19/0242/48

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ: หลักฐานทางพันธุกรรมในการพิสูจน์เอกลักษณ์สมุนไพร

*สุชาดา สุขหร่อง**

บทคัดย่อ

เป็นเรื่องปกติที่จะพบว่าสมุนไพรชนิดหนึ่งๆ มีชื่อเรียกได้หลายชื่อและสมุนไพรหลายชนิดกลับมีชื่อเดียวกัน ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องมีระบบการพิสูจน์เอกลักษณ์ที่เหมาะสมสำหรับพืช สำหรับสมุนไพร หรือแม้กระทั่งเครื่องยา การพิสูจน์เอกลักษณ์โดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้กลายเป็นทางเลือกอีกทางหนึ่ง นอกเหนือไปจากการสังเกตลักษณะรูปร่างภายนอก เพราะลายพิมพ์ดีเอ็นเอไม่เปลี่ยนแปลงตามระยะการเจริญเติบโตของพืชหรือตามสภาพสภาวะแวดล้อม วิธีนี้ดีเอ็นเอจะถูกนำมาวิเคราะห์เชิงโมเลกุล โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ไฮบริไดเซชั่น หรือเทคนิคการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ปัจจุบันได้เริ่มมีการนำลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาใช้เป็นวิธีหนึ่งในการรับรองมาตรฐานของสมุนไพรกันแล้ว โดยเฉพาะสมุนไพรที่หายากซึ่งมีราคาสูงในท้องตลาดหรือมีความเสี่ยงในการปนปลอมสมุนไพร

คำสำคัญ: ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ การพิสูจน์เอกลักษณ์ สมุนไพร เครื่องยา ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส

*ติดต่อได้ที่ ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พญาไท กรุงเทพ 10330
โทรศัพท์ 0 22188362 โทรสาร 0 2255 8227 อีเมล์: ssukr0@uky.edu, ssukrong@hotmail.com

DNA FINGERPRINTING: GENETIC EVIDENCE FOR IDENTIFICATION OF HERBAL DRUGS

*Suchada Sukrong**

Abstract

It is not uncommon to find that a given material has been called several different names and that several different herbal drugs share a name. It is essential to establish a properly identification system for plants, herbal drugs, or crude drugs. Since the identification based on genotype is not influenced by growth stage and environmental conditions of plants, it provides DNA fingerprint a promising alternative to conventional methods by phenotype. According to this technique, DNA was conducted using a molecular analysis based on polymerase chain reaction, hybridization or sequencing techniques. To this end, the DNA fingerprint has begun implementing standard for quality assurance of herbal drugs, particularly for those that are derived from endangered species, with high market value or intimated with adulterants.

Key words: DNA fingerprinting, identification, herbal drugs, crude drugs, polymerase chain reaction

*To whom correspondence should be addressed. Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Phayarhai, Bangkok, 10330, Thailand. Tel: 0 2218 8362, Fax: 0 2255 8227, E-mail address: ssukr0@uky.edu, ssukrong@hotmail.com

Original Article

บทนำ

ในแวดวงของผู้ที่เกี่ยวข้องกับสมุนไพรนั้น ไม่ว่าจะเป็นผู้ซื้อ ผู้ขาย ผู้ใช้ ปัญหาหนึ่งที่หลีกเลี่ยงไม่ได้ คือ จะมั่นใจได้อย่างไรว่าเป็นสมุนไพรชนิดที่เราต้องการจริง ๆ ถ้ามองกันแต่รูปลักษณ์ภายนอกนั้นอาจดูเหมือนกันมาก ต้องอาศัยประสาทสัมผัสอื่น ๆ เข้ามาช่วยพิสูจน์ เช่น ใช้การดมกลิ่น ลองชิมรสชาติ จับต้อง หรือแม้กระทั่งดูเนื้อเยื่อโดยใช้กล้องจุลทัศน์ส่องดู พร้อมทั้งใช้วิธีทางเคมีเช่น วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ตรวจหาสารสำคัญและใช้เทคนิคโครมาโตกราฟฟี แต่ในบางครั้ง แม้ใช้วิธีดังกล่าวแล้ว ก็ยังไม่สามารถยืนยันได้ว่าใช่สมุนไพรชนิดนั้น ๆหรือไม่ โชคดีที่วิทยาการทางชีวโมเลกุลก้าวหน้า มีการศึกษาลึกถึงระดับโมเลกุลภายในเซลล์ และพบว่ามีสารพันธุกรรมหรือที่เรียกว่าดีเอ็นเอบรรจุอยู่ภายในเซลล์ ดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีลักษณะเฉพาะตัว สามารถใช้สร้างเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอนี้เปรียบเหมือนกับลายพิมพ์นิ้วมือของแต่ละคนซึ่งจะแตกต่างกัน จึงสามารถใช้เป็นหลักฐานทางพันธุกรรมในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสมุนไพร การผนวกเอาความรู้ทางพันธุกรรมมาใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสมุนไพร จึงนับเป็นประโยชน์สูงสุด

ดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอ (DNA, Deoxyribonucleic acid) เป็นสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต สามารถจำลองตัวเองได้ ดีเอ็นเอทำหน้าที่เก็บรหัสข้อมูลของพ่อแม่และถ่ายทอดสู่รุ่นลูก ดังนั้นลูกจึงมีลักษณะของพ่อและแม่อยู่ในเซลล์ทุกเซลล์ โครงสร้างของดีเอ็นเอถูกค้นพบเมื่อปี พ.ศ. 2496 โดยนักวิทยาศาสตร์ชาวอเมริกันชื่อ เจมส์ วัตสัน (James Watson) และนักฟิสิกส์ชาวอังกฤษชื่อ ฟรานซิส คริก (Francis Crick)[1] ทั้งสองพบว่าดีเอ็นเอประกอบด้วยหน่วยย่อยหรือเบส 4 ชนิด ได้แก่ A (adenine) T (thymine) C (cytosine) และ G (guanine) เรียงต่อกันเป็นสายยาวยึดติดกันโดยมีแกนเป็นน้ำตาลดีออกซีไรโบส (deoxyribose) และฟอสเฟต (phosphate) สายยาวนี้เรียกว่าสายนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ดีเอ็นเอเป็นสายนิวคลีโอไทด์ 2 สาย จับกันเป็นเกลียวคู่โดยเบสต่าง ๆ การจับกันของเบสนั้นจะจับกันแบบเฉพาะเจาะจงโดยพันธะเคมี เบส A จะจับคู่กับเบส T และเบส C จะจับคู่กับเบส G ทำให้ดีเอ็นเอมีรูปร่างคล้ายบันไดเวียน (spiral) การเรียงตัวของเบส A T C และ G ที่ประกอบเป็นสายดีเอ็นเอมีความสำคัญมาก เพราะในที่สุดจะเป็นตัวกำหนดการแปลความหมายออกมาในรูปของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ[2] มีผู้ประมาณว่าถ้านำดีเอ็นเอทั้งหมดที่อยู่ในเซลล์ทุกเซลล์ของมนุษย์คนหนึ่ง ๆ มาคลี่เป็นสายยาว จะคิดเป็นระยะทางมากกว่า 700,000 กิโลเมตร ซึ่งเทียบเท่ากับระยะไป-กลับ โลก-ดวงจันทร์เลยทีเดียว[3]

ดีเอ็นเอของพืชนั้นกระจายอยู่ได้หลายแหล่งภายในเซลล์ ได้แก่ ในนิวเคลียส (nucleus) ไมโตคอนเดรีย (Mitochondria) และคลอโรพลาสต์ (chloroplast)[4] ดีเอ็นเอส่วนใหญ่ถูกบรรจุอยู่ในนิวเคลียส ถึงแม้ว่าไมโตคอนเดรียและคลอโรพลาสต์จะมีดีเอ็นเอเป็นของตัวเอง แต่การทำงานก็ยังต้องอาศัยดีเอ็นเอบางส่วนจากนิวเคลียสเข้าควบคุม นักพฤกษศาสตร์นิยมใช้ดีเอ็นเอใน

คลอโรพลาสต์ (chloroplast DNA) ในการจัดหมวดหมู่ (classification) และหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogeny) ของพืชชนิดต่าง ๆ[5]

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ คือรูปแบบของแถบชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกสร้างขึ้นและเป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัวของสิ่งมีชีวิตหนึ่ง ๆ[6] ลายพิมพ์ดีเอ็นเอมีได้หลายรูปแบบขึ้นกับเทคนิคที่ใช้ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอต้องสามารถสร้างซ้ำได้และต้องได้ลายพิมพ์เหมือนเดิมทุกครั้ง

