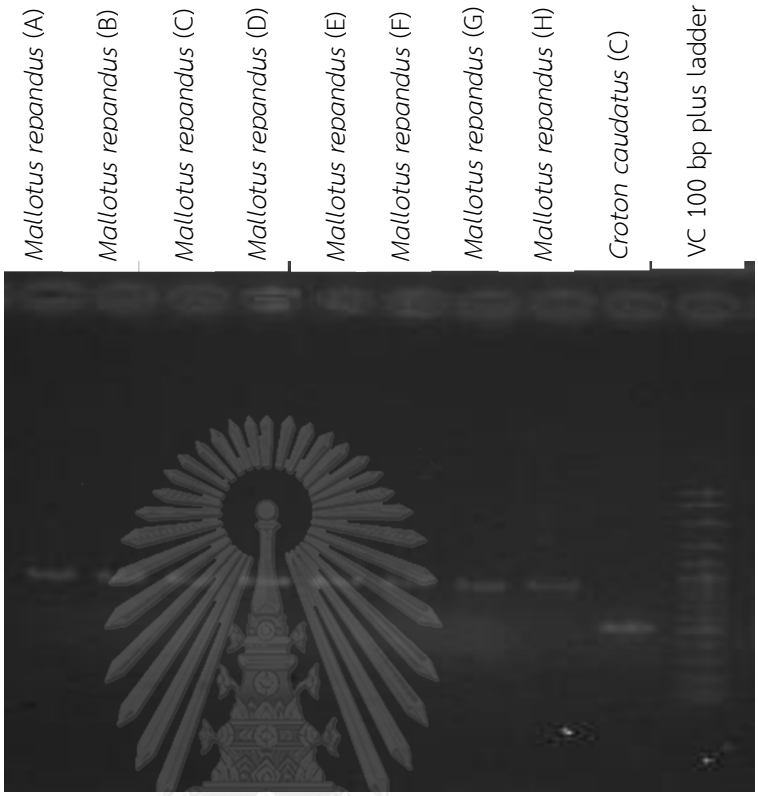
| ขั้นตอน | จำนวนรอบ | อุณหภูมิ (°C) | เวลา (นาที : วินาที) |
|---|---|---|---|
| Pre-denaturation | 1 | 94 | 3 : 00 |
| Denaturation | 29 x | 94 | 0 : 30 |
| Annealing | | 50 - 60 | 0 : 30 |
| Extension | | 72 | 1 : 00 |
| Final Extension | 1 | 72 | 5 : 00 |
| Hold | | 12 | ∞ |

**ตารางที่ 22** อุณหภูมิในแต่ละหลุมปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน *psb*A-*trn*H intergenic spacer ของ *Croton caudatus* และ *Mallotus repandus*

| หลุม | อุณหภูมิ |
|---|---|
| A | 60.0 °C |
| B | 59.2 °C |
| C | 58.0 °C |
| D | 56.1 °C |
| E | 53.8 °C |
| F | 51.9 °C |
| G | 50.7 °C |
| H | 50.0 °C |

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

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




**ภาพที่ 15** ผลการตรวจสอบ PCR product บริเวณ *psb*A-*trn*H intergenic spacer ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสของ *Croton caudatus* และ *Mallotus repandus*

4.1.2.3.2 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ *psb*A-*trn*H intergenic spacer ของ *Anamirta cocculus*

ไพร์เมอร์ที่ใช้ : *psb*A-*trn*HF และ *psb*A-*trn*HR

ปฏิกิริยา PCR ใช้รอบอุณหภูมิดังนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

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

**ตารางที่ 23** สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน *psb*A-*trn*H intergenic spacer ของ *Anamirta cocculus*

| ขั้นตอน | จำนวนรอบ | อุณหภูมิ (°C) | เวลา (นาที : วินาที) |
|---|---|---|---|
| Pre-denaturation | 1 | 94 | 3 : 00 |
| Denaturation | 29 x | 94 | 0 : 30 |
| Annealing | | 56 | 0 : 30 |
| Extension | | 72 | 0 : 45 |
| Final Extension | 1 | 72 | 5 : 00 |
| Hold | | 12 | ∞ |

**ภาพที่ 16** ผลการตรวจสอบ PCR product บริเวณ *psb*A-*trn*H intergenic spacer ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสของ *Anamirta cocculus*

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

4.1.2.4 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ Internal transcribed spacer (ITS)

4.1.2.4.1 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITS ของ *Mallotus repandus*

ไพร์เมอร์ที่ใช้: ITS1 กับ ITS4

ปฏิกิริยา PCR ใช้รอบอุณหภูมิดังนี้

**ตารางที่ 24** สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน ITS ของ *Mallotus repandus*

| ขั้นตอน | จำนวนรอบ | อุณหภูมิ (°C) | เวลา (นาที : วินาที) |
|---|---|---|---|
| Pre-denaturation | 1 | 94 | 3 : 00 |
| Denaturation | 29 x | 94 | 0 : 30 |
| Annealing | | 56 | 0 : 30 |
| Extension | | 72 | 0 : 45 |
| Final Extension | 1 | 72 | 5 : 00 |
| Hold | | 12 | ∞ |

**ภาพที่ 17** ผลการตรวจสอบ PCR product บริเวณ ITS ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสของ *Mallotus repandus*

