บทที่ 3
วิธีการทดลอง

การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างชิ้นส่วน ชิ้นเนื้อ หรืออวัยวะของสัตว์ที่คาดว่าจะเป็นสัตว์ป่า ที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ เมื่อสังเกตจากลักษณะภายนอก โดยซื้อจากผู้ค้าในเขตพื้นที่ อำเภอเขาชะเมา จังหวัดระยอง ในช่วงเดือน กุมภาพันธ์- สิงหาคม พ.ศ. 2558 รวมทั้งสิ้น 19 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3.1 และภาพที่ 3.1) โดยแต่ละตัวอย่างแยกบรรจุใน ถุงพลาสติกใสที่สะอาด ผนึกปากถุง แล้วแช่แข็งระหว่างการเดินทางเพื่อนำกลับมาที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณีเพื่อนำมาถ่ายภาพ และทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อใส่หลอด เพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 3.1 ข้อมูลการเก็บตัวอย่างชิ้นส่วน ชิ้นเนื้อ หรืออวัยวะของสัตว์ที่คาดว่าจะเป็นสัตว์ป่าในเขตพื้นที่ อำเภอเขาชะเมา จังหวัดระยอง

รหัสตัวอย่าง	ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้		สถานที่เก็บตัวอย่าง
	ลักษณะของตัวอย่าง	สัตว์ที่คาดว่าจะเป็น	
WL- 01	ชิ้นเนื้อ	กระจง	ตลาดน้ำเป็น
WL- 02	ชิ้นเนื้อ	กระเล็น	ตลาดน้ำเป็น
WL- 03	ชิ้นเนื้อ	กระรอก	ตลาดกองดิน
WL- 04	ชิ้นเนื้อ	กวาง	ตลาดเขาวงกต
WL- 05	ชิ้นส่วนขา	กระรอก	ตลาดเขาวงกต
WL- 06	ชิ้นเนื้อ	เลียงผา	ผู้ค้าเร่
WL- 07	ชิ้นเนื้อ	เต่า	ผู้ค้าเร่
WL- 08	ชิ้นเนื้อ	เก้ง	ตลาดเขาวงกต
WL- 09	ชิ้นเนื้อ	กระรอก	ผู้ค้าเร่
WL- 10	ชิ้นเนื้อ	เก้ง	ตลาดกองดิน
WL- 11	ชิ้นเนื้อ	กระเล็น	ตลาดน้ำเป็น
WL- 12	ชิ้นเนื้อ	เม่น	ตลาดกองดิน
WL- 13	ชิ้นเนื้อ	อีเห็น	ผู้ค้าเร่

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้		สถานที่เก็บตัวอย่าง
	ลักษณะของตัวอย่าง	สัตว์ที่คาดว่าจะเป็น	
WL- 14	ชิ้นเนื้อ	พังพอน	ผู้ค้าเร่
WL- 15	ชิ้นเนื้อ	กระรอก	ผู้ค้าเร่
WL-16	ชิ้นเนื้อ	ลิง	ผู้ค้าเร่
WL-17	ชิ้นเนื้อ	หมูป่า	ผู้ค้าเร่
WL-18	ชิ้นเนื้อ	อ้น	ผู้ค้าเร่
WL-19	ชิ้นเนื้อ	หมูป่า	ตลาดน้ำเป็น

วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมีในการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์

1. หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ (Microcentrifuge tube) ขนาด 0.5 และ 1.5 ml
2. ปิเปต (Pipette)
3. มือ (Gloves)
4. ปากคีบ (Forcep)
5. บีกเกอร์ (Beaker)
6. เครื่องเขย่าวน (Vortex)
7. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
8. เครื่องชั่งสาร (Balance)
9. เครื่องกวนสารเคมี (Hot Plate Stirrer)
10. เครื่องอุ่นสารในหลอดทดลอง (Heating Block Incubator)
11. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermal Cycler)
12. ชุดแยกสารด้วยกระแสไฟฟ้าแบบแนวนอน (Electrophoresis Set)
13. ตู้แสงสีขาว และแสงอัลตร้าไวโอเลต (Ultraviolet-visible Transilluminator)
14. เครื่องถ่าย และวิเคราะห์ภาพเจล (Gel Documentation)
15. นาฬิกาจับเวลา (Stopwatch)
16. กล้องถ่ายภาพ (Camera)
17. เครื่องดูด – จ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Auto Pipette)
18. ปิเปต ทิป (Pipette tip)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