ข้อดีของลายพิมพ์ดีเอ็นเอมีหลายอย่าง ได้แก่

1. มีความถูกต้องแม่นยำสูงในการพิสูจน์เอกลักษณ์พืช เช่น ใช้ตรวจสอบสมุนไพรในรูปผงว่าเป็นสมุนไพรอะไร มีสมุนไพรชนิดอื่นปนปลอมมาหรือไม่
2. สามารถทำได้กับส่วนต่าง ๆของพืช ที่อายุต่าง ๆกัน หรือแม้ในสภาวะแวดล้อมต่าง ๆกัน เพราะอายุและสภาวะแวดล้อมไม่มีผลกระทบต่อดีเอ็นเอ
3. ใช้ตัวอย่างในปริมาณน้อย ดีเอ็นเอที่สกัดได้ในปริมาณน้อยก็เพียงพอที่จะทำการวิเคราะห์ได้
4. ใช้ช่วยในการปรับปรุงพันธุ์พืช เช่น สามารถตรวจหาลักษณะที่ต้องการ (trait) บางอย่างโดยที่ไม่ต้องรอปลูกให้โต เช่น ตรวจการต้านทานโรค ต้านทานแมลง
5. ใช้แก้ปัญหาในการจัดหมวดหมู่พืช (taxonomy) โดยใช้ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของดีเอ็นเอเป็นหลัก
6. ใช้เป็นข้อมูลในการจดสิทธิบัตรรับรองพันธุ์พืช ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจะใช้อ้างอิงในการเปรียบเทียบว่าพันธุ์พืชที่จดสิทธิบัตรเป็นพันธุ์ที่พัฒนาใหม่จริง

ส่วนข้อด้อยของลายพิมพ์ดีเอ็นเอนั้น คงจะเป็นเรื่องของค่าใช้จ่าย ซึ่งมีราคาค่อนข้างแพง ลงทุนในครั้งแรกสูง แต่เมื่อคำนึงถึงข้อเด่นต่าง ๆดังกล่าวมาแล้ว ก็จะเห็นว่าการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอเก็บไว้เป็นข้อมูลนั้นเป็นสิ่งที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่ง

เทคนิคการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

เริ่มต้นด้วยการเก็บตัวอย่างพืชอาจเป็นพืชสดหรือพืชแห้งก็ได้ ถ้าเป็นพืชสดควรเลือกใบอ่อน ควรเก็บแยกต้น แยกแหล่งปลูกด้วยถ้าเป็นไปได้ ในกรณีที่เป็นสมุนไพร (herbal drug) หรือเครื่องยา (crude drug) อายุนานหลายปีก็ไม่เป็นปัญหา ตัวอย่างควรมีจำนวนมากพอสมควรที่จะเชื่อถือได้ ควรทำตัวอย่างพืช (herbarium specimen) เก็บไว้ยืนยันภายหลังในกรณีที่เกิดปัญหาในเรื่องการพิสูจน์เอกลักษณ์ จากนั้นจึงนำตัวอย่างมาสกัดดีเอ็นเอ แล้วจึงเลือกวิธีที่เหมาะสมในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอต่อไป

การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอสามารถแบ่งออกเป็นแบบต่าง ๆ ดังนี้

1. Polymerase chain reaction (PCR) - based methods

เป็นวิธีที่มีการใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส (polymerase chain reaction) ในขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งของการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอร่วมด้วย นักวิทยาศาสตร์ชาวอเมริกันชื่อ Kary Mullis ได้คิดค้น PCR เมื่อปี พ.ศ. 2527[7] หลักการของ PCR คือ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยตั้งต้นจากดีเอ็นเอต้นแบบ (template DNA) ในปริมาณเล็กน้อย สังเคราะห์ให้ได้ดีเอ็นเอสายใหม่ในปริมาณสูง โดยต้องอาศัยส่วนประกอบที่สำคัญ 3 ส่วนได้แก่ a) ไพร์เมอร์ (primers) ซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์สายสั้น ๆจับได้อย่างจำเพาะกับปลาย 3' ของดีเอ็นเอต้นแบบที่เป็นคู่ของมัน ไพร์เมอร์จะเป็นตัวกำหนดความยาวของสายดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณ b) เอนไซม์ DNA polymerase เป็นเอนไซม์ที่ช่วยในการนำเบสต่าง ๆมาต่อกันทำให้สายดีเอ็นเอยาวขึ้นและ c) นิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด คือ dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ซึ่งใช้สร้างดีเอ็นเอสายใหม่ นอกจากนี้ยังต้องมี เกลือ $MgCl_2$ และ บัฟเฟอร์ประกอบในปฏิกิริยาอีกด้วย การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิธีที่มีการใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรสร่วมด้วยนี้ สามารถแบ่งออกได้อีกเป็นหลายแบบได้แก่