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

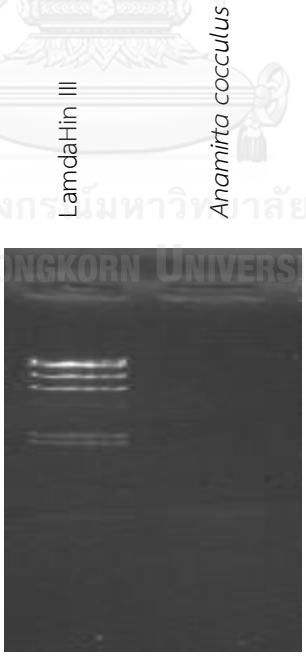
4.1.2.4.1 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITS ของ *Anamirta cocculus*

ไพร์เมอร์ที่ใช้: ITS1 กับ ITS4

ปฏิกิริยา PCR ใช้รอบอุณหภูมิดังนี้

**ตารางที่ 25** สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน ITS ของ *Anamirta cocculus*

| ขั้นตอน | จำนวนรอบ | อุณหภูมิ (°C) | เวลา (นาที : วินาที) |
|---|---|---|---|
| Pre-denaturation | 1 | 94 | 3 : 00 |
| Denaturation | 29 x | 94 | 0 : 30 |
| Annealing | | 55 | 0 : 30 |
| Extension | | 72 | 0 : 45 |
| Final Extension | 1 | 72 | 5 : 00 |
| Hold | | 12 | ∞ |



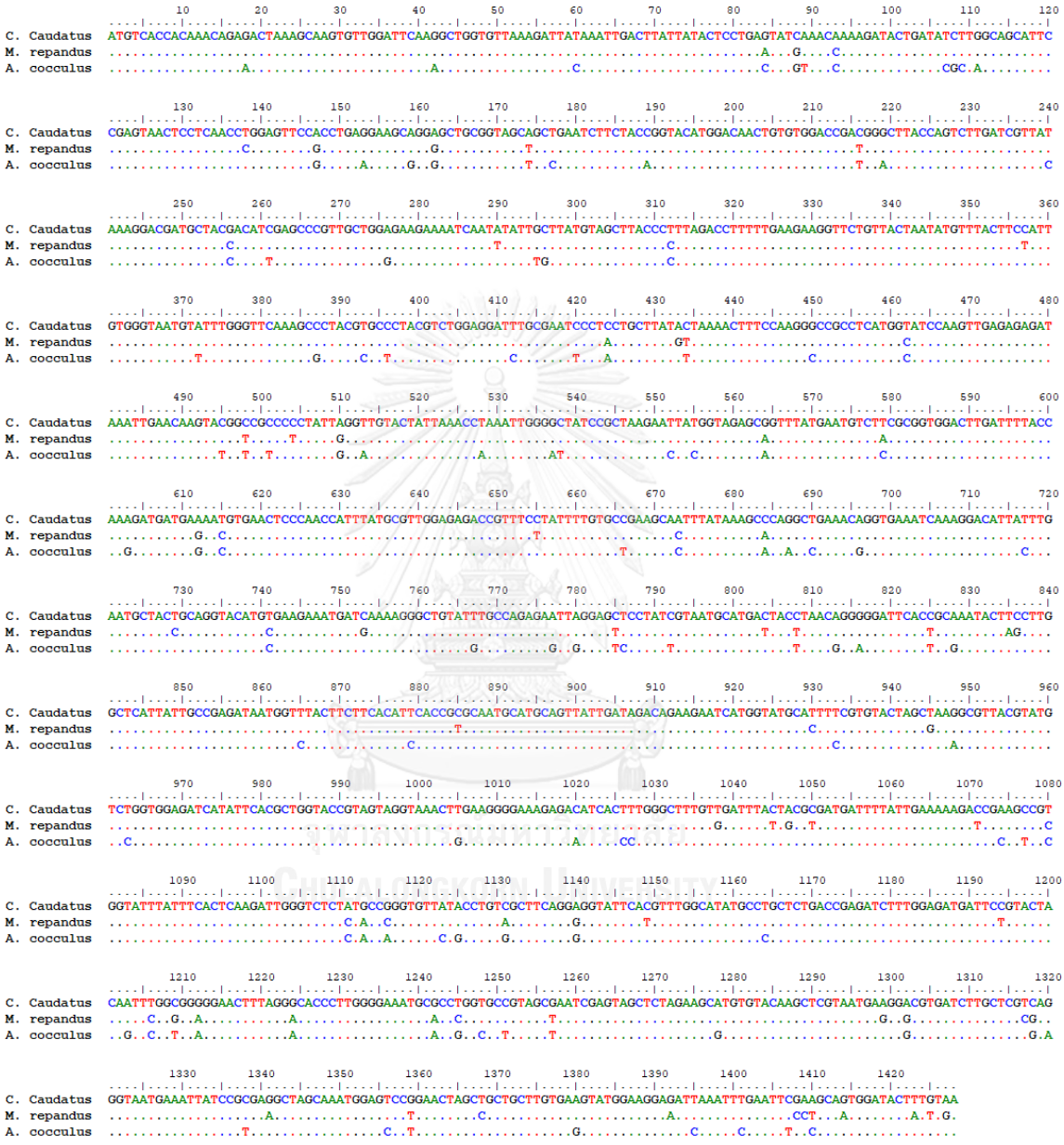

**ภาพที่ 18** ผลการตรวจสอบ PCR product บริเวณ ITS ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสของ *Anamirta cocculus*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

