บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

ข่า มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Alpinia galanga* (L.) Willd. อยู่ในตระกูล Zingiberaceae ลักษณะทั่วไปเป็นพืชล้มลุกมีอายุหลายปี สูงประมาณ 1.5-2.0 เมตร

ลำต้น เป็นลำต้นใต้ดินเรียกเหง้า (rhizome) มีขนาดใหญ่และมีข้อปล้องชัดเจน

ใบ เดี่ยว เรียงสลับ รูปรีแกมขอบขนาน หรือรูปใบหอก กว้าง 6-9 ซม. ยาว 20-40 ซม. ปลายใบแหลมฐานใบรูปลิ่ม ก้านใบยาวและห่อตัวเข้าหากัน เป็นลำต้นเทียมอยู่เหนือดิน

ดอก สีขาวครีมอมเขียวออกเป็นช่อตั้ง ยาวได้ถึง 25 ซม. กลีบรองดอกสีเขียวอ่อน โคนเชื่อมกัน ปลายแยกเป็น 3 แฉก กลีบดอก 3 กลีบ โคนเชื่อมกัน กลีบปากแผ่รูปไข่กว้าง สีขาวครีมมีเส้นสีม่วงแดงเป็นทาง เกสรเพศผู้สีเหลืองอ่อน ยื่นพ้นกลีบดอกชัดเจน

ผล รูปทรงกลม ขนาดประมาณ 1 ซม. ผลอ่อนสีเขียว เมื่อแก่มีสีแดง

ฤดูออกดอก-ผล ระหว่างเดือน มิถุนายน ถึง กันยายน

การกระจายและนิเวศวิทยา อินเดีย เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ถึงอินโดเซีย เจริญงอกงามดีในเขตร้อนชื้น และเขตกึ่งร้อน ที่เป็นพืชเกาะอาศัยมีน้อย (สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์, 2546)

ประโยชน์ นิยมนำมาปลูกเพื่อเป็นอาหารและยารักษาโรค นำเหง้ามาต้มเอาน้ำดื่มเพื่อบรรเทาอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ และขับลม สำหรับเหง้าสดตำเพื่อผสมเหล้าโรง ใช้ทารักษาผิวหนังที่เกิดจากเชื้อรา เช่น กลากเกลื้อน คุดทะราด แผลพุพอง ลมพิษ แก้ไข้และพยาธิ นอกจากนี้ยังพบสารออกฤทธิ์ที่สำคัญคือ สาร 1´ acetoxychavicol acetate ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา (อนุศักดิ์, 2536; Janssen and Scheffer, 1998) ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cryptococcus neoformans* และ *Microsporum gypseum* ที่เป็นสาเหตุของโรคในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอดส์ ยับยั้งการพัฒนาของเนื้องอก (Itokawa *et al.*, 1987; Kondo *et al.*, 1993; Moffatt *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2002) ยับยั้งอาการอักเสบ (Nakamura *et al.*, 1998) ต้านอนุมูลอิสระ (Kubota *et al.*, 2001) รักษาโรคกระเพาะอาหาร (Matsuda *et al.*, 2003) ป้องกันโรคภูมิแพ้ (Matsuda *et al.*, 2003)

สำหรับการศึกษาประโยชน์จากข่า มีการศึกษาอย่างแพร่หลายและกว้างขวาง ทั้งการศึกษาในด้านสรรพคุณทางยา และการใช้ประโยชน์ทางการเกษตร ตัวอย่างในการศึกษาเช่น อนุศักดิ์ (2536) ศึกษาสารต้านเชื้อราจากข่า (*Languas galangal* Linn) พบว่าสารสกัดหยาบด้วย dichoromethane จากเหง้ามีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Cladosporium cladosprioides* การแยกสารต้านเชื้อราด้วยวิธีทางโครมาโตกราฟี และ ตรวจสอบทางชีววิทยาได้ fraction ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา คือ LG I,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

LG II, LG III เมื่อวิเคราะห์สารด้วย GC-MS, IR และ CHNS/O Analyzer พบสารที่ออกฤทธิ์ใน 3 fractionคือ 1´acetoxychavical acetate และ ไอโซเมอร์ เมื่อนำส่วนสกัดหยาบไปทดสอบกับเชื้อราสาเหตุโรคในลิ้นจี่ ลำไย และมะม่วงจำนวน 11 สายพันธุ์ พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเชื้อราได้ทุกชนิด โดยยับยั้งเชื้อ *Alternaria* sp. ได้สูงสุด ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญได้คือ 1:1000 (v/v) ยกเว้น *Colletotrichum gloeocosporioides* กับ *Lasiodiplodia* sp. เฉพาะสารสกัดหยาบเข้มข้นเท่านั้นที่ยับยั้งได้ ส่วนการทดสอบบนผลลำไยไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Lasiodiplodia* sp., *Fusarium* sp. และ *Pestalotiopsis* sp.

อนุวัฒน์ (2545) ได้ศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากข่าต่อโรคแอนแทรคโนสและการเจริญเติบโตของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ พบว่า สารสกัดหยาบจากเหง้าข่า (*Alpinia galangal* Sw.) dichloromethane แล้วนำมาแยกองค์ประกอบโดยวิธี TLC (Thin Layer Chromatography และตรวจสอบทางชีววิทยา พบแถบต้านเชื้อราที่มีขนาดกว้างที่สุด ให้ชื่อว่า L14 มีค่า R_f 0.5-0.83 จากนั้นเพิ่มปริมาณสาร L14 ด้วย Column Chromatography นำไปทดสอบกับเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* บนอาหาร PDA พบว่า L14 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการงอกของสปอร์เชื้อราได้ 100 เปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้น 5,000 ส่วนต่อล้าน สาร L14 มีค่า ED_{50} เท่ากับ 72 ส่วนต่อล้าน

สุวคนธ์ (2540) ทำการสกัดสารจากลำต้นใต้ดินของพืช 8 ชนิด คือ ขิง, ข่า, ขมิ้น, กระชาย, เผือก, มันเทศ, หัวผักกาด และแครอท ด้วย dichloromethane นำส่วนสกัดหยาบมาทำ TLC-bioassay ตรวจสอบด้วยเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* และ เชื้อแบคทีเรีย พบว่า ในข่ามีสารต้านเชื้อรามีค่า Rf เท่ากับ 0.63-0.83 และแถบต้านเชื้อแบคทีเรียมีค่า Rf เท่ากับ 0.41-0.50 และ 0.63-0.77 นำมาทำให้บริสุทธิ์โดย preparative-TLC อีก 4 ครั้ง ได้สาร G-5 ซึ่งนำมาวิเคราะห์โดยแก๊สโครมาโตรกราฟีและสเปกโตรสโคปี พบว่าเป็นสารตัวเดียวกัน นั่นก็คือ 1´ acetoxychavicol acetate

สาร 1´ acetoxychavicol acetate เป็นสารในกลุ่ม phenylpropanoids มีรายงานว่า พบทั้งในเหง้า เมล็ด และใบของข่า Mitsui *et al* (1976) พบว่าสาร 1´ acetoxychavicol acetate จากเมล็ดของข่า มีคุณสมบัติในการรักษาแผลติดเชื้อเรื้อรัง โดยทดสอบกับเนื้อเยื่อในช่องท้องของหนู

Tanaka *et al.* (1997) พบว่าสาร 1´ acetoxychavicol acetateจากข่า สามารถยับยั้งการพัฒนาของเนื้องอกและการขยายตัวของเซลล์ในชั้น Mucosa ของลำไส้หนู ที่กระตุ้นด้วยสาร azoxymetrone ได้ และมีผลชักนำให้ glutathione S-transferase (GST) และ quinone reductase (QR) ในตับและลำไส้มีกิจกรรมมากขึ้น ซึ่งเอนไซม์ GST จะพบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และมีหน้าที่ทำลายสารพิษและสารก่อมะเร็ง โดยเปลี่ยนให้เป็นสารที่มีพิษต่ำลงและขับออกจากร่างกาย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Itokawa *et al.*(1987) พบว่าสาร 1´ acetoxychavicol acetate และ 1´ acetoxy -eugenol acetate จากข่ามีฤทธิ์ในการต้านการเกิดมะเร็ง Sarcoma 180 ascites ในหนู