สารเคมีในการทดลอง

1. ชุดน้ำยาสำเร็จรูป FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Kit (Favorgen, Taiwan) สำหรับสกัดดีเอ็นเอ

2. น้ำกลั่น (Distilled Water)

3. น้ำกลั่นปราศจากเกลือแร่ (Deionized distilled water)

4. ชุดน้ำยาสำเร็จรูป GenepHlow™ Gel/PCR Kit (Geneaid, Taiwan) สำหรับทำ PCR product ให้บริสุทธิ์

5. เอนไซม์ Proteinase K

6. สารละลาย 10x *Taq* buffer

7. สารละลาย 25 mM

8. 10 mM dNTP $MgCl_2$

9. 10 pmol Forward primer

10. 10 pmol Reverse primer

11. เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase

12. DNA template

13. ผงวุ้น Agarose

14. TBE (Tris-borate EDTA) Buffer

15. Red Safe

16. Ethidium Bromide

17. Tris

18. 100 bp Ladder (biotechrabbitGmbh, Gemany)

19. Acetic Acid

20. EthylenediaminetetraaceticAcid (EDTA)

การศึกษาในห้องปฏิบัติการ

ถ่ายรูปตัวอย่างชิ้นส่วน ชิ้นเนื้อ หรืออวัยวะของสัตว์ป่า

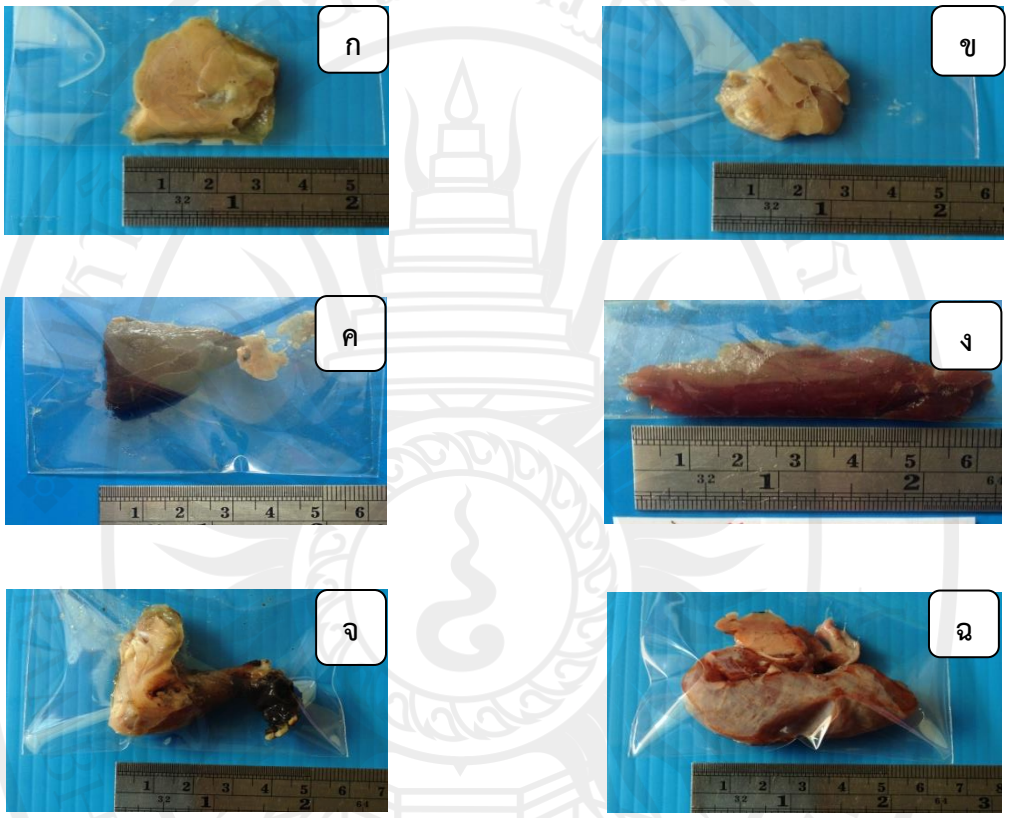
นำตัวอย่างมาที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี แล้วถ่ายรูปตัวอย่างชิ้นส่วน ชิ้นเนื้อ หรืออวัยวะของสัตว์ป่าที่ได้มา