1.1 RAPD (Rapid Amplified Polymorphic DNA)

วิธีนี้ใช้ปริมาณดีเอ็นเอน้อย และไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลทางพันธุกรรมมาก่อน ไพร์เมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรสนั้นจะเป็นชนิดที่มีขนาดสั้นประมาณ 10 นิวคลีโอไทด์ เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม (random amplification)[8] จากนั้นจึงแยกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอโดยใช้กระแสไฟฟ้า (electrophoresis) ผ่านอะกาโรสเจล (agarose gel) ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอจะปรากฏเป็นแถบ ศึกษาตำแหน่งและจำนวนแถบเพื่อดูความแตกต่างในพืชแต่ละชนิดได้ ข้อควรระวังของ RAPD คือ แถบดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณขึ้นจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส (PCR product bands) ที่เกิดขึ้นดูเหมือนมีขนาดเท่ากันแต่ความจริงแล้ว ถึงแม้ขนาดเท่ากันจริงแต่เป็นชิ้นดีเอ็นเอคนละชนิดกันเลย ทำให้แปลผลคลาดเคลื่อนได้ วิธีแก้ปัญหาคือเพิ่มจำนวนไพร์เมอร์ให้มากขึ้นเพื่อยืนยันผลการทดลอง หรือบางครั้ง PCR products ที่เกิดขึ้นมีปริมาณน้อยมากจนแถบดีเอ็นเอไม่ปรากฏให้เห็นหรือเห็นได้ลาง ๆ ทำให้ผู้ทดลองคิดว่าไม่มี PCR products เกิดขึ้น แก้ปัญหาโดยการปรับเปลี่ยนสภาพหรือความเข้มข้นของสารต่าง ๆในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส

1.2 PCR-RFLP (PCR - Restriction Fragment Length Polymorphism)

วิธีนี้เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายแบบเฉพาะเจาะจงโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส แล้วจึงใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ตัดดีเอ็นเอเป็นชิ้น ๆ พืชต่างชนิดกันจะมีตำแหน่งของการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบนสายดีเอ็นเอต่างกัน หรือบางชนิดอาจไม่มีตำแหน่ง

ให้ตัดเลย ทำให้เกิดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีขนาดไม่เท่ากัน[9] อ่านผลโดยการวิเคราะห์ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต่างกันหลังจากแยกดีเอ็นเอด้วยวิธี electrophoresis

1.3 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

วิธีนี้เป็นการใช้เทคนิค RFLP และ PCR เข้าด้วยกัน โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดดีเอ็นเอก่อนและเชื่อมต่อดีเอ็นเอด้วย adapter ที่เป็นนิวคลีโอไทด์สายสั้นไม่เกิน 20 เบส แล้วจึงเพิ่มปริมาณด้วย PCR โดยไพร์เมอร์จะจับเฉพาะเจาะจงกับ adapter นั้น ๆ ถือเป็นการเลือกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณ จากนั้นจึงแยกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอโดยใช้พอลิอะคลิลาไมด์เจล จะปรากฏชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป็นแถบ[10] ข้อควรระวังของ AFLP คือ แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจำนวนมากจากปฏิกิริยาครั้งหนึ่ง ๆ มีขนาดใกล้เคียงกัน บางครั้งแถบดีเอ็นเอที่เห็นว่ามีขนาดเท่ากันนั้น จริง ๆแล้วเป็นชิ้นดีเอ็นเอจำนวนมากในขนาดใกล้เคียงกัน ส่วนแถบดีเอ็นเอที่เห็นมีขนาดเท่ากันอาจมาจากการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอคนละตำแหน่งก็ได้