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

### 4.1.3 ผลการจัดทำแถบรหัสดีเอ็นเอ

4.1.3.1 ยีน *rbc*L

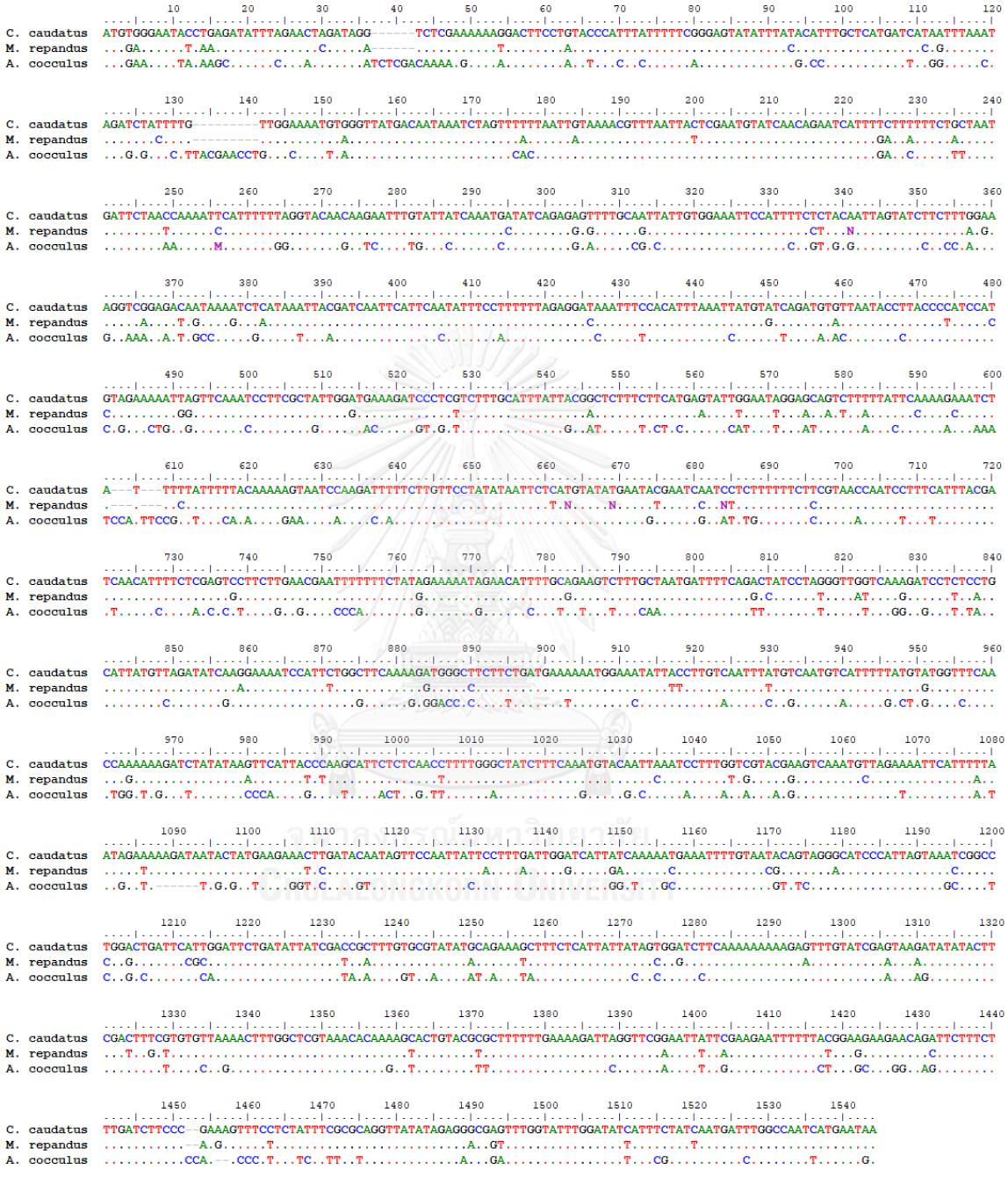



**ภาพที่ 19** แถบรหัสดีเอ็นเอของยีน *rbc*L ของพืชที่ใช้ชื่อพ้อง “โคคลาน” ในรูปแบบ FASTA

จากภาพแสดงให้เห็นถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนยีน *rbc*L ของพืชทั้งสามชนิดที่ใช้ชื่อพ้อง “โคคลาน” โดยจะเห็นว่าพืชทั้งสามชนิดมีแถบรหัสดีเอ็นเอในส่วนยีน *rbc*L มีลำดับเบสที่แตกต่างกัน ทำให้สามารถแยกพืชทั้งสามชนิดออกจากกันได้อย่างชัดเจน