เก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อใส่หลอด

เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วน ชิ้นเนื้อ หรืออวัยวะใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ ขนาด 1.5 ml เพื่อเตรียมสำหรับนำมาสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเนื้อเยื่อ

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างทั้ง 19 ตัวอย่าง โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Kit (Favorgen, Taiwan)



ภาพที่ 3.1 ตัวอย่างชิ้นส่วน ชิ้นเนื้อ หรืออวัยวะที่คาดว่าจะเป็นสัตว์ป่า จำนวน 19 ตัวอย่าง

ก. ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่คาดว่าจะเป็นกระจง (WL-01)

ข. ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่คาดว่าจะเป็นกระเล็น (WL-02)

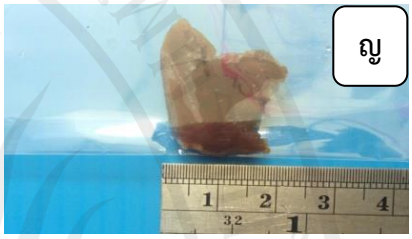
ค. ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่คาดว่าจะเป็นกระรอก (WL-03)

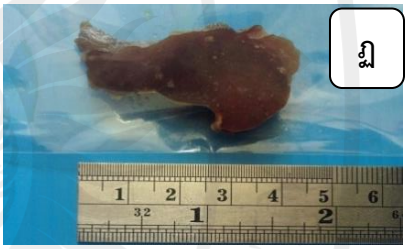
ง. ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่คาดว่าจะเป็นกวาง (WL-04)

จ. ตัวอย่างชิ้นส่วนขาที่คาดว่าจะเป็นกระรอก (WL-05)

ฉ. ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่คาดว่าจะเป็นเลียงผา (WL-06)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี





ภาพที่ 3.1 (ต่อ)

ช. ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่คาดว่าจะเป็นเต่า (WL-07)

ซ. ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่คาดว่าจะเป็นเก้ง (WL-08)

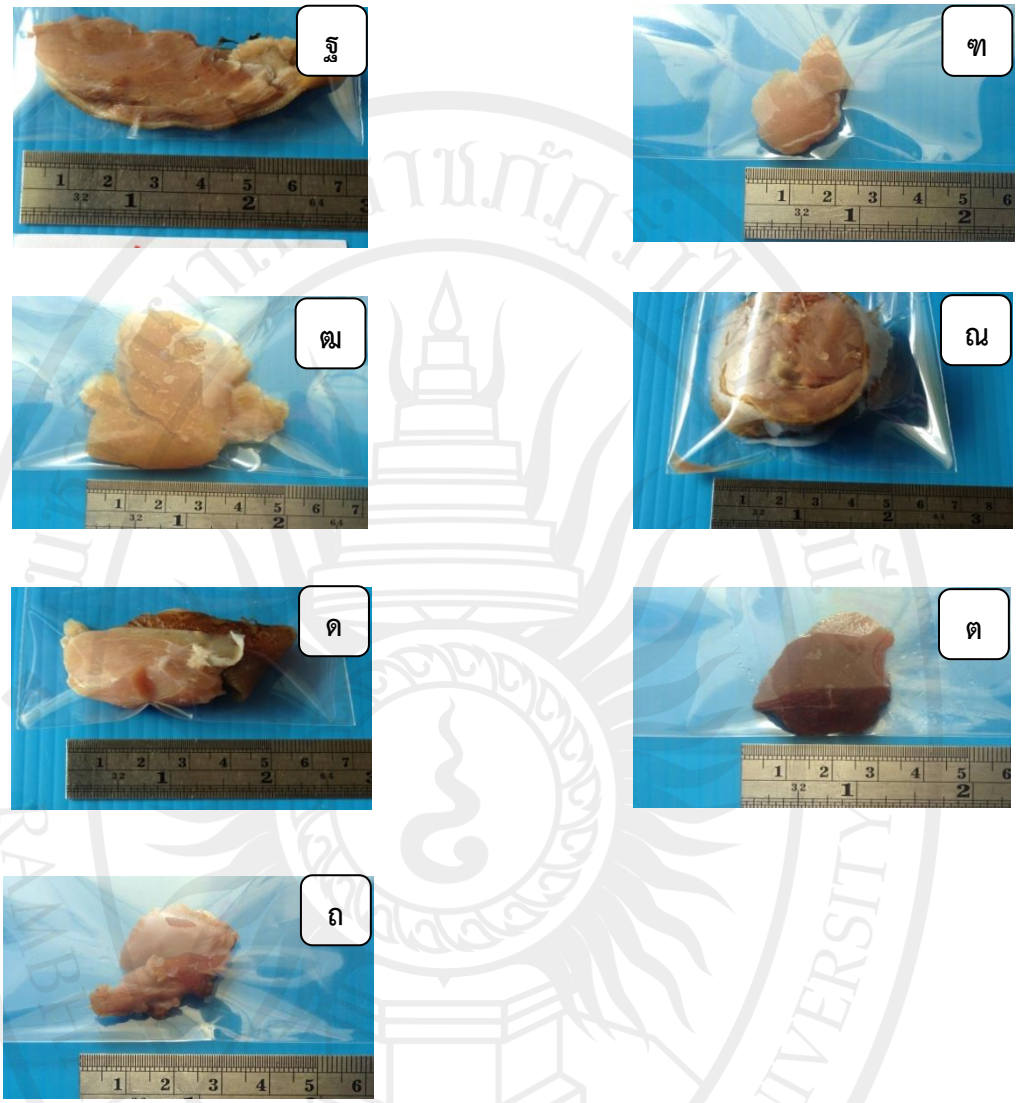
ฌ. ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่คาดว่าจะเป็นกระรอก (WL-09)