Lee and Houghton (2005) ได้ทำการทดสอบสารที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งจากข่ารวบรวมจากประเทศมาเลเซียและประเทศไทย พบว่า ส่วนประกอบหลักของสารที่สามารถทำลายเซลล์มะเร็งจากปอด CORL23 (Human non-small cell lung cancer) และเซลล์มะเร็งเต้านม MCF7 (Human breast adenocarcinoma) เป็นสาร 1´ acetoxychavicol acetate ซึ่งให้ค่า IC_{50} ที่การให้สาร 48 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 7.8μM (CORL23 Cell) 23.9 μM (MCF7 Cell) นอกจากนี้ยังพบว่า สารที่แยกจากข่าจากประเทศไทยให้สาร 1´ acetoxychavicol acetate ที่มากกว่าข่าของประเทศมาเลเซีย นอกจากนี้ยังพบว่าในข่ายังมีสารสำคัญอื่นๆ อีกหลายชนิด ดังตารางที่ 1 (Morita and Itokawa, 1987; Itokawa *et al*., 1987; De Pooter *et al*., 1985; Barik *et al*., 1987; Matsuda *et al*.,2003)

ตารางที่ 1 สารสำคัญที่พบในข่า

สารที่พบ		
1'-acetoxychavicol acetate	α-Bergamotene	*p*-Cymeol
1'*S*-1'acetoxychavicol acetate	β-Bisabolene	Citronellyl acetate
1'*S*-1'acetoxyeugenol acetate	Bornyl acetate	ar-Curcumene
1'*S*-1'-hydroxychavicol acetate	Borneol	Methyleugenol
trans-p-hydroxycinnamaldehyde	Camphene	2-Methylpropyl acetate
trans-p-coumaryl alcohol	Caryophyllene oxide	Neryl acetate
trans-p-hydroxycinnamylacetate	Chavicol	Pentadecane
trans-p-coumaryl diacetate	Chavicol acetate	α-Pinene
eugenol acetate	1,8-Cineole	β-Pinene
eugenol	*p*-hydroxycinnamaldehyde	Sabinene
[di-(*p*-hydroxy-*cis*-styryl)]methane	*trans*-β-Farnesene	Santalene
demethyleugenol	Geranyl acetate	γ-Terpinene
cinnamaldehyde	α-Humulene	α-Terpineol
trans-cinnamic acid	Limonene	4-Terpineol
trans-o-coumaric acid	Linalool	Terpinolene
trans-m-coumaric acid	*p*-Cymene	Tridecane
trans-p-coumaric acid		

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เครื่องหมายทางโมเลกุล (Molecular markers)

สุรินทร์ (2545)ได้รวบรวมเนื้อหาเกี่ยวกับเครื่องหมายทางโมเลกุลไว้ดังนี้คือ ในการศึกษาเพื่อจำแนกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตโดยใช้เครื่องหมาย (marker) เพื่อบ่งชี้ความแตกต่างและความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของสิ่งมีชีวิตทั้งทางปริมาณและคุณภาพ ในระหว่างและภายในสปีชีส์ (inter and intra-species) ระหว่างและภายในประชากร(inter and intra - populations) หรือระหว่างแต่ละตัว(inter and intra-individuals) เครื่องหมายที่ใช้จำแนกความแตกต่าง มี 2 ประเภท คือ

1. เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (Morphological marker)

การบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตด้วยวิธีการเปรียบเทียบลักษณะภายนอกทางสัณฐานวิทยาหรือทางสรีรวิทยา ซึ่งลักษณะที่ตรวจสอบนี้มักจะขึ้นกับสภาพแวดล้อมทำให้ตรวจสอบผลผิดพลาดได้ บางครั้งต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ อย่างไรก็ตามการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยายังมีความจำเป็นต้องทำเป็นอันดับแรก แล้วจึงใช้วิธีอื่นประกอบเพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์ขึ้น หรือแก้ปัญหาในกรณีที่ไม่สามารถใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว

2. เครื่องหมายทางโมเลกุล (Molecular marker)

เครื่องหมายทางโมเลกุลมี 2 ระดับ คือ ระดับโปรตีน เป็นการตรวจสอบที่โมเลกุลของโปรตีนชนิดต่างๆ และระดับดีเอ็นเอ ซึ่งตรวจสอบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

2.1 เครื่องหมายโปรตีน (Protein marker)

การตรวจสอบสิ่งมีชีวิตโดยใช้ความแตกต่างของโมเลกุลของโปรตีนใช้วิธีแยกโมเลกุลของโปรตีนด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส แล้วจึงย้อมดูแถบของโปรตีนจำเพาะโดยใช้สารที่เหมาะสม เช่น การตรวจสอบรูปแบบของโปรตีนในเลือด โปรตีนสะสมในเมล็ดพืช เป็นต้น นอกจากนี้ยังนิยมตรวจสอบรูปแบบของเอนไซม์บางชนิดหรือไอโซไซม์ต่าง ๆ ข้อดีของการตรวจสอบโปรตีนคือ สามารถตรวจได้หลายตำแหน่ง ค่าใช้จ่ายไม่สูงมากนัก และแถบของโปรตีนหรือไอโซไซม์นี้ยังมีการข่มร่วมกันแบบ codominant ช่วยให้แยกความแตกต่างระหว่างแถบโปรตีนแบบโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัสได้

ข้อจำกัดของการตรวจสอบโปรตีนหรือไอโซไซม์ คือ จำนวนยีนที่ตรวจสอบได้ยังมีไม่มากนัก ไม่กระจายครอบคลุมทั้งจีโนม และต้องมีการแสดงออกของยีนที่ศึกษาจึงต้องเลือกเนื้อเยื่อและระยะเวลาที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ ผลที่ได้ยังขึ้นอยู่กับชนิดของเนื้อเยื่อ ระยะของการเจริญเติบโตและสิ่งแวดล้อมด้วย นอกจากนี้โปรตีนและไอโซไซม์ยังสูญเสียสภาพธรรมชาติได้ง่าย จึงต้องวิเคราะห์ผลในเวลาจำกัด ไม่สามารถเก็บตัวอย่างไว้นานได้ ในแง่ของโอกาสการตรวจพบความ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แตกต่างในระดับโปรตีนยังมีค่าต่ำมากเมื่อเทียบกับการตรวจสอบระดับดีเอ็นเอ เนื่องจากอัลลีลหรือรูปแบบของยีนที่แตกต่างกันนั้น นิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันอาจไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน หรือบางครั้งแม้ว่าจะมีการเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งแล้วก็ตาม อาจจะไม่มีผลต่อระยะทางการเคลื่อนที่ของโมเลกุลเมื่อทำอิเล็กโทรโฟริซิส ทำให้ไม่สามารถตรวจพบความแตกต่างนั้น ๆ ได้ พบว่าการตรวจสอบระดับโปรตีนนี้ตรวจพบความแตกต่างของเครื่องหมายโปรตีนได้เพียง 30 เปอร์เซ็นต์ของที่เกิดการแทนที่เบสทั้งหมดเท่านั้น ทำให้ผลที่ตรวจสอบได้ พบความแตกต่างต่ำกว่าที่เป็นจริง

2.2 เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker)

การตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอมีข้อดีกว่าการตรวจสอบโปรตีน คือ โมเลกุลของดีเอ็นเอมีความเสถียรกว่าจึงเก็บไว้ได้นาน สามารถวิเคราะห์จากตัวอย่างที่ถูกเก็บไว้เป็นเวลายาวนานได้ และเนื่องจากดีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในเซลล์เกือบทุกเซลล์ในปริมาณเท่ากัน จึงสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อใด ๆ ระยะการเจริญเติบโตหรือสภาพทางสรีรวิทยาใดก็ได้โดยไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม ตรวจสอบดีเอ็นเอจากส่วนที่เป็นยีนหรือไม่ใช่ยีนก็ได้ จะมีการแสดงออกหรือไม่ก็ได้ จึงตรวจสอบได้โดยไม่จำกัด ครอบคลุมทั้งจีโนม ประกอบกับมีวิธีตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบต่าง ๆ ให้เลือกมากมาย ทำให้การใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายทำได้อย่างกว้างขวาง ประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ ได้ไม่จำกัด

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) หมายถึง ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตตัวหนึ่ง สายพันธุ์หนึ่ง สปีชีส์หนึ่ง หรือในระดับต่างสปีชีส์ เป็นดีเอ็นเอที่อยู่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ บนโครโมโซม(nuclear DNA) หรือ ดีเอ็นเอในออร์แกเนลล์ (mitochondrial DNA หรือ chloroplast DNA) การที่สามารถใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายได้เนื่องจากเกิดความแปรปรวน(variation)ของนิวคลิโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ หรือเกิดโพลีมอร์ฟิซึม (polymorphism) ของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอนั่นเอง

วิธีตรวจสอบโพลีมอร์ฟิซึมของดีเอ็นเอ (DNA polymorphism) ทำได้โดยการหาลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) หรือตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ การใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายบ่งบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตมีที่มาจากการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอซึ่งปัจจุบันนี้ก็ยังใช้อยู่ โดยมีความคาบเกี่ยวกันอยู่

การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) เป็นวิธีการที่ทำให้เกิดลายพิมพ์หรือแบบแผนของดีเอ็นเอที่จำเพาะ สามารถตรวจสอบโพลีมอร์ฟิซึมได้ โดยได้จากการนำดีเอ็นเอทั้งหมดในเซลล์ (genomic DNA) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วแยกขนาดโดยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิส ย้ายชิ้นดีเอ็นเอที่แยกแล้วทั้งหมดไปยังแผ่นเมมเบรนฟิลเตอร์(membrane filter)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ไฮบริไดซ์กับโพรบ (probe) ซึ่งมาจากดีเอ็นเอส่วนที่เป็นมินิแซทเทลไลท์ สามารถตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอได้จากหลายตำแหน่ง (multi-locus) พร้อมๆ กัน เกิดเป็นลายพิมพ์ที่จำเพาะกับแต่ละบุคคล มีความหมายเดียวกับคำว่า DNA profiling หรือ DNA typing

การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอในปัจจุบันยังหมายรวมถึง วิธีตรวจสอบดีเอ็นเอโดยการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ที่เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากหลายตำแหน่งพร้อม ๆ กัน (multi-locus PCR) เพราะทำให้เกิดแบบแผนของดีเอ็นเอจำเพาะเช่นเดียวกัน สำหรับการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมนุษย์ในทางการแพทย์จะใช้วิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ที่เป็นแบบจำเพาะครั้งละ 1 ตำแหน่ง (single locus PCR) แต่ทำหลายตำแหน่ง โดยใช้ไพรเมอร์หลายคู่ นำมาวิเคราะห์ผลร่วมกัน ก็สามารถแยกความแตกต่างของบุคคลได้เช่นเดียวกัน

จะเห็นได้ว่าการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ก็คือการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอนั่นเอง วิธีตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเออาจทำได้โดยใช้วิธีไฮบริไดเซชัน หรือ วิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์เป็นหลัก ดังตัวอย่างต่อไปนี้

2.2.1 อาร์เอฟแอลพี (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism)

อาร์เอฟแอลพี หมายถึง ความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) เนื่องจากการตรวจสอบในระดับโปรตีนทำได้ไม่กว้างขวางเท่าที่ควร จึงมีการตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอ ซึ่งมีข้อได้เปรียบ คือ สามารถวิเคราะห์จากส่วนใดก็ได้ โดยไม่ขึ้นกับเนื้อเยื่อ ระยะการเจริญเติบโต และสภาพแวดล้อม ทั้งยังสามารถตรวจสอบได้ทั้งส่วนของยีนและส่วนที่ไม่ใช่ยีน ส่วนของดีเอ็นเอในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตอยู่ในนิวเคลียสและออร์แกเนลล์บางชนิด ได้แก่ คลอโรพลาสต์และไมโตคอนเดรีย โมเลกุลของดีเอ็นเอนี้มีความสามารถที่จะจำลองโมเลกุลได้อย่างถูกต้องแม่นยำ เพื่อถ่ายทอดไปสู่เซลล์ลูกและคงลักษณะที่เหมือนเดิมตลอดไป แต่บางครั้งก็อาจมีการเปลี่ยนแปลงของเบสภายในดีเอ็นเอได้ เนื่องจากสภาพแวดล้อมหรือข้อผิดพลาดของเซลล์เอง นอกจากมีการเปลี่ยนแปลงของเบสแต่ละตัวแล้ว อาจมีการเปลี่ยนแปลงของชิ้นดีเอ็นเอขนาดใหญ่ หรือเปลี่ยนแปลงในระดับโครโมโซม เช่น มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอหรือโครโมโซมหายไป (deletion) มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอบางส่วนเพิ่มขึ้นมา (insertion) มีการจัดเรียงตัวใหม่ของส่วนของดีเอ็นเอภายในโครโมโซม (chromosome rearrangement) หรือมีการเปลี่ยนตำแหน่งของดีเอ็นเอบางส่วนภายในโครโมโซมหรือจากต่างโครโมโซม (transposition) การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้ ทำให้เกิดความหลากหลายภายในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) แล้วนำมาเปรียบเทียบกัน แต่เป็นวิธีที่ทำได้ยากและใช้เวลามาก วิธีที่ง่ายกว่า คือ นำดีเอ็นเอที่ต้องการหาความแตกต่างนั้น มาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบางชนิด แล้วเปรียบเทียบชิ้นส่วนของ ดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์นั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เอนไซม์ตัดจำเพาะเป็นเอนไซม์ที่แยกได้จากแบคทีเรีย และ จะตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งที่มีการเรียงตัวของเบสแบบจำเพาะ เรียกว่าตำแหน่งจดจำ (recognition site) ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์แต่ละชนิดประกอบด้วยเบส 4 ถึง 8 คู่เบส ดังนั้นเมื่อใช้เอนไซม์ชนิดหนึ่งตัดดีเอ็นเอเป้าหมายโมเลกุลหนึ่ง จะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดและจำนวนคงที่เสมอ ถ้าดีเอ็นเอเป้าหมายมาจากแหล่งต่างกันและมีลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงไป หรือมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างแบบใดแบบหนึ่งดังที่กล่าวมาแล้ว เมื่อนำมาตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน จะได้ขนาดและจำนวนชิ้น ดีเอ็นเอที่แตกต่างจากเดิม เรียกว่าเกิดโพลีมอร์ฟิซึม หรือ มีอาร์เอฟแอลพี

2.2.2 อาร์เอพีดี (RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA)

อาร์เอพีดี เป็นวิธีวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์อีกแบบหนึ่ง โดยไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลที่เกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใด (arbitrary primer) วิธีการนี้มีการเรียกชื่อแบบอื่น ๆ ได้อีก เช่น Arbitrarily Primed PCE (AR-PCR), DNA Amplification Fingerprinting (DAF) หรือ Multiple Arbitrary Amplicon Profiling (MAAP) ซึ่งแต่ละวิธีที่เรียกนี้มีข้อแตกต่างกันบ้าง คือ ขนาดของไพรเมอร์ที่ใช้ แต่หลักการไม่แตกต่างกัน คือ ใช้ไพรเมอร์ที่มีขนาดสั้นเพียงชนิดเดียว เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม มีนักวิจัยบางกลุ่มใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดพร้อมกันซึ่งก็ใช้ได้เช่นเดียวกัน แต่ที่นิยม คือ ใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว และใช้วิธีแบบที่เรียกว่าอาร์เอพีดีซึ่งตั้งขึ้นโดย William และคณะในปี ค.ศ. 1990 โดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลิโอไทด์เพียงชนิดเดียวเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้วแยกขนาดของดีเอ็นเอที่ได้โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจลและย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอทธิเดียมโบรไมด์

DAF ใช้ครั้งแรกโดย Caetano-Anolles และคณะในปี ค.ศ. 1991 โดยใช้ไพรเมอร์ขนาดสั้นเพียง 5-8 นิวคลีโอไทด์ และ ใช้โปรแกรมการเพิ่มปริมาณโดยใช้อุณหภูมิ 2 ระดับเท่านั้น แทนที่จะใช้ 3 ระดับแบบที่ใช้กับพีซีอาร์ทั่วไป แล้วแยกชิ้นดีเอ็นเอที่ได้โดยทำอิเล็กโทรโฟริซิสในโพลีอะครีลาไมด์เจลและย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท

AP-PCR ทำโดย Welsh and McClelland ในปี ค.ศ. 1990 โดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 20 หรือมากกว่า 20 นิวคลีโอไทด์ ใช้โปรแกรมการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 2 โปรแกรม คือ ใช้อุณหภูมิสำหรับ annealing ต่ำในรอบแรกแล้วจึงเพิ่มให้สูงขึ้นอีก 30-40 รอบ ในการทำพีซีอาร์ช่วงหลังใส่นิวคลีโอไทด์ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีลงไป แล้วจึงแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยโพลีอะครีลาไมด์เจล ตรวจสอบผลโดยทำออโตเรดิโอกราฟ ซึ่งนับเป็นวิธีที่ยุ่งยากที่สุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีอาร์เอพีดีของ William *et al.* (1990) ใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งจะเข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายในบริเวณที่มีเบสเป็นคู่สมกันโดยไม่จำเป็นต้องทราบว่าไพรเมอร์จะเข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอส่วนใดบนโครโมโซมใด

ความแตกต่างของแถบอาร์เอพีดีหรือโพลีมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นระหว่างแต่ละตัวอย่างอาจจะเกิดจาก

1. มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดใหญ่มาสอดแทรกในระหว่างตำแหน่ง 2 ตำแหน่งที่ไพรเมอร์เกาะทำให้ไพรเมอร์ทั้งสองโมเลกุลอยู่ห่างกันเกินกว่าที่จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ จึงไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ
2. ชิ้นส่วนดีเอ็นเอส่วนที่เป็นที่เกาะกับไพรเมอร์หายไปหนึ่งตำแหน่ง หรือทั้ง 2 ตำแหน่ง ทำให้ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอจากบริเวณดังกล่าว
3. มีการแทนที่หรือเปลี่ยนแปลงเบสบริเวณที่เป็นที่เกาะของไพรเมอร์ ทำให้ไพรเมอร์เกาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายไม่ได้จึงไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ
4. มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดเล็กสอดแทรกเข้ามาหรือหายไป ทำให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นเปลี่ยนแปลงไป

อย่างไรก็ตาม โพลีมอร์ฟิซึมของอาร์เอพีดีมักเกิดขึ้นในลักษณะการมีและไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ มากกว่าการเปลี่ยนขนาดของแถบดีเอ็นเอ เนื่องจากดีเอ็นเอของพืชพบทั้งจากนิวเคลียส คลอโรพลาสต์ และไมโตคอนเดรีย ในการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ทั้งหมดนำมาวิเคราะห์อาร์เอพีดี พบว่าแถบดีเอ็นเอบางส่วนประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของไมโตคอนเดรีย และน้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ มาจากดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ ดังนั้น แถบดีเอ็นเอเครื่องหมายอาร์เอพีดี (RAPD Marker) ส่วนใหญ่จึงมาจากดีเอ็นเอในนิวเคลียส ซึ่งมีการถ่ายทอดมาจากทั้งฝ่ายพ่อและฝ่ายแม่ แม้ว่าเทคนิคอาร์เอพีดีจะทำได้ง่าย รวดเร็วและให้ข้อมูลได้มาก แต่ก็มีข้อเสียในเรื่องการทดลองซ้ำ บางครั้งได้ผลที่ต่างจากเดิม เนื่องจากอาร์เอพีดีมีความไวต่อการเปลี่ยนสภาวะต่าง ๆ จึงต้องระมัดระวังและควบคุมสภาพการทดลองให้คงที่ นอกจากนี้แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากอาร์เอพีดียังแสดงการข่ม (dominant) ต่อการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ ซึ่งทำให้ไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างโฮโมไซโกตและเฮเทอโรไซโกตได้

2.2.3 เอเอฟแอลพี (AFLP, Amplified Fragment Length Polymorphism)

เอเอฟแอลพี (AFLP, Amplified Fragment Length Polymorphism) เป็นเทคนิคของเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) แบบหนึ่ง พื้นฐานของเอเอฟแอพี คือ การตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR, Polymerase Chain Reaction) ดังนั้น จึงรวมเอาความน่าเชื่อถือของเทคนิคอาร์เอฟแอลพี (RFLP, Restriction Fragment

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Length Polymorphism) และประสิทธิภาพของพีซีอาร์เข้าด้วยกัน เทคนิคเอเอฟแอลพีพัฒนาขึ้นโดย Zabeau และ Vos นักวิจัยของบริษัท Keygene N.V. ประเทศเนเธอร์แลนด์ และได้จดสิทธิบัตรในปี ค.ศ. 1993

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่มาจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทำได้โดยการเชื่อมต่อ adapter เข้าที่ปลายของชิ้นดีเอ็นเอต่อจากตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ โดย adapter เป็นดีเอ็นเอสายคู่ชิ้นสั้น ๆ ที่มีปลายด้านหนึ่งเป็นปลายเหนียวเหมือนกับปลายโมเลกุลของดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เลือกใช้ ดังนั้นจึงสามารถเชื่อมต่อกับชิ้นดีเอ็นเอที่ตัวไว้ได้โดยใช้ปลายเหนียว (sticky end ligation) และจะทำหน้าที่เป็นตำแหน่งที่จับของไพรเมอร์ในการทำพีซีอาร์ต่อไป ด้วยวิธีการดังกล่าวนี้ ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะก็จะสามารถเพิ่มปริมาณขึ้นได้โดยใช้ไพรเมอร์ซึ่งมีลำดับเบสตรงกับส่วนของ adapter รวมกับส่วนของเบสที่ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ อย่างไรก็ตาม จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ในคราวเดียวกันมีมากและไม่สามารถจะแยกจากกันหรือตรวจสอบโดยวิธีทั่ว ๆ ไป เช่น การทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ดังนั้นการสังเคราะห์ไพรเมอร์ในการทำเอเอฟแอลพี จึงเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกเข้าที่ปลาย 3' ต่อจากเบสที่ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ เพื่อให้เลือกจับกับชิ้นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสส่วนที่อยู่ต่อจากบริเวณตัดจำเพาะสอดคล้องกับเบสที่เพิ่มเข้าไปที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์นั้นเท่านั้น ทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเพียงบางส่วนและสามารถกำหนดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณได้โดยจำนวนเบสที่เพิ่มเข้าไปนั่นเอง ถ้าดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตหรือจีโนมที่ศึกษามีส่วนประกอบของเบสทั้ง 4 ชนิด (G,A,C,T) ในสัดส่วนเท่ากัน การเพิ่มเบสเข้าที่ปลาย 3' ของ ไพรเมอร์เพื่อคัดเลือก 1 เบส จะช่วยลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณเหลือเพียง 1 ใน 4 ของทั้งหมด ถ้าเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือก 2 เบส จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ตรวจสอบได้ก็จะลดลงเหลือ $(1/4)^2$ หรือ 1 ใน 16 ของชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดได้ทั้งหมดเท่านั้น ดังนั้นจึงสามารถควบคุมให้เกิดการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอในจำนวนที่เหมาะสมได้ โดยจำนวนเบสที่เพิ่มเข้าไปแต่ละเบสจะลดปริมาณชิ้นดีเอ็นเอลงเหลือ $(1/4)^n$ ของทั้งหมด (n คือ จำนวนเบสสำหรับคัดเลือกที่เพิ่มขึ้น) ในทางปฏิบัติ ต้องการให้มีจำนวนชิ้นดีเอ็นเอในช่วง 50-100 แถบ ซึ่งเป็นช่วงที่สามารถตรวจสอบได้โดยวิธี อิเล็กโทรโฟรีซิสใน denaturing polyacrylamide gel ในสิ่งมีชีวิตที่มีจีโนมขนาดเล็ก จะใช้ไพรเมอร์ที่มีการเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกจำนวนน้อย ในขณะที่ทำการตรวจสอบดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตที่มีจีโนมขนาดใหญ่หรือมีความซับซ้อนมากต้องใช้ไพรเมอร์ที่มีการเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกจำนวนมากขึ้น เพื่อปรับจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณให้มีจำนวนพอเหมาะ แบบของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์คู่หนึ่ง ๆ เรียกว่า ลายพิมพ์เอเอฟแอลพี (AFLP Fingerprint) ดังนั้นเทคนิคเอเอฟแอลพี จึงเป็นวิธีตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอวิธีหนึ่ง แถบดีเอ็นเอในลายพิมพ์ของแต่ละตัวอย่างบ่งบอกถึง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจึงสามารถใช้เครื่องหมาย เรียกว่า เครื่องหมายเอเอฟแอลพี (AFLP Marker) หรือเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA Marker) ใช้ศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตได้เช่นเดียวกับเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบอื่น