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

4.1.3.2 ยีน *mat*K

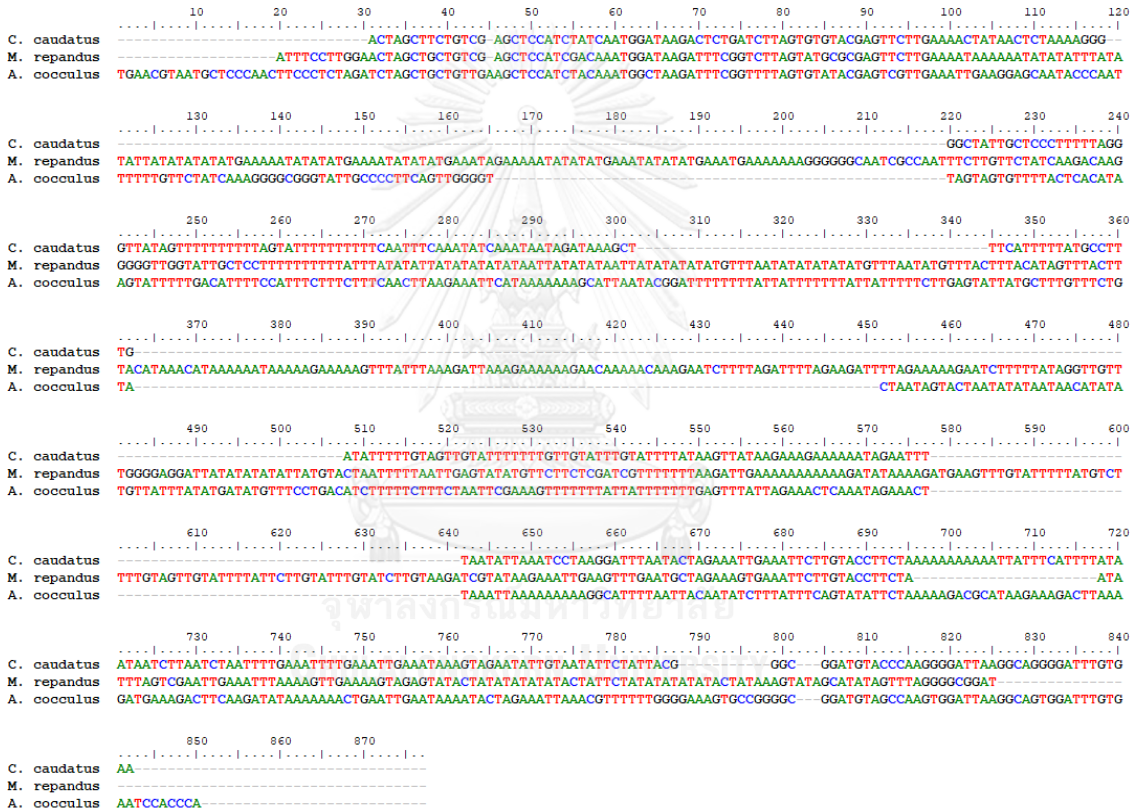



**ภาพที่ 20** แถบรหัสดีเอ็นเอของยีน *mat*K ของพืชที่ใช้ชื่อพ้อง “โคคลาน” ในรูปแบบ FASTA

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

จากภาพแสดงให้เห็นถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน *mat*K ของพืชทั้งสามชนิดที่ใช้ชื่อพ้อง “โคคลาน” โดยจะเห็นว่าพืชทั้งสามชนิดมีแถบรหัสดีเอ็นเอในส่วน *mat*K ที่มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน รวมถึงพบลำดับเบสที่แตกต่างกัน ทำให้สามารถแยกพืชทั้งสามชนิดออกจากกันได้อย่างชัดเจน

4.1.3.3 ยีน *psb*A-*trn*H intergenic spacer



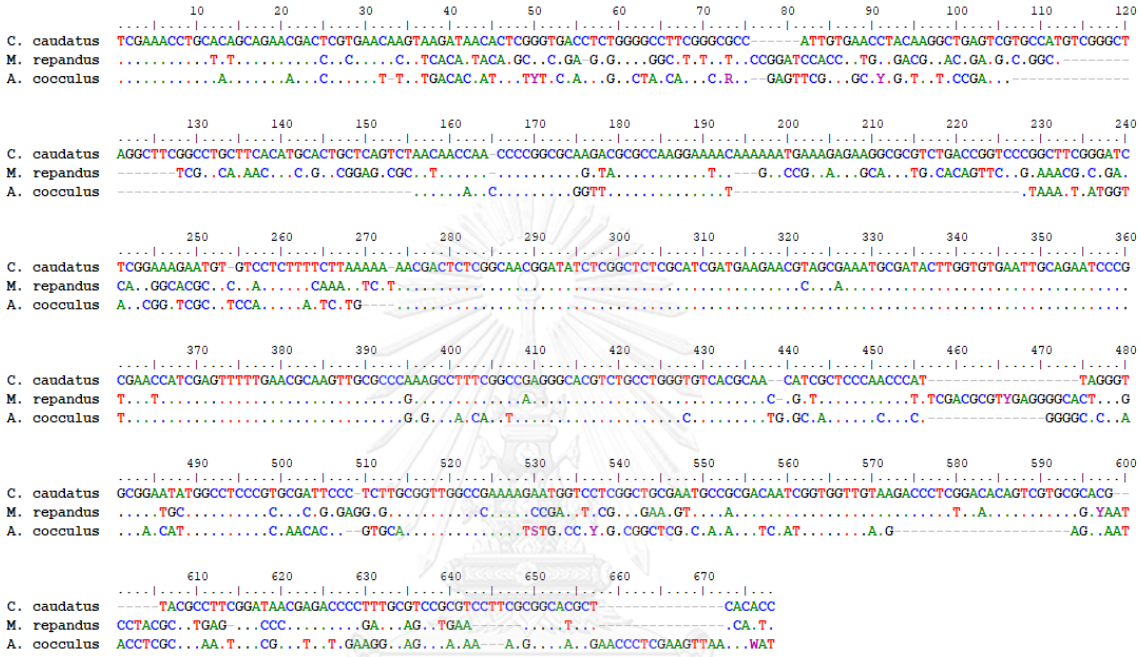

**ภาพที่ 21** แถบรหัสดีเอ็นเอของ *psb*A-*trn*H intergenic spacer ของพืชที่ใช้ชื่อพ้อง “โคคลาน” ในรูปแบบ FASTA

จากภาพแสดงให้เห็นถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน *psb*A-*trn*H intergenic spacer ของพืชทั้งสามชนิดที่ใช้ชื่อพ้อง “โคคลาน” โดยจะเห็นว่าพืชทั้งสามชนิดมีแถบรหัสดีเอ็นเอในส่วน *psb*A-*trn*H intergenic spacer ที่มีความยาวของลำดับนิวคลีโอ

