การใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อควบคุมคุณภาพสมุนไพร

เรือนแก้ว ประพฤติ
นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการพิเศษ
สถาบันบริการตรวจสอบคุณภาพ
และมาตรฐานผลิตภัณฑ์
มหาวิทยาลัยแม่โจ้

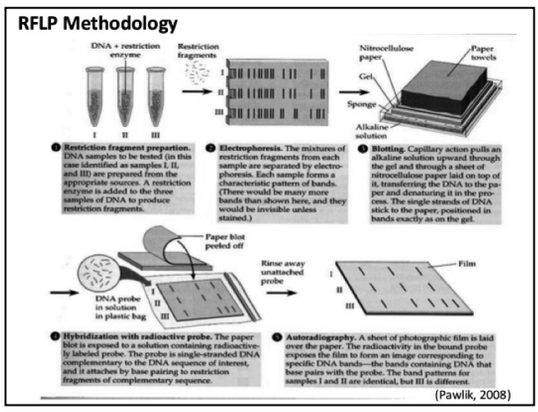
สรรพคุณของพืชสมุนไพรเป็นที่ยอมรับมาตั้งแต่ครั้งอดีตกาล ปัจจุบันมีรายงานการศึกษาวิจัยฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรด้วยวิธีทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ซึ่งได้แสดงข้อบ่งชี้ถึงสรรพคุณของสมุนไพร อย่างไรก็ตามผู้บริโภคยังมีความกังวลใจในเรื่องความปลอดภัยและมาตรฐานการผลิต เนื่องจากพืชสมุนไพรมีความแตกต่างหลากหลายของสายพันธุ์ บางสายพันธุ์มีลักษณะสัณฐานใกล้เคียงกันมากแต่มีสรรพคุณหรือปริมาณสารสำคัญต่างกันและอาจเกิดอันตรายขึ้นได้หากใช้สมุนไพรผิดชนิดเช่น ชนิดที่เป็นพิษซึ่งมีสาเหตุจากความสับสนในการแยกชนิดหรือสายพันธุ์ ดังนั้นหากสามารถยืนยันความถูกต้องของสายพันธุ์ได้จะช่วยให้การควบคุมคุณภาพในกระบวนการผลิตมีประสิทธิภาพ สร้างความน่าเชื่อถือและลดข้อกังวลใจของผู้บริโภคได้ บทความนี้จะกล่าวถึงเทคนิคทางชีวโมเลกุลที่นำมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อใช้ยืนยันเอกลักษณ์พืชสมุนไพร อันจะนำไปสู่การยกระดับมาตรฐานสมุนไพรไทยต่อไป

ดีเอ็นเอ หรือ กรดดีออกซีไรโบนิวคลิอิค (DNA; Deoxyribonucleic acid) เป็นสารพันธุกรรมที่พบมากในนิวเคลียส มีหน่วยย่อยเรียกว่านิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ประกอบด้วย น้ำตาลดีออกซีไรโบส หมู่ฟอตเฟสและไนโตรจีนัสเบส 4 ชนิด ได้แก่ อะดีนีน (Adenine, A), ไทมีน (Thymine, T), ไซโตซีน (Cytosine, C) และ กัวนีน (Guanine, G) โครงสร้างโมเลกุลเป็นสายคู่จับกันในทิศทางตรงข้าม ลักษณะเป็นเกลียวคู่คล้ายบันไดวน (double helix) โดยเบส A จับกับ T ด้วยพันธะไฮโดรเจนแบบพันธะคู่และเบส C จับกับ G แบบสามพันธะ ลำดับการเรียงตัวของเบสในสายดีเอ็นเอจะถูกใช้เป็นรหัสสำหรับแปลข้อมูลเพื่อควบคุมลักษณะทางจีโนไทป์และฟีโนไทป์ การแปรรหัสจากลำดับเบสนี้อาจเปรียบได้กับการนำตัวอักษรแต่ละตัวมาเรียงต่อกันอย่างถูกต้องก็จะเกิดเป็นคำและประโยคที่สมบูรณ์นั่นเอง

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ คือ แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากรหัสเบสบนสายดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตหรือพืชที่ศึกษา เนื่องจากพืชแต่ละชนิดแต่ละสายพันธุ์มีการเรียงตัวลำดับเบสไม่ซ้ำแบบกันและมีเอกลักษณ์เฉพาะคล้ายกับรหัสบาร์โค้ดของสินค้า ดังนั้นเราจึงใช้คุณสมบัตินี้มาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อเป็นเครื่องมือสำหรับระบุชนิดของพืช วิธีการทำสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ใช้กันแพร่หลายมี 3 วิธีได้แก่