หลักการทำเอเอฟแอลพี

ขั้นแรก คือ การนำดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด นิยมใช้เอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 6 คู่เบส ซึ่งจะตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งห่างกันประมาณ 4^6 (=4,096) คู่เบส เรียกว่า Rare cutter ร่วมกับเอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 4 คู่เบส ซึ่งจะตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งห่างกันประมาณ 4^4 (=256) คู่เบส เรียกว่า frequent cutter แล้วเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับ adapter ของเอนไซม์ทั้งสองชนิด เพื่อให้เป็นที่จับของไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณโดยวิธีพีซีอาร์ในขั้นต่อไป

การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดจะทำให้ได้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอพอเหมาะ และมีข้อดีอีกหลายประการ ดังนี้

1. เอนไซม์ตัดจำเพาะที่เป็น frequent cutter จะตัดดีเอ็นเอได้ชิ้นขนาดเล็กซึ่งจะเพิ่มปริมาณได้ดีในการทำพีซีอาร์และอยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับแยกด้วยวิธี อิเล็กโทรโฟริซิสโดยใช้ denaturing polyacrylamide gel
2. เอนไซม์ตัดจำเพาะที่เป็น rare cutter มีตำแหน่งที่จะตัดดีเอ็นเอได้น้อย จึงช่วยลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณจากการทำพีซีอาร์ลง เนื่องจากชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ทั้งหมดหรือเกือบทั้งหมดเป็นชิ้นดีเอ็นเอที่มีปลายด้านหนึ่งเป็นตำแหน่งตัดของเอนไซม์ที่เป็น rare cutter และอีกด้านหนึ่งเป็น frequent cutter ชิ้นดีเอ็นเอที่มีปลายทั้ง 2 ด้านเป็นตำแหน่งของเอนไซม์แบบ frequent cutter เมื่อเชื่อมต่อกับ adapter แล้วจะมีลักษณะเป็นลำดับเบสซ้ำ (inverted repeat) เมื่อถูกทำให้เสียสภาพเป็นสายเดี่ยว จะสามารถกลับมาจับกันเองโดยเบสคู่สม เกิดเป็นโครงสร้างแบบ stem-loop ทำให้ไพรเมอร์ไม่สามารถเข้ามาจับได้ ส่วนชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดโดยเอนไซม์ที่เป็น rare cutter ทั้ง 2 ด้านมักจะมีขนาดใหญ่มาก จึงไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ในสภาวะที่ใช้ทดลอง
3. การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดในการทำพีซีอาร์ จะใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดเช่นเดียวกัน ทำให้สามารถเลือกติดฉลากที่ไพรเมอร์ชนิดใดชนิดหนึ่งได้ ดังนั้น จึงมีดีเอ็นเอที่ติดฉลากเพียงสายเดียว เมื่อนำไปแยกขนาดโดย denaturing polyacrylamide gel ดีเอ็นเอทั้ง 2 สายอาจจะเคลื่อนที่ไปได้ระยะทางไม่เท่ากัน เกิดเป็นแถบดีเอ็นเอ 2 แถบคู่กัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

(Double) การวิเคราะห์ผลจึงยุ่งยาก ในกรณีที่มีการติดฉลากเพียงสายเดียว จะตรวจพบแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวทำให้วิเคราะห์ได้ง่ายขึ้น

4. การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด ช่วยให้การปรับจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณมีความยืดหยุ่นดี โดยปรับจำนวนเบสเพื่อคัดเลือกที่ไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิดร่วมกัน
5. สามารถทำให้เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันได้จำนวนมาก โดยใช้คู่ผสมของไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิดจำนวนน้อย เช่น มีไพรเมอร์ชนิดละ 5 แบบ จากการเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือก สามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ถึง 25 แบบ เป็นต้น

การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะอาจใช้ชนิดที่เป็น rare cutter ทั้ง 2 ชนิดก็ได้ แต่จะตรวจพบชิ้นดีเอ็นเอจำนวนน้อยเฉพาะชิ้นที่มีขนาดเล็กเท่านั้น เพราะชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กจะเพิ่มปริมาณได้ดีกว่าจึงไม่ค่อยนิยม

เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ได้มีหลายชนิด เช่น *Eco*RI, *Hin*dIII, *Psl*I, *Bgl*I, *Xba*I(6-cutter) และ *Sse* 8387l(8-cutter) ร่วมกับ *Mse*I หรือ *Tag*I ซึ่งเป็น 4-cutter เอนไซม์ *Mse*I มีตำแหน่งจดจำเป็น 5'-TTAA-3'และ *Taq*I มีตำแหน่งจดจำเป็น 5'-TCGA-3'

ดีเอ็นเอของยูคาริโอทส่วนใหญ่จะมีองค์ประกอบเป็นเบส A และ T จำนวนมาก (AT rich) เอนไซม์ *Mse*I จึงตัดดีเอ็นเอได้ขนาดเล็กกว่าเอนไซม์ *Taq*I เมื่อใช้เอนไซม์ *Taq*I ชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มักไม่ค่อยสม่ำเสมอ จะปรากฏเป็นแถบขนาดใหญ่ซึ่งอยู่ส่วนบนของเจล ดังนั้นจึงนิยมใช้เอนไซม์ *Mse*I มากกว่า เพราะตัดดีเอ็นเอได้ขนาดพอเหมาะสำหรับการเพิ่มปริมาณโดยวิธีพีซีอาร์ และ การแยกโดยใช้ denaturing polyacrylamide gel ส่วนเอนไซม์ที่เป็น rare cutter ใช้ได้ทั่วไป แต่ที่ใช้เอนไซม์ *Eco*RI กันมาก เนื่องจากมีราคาถูกและการตัดดีเอ็นเอมีประสิทธิภาพดี โดยมีโอกาสพบการตัดไม่สมบูรณ์ได้น้อย

การเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและการเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่ได้กับ adapter สามารถทำพร้อมกันได้ เนื่องจาก adapter ที่สังเคราะห์ขึ้นมานั้น ออกแบบให้มีปลายที่เป็นดีเอ็นเอสายเดียวมีลำดับเบสเป็นคู่สมกับปลายเหนียวของดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เลือกใช้ แต่เบสคู่ที่อยู่ในตำแหน่งถัดมาเป็นเบสคนละชนิดกับเบสที่บริเวณจดจำของเอนไซม์ ดังนั้นเมื่อ adapter เข้าไปเชื่อมต่อกับชิ้นดีเอ็นเอแล้ว เอนไซม์ตัดจำเพาะนั้นจะไม่สามารถตัดได้อีก แต่ถ้าชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดเชื่อมต่อกลับไปใหม่จะสามารถตัดได้อีก การเชื่อมต่อ adapter โดยมีเอนไซม์ตัดจำเพาะอยู่ด้วยจึงไม่มีผลเสียใด ๆ และยังช่วยให้การตัดดีเอ็นเอเกิดได้สมบูรณ์อีกด้วย

ขั้นที่สอง คือ การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบางส่วนโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ ไพรเมอร์ที่ใช้มีลำดับเบสทางปลาย 5' เหมือนกับลำดับเบสของ adapter ต่อด้วยลำดับเบสบริเวณจดจำหรือบริเวณ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตัดจำเพาะของเอนไซม์ และ เพิ่มเบสเข้าไปที่ปลาย 3’ อีกส่วนหนึ่ง เพื่อให้เกิดการคัดเลือกเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางชิ้น ส่วนของไพรเมอร์ที่เหมือนกับ adapter และบริเวณจดจำของเอนไซม์ เรียกว่า common part ส่วนเบสที่เพิ่มเข้าไปที่ปลาย 3’ เรียกว่า selective part จำนวนเบสที่เพิ่มเข้าไปที่ปลาย 3’ จะช่วยลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณลง โดยชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณได้ ต้องมีลำดับเบสที่อยู่ต่อกับตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์สอดคล้องกับเบสที่เพิ่มเข้าไป ถ้าเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกมากขึ้น จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณจะลดลงประมาณ 4 เท่าต่อทุก ๆ เบสที่เพิ่มขึ้น ในการศึกษาจีโนมขนาดเล็กหรือโคลนที่อยู่ในพลาสมิด คอสมิดหรือ BAC (Bacterial Artificial Chromosome) ไม่จำเป็นต้องเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือก เนื่องจากจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะมีจำนวนน้อยอยู่แล้ว สิ่งมีชีวิตที่มีจีโนมขนาดไม่ใหญ่มาก เช่น แบคทีเรีย หรือเชื้อราจะเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือก 1-2 เบส ส่วนพวกที่มีจีโนมขนาดใหญ่จะเพิ่มเบสมากกว่า 2 เบสที่ไพรเมอร์ทั้งสองชนิด ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกที่ปลาย 3’ จะเรียกว่าเป็นไพรเมอร์ +1, +2, +3 และ +4 ตามลำดับ เช่น ไพรเมอร์ทางปลาย *Eco*RI adapter จะเรียกว่า *Eco*RI+1, *Eco*RI+2, *Eco*RI+3 และ *Eco*RI+4 เป็นต้น

การทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสที่ปลาย 3’ มากกว่า 2 เบส จะทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณ 2 ครั้ง ครั้งแรกเรียกว่า preselective amplification และ การทำพีซีอาร์ครั้งที่ 2 เรียกว่า selective amplification

การทำปฏิกิริยา preselective amplification เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบให้มากขึ้นและช่วยให้เกิดการคัดเลือกเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกต้อง มีการทดลองเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพียงครั้งเดียวโดยใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสเพื่อคัดเลือก +1, +2, +3 และ +4 เบสตามลำดับ พบว่าจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ลดลงเป็นลำดับจากการใช้ไพรเมอร์แบบ +1, +2 และ +3 แสดงถึงประสิทธิภาพในการคัดเลือกที่ถูกต้อง แต่ไพรเมอร์ +4 ให้ผลไม่สอดคล้องกัน สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอจำนวนมากที่ไม่ตรงกับแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณโดยไพรเมอร์ +1, +2 และ +3 แสดงว่าเกิดการจับคู่ของเบสที่ไม่จำเพาะ (mismatch) ในตำแหน่งที่อยู่ห่างจากปลาย 3’ 3 เบส หรือเบสคัดเลือกตัวแรกที่อยู่ติดกับตำแหน่งตัดจำเพาะนั่นเอง ในการทดลองต่อมาพบว่าการเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกครั้งเดียว 3 เบส ก็ทำให้เกิดการจับคู่ไม่จำเพาะของเบสที่เพิ่มขึ้นตัวแรกสุดได้เช่นเดียวกัน แต่เกิดในความถี่ต่ำ ดังนั้นถ้าต้องการเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกตั้งแต่ 3 เบสขึ้นไป จึงต้องใช้วิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 2 ครั้ง โดยครั้งแรกใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสคัดเลือกเพียง 1-2 เบส และครั้งที่ 2 จึงใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสคัดเลือกต่อจากไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในครั้งแรกอีก 1-2 เบส รวมเบสที่เพิ่มเพื่อการคัดเลือก 3-4 เบสตามที่ต้องการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็น 2 ขั้น นอกจากเป็นการประกันว่าการคัดเลือกเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของไพรเมอร์ที่ใช้เป็นไปอย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพสูงสุดแล้ว ยังช่วยลด background ที่เป็นพื้นดำในลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วย นอกจากนี้ยังอาจทำ preselective amplification โดยใช้ไพรเมอร์ที่ไม่มีเบสคัดเลือก(ไพรเมอร์ +0) ได้ในกรณีการวิเคราะห์จีโนมขนาดเล็กที่ต้องใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสคัดเลือกจำนวนน้อย เพื่อทำให้ปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มมากขึ้นและสามารถตรวจสอบแถบดีเอ็นเอได้ชัดเจนขึ้น

ขั้นสุดท้าย คือ การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้โดยทำอิเล็กโทรโฟรีซีสใน denaturing polyacrylamide gel แบบเดียวกับที่ใช้หาลำดับเบสของดีเอ็นเอ แถบดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการแยกโดยวิธีนี้อยู่ในช่วง 50-100 แถบ การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นใช้วิธีติดฉลากไพรเมอร์ ชนิดใดชนิดหนึ่งด้วยสารกัมมันตรังสี หลังจากทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเสร็จแล้ว ตรวจผลโดยการทำออโตเรดิโอกราฟ หรืออาจใช้วิธีติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (fluorescent dye) แล้วตรวจสอบโดยใช้เครื่องหาลำดับเบสแบบอัตโนมัติ (automated sequencer) ก็ได้ จากการที่ต้องตรวจสอบผลการทำเอเอฟแอลพีโดยใช้สารกัมมันตรังสีหรือใช้เครื่องหาลำดับเบสแบบอัตโนมัติ ทำให้เกิดข้อจำกัดในห้องปฏิบัติการหลายแห่ง เนื่องจากขาดประสบการณ์และระบบการปฏิบัติงานที่ใช้สารกัมมันตรังสี หรือไม่สามารถซื้อเครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติที่มีราคาแพงได้ จึงมีการประยุกต์ใช้วิธีตรวจสอบเอเอฟแอลพีด้วยการไฮบริไดเซชันโดยใช้โพรบ(probe) ที่ติดฉลากด้วยสารปลอดรังสี (non radioactive label) หรือ วิธีย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรท(silver staining) ซึ่งให้ผลเป็นที่น่าพอใจและสามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการทางดีเอ็นเอทั่วไป

