

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 คอมพิวเตอร์และเครือข่ายอินเทอร์เน็ต

3.2 โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้ศึกษา

3.2.1 BioEdit version 7.0.9

3.2.2 ClustalX version 2.0.11

3.2.3 MEGA version 5.1

3.3 เว็บไซต์ปฏิบัติการออนไลน์

3.3.1 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

3.4 การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *Chalcone synthase*

3.4.1 นำลำดับเบสของยีน *Chalcone synthase* ของชาสกุล *Camellia* จากฐานข้อมูล GenBank จำนวน 64 ข้อมูล ณ เดือนมีนาคม พ.ศ. 2555 (แสดงในตาราง 3-1) มาเทียบเคียงความเหมือน (multiple alignment) ด้วยโปรแกรม ClustalX version 2.0.11 หลังจากนั้นจัดตำแหน่งแต่ละลำดับเบสให้เทียบเคียงให้เป็นบริเวณเดียวกัน โดยใช้โปรแกรม BioEdit version 7.0.9

3.4.2 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เทียบเคียง และคัดเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมที่แสดงความแตกต่างของแต่ละข้อมูล

3.4.3 ใช้เว็บไซต์ปฏิบัติการออนไลน์จำลองแถบดีเอ็นเอบนเจลอะกาโรสเสมือนเป็นภาพหลังทำอิเล็กโทรโฟริซิสในห้องปฏิบัติการ

3.4.4 นำลำดับนิวคลีโอไทด์ ข้อ 3.4.1 มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA ver. 5.1

ตารางที่ 3-1 ตัวอย่างและข้อมูลของชาสกุล *Camellia* ที่บันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank
ที่นำมาศึกษา

Scientific name	Source	GenBank accession no.	Size (bp)
* <i>Camellia sinensis</i>	Zhejiang, China	D26594	1,405
<i>C. amplexicaulis</i>	Zhejiang, China	GU722448	724
<i>C. atrothea</i>	Zhejiang, China	GU722451	724
<i>C. brevistyla</i>	Taitung, Taiwan	GU722504	724
<i>C. brevistyla</i>	Taitung, Taiwan	GU722452	724
<i>C. chungkingensis</i>	Zhejiang, China	GU722456	724
<i>C. costei</i>	Yunnan, China	GU722458	724
<i>C. cordifolia</i>	Guangdong, China	GU722457	724
<i>C. crapnelliana</i>	Guangxi, China	GU722459	724
<i>C. chrysantha</i>	Yunnan, China	GU722455	724
<i>C. cuspidate</i>	China	GU722460	724
<i>C. caudate</i>	China	GU722453	724
<i>C. cordifolia</i>	Guangdong, China	GU722457	724
<i>C. edithae</i>	Dyer Hunan, China	GU722461	724
<i>C. euryoides</i>	Guangdong, China	GU722463	724
<i>C. euryoides</i> var. <i>nokoensis</i>	Guangdong, China	GU722486	724
<i>C. euphlebia</i>	Yunnan, China	GU722462	724
<i>C. flava</i>	China	GU722464	724
<i>C. forrestii</i>	China	GU722467	724
<i>C. fluviatilis</i>	China	GU722465	724
<i>C. furfuracea</i>	Guangxi, China	GU722468	724
<i>C. furfuracea</i> var. <i>latipetiolata</i>	Guangxi, China	GU722478	724
<i>C. gauchowensis</i>	Zhejiang, China	GU722469	724

หมายเหตุ * คือ ชาที่พบว่ามีปลูกในภาคเหนือของประเทศไทย; D26594 = ชาจีน

GU722449 = ชาอัสสัม และ GU722488 = ชาน้ำมัน

ตารางที่ 3-1 (ต่อ)

