การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค๊ดเพื่อระบุและจำแนกสิ่งมีชีวิต

จันทร์แรม รูปขำ
นักวิจัยชำนาญการ
ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์ สวพ มก.

การระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตต้องอาศัยความรู้และความเชี่ยวชาญด้านสัญฐานวิทยาและการสังเกตุเพื่อแยกความแตกต่างจากลักษณะภายนอกที่เห็นประกอบกัน ซึ่งในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดก็มีข้อจำกัดที่แตกต่างกันทำให้ไม่สามารถระบุชนิดได้ ปัจจุบันวิทยาศาตร์มีวิวัฒนาการและมีความเจริญก้าวหน้าทำให้มีงานวิจัยด้านอณูพันธุศาสตร์ (Molecular genetic) มีมากขึ้นตั้งแต่มีการค้นพบสารพันธุกรรมหรือสารชีวโมเลกุลที่อยู่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ซึ่งทำหน้าที่เก็บรวบรวมข้อมูลรหัสการทำงานของสิ่งมีชีวิตต่างๆ เมื่อสิ่งมีชีวิตมีการสืบพันธุ์มีการแบ่งเซลล์จะแบ่งสารพันธุกรรมนี้ไปด้วย สารพันธุกรรมหรือกรดนิวคลีอิคนี้มี 2 ชนิดคือ อาร์เอ็นเอ (Ribonucleic acid, RNA) และดีเอ็นเอ (Deoxyribonucleic acid, DNA) สิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่แล้วมีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอ ยกเว้นไวรัสบางชนิดมีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอ สารพันธุกรรมประกอบด้วยกรดนิวคลิอิก น้ำตาล หมู่ฟอสเฟสและนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด คือ อะดีนีน (adenine, A) ไทมีน (thymine, T) ไซโทซีน (cytosine, C) และกัวนีน (guanine, G) จากการจัดเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์สี่ชนิดที่แตกต่างกันในแต่ละสิ่งมีชีวิตทำให้เกิดความหลากหลายของรหัสพันธุกรรมทำให้สิ่งมีชีวิตมีความแตกต่างกันจึงเป็นที่มาของการทำบาร์โค๊ดในสิ่งมีชีวิต

ดีเอ็นเอบาร์โค๊ด (DNA barcode) นำมาใช้ประโยชน์ในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต เช่น ใช้ในการระบุชนิดของผีเสื้อสกิปเปอร์ (*Astraptes fulgerator*) (Hebert et al, 2004) ซึ่งสามารถจำแนกสายพันธุ์ผีเสื้อที่ต่างกันได้ถึง 10 ชนิด ใช้ตรวจสอบสินค้าในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลที่มีการปลอมปน และยังเป็นที่ยอมรับในการใช้ตรวจผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพที่ถูกยึดได้โดยศุลกากร ดีเอ็นเอบาร์โค๊ดเป็นบริเวณที่จำเฉพาะของลำดับดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตที่มีความผันแปรสูงของจีโนมจึงใช้จำแนกสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดได้ เช่น ดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรียและในคลอโรพลาสต์

การระบุชนิดพืชนิยมใช้ยีนในคลอโรพลาสต์ เช่น ยีน *mat*K (maturase K) และร่วมกับยีนบริเวณอื่น เช่น internal transcribed spacers (ITS), *rbcL* (Ribulose-1 ,5 - bisphosphate carboxylase oxygenase; RuBisCo) และ *trn*H ในพืชบางชนิดไม่สามารถระบุชนิดได้ด้วยยีน *rbcL* และ *matK* เช่น สาหร่ายสีเขียวไม่มียีน *matK* และไม่สามารถเพิ่มปริมาณด้วยยีน *rbcL* และ ITS ได้จึงใช้ยีนในคลอโรพลาสต์บริเวณอื่นเช่นยีน *tuf*A ในการจำแนกชนิด ((Kress et al, 2007; Purty et al, 2016)

ในสัตว์ใช้ยีนไมโตคอนเดรีย เช่น *COI* หรือ *COX*1 (cytochrome c oxidase subunit I) และยีน *Cytb* (cytochrome b) ซึ่งในสัตว์นิยมใช้ยีนในไมโตคอนเดรียมากกว่าเพราะมีจำนวนซ้ำมากกว่า (Hebert et al, 2003; Blaxter et al, 2004)