ที่มาของความแตกต่างระหว่างลายพิมพ์เอเอฟแอลพี

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการทำเอเอฟแอลพี มีลักษณะเป็นลายพิมพ์แบบสุ่ม (random fingerprint) ซึ่งใช้กับดีเอ็นเอใด ๆ ก็ได้ ไม่ขึ้นกับขนาดและความซับซ้อนของจีโนม สามารถปรับให้เกิดลายพิมพ์ที่เหมาะสมได้โดยปรับจำนวนเบสคัดเลือกที่ปลาย 3’ ของไพรเมอร์ที่ใช้ แม้ว่าวิธีการทำเอเอฟแอลพีจะค่อนข้างยุ่งยาก แต่ผลที่ได้สามารถทำซ้ำได้ผลคงเดิม (reproducible) และสามารถเลือกคู่ผสมของไพรเมอร์ได้หลายแบบ ทำให้เกิดลายพิมพ์ที่แตกต่างกันจำนวนมาก ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์คู่หนึ่งนั้น จะเกิดแถบดีเอ็นเอจำนวนมากในเวลาเดียวกัน แบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างหรือโพลีมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นมาจากการเปลี่ยนแปลงเบส(point mutation) ที่ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ ทำให้ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์หายไปหรือเกิดขึ้นใหม่ หรือการเปลี่ยนแปลงของเบสที่ตำแหน่งติดกับตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตรงส่วนที่มีการเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกของไพรเมอร์ที่ใช้ ทำให้สามารถหรือไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวแล้วแต่กรณี หรืออาจเกิดจากมีชิ้นดีเอ็นเอสั้น ๆ ขาดหายไป หรือสอดแทรกเข้ามาในระหว่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ก็ได้ ผลที่เกิดขึ้น คือการมีแถบดีเอ็นเอ หรือไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งนั้น ๆ หรือชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาดเปลี่ยนไป

การถ่ายทอดลักษณะของแถบดีเอ็นเอจากการทำเอเอฟแอลพี จึงมีทั้งแบบที่แสดงลักษณะข่ม (dominance) โดยปรากฏเป็นการมีหรือไม่มีแถบดีเอ็นเอ และแบบที่แสดงลักษณะข่มร่วมกัน (codominance) โดยปรากฏเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน โดยทั่วไปจะพบเครื่องหมายเอเอฟแอลพี (AFLP Marker) แบบที่เป็นลักษณะข่มมากกว่า

ข้อดีและข้อด้อยของเทคนิคเอเอฟแอลพี

เทคนิคเอเอฟแอลพี ตั้งชื่อเลียนแบบจากเทคนิคอาร์เอฟแอลพี แต่โพลีมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่ไม่ได้เกิดจากความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอเหมือนในอาร์เอฟแอลพี จะเกิดจากการมีและไม่มีแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณขึ้น อย่างไรก็ตามเอเอฟแอลพีเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบหนึ่งซึ่งใช้ในการศึกษาทางพันธุศาสตร์ได้แบบเดียวกับเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบอื่น ๆ เช่น การศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร ศึกษาเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ความหลากหลายทางชีวภาพ และใช้ทำแผนที่ของจีโนมได้เป็นอย่างดี โดยมีข้อดีที่ได้เปรียบกว่าเทคนิคอื่น ๆ ดังนี้

1. การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคเอเอฟแอลพี ไม่ต้องการข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอเช่นเดียวกับเทคนิคอาร์เอพีดี จึงทำได้อย่างกว้างขวาง
2. ทำได้รวดเร็วและใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นจำนวนน้อย โดยอาศัยการเพิ่มปริมาณโดยวิธีพีซีอาร์จึงมีประสิทธิภาพสูง
3. ในการทำปฏิกิริยาครั้งหนึ่ง ๆ สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่ง (multi-locus) พร้อมกันคือ มี multiplex ratio สูง ในหนึ่งปฏิกิริยาจะให้แถบดีเอ็นเอมากกว่าอาร์เอพีดีประมาณ 4 เท่า
4. ทำให้เกิดโพลิมอร์ฟิซึมได้จำนวนมาก จึงสามารถใช้บอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวอย่างได้ดี ใช้ในการศึกษาเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต การจดทะเบียนลิขสิทธิ์ การตรวจสอบความเป็นลูกผสม เป็นต้น
5. ใช้กับสิ่งมีชีวิตที่มีจีโนมขนาดใดก็ได้ โดยการปรับจำนวนเบสที่ใช้คัดเลือกที่ส่วนปลาย 3’ ของไพรเมอร์ หรือใช้กับดีเอ็นเอที่โคลนไว้ก็ได้
6. รายงานของ Vos and Kuiper (1997) กล่าวว่าสามารถแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอแบบโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัสได้โดยดูจากความเข้มของแถบ จึงวิเคราะห์ผลได้แบบเดียวกับดีเอ็นเอเครื่องหมายที่แสดงการข่มแบบ codominance แต่จากรายงานอื่น ๆ จะถือว่าเครื่องหายเอเอฟแอลพีแสดงการข่มแบบ dominance

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ข้อด้อยหรือข้อจำกัดของเอเอฟแอลพี คือ

1. ค่าใช้จ่ายในการทำเอเอฟแอลพีค่อนข้างสูง วัสดุหลายอย่างมีราคาแพง วิธีการที่ใช้ค่อนข้างสลับซับซ้อนเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคอาร์เอพีดีหรือการวิเคราะห์ไมโคร แซทเทลไลท์
2. แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่แสดงการข่มแบบ dominance ซึ่งทำให้วิเคราะห์ผลได้ยากกว่าเครื่องหมายแบบที่เป็น codominance เช่น อาร์เอฟแอลพี
3. เนื่องจากการทำปฏิกิริยาครั้งหนึ่ง ๆ เกิดแถบดีเอ็นเอจำนวนมาก และมีขนาดใกล้เคียงกัน บางครั้งแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากันอาจมาจากชิ้นดีเอ็นเอคนละตำแหน่ง ทำให้การวิเคราะห์ผลผิดพลาดได้
4. เทคนิคเอเอฟแอลพีไม่เหมาะสำหรับใช้เปรียบเทียบสิ่งมีชีวิตที่มีความแตกต่างกันมาก คือ มีลำดับเบสที่เหมือนกันต่ำกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ เพราะจะมีแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน (common band) จำนวนน้อย ทำให้การวิเคราะห์ผลในแง่การหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการผิดพลาดได้
5. สำหรับสิ่งมีชีวิตที่ลำดับเบสใกล้เคียงกันมาก ก็ไม่เหมาะสมเช่นกัน เพราะจะพบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจำนวนน้อย แม้ว่าในการทำปฏิกิริยาจะทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอจำนวนมากก็ตาม

จากข้อดีของเทคนิค AFLP และข้อจำกัดของเทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) วิธีการอื่น เช่น เทคนิค RAPD ให้ผลไม่แน่นอน เทคนิค RFLP มีวิธีการที่ยุ่งยาก ใช้เวลานาน ให้ polymorphic band น้อย เทคนิค DNA sequence ถึงแม้จะเป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำสูง แต่ในการทดลองจำเป็นต้องทราบข้อมูลของ genome ที่จะทำการศึกษา และเป็นวิธีการที่เสียค่าใช้จ่ายสูง จึงทำให้ได้มีการนำเอา เทคนิค AFLP มาใช้ในการศึกษาด้านอณูวิทยามากขึ้น (Vos *et al.*, 1995) จากรายงานของ Qi *et al*. (1999) ใช้เทคนิค AFLP ศึกษาแผนที่ gene ของข้าวบาร์เลย์สายพันธุ์ RIL ซึ่งมี gene QTL ต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *Puccinia horidei* isolates 1.2.1 พบว่า gene QTL3 มีความต้านทานต่อโรคในระยะต้นกล้า และ gene QTL5 มีความต้านทานต่อโรคในระยะต้นโต จึงนำความรู้ที่ได้มา สร้างพืชต้านทานต่อโรค O'Neil *et al.* (1997) ใช้เทคนิค AFLP จำแนกสปีชีส์ของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. เชื้อสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในอัลฟัลฟ่า เนื่องจากไม่สามารถจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ เพราะมีลักษณะคาบเกี่ยวกันระหว่าง *C. trifolii* และ*C. gloeosporioides* พบว่า Arl-Nw และ 57RR คือ *C. trifolii* และ *C. gloeosporioides* ตามลำดับ Maughan *et al* .(1996) ใช้เทคนิค AFLP เพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายของถั่วเหลือง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