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

ไทด์ที่แตกต่างกัน รวมถึงพบลำดับเบสที่แตกต่างกัน ทำให้สามารถแยกพืชทั้งสามชนิดออกจากกันได้อย่างชัดเจน

4.1.3.4 ITS




**ภาพที่ 22** แถบรหัสดีเอ็นเอของ ITS ของพืชที่ใช้ชื่อพ้อง “โคคลาน” ในรูปแบบ FASTA

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จากภาพแสดงให้เห็นถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน ITS ของพืชทั้งสามชนิดที่ใช้ชื่อพ้อง “โคคลาน” โดยจะเห็นว่าพืชทั้งสามชนิดมีแถบรหัสดีเอ็นเอในส่วน ITS ที่มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน รวมถึงพบลำดับเบสที่แตกต่างกัน ทำให้สามารถแยกพืชทั้งสามชนิดออกจากกันได้อย่างชัดเจน

## 4.2 ผลการสร้างแถบรหัสดีเอ็นเอร่วมกับเทคนิคการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง

### 4.2.1 การเลือก primer

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน *rbc*L ของพืชสมุนไพรทั้ง 3 สปีชีส์ ที่ได้จากการสร้างแถบรหัสดีเอ็นเอ จึงได้ทำการออกแบบไพร์เมอร์ เพื่อให้ได้ชิ้นส่วนยีน *rbc*L ที่มี

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

ขนาด 100 ถึง 200 คู่เบส เพื่อใช้สำหรับการสร้างแถบรหัสดีเอ็นเอร่วมกับเทคนิคการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง โดยรายละเอียดของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษาแสดงในตารางที่ 26

**ตารางที่ 26** ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการสร้างแถบรหัสดีเอ็นร่วมกับเทคนิคการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง

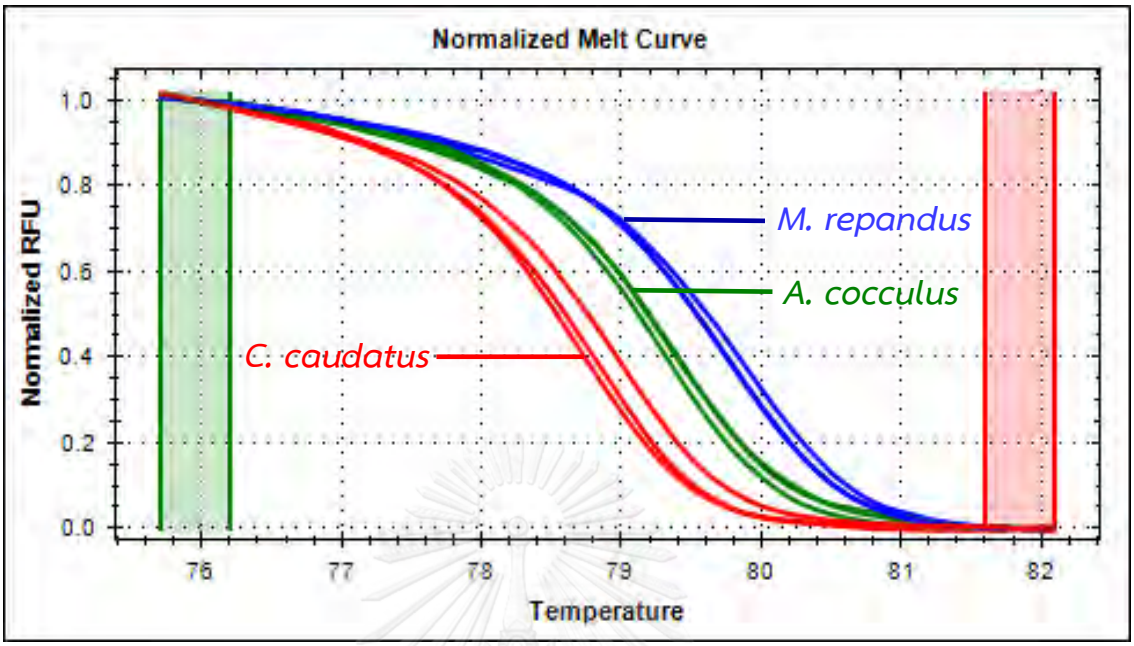
| ไพร์เมอร์ | ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5’ – 3’) |
|---|---|
| KK-rbcLF | TGCATGCAGTTATTGATAGACAGA |
| KK-rbcLR | CCTACTACGGTACCAGCGTG |