ญ. ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่คาดว่าจะเป็นเก้ง (WL-10)

ฎ. ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่คาดว่าจะเป็นกระเล็น (WL-11)

ฏ. ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่คาดว่าจะเป็นแม่น (WL-12)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี



ภาพที่ 3.1 (ต่อ)

ฐ. ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่คาดว่าจะเป็นอีเห็น (WL-13)
ฑ. ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่คาดว่าจะเป็นพังพอน (WL-14)
ฒ. ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่คาดว่าจะเป็นกระรอก (WL-15)
ณ. ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่คาดว่าจะเป็นลิง (WL-16)
ด. ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่คาดว่าจะเป็นหมูป่า (WL-17)
ต. ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่คาดว่าจะเป็นอ้น (WL-18)
ถ. ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่คาดว่าจะเป็นหมูป่า (WL-19)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ ด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียม 1% Agarose Gel โดยชั่งผงวุ้น Agarose 0.4 g ต้มใน 0.5X TBE Buffer จนสารละลายใสเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเติมสารละลาย Red safe 2 µl ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 40 ml จากนั้นเทใส่แม่พิมพ์ เสียบหวีไว้เพื่อให้เกิดหลุมแล้วทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว

2. เตรียมเครื่อง Agarose Gel Electrophoresis เปิดและปรับการทำงานที่ 100 V นาน 20 นาที

3. วางถาดเจลที่เตรียมไว้ลงในเครื่อง แล้วเติม 0.5X TBE Buffer ให้ท่วมเจลพอดี

4. นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบปริมาตร 4 µl ผสมกับ Loading dye 1 µl แล้วโหลดลงในหลุมเจลจนครบทุกตัวอย่าง โดยโหลดดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb (biotechrabbit GmbH, Germany) ปริมาตร 2 µl ลงในหลุมเจลช่องแรก

5. นำแผ่นเจลมาส่องดูแถบดีเอ็นเอ เพื่อตรวจสอบผลของการเพิ่มปริมาณและถ่ายภาพเจลด้วยเครื่อง Ultraviolet-Visible Transilluminator

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ มาทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR โดยปฏิกิริยาประกอบไปด้วยสารต่าง ๆ (PCR mixture) ซึ่งมีปริมาตรรวม 50 µl ประกอบด้วย

น้ำกลั่นปราศจากเกลือแร่	30.5 µl
10x *Taq* buffer	5.0 µl
25 mM $MgCl_2$	4.0 µl
10 mM dNTP	2.0 µl
10 pmol PrimerF	1.0 µl
10 pmol PrimerR	1.0 µl
Taq DNA polymerase	0.5 µl
DNA template	6.0 µl