1. วิธี Hybridization Based Method

วิธีนี้ใช้นิวคลีโอไทด์เบสสายสั้นๆเรียกว่าตัวตรวจสอบ (probe) ที่ติดฉลากด้วยสารรังสี ตัวตรวจสอบนี้สามารถจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายตรงบริเวณที่มีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกัน (complementary) เมื่อถูกกระตุ้นด้วยรังสี ชิ้นดีเอ็นเอที่มีตัวตรวจสอบจับอยู่จะเปลี่ยนเป็นแถบสีดำบนฟิล์มเอกเรย์ เทคนิคการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ใช้หลักการนี้ ได้แก่ RFLP (Restriction Fragment Lemght Polymorphisms) มีขั้นตอนพอสังเขปดังนี้ สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างพืชให้ได้สารละลายดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์ จากนั้นตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) สายดีเอ็นเอถูกตัดออกเป็นชิ้นๆ มีขนาดแตกต่างกันแยกแถบดีเอ็นเอในแผ่นวุ้นด้วยเทคนิคเจลอิเลคโตรโฟริซีส ย้ายแถบดีเอ็นเอจากแผ่นเจลลงสู่แผ่นเมมเบรน ดีเอ็นเอสายคู่ซึ่งติดอยู่บนแผ่นเมมเบรนเมื่อนำไปแช่ในสายละลายด่างจะแยกเป็นสายเดี่ยวและสามารถจับคู่กับชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย (hybridization) นำแผ่นเมมเบรนไปประกบกับฟิล์มเอกเรย์แล้วกระตุ้นด้วยรังสีเอกเรย์จะปรากฏเป็นแถบสีดำ ขั้นตอนวิธีทำดังแสดงในภาพที่ 1

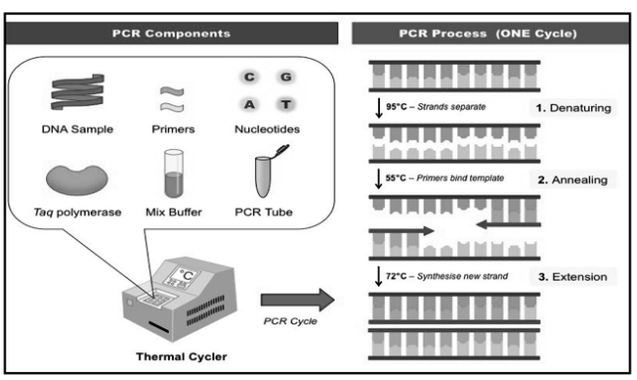


ภาพที่ 1 ขั้นตอนการทำเทคนิค RFLP
ที่มา : http://www.slideshare.net/FAOoftheUN/application-of-genetic-analyzer-in-aflp -technique-55686801

เทคนิค RFLP มีข้อจำกัดคือความไวของวิธีทดสอบค่อนข้างต่ำ (low sensitivity) ใช้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพและปริมาณสูง ซึ่งค่อนข้างทำได้ยากกับตัวอย่างสมุนไพรที่ผ่านการแปรรูปนอกจากนี้แล้วเทคนิคนี้ยังให้ผลการทำซ้ำไม่คงที่ (low reproducibility) เนื่องจากผลทดสอบขึ้นอยู่กับคุณภาพของดีเอ็นเอและทักษะความชำนาญของผู้ปฏิบัติการทดสอบ