### 4.2.2 ผลการสร้างแถบรหัสดีเอ็นเอร่วมกับเทคนิคการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง

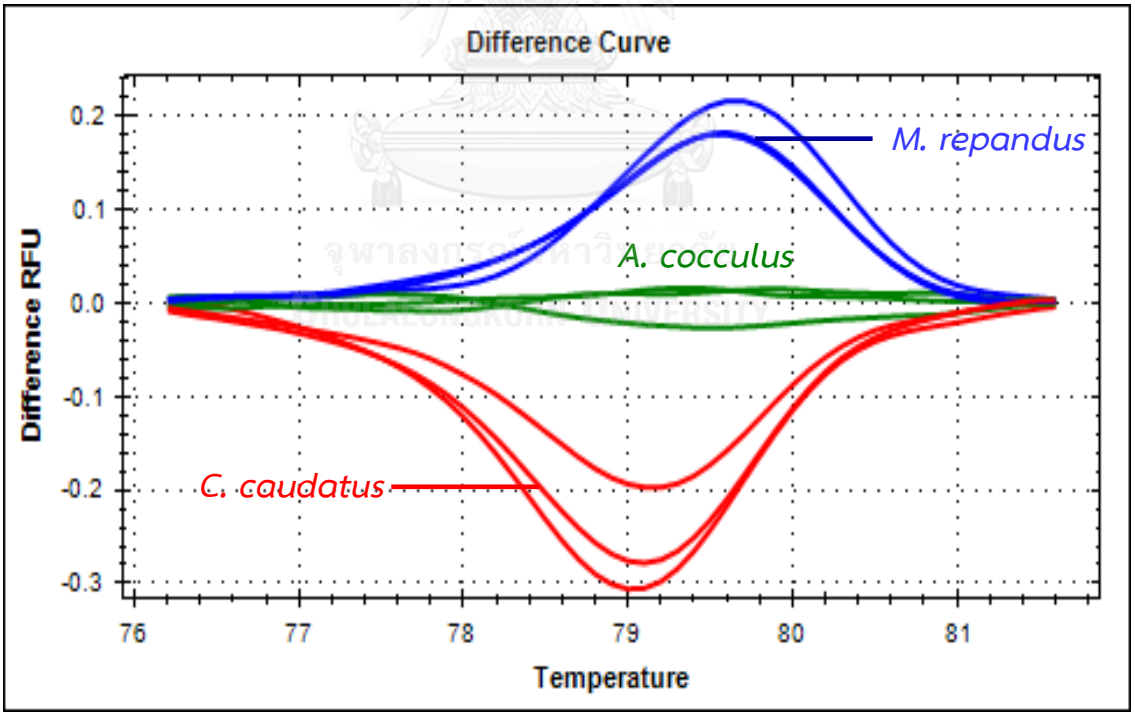
จากการสร้างแถบรหัสดีเอ็นร่วมกับเทคนิคการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง ผลการทดลองที่ได้จะอยู่ในรูปของเส้นโค้งการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูงที่ผ่านการปรับให้เป็นมาตรฐาน (Normalized HRM curve) และเส้นโค้งแสดงความแตกต่างของเอชอาร์เอ็ม (Difference HRM curve) ดังภาพที่ 23 และ 24

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

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




**ภาพที่ 23** เส้นโค้งการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูงที่ผ่านการปรับให้เป็นมาตรฐานของพืชสมุนไพรที่ใช้ชื่อพ้องว่า “โคคลาน”




**ภาพที่ 24** เส้นโค้งแสดงความแตกต่างของเอชอาร์เอ็มของพืชสมุนไพรที่ใช้ชื่อพ้องว่า “โคคลาน”

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

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าเส้นโค้งการหลอมเหลม (Melting curve) ของพืชทั้ง 3 ชนิดมีความแตกต่างกัน โดยแบ่งออกเป็น 3 cluster อย่างเห็นได้ชัด ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *rbc*L amplicon ขนาด 109 คู่เบสที่เลือกใช้นั้นมีประสิทธิภาพในการการพิสูจน์อัตลักษณ์ของพืชสมุนไพรไทยที่ใช้ชื่อพ้อง “โคคลาน”

นอกจากนั้น เมื่อพิจารณาค่าอุณหภูมิหลอมเหลว ($T_m$) ซึ่งคืออุณหูมิที่ทำให้สายดีเอ็นเอเกลียวคู่ออกจากกันครึ่งหนึ่ง พบว่าค่าอุณหภูมิหลอมเหลวของผลผลิต PCR ของพืชทั้ง 3 ชนิดมีค่าแตกต่างกันเนื่องจากองค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์ที่มีเบสที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 27

**ตารางที่ 27** ค่าอุณหภูมิหลอมเหลว ($T_m$) ของพืชทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ชื่อพ้อง “โคคลาน”

| ตัวอย่าง | ค่าอุณหภูมิหลอมเหลว (°C) |
|---|---|
| *Croton caudatus* | 78.80 ± 0.20 |
| *Mallotus repandus* | 79.80 ± 0.10 |
| *Anamirta cocculus* | 79.33 ± 0.13 |

**4.3 ผลการสร้างแถบรหัสดีเอ็นเอร่วมกับเทคนิคการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง**

จากการสร้างแถบรหัสดีเอ็นเอร่วมกับเทคนิคของการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูงของตัวอย่างที่นำมาพิสูจน์อัตลักษณ์ทั้ง 4 ตัวอย่าง พบว่าค่าอุณหภูมิหลอมเหลว ($T_m$) ของตัวอย่างที่ 1, 2 และ 3 นั้นอยู่ในช่วงค่าอุณหภูมิหลอมเหลวของ *Mallotus repandus* จึงสรุปได้ว่า ตัวอย่างที่ 1, 2 และ 3 คือ *Mallotus repandus* ในขณะที่ค่าอุณหภูมิหลอมเหลว ($T_m$) ของตัวอย่างที่ 4 นั้นอยู่ในช่วงค่าอุณหภูมิหลอมเหลวของ *Anamirta cocculus* จึงสรุปได้ว่าตัวอย่างที่ 4 คือ *Anamirta cocculus* ดังตารางที่ 28