Scientific name	Source	GenBank accession no.	Size (bp)
<i>C. gilbertii</i>	Vietnam	GU722470	724
<i>C. granthamiana</i>	Zhejiang, China	GU722471	724
<i>C. grijsii</i>	Yunnan, China	GU722472	724
<i>C. hongkongensis</i>	Taiping Mt., HK	GU722473	724
<i>C. japonica</i>	Keelung, Taiwan	GU722475	724
<i>C. kissii</i>	China	GU722477	724
<i>C. lawii</i>	Zhejiang, China	GU722479	724
<i>C. leptophylla</i>	Zhejiang, China	GU722480	724
<i>C. mairei</i> var. <i>lapidea</i>	Zhejiang, China	GU722481	724
<i>C. microphylla</i>	Zhejiang, China	GU722483	724
<i>C. meiocarpa</i>	Taipei, Taiwan	GU722482	724
<i>C. multiperulata</i>	Guangdong, China	GU722484	724
<i>C. nitidissima</i>	Guangxi, China	GU722485	724
<i>C. octopetala</i>	Fujian, China	GU722487	724
* <i>C. oleifera</i>	Zhejiang, China	GU722488	724
<i>C. pachysandra</i>	China	GU722489	724
<i>C. parafurfuracea</i>	Zhejiang, China	GU722490	724
<i>C. parvilimba</i>	Zhejiang, China	GU722491	724
<i>C. parvimuricata</i> var. <i>hupehensis</i>	Zhejiang, China	GU722474	724
<i>C. paucipetala</i>	Zhejiang, China	GU722492	724
<i>C. piquetiana</i>	Zhejiang, China	GU722493	724
<i>C. pitardii</i>	Yunnan, China	GU722494	724
<i>C. pubifurfuracea</i>	Zhejiang, China	GU722495	724
<i>C. pyxidiacea</i> var. <i>rubituberculata</i>	China	GU722497	724

หมายเหตุ * คือ ชาที่พบว่ามีการปลูกในภาคเหนือของประเทศไทย; D26594 = ชาจีน

GU722449 = ชาอัสสัม และ GU722488 = ชาน้ำมั้น

ตารางที่ 3-1 (ต่อ)

Scientific name	Source	GenBank accession no.	Size (bp)
<i>C. salicifolia</i>	Pingtung, Taiwan	GU722498	724
<i>C. saluenensis</i>	China	GU722499	724
<i>C. sasanqua</i>	Taipei, Taiwan	GU722500	724
* <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i>	Taiwan, Thailand	GU722449	724
<i>C. sinensis</i> f. <i>formosensis</i>	Taiwan	GU722466	724
<i>C. szechuanensis</i>	Sichuan, China	GU722503	724
<i>C. tachangensis</i> var. <i>remotiserata</i>	China	GU722476	724
<i>C. transarisanensis</i>	Taichung, Taiwan	GU722505	724
<i>C. transnokoensis</i>	Nantou, Taiwan	GU722506	724
<i>C. tuberculata</i>	Zhejiang, China	GU722507	724
<i>C. tunghinensis</i>	Zhejiang, China	GU722508	724
<i>C. rhytidocarpa</i>	Zhejiang, China	GU722496	724
<i>C. semiserrata</i>	Guangdong, China	GU722501	724
<i>C. vietnamensis</i>	Zhejiang, China	GU722509	724
<i>C. wenshanensis</i>	Zhejiang, China	GU722510	724
<i>C. yuhsienensis</i>	Yunnan, China	GU722511	724
<i>C. yunnanensis</i>	Yunnan, China	GU722512	724
<i>C. yunnanensis</i>	Yunnan, China	AY146704	776

หมายเหตุ * คือ ชาที่พบว่ามีปลูกในภาคเหนือของประเทศไทย; D26594 = ชาจีน

GU722449 = ชาอัสสัม และ GU722488 = ชาฉำฉา

3.5 การสร้าง Phylogenetic tree

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย phylogenetic tree จากโปรแกรม MEGA ver. 5.1 โดยทดสอบเพื่อคัดเลือกวิธีและโมเดลที่เหมาะสมสำหรับการสร้าง phylogenetic tree ของนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด แล้วเลือกใช้วิธี Maximum likelihood และโมเดล Kimura 2-parameter ทำการสับเปลี่ยนข้อมูล 1,000 ครั้ง