



ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

และการประยุกต์ใช้ (บาร์-เอชอาร์เอ็ม)

DNA AND ITS APPLICATION (BAR-HRM)

มัสนิน โสภณบัณฑิตกุล

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

และการประยุกต์ใช้ (บาร์-เอชอาร์เอ็ม)

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

และการประยุกต์ใช้ (บาร์-เอชอาร์เอ็ม)

มัสนิน โอสถำนันต์กุล

 **สำนักพิมพ์**
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2563

160.-

มัสลิน โอสถานันต์กุล

ดิเอ็นเอบาร์โค้ดและการประยุกต์ใช้ (บาร์-เอชอาร์เอ็ม) / มัสลิน โอสถานันต์กุล

1. ลายพิมพ์ดิเอ็นเอ. 2. การพิสูจน์เอกลักษณ์.

572.8633

ISBN 978-974-03-3989-2

สพจ. 2472



asskunคำวิชาการสู่สังคม

Knowledge to All

www.cupress.chula.ac.th

สิทธิในการผลิตและพิมพ์หนังสือเล่มนี้เป็นของสำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยแต่ผู้เดียว

การผลิตและการลอกเลียนหนังสือเล่มนี้ไม่ว่ารูปแบบใดทั้งสิ้น

ต้องได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากสำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จัดพิมพ์โดย สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ครั้งที่ 1 จำนวน 1,000 เล่ม พ.ศ. 2563

ผู้จัดทำนาย ศูนย์หนังสือจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

สาขา

ศาลาพระเกี้ยว โทร. 0-2218-7000-3 โทรสาร 0-2255-4441

สยามสแควร์ โทร. 0-2218-9881-2 โทรสาร 0-2254-9495

ม.นเรศวร จ.พิษณุโลก โทร. 0-5526-0162-4 โทรสาร 0-5526-0165

ม.เทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา โทร. 0-4421-6131-4 โทรสาร 0-4421-6135

ม.บูรพา จ.ชลบุรี โทร. 0-3839-4855-9 โทรสาร 0-3839-3239

โรงเรียนนายร้อย จปร. จ.นครนายก โทร. 0-3739-3023 โทรสาร 0-3739-3023

ม.พะเยา จ.พะเยา โทร. 0-5446-6799-800 โทรสาร 0-5446-6798

จัตุรัสจามจุรี (CHAMCHURI SQUARE) ชั้น 4 โทร. 0-2160-5301-2 โทรสาร 0-2160-5304

หัวหมาก โทร. 0-2374-1378 โทรสาร 0-2374-1377

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี จ.นครราชสีมา โทร. 0-4492-2662-3

โทรสาร 0-4492-2664

Call Center (จัดส่งทั่วประเทศ) โทร. 0-2255-4433 <http://www.chulabook.com>

และเครือข่ายฯ

ร้านค้าติดต่อ แผนกขายส่ง สาขาหัวหมาก โทร. 0-2374-1375-6 โทรสาร 0-2374-1375

กองบรรณาธิการ : ลักษมณ รัชตะวณิชย์

ออกแบบปกและรูปเล่ม : สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ที่ : สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย [CUB6302-020] โทร. 0-2218-3562-3

โทรสาร 0-2218-3547 www.cupress.chula.ac.th

คำนำ

ปัจจุบัน การนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดสั้น ๆ มาใช้ในการระบุชนิดสิ่งมีชีวิต หรือที่เรียกว่า “ดีเอ็นเอบาร์โค้ด” (DNA Barcode) เป็นที่ยอมรับและนิยมนำมาใช้ เริ่มต้นเมื่อปี พ.ศ. 2546 โดยคณะวิจัยจากประเทศแคนาดา เป็นกลุ่มแรกที่รายงานการพัฒนาตัวเทคนิคและตีพิมพ์ผลงานวิจัย โดยให้คำจำกัดความแบบง่าย ๆ ของเทคนิคว่า “ดีเอ็นเอบาร์โค้ด” (DNA Barcode) คือลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเฉพาะจากจีโนมของสิ่งมีชีวิต มีขนาดสั้น ๆ (ไม่เกิน 700 คู่เบส) ที่สามารถนำข้อมูลชิ้นส่วนดีเอ็นเอนี้มาใช้ระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยการเทียบเคียงกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีในคลัง หรือฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

หนังสือเล่มนี้ได้รวบรวมงานที่เกี่ยวข้องกับการใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ด รวมไปถึงรวบรวมวิธีการทดลองและขั้นตอนสำหรับสิ่งมีชีวิตกลุ่มต่าง ๆ ทั้งสัตว์ พืชและเห็ดรา และมีการแบ่งเนื้อหาออกเป็น 7 ส่วน โดยมีส่วนที่ 1 เป็นบทนำ เป็นการกล่าวนำให้เห็นภาพและความหมายของเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดตั้งาคืออะไร ? เอาไปใช้งานอะไรได้บ้าง ? และมีวิธีการทำอย่างไร ? ส่วนที่ 2-5 เกี่ยวกับจีโนมในออร์แกเนลล์ เป็นการกล่าวถึงจีโนมของออร์แกเนลล์สองชนิด ได้แก่ ไมโทคอนเดรียลจีโนม (Mitochondrial Genome) และคลอโรพลาสต์จีโนม (Chloroplast Genome) และมีเนื้อหากล่าวถึง

การนำเอาเอ็นที่พบในจีโนมทั้งสองไปประยุกต์ใช้ในการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด ส่วนที่ 6 เป็น โพรโทคอลในการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด โดยยึดตามโพรโทคอลของ Cold Spring Harbor Laboratory DNA Learning Center ซึ่งผู้เขียนมีความเห็นว่า สามารถทำตามได้ง่าย และส่วนที่ 7 ได้กล่าวถึงการประยุกต์ใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการศึกษาวิจัย ซึ่งผู้เขียน มุ่งเน้นไปที่การนำเอาดีเอ็นเอบาร์โค้ดไปใช้ร่วมกับการวิเคราะห์ไฮเรสโซลูชันเมลดิง ที่เรียกเป็น บาร์-เอชอาร์เอ็ม (Bar-HRM) พร้อมมีการยกตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มัสลิน ใสถำนันต์กุล

สารบัญ

หน้า

■■■■■ ส่วนที่ 1 บทนำ

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดคืออะไร ?	3
ดีเอ็นเอบาร์โค้ด	3
ดีเอ็นเอบาร์โค้ดมีขั้นตอนอย่างไร ? เอาไปใช้ทำอะไรได้ ?	5

■■■■■ ส่วนที่ 2 จีโนมในออร์แกนอลล์

ฐานข้อมูลออร์แกนอลล์จีโนม	15
ไมโทคอนเดรียจีโนม	17
ลักษณะเด่นของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ	17
ไมโทคอนเดรียอื่น	19
ไมโทคอนเดรียอื่นแบ่งเป็น 3 กลุ่มหลัก ๆ	20
ไมโทคอนเดรียจีโนมสัตว์	27
ไมโทคอนเดรียจีโนมพืช	31
ไมโทคอนเดรียจีโนมฟังไจ	34

■■■■■ ส่วนที่ 3 การใช้ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอในการทำบาร์โค้ด

การใช้ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอในการทำบาร์โค้ด	47
ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอบาร์โค้ดในสัตว์	48
ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอบาร์โค้ดในพืช	53
ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอบาร์โค้ดในฟังไจ	54

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

■■■■■■■■ ส่วนที่ 4 คลอโรพลาสต์จีโนม

คลอโรพลาสต์จีโนม	61
คุณลักษณะของคลอโรพลาสต์จีโนม	61
ยีนในคลอโรพลาสต์จีโนมที่เกี่ยวกับการถอดรหัส และการแปลรหัส	67
ยีนในคลอโรพลาสต์จีโนมที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์ด้วยแสง	71
ยีนในคลอโรพลาสต์จีโนมที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์สารชีวโมเลกุล	73