2. วิธี PCR Based Method

PCR หรือ Polymerase Chain Reaction เป็นเทคนิคการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอโดยอาศัยปฏิกิริยาแบบลูกโซ่ซึ่งเกิดขึ้นในหลอดทดลองต้องใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR thermal cycler) โดยใช้ดีเอ็นเอของตัวอย่างเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ ดีเอ็นเอชุดใหม่ที่ถูกจำลองขึ้นนั้นจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์เบสเหมือนดีเอ็นเอแม่แบบทุกประการ ยีนหรือบริเวณที่จะที่ถูกเพิ่มปริมาณนั้นขึ้นอยู่กับลำดับเบสของไพรเมอร์ ไพรเมอร์ที่นิยมใช้มี 2 ชนิดคือ ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสแบบสุ่ม (random sequence primer) และไพรเมอร์แบบจำเพาะ (specific primer) วิธี PCR bases method มีขั้นตอนพอสังเขปดังนี้ เตรียมสารเคมีสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ ซึ่งมีองค์ประกอบหลักๆ ได้แก่ ดีเอ็นเอแม่แบบซึ่งสกัดจากสมุนไพรที่ต้องการศึกษา, ไพรเมอร์, เอนไซม์ Taq DNA polymerase, dNTPs, นำมาทำปฏิกิริยาในหลอดทดลองและเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม มีขั้นตอนการทำงาน 3 ขั้นตอนคือ 1) denaturation ดีเอ็นเอแม่แบบถูกทำให้เป็นสายเดี่ยวที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 2) annealing เป็นการลดอุณหภูมิลงให้อยู่ในช่วง 35-60 องศาเซลเซียส เพื่อให้ไพรเมอร์สามารถจับกับดีเอ็นเอแม่แบบ 3) extension เอนไซม์ Taq DNA polymerase ทำหน้าที่นำนิวคลีโอไทด์เบสแต่ละชนิดมาต่อกับปลาย 3’ ของไพรเมอร์ ได้เป็นดีเอ็นเอสายใหม่ซึ่งมีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอแม่แบบทุกประการ เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปจนครบทั้ง 3 ขั้นตอน เรียกว่า 1 รอบของปฏิกิริยา จำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอชุดใหม่ที่เกิดขึ้นมีการจำลองตัวแบบทวีคูณ (exponential) หรือจำนวนเท่ากับ 2n เมื่อ n เป็นจำนวนรอบของการเกิดปฏิกิริยา โดยทั่วไปจะใช้จำนวนรอบของปฏิกิริยาประมาณ 35-45 รอบ สามารถเพิ่มสำเนาของชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้หลายล้านสำเนา เทคนิคการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธีการนี้ ได้แก่

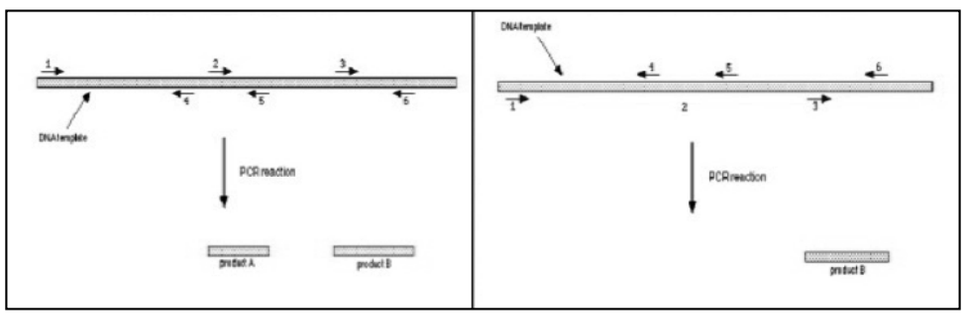


ภาพที่ 2 ขั้นตอนของปฏิกิริยาพีซีอาร์
ที่มา : http://www.slideshare.net/FAOoftheUN/application-of-genetic-analyzer-in-aflp-technique-55686801

2.1 เทคนิค Rapid Amplified Polymorphism DNA (RAPD)

เทคนิคนี้อาศัยหลักการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาแบบลูกโซ่เหมาะกับพืชที่ยังไม่ทราบข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรม ไม่จำเป็นต้องใช้ข้อมูลลำดับเบสเพื่อออกแบบไพรเมอร์ สามารถใช้ไพรเมอร์ที่มีนิวคลีโอไทด์แบบสุ่มจำนวนตั้งแต่ 5-10 เบส การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จะเกิดได้ก็ต่อเมื่อไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอแม่แบบในตำแหน่งและทิศทางที่เหมาะสมเท่านั้น จำนวนชิ้นดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้นอยู่กับตำแหน่งที่ไพรเมอร์สามารถจับกับดีเอ็นเอแม่แบบ พืชต่างชนิดกันจะมีลำดับเบสไม่เหมือนกันจึงทำให้ตำแหน่งที่ไพรเมอร์จับมีความแตกต่างกันเป็นผลให้ได้รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่แสดงเอกลักษณ์เฉพาะ