เมื่อเติมสารต่าง ๆ ลงในหลอดครบแล้ว ผสมให้เข้ากัน และเติมสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่างปริมาตร 6 µl ลงไป สำหรับหลอดที่ใช้ตรวจสอบสภาวะของ PCR ได้แก่ Negative control จะเติมน้ำกลั่นปราศจากเกลือแร่ปริมาตร 6 µl แทนสารละลายดีเอ็นเอของตัวอย่าง และ Positive control จะเติมสารละลายที่ทำ PCR ขึ้นแล้ว จากนั้นนำหลอดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermal Cycler) โดยตั้งสภาวะการทำงานของ PCR ดัดแปลงจาก Hsieh และคณะ (2001) มีดังนี้

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

- Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 ^{o}C นาน 10 นาที จากนั้น
- Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 ^{o}C นาน 45 วินาที
- Annealing ที่อุณหภูมิ 50 ^{o}C นาน 45 วินาที } 35 รอบ
- Extension ที่อุณหภูมิ 72 ^{o}C นาน 90 วินาที
- Final Extension ที่อุณหภูมิ 72 ^{o}C นาน 10 นาที

ในการศึกษาครั้งนี้ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR เป็น Universal primer ที่ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีนไซโตโครม บี ในจำพวกสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม คือ ไพรเมอร์ L14724 และ H15149 โดยมีลำดับเบสดังนี้

L14724 (Forward primer) : 5'-CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG-3'

H15149 (Reverse primer) : 5'-AAACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3'

ตรวจสอบผลของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis

ภายหลังการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีนไซโตโครม บี ด้วยเทคนิค PCR ทำการตรวจสอบผลิตผล PCR ด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis โดยมีขั้นตอนดังที่ได้อธิบายไว้แล้วในข้างต้น

การทำ PCR product ให้บริสุทธิ์และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ภายหลังการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีนไซโตโครม บี แล้ว PCR product ที่ได้จะทำให้บริสุทธิ์ (Purified) โดยสิ่งปนเปื้อนใน PCR product อันประกอบด้วย dNTP ไพรเมอร์ เอนไซม์ DNA polymerase และเกลือ $MgCl_2$ จะถูกกำจัดออกไป โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป GenepHlow™ Gel/PCR kit (Geneaid, Taiwan) จากนั้นส่ง PCR product ที่บริสุทธิ์ ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเครื่องหาลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติ (Automated sequencer) ไพรเมอร์ที่ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ คือไพรเมอร์ L14724 และ H15149 ซึ่งเป็นคู่เดียวกันกับที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อสร้างชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายที่สมบูรณ์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่ได้ของทุกตัวอย่างจะถูกตรวจสอบโดยวิเคราะห์ Chromatogram โดยใช้โปรแกรม MEGA v.6.0

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างกับฐานข้อมูลพันธุกรรมสากล GenBank

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่างที่ได้จากข้อ 3.4.1 ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลพันธุกรรมสากล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) โดยใช้โปรแกรม Blastn (Basic Local Alignment Search Tool) เพื่อตรวจสอบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์

ของตัวอย่างดังกล่าวเป็นชิ้นส่วนของยีนไซโตโครม บี หรือไม่ และรหัสพันธุกรรมดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับสิ่งมีชีวิตชนิดใด

การสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของทุกตัวอย่าง ในส่วนของยีนไซโตโครม บี มาทำการเปรียบเทียบ (Multiple sequence alignment) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซโตโครม บี ที่นำมาจากฐานข้อมูลพันธุกรรมสากล GenBank ที่มีความคล้ายคลึงกับกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่างมากที่สุด (ตารางที่ 3.2) โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซโตโครม บี ของไก่ (*Gallus gallus*) ที่นำมาจากฐานข้อมูล GenBank (AB044986) ตัวอย่างนอกกลุ่ม (Outgroup)

ตารางที่ 3.2 ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นำมาจากฐานข้อมูลพันธุกรรมสากล GenBank