ในกลุ่มของเชื้อราต้องใช้มากกว่าหนึ่งบริเวณเช่น ยีน *COI* ซึ่งได้กับเชื้อราบางกลุ่ม (Bellemain et al, 2010; Seifert et al, 2007) แต่ส่วนใหญ่แล้วนิยมใช้ดีเอ็นเอในนิวเคลียสบริเวณ ITS (internal transcribed spacer) และส่วนของไรโบโซมที่มีหน่วยย่อยขนาดใหญ่ (large subunit, LSU) (Khaund et al, 2014)

สำหรับแบคทีเรียจะใช้ยีน 16S rRNA ในการจัดจำแนกซึ่งยีนบริเวณนี้มีบริเวณอนุรักษ์สูง (Janda et al, 2007) บางงานวิจัยใช้ยีน *COI* (Smith et al, 2012) ยีน *cpn*60 ชนิด type II chaperonin และยีน *rpo*B (Links et al, 2012; Case et al, 2007) ซึ่งสามารถใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค๊ดได้เช่นกัน

การระบุและจำแนกชนิดสิ่งมีชีวิตทำได้โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตเช่น พืช แมลง เชื้อรา สัตว์ จุลินทรีย์
2. สกัดดีเอ็นเอตัวอย่างที่เก็บมาด้วยวิธีที่เหมาะสม
3. เลือกเพิ่มปริมาณบริเวณที่จำเพาะกับสิ่งมีชีวิตแต่ชนิดด้วยวิธี PCR
4. วิเคราะห์ผลผลิต PCR ด้วยการส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับฐานข้อมูลของ GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov)
5. สร้างแผนภูมิต้นไม้เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

ในการระบุและจำแนกชนิดสิ่งมีชีวิตบางครั้งทำได้ยากด้วยดีเอ็นเอบาร์โค๊ดที่เหมือนกันบริเวณเดียว จึงต้องใช้ดีเอ็นเอบาร์โค๊ดมากกว่าสองบริเวณเข้ามาช่วยจึงสามารถแยกสายพันธุ์ได้เพื่อให้การระบุชนิดได้ถูกต้องที่สุด

เอกสารอ้างอิง

Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P. and Kauserud, H., 2010. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC microbiology*, *10*(1), p.189.

Blaxter, M.L., 2004. The promise of a DNA taxonomy. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *359*(1444), pp.669-679.

Case, R. J., Boucher, Y., Dahllöf, I., Holmström, C., Doolittle, W. F. and Kjelleberg, S. 2007. Use of 16S rRNA and *rpo*B genes as molecular markers for microbial ecology studies. Applied and environmental microbiology, 73(1), 278-288.

Hebert, P.D., Ratnasingham, S. and De Waard, J.R., 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *270*(suppl_1), pp.S96-S99.

Hebert, P.D., Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D.H. and Hallwachs, W., 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly Astraptes fulgerator. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(41), pp.14812-14817.

Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. Journal of clinical microbiology, 45(9), 2761-2764.

Khaund, P. and Joshi, S.R., 2014. DNA barcoding of wild edible mushrooms consumed by the ethnic tribes of India. *Gene*, *550*(1), pp.123-130.

Kress, W.J. and Erickson, D.L., 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbc*L gene complements the non-coding trnH-psbA spacer region. *PLoS one*, *2*(6), p.e508.

Links, M.G., Dumonceaux, T.J., Hemmingsen, S.M. and Hill, J.E., 2012. The chaperonin-60 universal target is a barcode for bacteria that enables de novo assembly of metagenomic sequence data. PloS one, 7(11), p.e49755.

Purty, R.S. and Chatterjee, S., 2016. DNA barcoding: an effective technique in molecular taxonomy. *Austin J Biotechnol Bioeng*, *3*(1), p.1059.

Seifert, K.A., Samson, R.A., Dewaard, J.R., Houbraken, J., Lévesque, C.A., Moncalvo, J.M., Louis-Seize, G. and Hebert, P.D., 2007. Prospects for fungus identification using CO1 DNA barcodes, with Penicillium as a test case. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(10), pp.3901-3906.

Smith, M.A., Bertrand, C., Crosby, K., Eveleigh, E.S., Fernandez-Triana, J., Fisher, B.L., Gibbs, J., Hajibabaei, M., Hallwachs, W., Hind, K. and Hrcek, J. 2012. Wolbachia and DNA barcoding insects: patterns, potential, and problems. PloS one, 7(5), p.e36514.