1.4 SSR (Simple Sequence Repeat; Minisatellites, Microsatellites)

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอแบบ SSR นี้ ถูกสร้างโดยอาศัยคุณสมบัติหนึ่งของดีเอ็นเอเองที่มีการซ้ำของเบสชุดสั้น ๆ (tandem repeat) กระจายอยู่ทั่วไปในจีโนม (genome) ถ้าเป็นการซ้ำของชุด 10-60 เบส เรียก minisatellites ถ้าเป็นการซ้ำของชุด 1-10 เบส เรียก microsatellites[11] ตัวอย่างของชุดซ้ำ SSR เช่น CACACACACACACACACA หรือ ACCTGA ACCTGA ACCTGA ACCTGA ACCTGA เราสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอช่วงนี้ได้โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส ซึ่งต้องใช้ไพร์เมอร์ที่จับกับช่วงซ้ำ ๆนี้ พืชที่มีจำนวนชุดซ้ำต่างกัน เช่นมีซ้ำ 10 หรือ 20 ชุด หลังจากผ่าน PCR แล้ว จะแสดงแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน

1.5 PCR based methods อื่น ๆ

ยังมีวิธีอื่น ๆอีกมากได้ถูกพัฒนาขึ้นและถูกปรับเปลี่ยนในรายละเอียดเล็ก ๆน้อย ๆ แล้วตั้งชื่อเรียกต่าง ๆกันไป ซึ่งล้วนแล้วแต่ใช้หลักการเดียวกันคือ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส ทั้งสิ้น ตัวอย่างเช่น ARMS (Amplification Refractory Mutation System)[12], DALP (Direct Amplification of Length Polymorphism)[13] และ SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)[13, 14]

2. Hybridization based methods

วิธีนี้ใช้หลักการ hybridization ในการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ได้แก่

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)[15]

RFLP เป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่บอกความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยทั่วไปแล้วในความหมายเดิมจะไม่มีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส (PCR) เข้ามาเกี่ยวข้อง แต่ในปัจจุบันจะมีการประยุกต์ใช้ PCR เข้าร่วมด้วย จึงพบคำว่า PCR-RFLP แต่ในที่นี้จะขอกล่าวถึง RFLP ในความหมายเดิม วิธีนี้มีเทคนิคดังนี้ หลังจากตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและแยกชิ้นดีเอ็นเอด้วยอิเล็กโตรโฟรีซีสแล้ว ต้องย้ายชิ้นดีเอ็นเอเหล่านั้นไปไว้บนแผ่นฟิลเตอร์ (filter membrane) แล้วนำมาจับ (hybridize) กับตัวตรวจจับ (probe) ที่ติดฉลากด้วยกัมมันตรังสีหรือสารเคมี probe อาจเป็นดีเอ็นเอที่สกัดมาจากพืชชนิดเดียวกับที่ต้องการตรวจโดยใช้ต้นใดต้นหนึ่ง หรือ probe อาจเป็นสายนิวคลีโอไทด์สังเคราะห์สั้น ๆก็ได้ เมื่อใช้เอนไซม์ชนิดหนึ่งตัดดีเอ็นเอของพืชชนิดหนึ่ง จะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดและจำนวนคงที่เสมอ ถ้าดีเอ็นเอของพืชต่างกันและมีลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงไป เมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน จะได้ขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างจากเดิม เรียกว่าเกิดพอลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) หรือ RFLP ขึ้น

3. Sequencing based methods

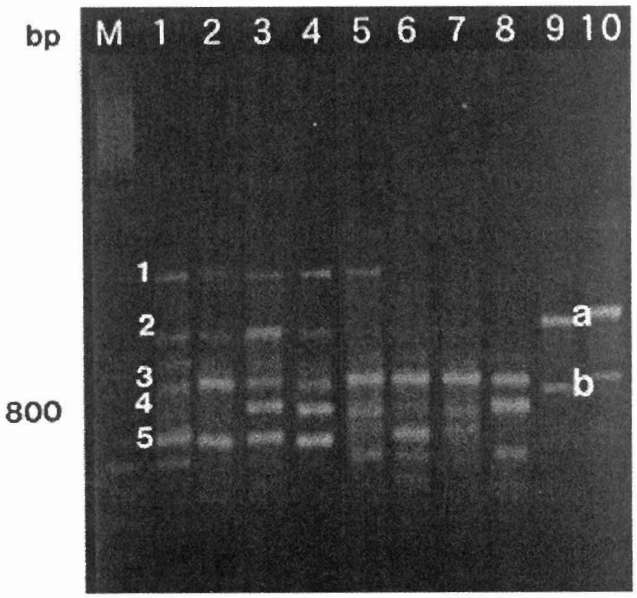
การทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยการหาลำดับเบสเป็นวิธีที่สามารถตรวจสอบความแตกต่างของพืชได้อย่างละเอียด สามารถทราบได้ถึงความแตกต่างของดีเอ็นเอที่อาจเป็นแบบ การแทนที่กันของเบส (substitution) การเพิ่มของเบส (insertion) หรือการขาดหายไปของเบส (deletion)โดยทั่วไปนิยมหาลำดับเบสในส่วน ITS (internal transcribed spaces) ของ 5S หรือ 18S-26S nuclear ribosomal DNA[16] และ chloroplast DNA โดยเฉพาะคลอโรพลาสต์ในส่วนของ *mat*K, *atp*B gene, *rbc*Lgene และในส่วนอื่น ๆ ด้วย[17] ข้อมูลที่ได้มักนำมาจัดทำเป็นสายความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต (phylogenetic tree) ซึ่งอาจจัดได้ว่าเป็นลายพิมพ์ชนิดหนึ่ง การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยการหาลำดับเบสนี้ใช้ทุนสูง เนื่องจากต้องใช้สารเคมีและเครื่องมือซึ่งมีราคาแพง แต่จะเกิดประโยชน์สูงด้วยถ้ามีการนำไปประยุกต์ใช้แก้ปัญหาที่เกิดขึ้นกับสมุนไพรต่าง ๆ