■■■■■■■■ ส่วนที่ 5 การใช้คลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอในการทำบาร์โค้ดในพืช

การใช้คลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอในการทำบาร์โค้ดในพืช	81
คลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในพืช	81
คลอโรพลาสต์ยีนที่ได้รับการแนะนำสำหรับการทำบาร์โค้ดพืช	84
สรุปการหาบาร์โค้ดสำหรับพืช	86

■■■■■■■■ ส่วนที่ 6 ไลบรารีคอลลในการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด

วิธีการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดอ้างอิงตาม Cold Spring Harbor Laboratory DNA Learning Center	93
การเก็บ การบันทึกข้อมูลรายละเอียด และการระบุชนิดตัวอย่าง	93
การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างพืช ฟังไจ และสัตว์	94
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยพีซีอาร์	97
การตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยการแยกด้วยสนามไฟฟ้า	101
การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศ	102

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
■■■■■■■ ส่วนที่ 7 การประยุกต์ใช้ร่วมกับการวิเคราะห์ไฮเรสโซลูชันแมสตั้ง	
การประยุกต์ใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ด	107
ภาพรวมของเทคโนโลยีแมสตั้ง	108
การวิเคราะห์ไฮเรสโซลูชันแมสตั้ง หรือเอชอาร์เอ็ม	110
สียานิน : สีที่เข้าจับกับดีเอ็นเอสายคู่	112
สีที่ใช้ในการทำเอชอาร์เอ็ม	113
ปฏิสัมพันธ์ระหว่างสีกับดีเอ็นเอ	115
สีที่เข้าจับแบบแทรกตัวที่ช่องว่างคู่เบสและสีที่เข้าเกาะที่ร่องขนาดเล็ก	116
เทคนิคผสมระหว่างดีเอ็นเอบาร์โค้ดกับการวิเคราะห์ไฮเรสโซลูชันแมสตั้ง	121
การใช้บาร์-เอชอาร์เอ็มในการระบุชนิดพืชสมุนไพร	123
ตัวอย่างงานวิจัยที่นำบาร์-เอชอาร์เอ็ม มาใช้เพื่อตรวจสอบสมุนไพร	124
บทสรุป	153
อภิธานศัพท์	163
ดัชนี	167

สารบัญภาพ

ภาพ 2.1	ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์แบบสมบูรณ์ของ ไมโทคอนเดรียจีโนม	16
ภาพ 3.1	ไมโทคอนเดรียจีโนมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม	50
ภาพ 3.2	โครงสร้างทุติยภูมิของ COI บาร์โค้ด	52
ภาพ 3.3	ตำแหน่งของชิ้นส่วนโปรตีนที่สังเคราะห์มาจาก ยีน COI ส่วนที่ใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ด	53
ภาพ 7.1	กลุ่มของ fluorescent dye	120

สารบัญตาราง

ตาราง 2.1	แสดงชื่อยีนและโปรตีนที่พบใน ไมโทคอนเดรียจีโนมของสัตว์	30
ตาราง 4.1	แสดงยีนที่พบในคลอโรพลาสต์จีโนมที่มีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว	66
ตาราง 6.1	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในแต่ละกลุ่มสิ่งมีชีวิต	98
ตาราง 6.2	สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม PCR master mix	99
ตาราง 6.3	แสดงโปรแกรม PCR thermal cycling	100
ตาราง 7.1	ตัวอย่างสมุนไพรรในท้องตลาดที่นำมาสู่มตรวจด้วยเทคนิค Bar-HRM	137

บทนำ



ส่วนที่

1

- ดีเอ็นเอบาร์โค้ดคืออะไร ?
- ดีเอ็นเอบาร์โค้ดคืออะไร
- ดีเอ็นเอบาร์โค้ดมีขั้นตอนอย่างไร ?
- เอาไปใช้ทำอะไรได้ ?

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดดิ้ง (DNA Barcoding) คืออะไร ?