พันธุ์ปลูก (*Gycine max*.) และพันธุ์ป่า (*G. Soja*) จำนวน 23 ตัวอย่าง เป็นพันธุ์นำเข้า 16 ตัวอย่าง พันธุ์ปลูกในประเทศ 6 ตัวอย่าง พันธุ์ที่มียีนต้านทาน 4 ตัวอย่าง ใช้ไพรเมอร์ 15 คู่ ในการตรวจสอบพบจำนวนแถบที่มีความแตกต่างในกลุ่มของ *G .max* จำนวน 37 แถบ และแถบที่แตกต่างในกลุ่มของ *G .soja* จำนวน 147 แถบ แสดงให้เห็นว่า ถั่วเหลืองพันธุ์ป่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่า ถั่วเหลืองพันธุ์ปลูก Paul *et al.* (1997) ศึกษาความหลากหลายและความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรของชาอินเดีย และชาจากเคนยา *(Camello sinensis* (L.) C. *Kuntze*) จำนวน 32 ตัวอย่าง เป็นชาที่เก็บจากอินเดีย 15 ตัวอย่าง และชาที่เก็บจากเคนยา 17 ตัวอย่าง เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้วสามารถแบ่งชาได้เป็น 3 ชนิด คือ China type, Assam type และ Cambod type ในการทดลองใช้ไพรเมอร์ 5 คู่ พบแถบที่แตกต่างกัน 73 แถบ แถบมีขนาด 106-218 คู่เบส และเมื่อวิเคราะห์ความหลากหลายของประชากรพบว่า ชาจากเคนยามีความหลากหลายสูงกว่าชาจากอินเดีย เมื่อเปรียบเทียบความหลากหลายของกลุ่มชาพบว่า Cambod type เป็นชาที่มีความหลากหลายในสายพันธุ์ต่ำสุดเมื่อเทียบกับ China type และ Assam type เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าเทคนิค AFLP มีประสิทธิภาพสูง เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุลอื่นๆ ตัวอย่างเช่น Sharma *et al.* (1996) ใช้เทคนิค AFLP จำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมและวิวัฒนาการของถั่วฝักยาว 54 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์ 4 คู่ พบแถบดีเอ็นเอซึ่งสามารถใช้เป็นเครื่องบ่งชี้และแบ่งแยกความหลากหลายของถั่วฝักยาวสายพันธุ์ต่าง ๆ ได้มากกว่าเทคนิค RAPD Huang *et al.* (1994) เปรียบเทียบเทคนิค AFLP marker กับ RFLP marker ที่ได้จากประชากรข้าว พบว่า AFLP marker ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอสูงกว่า มีประสิทธิภาพมากกว่า และยังให้ผลที่รวดเร็วกว่าเทคนิค RFLP marker ยุคลธร (2542) ได้วิเคราะห์จีโนมของพืชโดยเทคนิค AFLP พืชในสกุล Garcinia จำนวน 22 ตัวอย่าง ประกอบด้วยมังคุด (*G. mangostana Linn*.) 11 ตัวอย่าง และพืชสกุลใกล้เคียงอีก 2 ชนิด รวม 24 ตัวอย่าง ใช้ไพรเมอร์จำนวน 10 คู่ พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันของมังคุดกับพืชสกุล Garcinia ชนิดอื่น และสกุลใกล้เคียงซึ่งสามารถใช้เป็น ดีเอ็นเอเครื่องหมายทางโมเลกุลที่จำเพาะในการจำแนกชนิดของพืชได้ กาญจนา (2544) ได้ศึกษาเครื่องหมายเชิงโมเลกุลที่ใช้บ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคขอบใบแห้งของข้าวที่เป็น Near Isogenic Line จำนวน 120 ต้นด้วยเทคนิค AFLP พบว่ามีไพรเมอร์ 12 คู่ที่สามารถบอกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งเดียวกันได้ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับประชากร bulk resistant และ bulk susceptible ที่ได้จากการรวมดีเอ็นเอ 2 กลุ่ม โดยดูทั้งจาก ฟีโนไทป์และ จากการรวมจีโนไทป์ ของดีเอ็นเอแต่ละกลุ่ม วารุณี (2544) ได้ศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่อยู่ใกล้กับยีนควบคุมความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กในถั่วเขียว จากประชากร 3 กลุ่ม กลุ่มละ 15 สายพันธุ์ โดยแต่ละกลุ่มมีจีโนไทป์ที่แตกต่างกัน จากนั้น นำมาวิเคราะห์ AFLP จากเครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มประชากร พบว่ามี 8

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

แถบที่แสดงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ทนทานและอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็ก Lin *et al.* (1996) ได้เปรียบเทียบการทำแผนที่ดีเอ็นเอถั่วเหลือง *(Glycine max)* โดยใช้เทคนิค RFLP RAPD และ AFLP พบว่าเทคนิค AFLP เหมาะสมในการนำมาทำแผนที่ดีเอ็นเอของถั่วเหลืองมากที่สุด เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างมากกว่าเทคนิคอื่นๆ Powell *et al.* (1996) วิเคราะห์แหล่งพันธุกรรมของถั่วเหลืองโดยเปรียบเทียบด้วยเทคนิค RFLP, RAPD, AFLP และ SSR ในการตรวจ expected heterozygosity และจำนวน loci ในการทดลอง multiplex ratio พบว่าเทคนิค SSR มี expected heterozygosity สูงที่สุด ในขณะที่เทคนิค AFLP มี multiplex ratio สูงสุด ส่วนการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่าเทคนิค RFLP, AFLP และ SSR แสดงความสัมพันธ์ได้สูง ทั้งในพันธุ์ปลูกและพันธุ์ป่า แต่ถ้าเปรียบเทียบเฉพาะ *Glycine max* . เท่านั้น เทคนิค RAPD และ AFLP จะให้ความสัมพันธ์ได้มากกว่าเทคนิคอื่น ๆ Yee (1999) ได้เปรียบเทียบเทคนิค RAPD และ AFLP ในการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่ว *Vigna angularis* (Azuki) เพื่อการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ พบว่าในการใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วย วิธี RAPD 57 แถบ และวิธี AFLP 214 แถบ และมีค่าเฉลี่ยในการเกิดแถบในลักษณะ polymorphic จากวิธี RAPD และ AFLP เป็น 3.2 และ 11.3 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเทคนิค AFLP มีประสิทธิภาพสูงกว่าเทคนิค RAPD ในการเพิ่มแถบดีเอ็นเอ

สุรินทร์ (2545) ได้สรุปการเปรียบเทียบเทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เทคนิค RFLP, RAPD และ SSR (micro satellite) ในด้านต่าง ๆ ไว้ดังนี้

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบเทคนิคของเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบต่าง ๆ (สุรินทร์ ,2545)

	RFLP	**RAPD**	**SSR**	**AFLP**
Principle	Restriction endonuclease digestion, Southern blotting hybridization	DNA amplification with random primers	PCR of simple sequence repeat regions	PCR of subset of restriction fragments from extended adapter primers
Abundance in the genome	High	Very high	Medium	High
Level of polymorphism	Medium	Medium	High	Medium

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2 (ต่อ)

	RFLP	**RAPD**	**SSR**	**AFLP**
Dominance	Co-dominant	Dominant	Co-dominant	Mixed
Multiplex ratio	1-2	5-20, adjustable	1	30-100, adjustable
DNA amt. required	2-10 μg.	10-25 ng.	50-100 ng.	1-2 μg.
DNA sequence information	No	No	Yes	No
Radioactive detection	Yes/No	No	Yes/No	Yes/No
Development cost	Medium	Low	High	Medium
Start-up costs	Medium/High	Low	High	Medium

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved