การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR – Restriction fragment length Polymophism

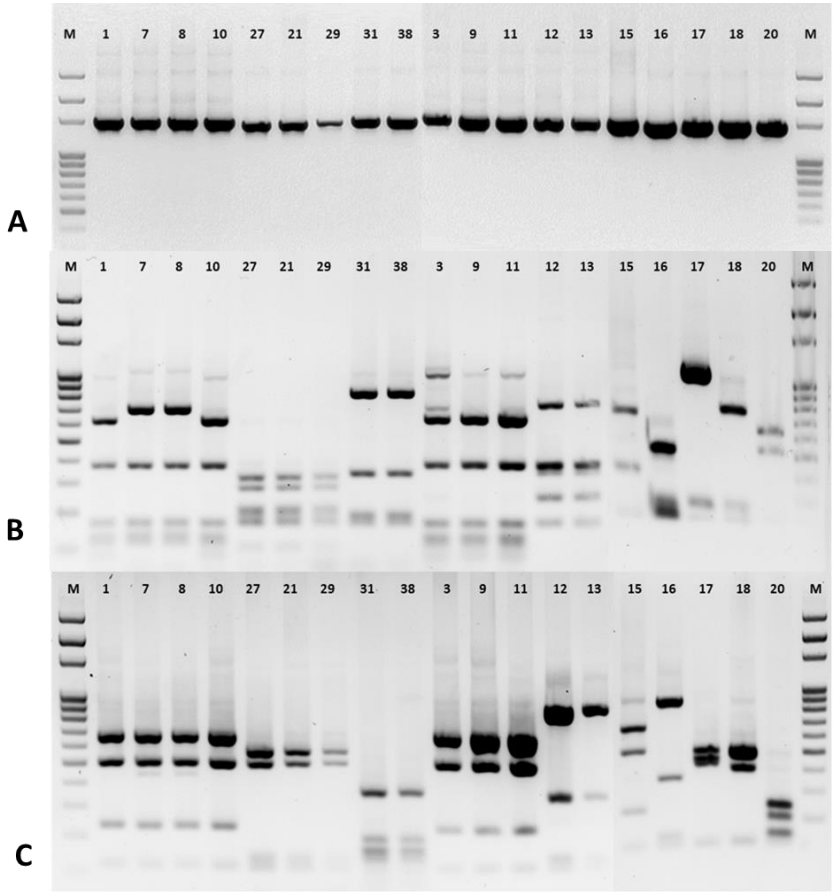
จันทร์แรม รูปขำ
นักวิจัยชำนาญการพิเศษ ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์
สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ดีเอ็นเอเป็นสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตทำหน้าที่เก็บข้อมูลรหัสทางพันธุกรรมที่สามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นต่อไปได้ ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาล หมู่ฟอสเฟต และเบส 4 ชนิดได้แก่ A (adenine) G (guanine) C (cytosine) และT (thymine) การเรียงกันของเบสแต่ละชนิดทำให้สิ่งมีชีวิตมีความต่างกัน ดีเอ็นเอนี้กระจายอยู่ในเซลล์ ไมโตคอนเดรีย คลอโรพลาสต์และนิวเคลียส การเรียงกันของสายดีเอ็นเอนี้สามรถนำมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ซึ่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอคือรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ถูกสร้างขึ้นและเป็นลักษณะเฉพาะของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ เทคนิคการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอมีหลายเทคนิค แต่ละเทคนิคที่ใช้สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอต้องทำซ้ำได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เหมือนเดิม ซึ่งวิธีที่ใช้ในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอต้องอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส (Polymerase chain reaction; PCR) ซึ่งเป็นขั้นตอนหนึ่งของการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ประโยชน์ของการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอมีข้อดีคือมีความถูกต้องแม่นยำสูง ทำได้กับส่วนต่างๆ ของสิ่งมีชีวิตแม้ในสภาวะแวดล้อมต่างกัน ใช้ตัวอย่างในปริมาณน้อย ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต สามารถตรวจลักษณะที่ต้องการได้โดยไม่ต้องรอให้โต เช่นการตวรจโรควินิจฉัยโรค การหาลักษณะที่ผิดปกติทางพันธุกรรม ใช้ในการจัดหมวดหมู่ ใช้หาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและใช้เป็นข้อมูลการอ้างอิงในการเปรียบเทียบพันธุ์พืช สัตว์และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ซึ่งการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ใช้การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR และแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโพรีซีสมีหลายรูปแบบ ได้แก่

1. RAPD (Rapid Amplified Polymerphic DNA) วิธีนี้ใช้ดีเอ็นเอน้อยไม่ต้องทราบข้อมูลทางพันธุกรรมไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยามีขนาดสั้นๆประมาณ 10 นิวคลีโอไทด์ เป็นการเพิ่มปริมาณแบบสุ่ม แล้วนำไปทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส (gel electrophoresis) เพื่อศึกษาลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน
2. PCR-RFLP (PCR – Restriction fragment length Polymophism) ซึ่งเทคนิคนี้เป็นการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายแบบเฉพาะเจาะจงโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซพอลีเมอเรสแล้วใช้เอมไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ตัดชิ้นดีเอ็นเอ ซึ่งสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันก็จะมีตำแหน่งของการตัดด้วยเอมไซม์ตัดจำเพาะบนสายดีเอ็นเอต่างกันทำให้เกิดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอมีขนาดไม่เท่ากัน แล้ววิเคาะห์ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis)
3. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ใช้เทคนิค RFLP และ PCR ร่วมกันเริ่มจากการตัดดีเอ็นเอด้วยเอมไซม์ตัดจำเพาะก่อนแล้วเชื่อมต่อดีเอ็นเอด้วย adapter ที่เป็นนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆไม่เกิน 20 เบส แล้วเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR ด้วยไพรเมอร์ที่จะจับเฉพาะ adapter จากนั้นแยกชิ้นส่วนของชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีพอลีอะคลิลาไมด์เจล
4. SSR (Simple Sequence Repeat) ลายพิมพ์ชนิดนี้อาศัยชุดซ้ำของสายดีเอ็นในจีโนม การซ้ำของเบสชุดสั้นๆ (tendem repeat) ที่กระจายอยู่ทั่วจีโนม การซ้ำของชุดที่มีนิวคลีโอไทด์ขนาด 10-60 เบส เรียกว่า minisatellites การซ้ำของชุดที่มีนิวคลีโอไทด์ขนาด 1-10 เบส เรียกว่า microsatellites การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วงนี้ใช้ไพรเมอร์ที่จับกับช่วงซ้ำๆ นี้ ถ้าสิ่งมีชีวิตมีจำนวนชุดซ้ำต่างกันก็จะแสดงแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน

ปัจจุบันเทคนิค PCR- RFLP เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้สร้างลายพิมพ์ดีเอ็เอเพื่อหาความแตกต่างทางพันธุกรรมอาศัยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและตัดด้วยเอมไซม์ตัดจำเพาะและวิเคราะห์ผลด้วยการทำเจลอิเล็กโทรโพรีซีส ในสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันก็จะมีตำแหน่งของการตัดด้วยเอมไซม์ตัดจำเพาะบนสายดีเอ็นเอที่ต่างกันทำให้เกิดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอมีขนาดไม่เท่ากัน (Botstein et al, 1980) วิธีนี้ยังนิยมใช้กันมากในปัจจุบัน ซึ่งข้อดีของวิธีนี้คือเสียค่าใช้น้อยไม่ต้องใช้เครื่องมือวิเคราะห์ขั้นสูง การใช้ประโยขน์จากเทคนิค PCR – RFLP นี้สามารถใช้ในการจำแนกสิ่งมีชีวิต เช่นพืช สัตว์ จุลินทรีย์ การวินิจฉัยโรคต่างๆ และวิเคราะห์การปนเปื้อนในอาหาร การจำแนกด้วยวิธีนี้ถ้าใช้เอมไซม์มากกว่าหนึ่งชนิดจะทำให้การวิเคราะห์มีความถูกต้องแม่นยำยิ่งขึ้น (Rasmussen, 2012; Hashim et al. 2019)

การประยุกต์ใช้วิธี PCR – RFLP กับเชื้อแบคทีเรียที่แยกมาได้จำนวน 19 สายพันธุ์ เมื่อนำมาทำ PCR- RFLP ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน 16S rDNA แล้วใช้เอมไซม์ตัดจำเพาะ *BfaI* และ *RsaI* สามารถจำแนกชนิดและจัดกลุ่มของเชื้อแบคทีเรียได้ 10 กลุ่ม (ภาพที่ 1) ซึ่งวิธีนี้สามารถใช้จำแนกชนิดของแบคทีเรียและใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการจัดกลุ่มของแบคทีเรียได้



ภาพที่ 1 การทำ PCR – RFLP จากยีน 16S rDNA และตัดด้วยเอมไซม์ตัดจำเพาะ *BfaI* และ *RSaI*

A. PCR product ของยีน16S rDNA
B. PCR – RFLP ตัดด้วยเอมไซม์ตัดจำเพาะ *BfaI*
C. PCR – RFLP ตัดด้วยเอมไซม์ตัดจำเพาะ *RSaI*

เอกสารอ้างอิง

Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics*, *32*(3), 314.

Hashim, H. O., & Al-Shuhaib, M. B. S. (2019). Exploring the potential and limitations of PCR-RFLP and PCR-SSCP for SNP detection: A review. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, *6*(4), 137-144.

Rasmussen, H. B. (2012). Restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments (PCR-RFLP) and gel electrophoresis-valuable tool for genotyping and genetic fingerprinting. In *Gel electrophoresis-principles and basics*. InTechopen.