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

**ตารางที่ 28** ค่าอุณหภูมิหลอมเหลว ($T_m$) และการพิสูจน์อัตลักษณ์ของพืชตัวอย่าง

| ตัวอย่าง | สถานที่เก็บตัวอย่าง | ชนิดของพืชที่ได้มีการระบุไว้ | ชนิดของพืชที่ตรวจสอบได้ |
|---|---|---|---|
| ตัวอย่างที่ 1 | จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย | *Croton caudatus* | *Mallotus repandus* |
| ตัวอย่างที่ 2 | มุกดาหาร | โคคลาน | *Mallotus repandus* |
| ตัวอย่างที่ 3 | เวชพงศ์โอสถ | โคคลาน | *Mallotus repandus* |
| ตัวอย่างที่ 4 | ปราจีนบุรี | โคคลาน | *Anamirta cocculus* |

จากข้อมูลแสดงให้เห็นว่า ตัวอย่างที่ 1 นั้นมีการแปะป้ายบอกชื่อชนิดของพืชผิด สำหรับตัวอย่างที่ 2 และ 3 นั้นมีการใช้ที่ถูกต้องเนื่องจากเป็นเครื่องยาที่มีการระบุให้ใช้ส่วนรากต้มเพื่อรักษาอาการปวดเมื่อย และตัวอย่างที่ 4 แสดงให้เห็นถึงความอันตรายของการใช้พืชที่เรียกว่าโคคลาน หากไม่ทราบแน่ชัดว่าเป็นชนิดใด เนื่องจากหากบริโภคพืชตัวอย่างที่ 4 โดยคิดว่าเป็น *Croton caudatus* หรือ *Mallotus repandus* อาจทำให้ผู้บริโภคได้รับสาร picrotoxin ได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

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

# บทที่ 5
# สรุปผลและข้อเสนอแนะ

## 5.1 สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่มีการพิสูจน์อัตลักษณ์ของพืชสมุนไพรไทยที่ใช้ชื่อพ้อง “โคคลาน” โดยแถบรหัสดีเอ็นเอร่วมกับเทคนิคการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง ซึ่งประสบความสำเร็จโดยการใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอในส่วนของ *rbc*L ร่วมกับเทคนิคการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง โดยวิธีดังกล่าวนี้สามารถนำไปประยุกต์เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพของสมุนไพรได้ในอนาคต

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

อย่างไรก้ตามวิธีการใช้แถบรหัสดีเอ็นเอร่วมกับเทคนิคการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูงในพิสูจน์อัตลักษณ์ของพืชสมุนไพรนี้ ไม่เหมาะสมกับการนำไปตรวจสมุนไพรที่อยู่ในรูปแบบผสม หากต้องการตรวจสารดังกล่าว แนะนำให้ใช้เทคนิค next generation sequencing (NGS) แทน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

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

# รายการอ้างอิง


1. กระทรวงสาธารณสุข และองค์กรภาครัฐ.แผนแม่บทแห่งชาติ ว่าด้วยการพัฒนาสมุนไพรไทย. พิมพ์ครั้งที่ 2 นนทบุรี: บริษัท ทีเอส อินเตอร์พริ้นท์ จำกัด; 2559.
2. สุชาดา สุขหร่อง. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสมุนไพร. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2553.
3. เต็ม สมิตินันท์. *ชื่อ*พรรณไม้แห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ: สำนักงานหอพรรณไม้ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช; 2557.
4. ลีนา ผู้พัฒนพงศ์. สมุนไพร ตอนที่ 5. กรุงเทพมหานคร: ห.จ.ก. ชุติมาการพิมพ์; 2530.
5. ฐานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. โคคลาน [อินเทอร์เน็ต]. 2553 [เข้าถึงเมื่อ 3 มกราคม 2562]. เข้าถึงได้จาก: http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=215.
6. Wulijarni-Soeujipto N, Valkenburg JV. Amanirta cocculus (prosea) [Internet]. 2015 [cited 2019 Jan 3]. Available from: https://uses.plantnet-project.org/en/Anamirta_cocculus_ (PROSEA).
7. วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม. พจนานุกรมสมุนไพรไทย. กรุงเทพมหานคร: รวมสาสน์; 2548.
8. National Center for Biotechnology Information. Picrotoxin [Internet]. [cited 2019 Jan 3]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68010852.
9. Tropical Plants Database, Ken Fern. Croton caudatus [Internet]. 2014 [cited 2019 Apr 12]. Available from: http://tropical.theferns.info/viewtropical.php?id=Croton+caudatus.
10. Hasan M, Uddin N, Hasan R, Islam M, Hossain M, Bahman A, et al. Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of Leaf Extract of Mallotus repandus (Willd.) Muell. Arg. Biomed Res Int. 2014; 2014: 539807.