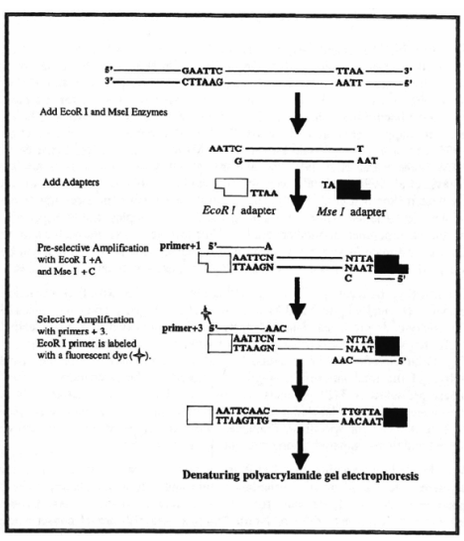
ข้อดีของเทคนิค RAPD คือสามารถเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอได้จำนวนมาก ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสเพื่อใช้ออกแบบไพรเมอร์ ไพรเมอร์แบบสุ่มสามารถใช้ได้กับพืชทุกชนิด ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบปริมาณน้อย ค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ไม่สูง ขั้นตอนไม่ยุ่งยากซับซ้อน แต่มีข้อด้อยคือความเสถียรของผลการทำซ้ำค่อนข้างต่ำ (low reproducibility)



ภาพที่ 3 ไพรเมอร์จับกับชิ้นดีเอ็นเอแม่แบบในตำแหน่งและทิศทางที่เหมาะสม
ที่มา : http://www.slideshare.net/SaramitaDeChakravart/molecular-markers-major-applications-in-insects

2.2 เทคนิค AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

เทคนิคนี้เริ่มจากการตัดดีเอ็นเอแม่แบบด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) แล้วนำชิ้นดีเอ็นเอนี้มาเชื่อมต่อเข้ากับชิ้นดีเอ็นเออีกชิ้นหนึ่งเรียกว่า adapter และใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดสำหรับเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ไพรเมอร์ชนิดแรกใช้เพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอเฉพาะชิ้นดีเอ็นเอที่เป็นเบสคู่สมกับ adaptor เท่านั้น เรียกขั้นตอนนี้ว่า preselective PCR จากนั้นจึงนำผลิตภัณฑ์จากขั้นตอน preselective มาเพิ่มปริมาณอีกครั้งในขั้นตอน selective PCR โดยใช้ไพรเมอร์ชนิดที่ 2 ซึ่งจะออกแบบโดยเพิ่มจำนวนเบสคัดเลือกเข้าไปที่ปลาย 3’ จำนวน 1-3 เบส การทำพีซีอาร์ครั้งที่สองนี้จำนวนชิ้นและขนาดของดีเอ็นเอที่เกิดจะขึ้นอยู่กับบริเวณที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์และบริเวณที่มีเบสคัดเลือกเท่านั้น จากภาพที่ 4 แสดงการตัดดีเอ็นเอแม่แบบด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoR I และ Mse I นำชิ้นดีเอ็นเอนี้มาเชื่อมกับชิ้นดีเอ็นเอ adapter แล้วทำปฏิกิริยา preselective PCR ด้วยไพรเมอร์ที่มีเบสคู่สมกับลำดับเบสของเอนไซม์ตัดจำเพาะใส่เบสคัดเลือกเข้าไปอีกหนึ่งเบสคือ A ส่วนไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสของเอนไซม์ Mse I เพิ่มเบสคัดเลือก C ในขั้นตอน pre selective PCR นี้ชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณจะมีเพียงชิ้นดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกับลำดับเบสของเอนไซม์และเบสคัดเลือกเท่านั้น ในขั้นตอน selective PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสคัดเลือกเข้าไปอีก 3 เบส ไพรเมอร์ที่ใช้หากไม่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงก็สามารถทำได้โดยย้อมเจลด้วย silver stain การเพิ่มจำนวนเบสคัดเลือกเข้าไปทำให้จำนวนชิ้นดีเอ็นเอมีจำนวนน้อยลงและง่ายต่อการอ่านผล



ภาพที่ 4 ขั้นตอนการทำเทคนิค AFLP
ที่มา : https://www.researchgate.net/figure/228092312_fig1_Figure-1-An-example-of-the-AFLP-procedure-using-one-primer-pair