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ถูกสร้างขึ้นนั้นมีได้หลายรูปแบบขึ้นกับปัจจัยหลายชนิด รวมทั้งเครื่องมือและเทคนิคที่ใช้ก็เป็นปัจจัยหนึ่งในการกำหนดรูปแแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ การนำลายพิมพ์ไปใช้ก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งว่าจะใช้เพื่อการตรวจสอบหรือเพื่อเก็บเป็นข้อมูลเท่านั้น ถ้าเพื่อการตรวจสอบการปลอมปนของสมุนไพร ความละเอียดของลายพิมพ์ดีเอ็นเอต้องสูง ต้องมีความเฉพาะเจาะจงมากขึ้น ตัวอย่างหรือสมุนไพรเองก็เป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่งที่ต้องพิจารณา ว่ามีข้อมูลของสมุนไพรชนิดนั้น ๆ มาก่อนหรือไม่ แล้วจึงเริ่มทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากข้อมูลที่มีอยู่ เช่น เริ่มจากลายพิมพ์ RAPD ก่อน ต่อไปอาจขยายผลทำลายพิมพ์ที่มีความละเอียดมากขึ้น เช่น การหาลำดับเบสในที่สุด

ตัวอย่างการนำลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาใช้ประโยชน์

กรณีศึกษาที่ 1: การพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชในสกุล *Papaver*[18]

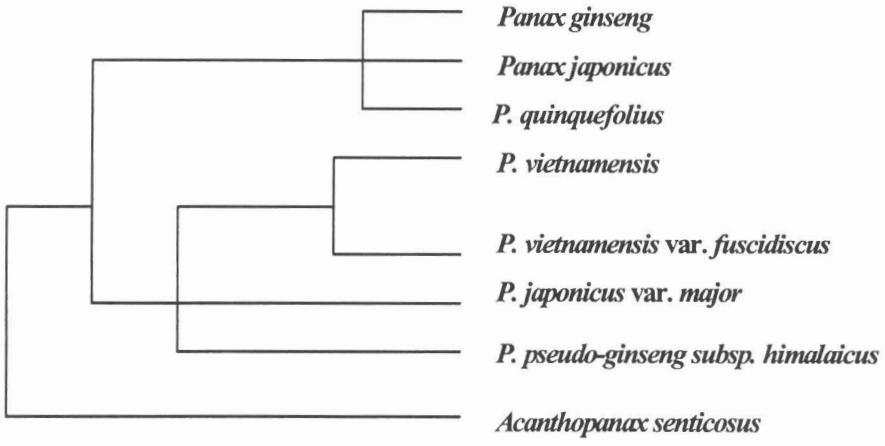
กลุ่มนักวิจัยชาวญี่ปุ่นโดย Shoyama Yukihiro และคณะ ได้ทำการศึกษาพืชในสกุล *Papaver* ซึ่งเป็นพืชในสกุลฝิ่นโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเข้ามาช่วยแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นในพืชกลุ่มนี้ ตามกฎหมายฝิ่นของประเทศญี่ปุ่น (The Opium Law) นั้น จัด *Papaver somniferum* L และ *P. setigerum* DC เป็นพืชเสพติดที่ห้ามปลูกเพราะสามารถนำไปสังเคราะห์เป็นสารเสพติด morphine ได้ ต่อมาเมื่อปี พ.ศ. 2533 ญี่ปุ่นได้จัดสาร thebaine เป็นสารเสพติดอีกชนิดหนึ่ง ทำให้ *P. bracteatum* ซึ่งมีสารชนิดนี้อยู่ ถูกจัดเป็นพืชเสพติดด้วย ดังนั้น *Papaver* ทั้งสาม species นี้เป็นพืชเสพติดทั้งหมด ปัญหาที่เกิดขึ้นคือ ยังมี *Papaver* spp. อีกกลุ่มหนึ่งที่ไม่จัดเป็นพืชเสพติดแต่จัดเป็นไม้ดอกไม้ประดับเพราะมีดอกอันสวยงามและไม่สร้างสารเสพติด ได้แก่ *P. orientale, P. pseudo-orientale* และ พันธุ์ผสม (hybrids) ของมัน แต่การแยกชนิดของพืชเหล่านี้ว่าเป็นพืชเสพติดหรือไม่เป็น ทำได้ลำบากเนื่องจากมีลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ใกล้เคียงกันมาก จึงทำให้มีการแอบปลูก *P. bracteatum* โดยอ้างว่าเป็น hybrids ของ *P. orientale* นักวิจัยกลุ่มนี้จึงประยุกต์ใช้เทคนิค RFLP และ RAPD เข้ามาช่วยในการพิสูจน์เอกลักษณ์ว่าเป็น *Papaver* ชนิดใด (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 ภาพถ่ายลายพิมพ์ดีเอ็นเอชนิด RAPD ของ *Papaver* spp. Lane 1: *P. pseudo-orientale*, Lane 2-7: F1 Hybrids, Lane 8: *P. bracteatum*, Lane 9: *P. somniferum*, Lane 10: *P. setigerum*, Lane M: molecular marker

กรณีศึกษาที่ 2: การค้นพบสายพันธุ์ใหม่ของพืชในสกุล *Panax*[19]

ในปี พ.ศ. 2542 กลุ่มนักวิจัยชาวญี่ปุ่นโดย Katsuko Komatsu และคณะได้เก็บตัวอย่างของพืชในสกุล *Panax* ทางตอนใต้ของมณฑลยูนาน ประเทศจีน พืชชนิดนี้คล้ายกับ *Panax japonicus* C.A. Mey มาก ซึ่ง *Panax japonicus* นี้มีหลาย variety และไม่ทราบว่า ตัวอย่างพืชนี้เป็น variety ใด แต่จากรายงานโดยนักวิจัยชาวจีนสองคณะคือ Zhou, J.[20] และ Wu, C.Y.[21] พบว่าบริเวณที่สำรวจจะพบเพียงแต่ *P. japonicus* var. *japonicus* และ *P. japonicus* var. *angustifoius* (Burk.) Cheng & Chu เท่านั้น จึงได้นำตัวอย่างมาศึกษาการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequences) ของ 18S rRNA gene และ chloroplast *mat*K gene และเมื่อนำข้อมูลลำดับเบสมาสร้าง phylogenetic tree แล้ว (รูปที่ 2) พบว่า ตัวอย่างที่เก็บได้มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมต่างกันกับ *P. japonicus* C.A. Mey แต่กลับไปใกล้เคียงกับ *Panax* ชนิดหนึ่งคือ *P. vietnamensis* Ha & Grushv. ดังนั้นจึงกำหนดให้ *Panax* ชนิดนี้ เป็นสายพันธุ์ชนิดใหม่มีชื่อว่า *P. vietnamensis* Ha & Grushv. var. *fuscidicus* K.Komatsu, S. Zhu & S.Q. Cai ตามชื่อผู้ค้นพบ



รูปที่ 2 Phylogenetic tree ของ *Panax* spp. สร้างขึ้นจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ในส่วนของ 18S rRNA gene และ chloroplast *mat*K gene โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ PAUP (Version 4.0b6a, Sinauer Assoc. Inc, U.S.A.)

สรุป

จนมาถึงวันนี้ ความก้าวหน้าของเทคโนโลยีทางชีวโมเลกุล โดยเฉพาะดีเอ็นเอ ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆโดยเฉพาะการพิสูจน์เอกลักษณ์พืชสมุนไพร ได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ และรวดเร็ว อันเป็นส่วนหนึ่งของการควบคุมคุณภาพสมุนไพรและผลิตภัณฑ์จากสมุนไพร และเพื่อส่งเสริมการพัฒนาเป็นพืชเศรษฐกิจเพื่อการส่งออกของประเทศไทยต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Raven PH., Evert RF., and Eichhorn SE. 1999. Biology of Plants. W.H. Freeman and Company. New York U.S.A. p 197.
2. Griffiths A., Gelbart W., Miller J. and Lewontin R. 1999. Modern Genetic Analysis. W.H. Freeman and Company. New York, U.S.A. p 26-27.
3. Brookes M. 2003. Get a Grip on Genetics. Barns & Noble Books, New York. U.S.A. p 13.
4. Borsch T., Hilu KW., Quandt D., Wilde V., Neinhuis C., and Barthlott W. 2003. Noncoding plastid *trnT-trnF* sequences reveal a well resolved phylogeny of basal angiosperms. J Evol Biol 16: 558-576.
5. Gielly L. and Taberlet P. 1994. The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: noncoding versus *rbcl* sequences. Mol Biol Evol 11: 769-777.
6. Tzuri G., Hillel J., Haberfeld A., and Vainstein A. 1991. DNA fingerprint analysis of ornamental plants. Plant Sciences 76 (199): 91-97.
7. Lehninger AL., Nelson DL. and Cox M. 1993. Principles of Biochemistry. 2nd edition. Worth Publishers. New York, U.S.A. p 999.
8. Gavidia I., Castillo Agudo L., and Perez-Bermudez P., 1996. Selection and long-term cultures of high-yielding *Digitalis obscura* plants: RAPD markers for analysis of genetic stability. 121: 197-205.
9. Sukrong S. 2004. Characterization of stress tolerance in *Arabidopsis* by the isolation of mutants with improved performance under oxidative stress conditions. Ph.D. Dissertation, Univ. Kentucky.
10. Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Lee T., Horns M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., and Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23 (21): 4407-4414.
11. Sharma PC., Huttel B., Winter P., Kahl G., Gardner RC., and Weising K. 1995. The potential of microsatellites for hybridization and polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and related species. Electrophoresis 16 (9): 1755-61.
12. Sasaki Y., Fushimi H., Cao H., Cai S., and Komatsu K. 2002. Sequence Analysis of Chinese and Japanese *Curcuma* Drugs on the 18S rRNA Gene and *trnK* Gene and the Application of Amplification-Refractory Mutation System for Their Authentication. Biol Pharm Bull 25: 1593-1599.

13. Shaw PC., Wang J., and But P P-H. 2002. Authentication of Chinese Medicinal Materials by DNA Technology. World Scientific Publishing Co., Pte. Ltd. Singapore. p 10-11.

14. Kong P., Hong C., Richardson PA., and Gallegly ME. 2003. Single-strand-conformation polymorphism of ribosomal DNA for rapid species differentiation in genus *Phytophthora*. Fungal Gen Biol 39: 238-249.

15. สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2539. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. ภาควิชาพันธุศาสตร์. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพ. หน้า 233-234.

16. Baldwin BG. 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae. Mol Phylogenet Evol 1: 13-16.

17. Olmstead R., and Palmer J. 1994. Chloroplast DNA systematics: A review of methods and data analysis. Am J Bot 81: 1205-1224.

18. Shoyama Y., Kawachi F., Tanaka H., Nakai R., Shibata T., and Nishi K. 1998. Genetic and alkaloids of *Papaver* species and their hybrid by RAPD, HPLC and ELISA. Forensic Sci Inter 91: 207-217.

19. Zhu S., Fushimi H., Cai S., Chen H., and Komatsu K. 2003. A New Variety of the Genus *Panax* from Southern Yunnan, China and Its Nucleotide Sequences of 18S Ribosomal RNA Gene and *mat*K Gene. J Jpn Bot 78: 86-94.

20. Zhou J., Huang WG., Wu MZ.,Yang CR., Feng GM., and Wu CY. 1975. Triterpenoids from *Panax* Linn. and their relationship with taxonomy and geographical distribution. Acta Phytotax Sin 13: 29-45.

21. Wu CY., Feng KM., and Li YR. 1979. Kunming Institute of Botany, the Chinese Academy of Science, ed. Flora Yunnanica Tomus 2: 509-515.