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดดิ้ง (DNA Barcoding) คือเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการระบุชนิดสิ่งมีชีวิตได้อย่างรวดเร็ว โดยอาศัยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาจากสิ่งมีชีวิตที่สนใจเปรียบเทียบกับของที่ปรากฏในฐานข้อมูล ในปัจจุบันเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดได้ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายและตอบโจทย์ในกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่หลากหลายมากขึ้น ด้วยเหตุนี้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดดิ้งจึงจัดเป็นเครื่องมืออันทรงประสิทธิภาพในการช่วยระบุชนิดสิ่งมีชีวิต ที่สามารถช่วยระบุสิ่งมีชีวิตได้ในทุกระยะการเจริญเติบโต เช่น ระยะตัวอ่อนแมลง ต้นกล้าพืช หรือสัตว์ที่ยังไม่โตเต็มวัย นอกจากนี้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดยังสามารถใช้เป็นเทคนิคในงานวิจัยเพื่อตอบคำถามทั้งทางด้านนิเวศวิทยาและวิวัฒนาการ เช่น การศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของพืชชนิดต่าง ๆ

กระบวนการพื้นฐานของเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดประกอบไปด้วยขั้นตอน 2 ส่วน คือ (1) การสร้างหรือรวบรวมฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของสิ่งมีชีวิตที่ทราบชนิดแน่นอนแล้ว และ (2) การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการจะทราบชนิดเข้ากับฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ด

แม้ว่าเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด เพิ่งจะถูกนำมาใช้ได้ไม่นาน แต่จำนวนข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่มีอยู่ในฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของสิ่งมีชีวิตมีอยู่ในปริมาณที่มากจนทำให้มีการนำเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดไปประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวาง

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดดิ้ง

โดยทั่วไปปัญหาทางด้านอนุกรมวิธานที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาทางอณูพันธุศาสตร์ นิเวศวิทยา ความหลากหลายทางชีวภาพหรือศาสตร์อื่น ๆ มักเกี่ยวข้องกับความยากลำบากในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการจะศึกษาได้อย่างถูกต้องแม่นยำ ซึ่งปัญหานี้

เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้นักวิทยาศาสตร์พยายามพัฒนาวิธีการใหม่ ๆ มาช่วยในการระบุชนิดสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยลำดับพันธุกรรมของดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ มาใช้เป็นพื้นฐาน “ดีเอ็นเอบาร์โค้ดดิ้ง” (DNA barcoding) จึงเป็นการนำข้อมูลดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเฉพาะในรูปลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาดประมาณ 400-700 คู่เบสมาใช้เปรียบเทียบ ซึ่งโดยหลักการชิ้นส่วนดีเอ็นเอนี้พบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด แต่ก็มี ความแปรผันในรูปแบบที่เฉพาะแตกต่างกันไป และด้วยความก้าวหน้าทางด้านอณูพันธุศาสตร์ (molecular genetics) เทคนิคการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) และชีวสารสนเทศศาสตร์ (bioinformatics) ทำให้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดทำได้รวดเร็วและแม่นยำมากขึ้น ซึ่งนอกจากการใช้อย่างที่กล่าวมาในการระบุชนิดสิ่งมีชีวิตแล้ว เทคนิคนี้ยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการช่วยค้นพบสิ่งมีชีวิตชนิดใหม่ ๆ ได้อีกด้วย