เทคนิค AFLP แม้จะไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสเพื่อใช้ออกแบบไพรเมอร์เช่นเดียวกับเทคนิค RAPD แต่เทคนิคนี้มีความเสถียรของผลการทำซ้ำสูง (high reproducibility) กว่าเทคนิค RAPD แต่เทคนิค RFLP มีขั้นตอนยุ่งยากซับซ้อน ใช้ระยะเวลานานในการทดสอบและมีค่าใช้จ่ายสูง

2.3 เทคนิค Varieble Number Tandem Repeat (VNTR)

เทคนิคนี้การเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอบริเวณที่มีเบสซ้ำกัน (tandem repeat) เป็นชุดๆ ลักษณะเบสที่ซ้ำกันนี้พบกระจายทั่วไปบนโครโมโซม ถ้ามีจำนวนเบสซ้ำกันตั้งแต่ 2-6 เบส เรียกว่า microsatellite เช่น ชุดซ้ำของเบส ACG ACG ACG ACG ACG หรือ (ACG)6 จำนวนเบสซ้ำกันตั้งแต่ 10-100 เบส เรียกว่า minisatellite จำนวนชุดที่ซ้ำจะทำให้เกิดรูปแบบแถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน

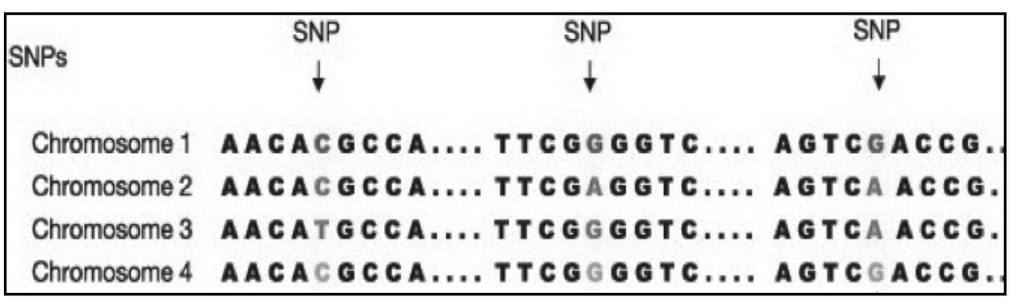
2.4 เทคนิค PCR-RFLP

การเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์แบบจำเพาะ (specific primer) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ก่อนจากนั้นทำการตัดชิ้นดีเอนเอด้วยเอนไซมม์ตัดจำเพาะ แถบดีเอ็นเอถูกตัดออกเป็นชิ้นเล็กๆ พืชต่างชนิดกันลำดับเบสที่เป็นบริเวณตัดของเอนไซม์จะอยู่ในตำแหน่งที่ต่างกันจึงได้แถบดีเอ็นเอขนาดไม่เท่ากัน

นอกเหนือจากเทคนิคที่กล่าวมาแล้วยังมีอีกหลายเทคนิคที่ถูกพัฒนาขึ้น อาทิเช่น Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPs), Terminal Restriction Patterns (TRFPs), Direct Amplification of Length Polymorphism (DALP) เป็นต้น ซึ่งเทคนิคเหล่านี้อาศัยหลักการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ทั้งสิ้น

3. วิธี Sequencing Based Method

วิธีนี้ชิ้นดีเอ็นเอหรือยีนที่สนใจจะถูกเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิคพีซีอาร์จากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์หาลำดับเบสด้วยเครื่องวิเคราะห์หาลำดับเบส (DNA sequencing) แล้วเปรียบเทียบลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงไปเพียงหนึ่งเบสซึ่งอาจเกิดจากการแทนที่ของเบส (substitution), การเพิ่ม (insertion) หรือการหายขาดหายไป (deletion) การเปลี่ยนแปลงนี้อาจจะไม่แสดงออกทางฟีโนไทป์ แต่สามารถใช้เป็นหลักฐานแสดงเอกลักษณ์ของพืชได้ ยีนที่มักใช้วิเคราะห์หาลำดับเบส เช่น 5S rDNA, Internal Transcribed Spacer (ITS) และบริเวณ 16S และ 26S rDNA ซึ่งมีความผันแปรของลำดับเบสสูง เทคนิคที่นิยมนำมาใช้ยืนยันชนิดพืชสมุนไพร ได้แก่ Single nucleotide polymorphism (SNP) ความผันแปรทางพันธุกรรมของลำดับเบสบนจีโนมซึ่งเกิดจากการผันแปรของเบสจำนวน 1 เบส เทคนิค Short tendem repeat (STR) มีเบสซ้ำจำนวน 2-10 เบสซ้ำกันเป็นชุดๆ เช่น (CATG)n เมื่อ n คือจำนวนชุดที่ซ้ำกัน จะพบลักษณะการเรียงตัวแบบนี้ในบริเวณที่เป็น non coding intron region จำนวนชุดที่ซ้ำกันนี้ใช้แสดงเอกลักษณ์ของพืชสมุนไพรแต่ละชนิด