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

11. The botanical database. Anamirta cocculus [Internet]. 2013 [cited 2019 Apr 12]. Available from: http://www.qsbg.org/Database/plantdb/mdp/medicinal-specimen.asp?id=112.
12. A. Takeuchi, Noriko Takeuchi. A study of the action of picrotoxin on the inhibitory neuromuscular junction of the crayfish. J Physiol. 1969; 205(2): 377–91.
13. Richard W. Olsen. Picrotoxin-like channel blockers of GABAA receptors. Proc Natl Acad Sci USA. 2006; 103(16): 6081–2.
14. Ahmad I, Aqil F, Owais M. Modern phytomedicine: turning medicinal plants into drugs. New York: John Wiley & Sons; 2006.
15. Willow JH. Traditional herbal medicine research methods: identification, analysis, bioassay and pharmaceutical and clinical studies. New York: John Wiley & Sons; 2011.
16. Benzie IF, Wachtel-Galor S. Herbal medicine: biomolecular and clinical aspects, oxidative stress and disease. 2nd ed. Florida: CRC Press; 2011. p. 499.
17. Odugvemi T. A textbook of medicinal plants from Nigeria. Nigeria: Tolu Odugbemi; 2008.
18. Wendy L. Applequist & James S. Miller. Selection and authentication of botanical material for the development of analytical methods. Anal Bioanal Chem. 2013; 405:4419–28.
19. Shehla Akbar, Uzma Hanif, Jaffar Ali, and Saiqa Ishtiaq. Pharmacognostic studies of stem, roots and leaves of Malva parviflora L. Asian Pac J Trop Biomed. 2014; 4(5): 410–5.
20. Babu K, Shankar SG, Rai S. Comparative pharmacognostic studies on the barks of four Ficus species. Turk J Bot. 2010; 34(3):215–24.
21. Gingrich, J. C. & Hallick, R. B. Chloroplast gene sequences and the study of plant evolution. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Jan 15; 90(2): 363–367.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

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

22. Curtis, S. E. & Clegg, M. T. Molecular evolution of chloroplast DNA sequences. Mol Biol Evol. 1984; 1(4):291-301.
23. Selvaraj D. Phylogenetic analysis of chloroplast matK gene from Zingiberaceae for plant DNA barcoding. Bioinformation. 2008; 3(1): 24–7.
24. Ito M, Kawamoto A. Phylogenetic Relationships of Amaryllidaceae Based on matK Sequence Data. Journal of Plant Research. 1999; 207:216.
25. Wolfe K. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. Proc Natl Acad Sci USA. 1987; 84(24): 9054–58.
26. Man S.M., Kaakoush N.O, Octavia S, Mitchell H. The Internal Transcribed Spacer Region, a New Tool for Use in Species Differentiation and Delineation of Systematic Relationships within the Campylobacter Genus. Appl Environ Microbiol. 2010; 76(10): 3071–81.
27. Lilit Garibyan, Nidhi Avashia. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). J Invest Dermatol. 2013; 133(3): e6.
28. Khan academy. DNA sequencing [Internet]. 2017 [cited 2019 Apr 12]. Available from: https://www.khanacademy.org/science/high-school-biology/hs-molecular-genetics/hs-biotechnology/a/dna-sequencing.
29. Premier biosoft. HRM technology [Internet]. 2018 [cited 2019 Apr 12]. Available from: http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/high_resolution_melting_analysis.html.
30. Qiagen. DNeasy® Plant Handbook. Hilden: Qiagen; 2018.
31. Lee P, Costumbrado J, Hsu C, Kim Y. Agarose gel electrophoresis for the separation of dna fragmentation. J Vis Exp. 2012; 62:3923.PMID: 22546956.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

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

# ภาคผนวก ก

**ภาพต้นไม้ในงานวิจัยนี้**

*Mallotus repandus* (Rottler) Mull. Arg.

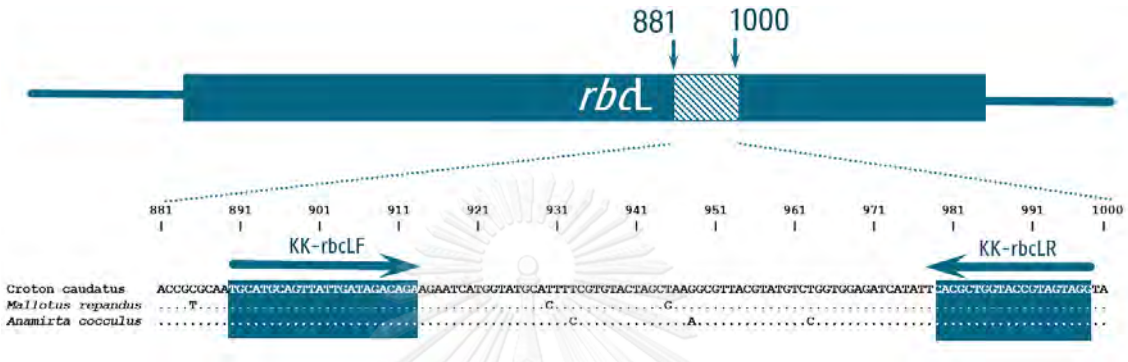
*Anamirta cocculus* (L.) Wight & Arn.

*Anamirta cocculus* (L.) Wight & Arn.

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

# ภาคผนวก ข

**ไพร์เมอร์ที่ใช้สำหรับการสร้างแถบรหัสดีเอ็นร่วมกับเทคนิคการตรวจวิเคราะห์การหลอมเหลวความละเอียดสูง**




จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

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