ในปี พ.ศ. 2546 (ค.ศ. 2003) Paul Hebert และคณะ เป็นนักวิทยาศาสตร์กลุ่มแรกที่นำเอาดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาใช้ในการระบุชนิดสิ่งมีชีวิต โดยได้วางเป้าหมายในการนำดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาช่วยระบุชนิดสิ่งมีชีวิตครอบคลุมหลากหลายกลุ่ม ไม่ว่าจะเป็นพืช สัตว์ ฟังไจ โดยเทคนิคในการระบุชนิดสัตว์ได้รับการพัฒนาขึ้นมาก่อน ขณะที่เทคนิคที่ใช้ในพืชนั้นช่วงแรกกลุ่มผู้ทำวิจัยที่ศึกษาทางพืชยังไม่ยอมรับวิธีการดีเอ็นเอบาร์โค้ด จนกระทั่งผ่านไป 6 ปี หลังจากที่ Hebert ได้ตีพิมพ์ผลงานวิจัยดีเอ็นเอบาร์โค้ดดิ้งในสัตว์ กลุ่มผู้ทำวิจัยที่ศึกษาในพืชจึงเริ่มให้ความสนใจ และยอมรับกับแนวคิดนี้ที่จะใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาใช้ในการระบุชนิดพืช ซึ่งหลังจากเริ่มมีการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดดิ้งในพืช ก็พบว่าบาร์โค้ดดิ้งในพืชเป็นเรื่องที่ซับซ้อนกว่าในสัตว์ ซึ่งต่อมาคณะวิจัยหลายกลุ่มจึงได้แนะนำตำแหน่งดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่เหมาะสมสำหรับใช้กับพืชซึ่งมีอยู่หลายตำแหน่ง เช่น ตำแหน่งบนคลอโรพลาสต์จีโนม (*rbcL*, *matK* และ *trnH-psbA*) ปัจจุบันเริ่มมีงานวิจัยดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่มุ่งเน้นไปในแต่ละกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่หลากหลายมากขึ้นไม่ว่าจะเป็นสัตว์ เช่น นก ปลา แมงมุม ผีเสื้อพวก Lepidoptera

แมลงหนอนปลอกน้ำพวก Trichoptera สำหรับ ฟังใจ และแบคทีเรีย ความซับซ้อนของการใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการระบุชนิดพืชนั้นจะกล่าวถึงในบทต่อไป

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดถึงมีขั้นตอนอย่างไร ? เอาไปใช้ทำอะไรได้ ?

ขั้นตอนการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดดังนั้นจะประกอบไปด้วย 2 ขั้นตอนหลัก คือ (1) การสร้างฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของสิ่งมีชีวิตที่ทราบชนิด และ (2) การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการจะทราบชนิดเข้ากับฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อใช้ในการระบุชนิดสิ่งมีชีวิตที่ต้องการทราบ

ขั้นตอนแรก การสร้างฐานข้อมูล เป็นขั้นตอนที่จำเป็นต้องมีนักอนุกรมวิธานผู้เชี่ยวชาญมาช่วยในการยืนยัน และระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตให้ถูกต้อง แนวทางปฏิบัติที่ดีคือการสร้างฐานข้อมูลจากตัวอย่างที่ทราบชนิดที่แน่นอนมาก่อนแล้วจากตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์ (museum) หรือหอพรรณไม้ (herbarium) ซึ่งมีเลขอ้างอิงประจำตัวตัวอย่าง หรือหมายเลขทะเบียนตัวอย่างอย่างเป็นระบบ (voucher number) โดยทั่วไปการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างแห้งที่ได้จากพิพิธภัณฑ์หรือหอพรรณไม้ จะมีปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างเพียงพอ อย่างไรก็ตาม กรณีที่ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างแห้งมีจำนวนน้อยเกินไป สามารถใช้ตัวอย่างสดที่เพิ่งถูกเก็บมาได้ แต่ก็ควรนำตัวอย่างนั้น ๆ มาตรวจสอบและเก็บฝากไว้ในพิพิธภัณฑ์ หรือหอพรรณไม้ให้เป็นระบบต่อไป

หลังจากการจัดทำฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดแล้ว ในขั้นตอนถัดมาคือการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างที่เราต้องการทราบชนิด เพื่อนำมาเทียบกับฐานข้อมูล (database) การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จะใช้ตรรกะทางคณิตศาสตร์ในการจับคู่ (matching algorithm) ซึ่งก็มีอยู่หลายแบบ แต่หลักการขั้นพื้นฐานเพื่อให้ได้มาซึ่ง