ภาพที่ 5 การเปลี่ยนแปลงชนิดเบสบนโครโมโซมจาก C เป็น T, จากเบส G เป็น A และจากเบส G เป็น A
ที่มา : http://www.nature.com/nature/journal/v426/n6968/fig_tab/nature02168_F1.html

การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อใช้ยืนยันเอกลักษณ์สายพันธุ์พืชสมุนไพรสามารถทำได้หลายวิธีแต่ละวิธีมีข้อดีและข้อจำกัดแตกต่างกัน การเลือกเทคนิคที่เหมาะสมต้องพิจารณาหลายปัจจัยประกอบกัน เช่น ชนิดพืช ลักษณะและคุณภาพของตัวอย่าง การแปลผลทดสอบรวมถึงค่าใช้จ่ายเรื่องสารเคมีและเครื่องมือทดสอบที่ต้องใช้ การใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของชนิดพืชสมุนไพรถือได้ว่ามีจุดเด่นคือความถูกต้องสูง มีความน่าเชื่อถือและเป็นที่ยอมรับ สามารถนำเนื้อเยื่อจากทุกส่วนของพืช ทุกระยะการเจริญเติบโตมาตรวจสอบได้ ใช้ปริมาณตัวอย่างเพียงเล็กน้อยระดับมิลลิกรัม เช่นตัวอย่างสมุนไพรอบแห้ง ผงเครื่องยาหรือผลิตภัณฑ์แปรรูป การตรวจหาชนิดและปริมาณสารสำคัญด้วยเทคนิคโครมาโตรกราฟีก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ถูกนำใช้ควบคุมคุณภาพสมุนไพรแต่เนื่องจากปริมาณและชนิดของสารที่พืชสร้างขึ้นมักจะแปรปรวนตามสภาพแวดล้อมทำให้บางครั้งการแปลผลทดสอบทำได้ยาก การนำเทคนิคลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาใช้ควบคู่กับเทคนิคทางเคมีจะช่วยให้การยืนยันสายพันธุ์พืชมีความถูกต้องและชัดเจนมากยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

สุชาดา สุขหร่อง. (2548). ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ: หลักฐานทางพันธุกรรมในการพิสูจน์เอกลักษณ์สมุนไพร. **วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์** 19(1): 75-85.

Rydberg, A. (2010). DNA barcording as a tool for the identification of unknown plant material. https://uu.diva-portal.org/smash/get/diva2:386246/FULLTEXT01.pdf (20 กุมภาพันธ์ 2016)

Yan H., and Baolin, G. (2006). Utility of DNA profiling in quality control of medicinal herbs. **Alternative medicine.** 10(2): 102-105.

Kirti, M.K., Leena, S.P., Vineeta, V.K. and Vilasrao, J.K. (2014). Fingerprinting techniques in herbal standardization. **Indo American Journal of Pharmaceutical Research**. 4(2): 1049-1062.

Moom, B.C., Yunui, J., Young, M.L., Jin, M.C., Yeong, L., Byung, K.C. and Ho, K.K. (2011). Development of SCAR markers for the authentication of *Acori rhyzoma* based on the analysis of RAPD and multiplex PCR. **J. Medicinal Crop Sci**. 19(3): 162-169.

Shinde, V.M., K. Dhalwal, K., Mahadik, R.K., Joshi, K.S. and Patwardhan, B.K. (2007). RAPD analysis for determination of components in herbal medicine. Evid Based **Complement Alternat Med.** 4 (suppl1): 21-23.

Swatantra, K.S.K., Neelottama, K., Neeleshwar, M. and Rai, A.K. (2010). Role of markers in the standardization of herbal drugs: A review. **Archives Applied Science Research**. 2(1): 225-229.