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้	**รหัสตัวอย่าง**	**ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นำมาจากฐานข้อมูลพันธุกรรมสากล GenBank**	
		ชื่อสิ่งมีชีวิต	**Accession No. ใน GenBank**
ชิ้นเนื้อที่คาดว่าจะเป็นกระจง	WL-01	*Tragulus kanchil*	JN632709
ชิ้นเนื้อที่คาดว่าจะเป็นกระเล็น	WL-02	*Dremomys pernyi*	KP708711
ชิ้นเนื้อที่คาดว่าจะเป็นกระรอก	WL-03	*Ratufa bicolor*	KF575124
ชิ้นเนื้อที่คาดว่าจะเป็นกวาง	WL-04	*Rusa unicolor*	MF177005
ชิ้นเนื้อที่คาดว่าจะเป็นกระรอก	WL-05	*Callosciurus erythraeus*	KY117538
ชิ้นเนื้อที่คาดว่าจะเป็นเลียงผา	WL-06	*Capricornis sumatraensis*	FJ207534
ชิ้นเนื้อที่คาดว่าจะเป็นเต่า	WL-07	*Indotestudo elongata*	DQ080043
ชิ้นเนื้อที่คาดว่าจะเป็นเก้ง	WL-08	*Muntiacus muntjak*	KY117560
ชิ้นเนื้อที่คาดว่าจะเป็นกระรอก	WL-09	*Callosciurus finlaysonii*	KY117540
ชิ้นเนื้อที่คาดว่าจะเป็นเก้ง	WL-10	*Rusa unicolor*	MF177002
ชิ้นเนื้อที่คาดว่าจะเป็นกระเล็น	WL-11	*Dremomys pernyi*	KP708711
ชิ้นเนื้อที่คาดว่าจะเป็นเม่น	WL-12	*Hystrix brachyurus*	JQ991599
ชิ้นเนื้อที่คาดว่าจะเป็นอีเห็น	WL-13	*Paradoxurus hermaphroditus*	FJ881676
ชิ้นเนื้อที่คาดว่าจะเป็นพังพอน	WL-14	*Herpestes javanicus*	DQ519059
ชิ้นเนื้อที่คาดว่าจะเป็นกระรอก	WL-15	*Hylopetes phayrei*	AB126252

ตารางที่ 3.2 (ต่อ)

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้	รหัสตัวอย่าง	ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นำมาจากฐานข้อมูลพันธุกรรมสากล GenBank	
		ชื่อสิ่งมีชีวิต	Accession No. ใน GenBank
ชิ้นเนื้อที่คาดว่าจะเป็นลิง	WL-16	*Macaca silenus*	KM679363
ชิ้นเนื้อที่คาดว่าจะเป็นหมูป่า	WL-17	*Sus scrofa*	EF545585
ชิ้นเนื้อที่คาดว่าจะเป็นอ้น	WL-18	*Rhizomys pruinosus*	KC789518
ชิ้นเนื้อที่คาดว่าจะเป็นหมูป่า	WL-19	*Sus scrofa*	EF545585

นำผลจากการทำ Multiple sequence alignment มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่าง โดยการสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี Maximum likelihood (ML) โดยใช้โปรแกรม MEGA v.6.0 ทดสอบความเชื่อมั่น tree ที่ได้ด้วยการทดสอบ bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ แล้วสร้าง consensus tree ด้วยวิธี 50% majority rule ซึ่งจะแสดง branch ใด ๆ ใน consensus tree ก็ต่อเมื่อ branch นั้นปรากฏใน tree ที่ได้จากการทดลอง booststrap มากกว่าครึ่งหนึ่ง (50%) ของ tree ทั้งหมด

ในกรณีที่ผลจากการเปรียบเทียบ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างได้ผลเป็นหมู (*Sus scrofa*) ซึ่งในฐานข้อมูลพันธุกรรมสากล GenBank ไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นหมูป่า (*Sus scrofa scrofa*) หรือหมูบ้าน (*Sus scrofa domesticus*) จะนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างดังกล่าวมาทำการเปรียบเทียบ (Multiple sequence alignment) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซโตโครม บี ที่นำมาจากฐานข้อมูลพันธุกรรมสัตว์ป่าของกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของหมูป่า (*Sus scrofa scrofa*) จำนวน 5 sequences (รหัส Wild boar 12, 14, 15, 16 และ 19) และหมูบ้านจำนวน 6 sequences (รหัส Domestic pig 02, 04, 06, 07, 10 และ 11) และสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี ML โดยใช้โปรแกรม MEGA v.6.0 ตามวิธีที่ได้กล่าวข้างต้น โดยใช้ *Rusa unicolor* (MF177005) เป็นตัวอย่างนอกกลุ่ม (Outgroup)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี