บทที่ 5

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน (Electroporation) ระหว่าง *E. coli* สายพันธุ์ HB101 กับพลาสมิด pUC18 โดยใช้เครื่องอิเล็กโทรพอเรชันที่ให้กำเนิดคลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยม (Square wave pulse)

จากรายงานของนักวิทยาศาสตร์ได้มีการนำเครื่องอิเล็กโทรพอเรชันที่ให้กำเนิดคลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยมมาใช้ในการทรานสฟอร์เมชัน และได้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันสูง ดังได้กล่าวมาแล้วในบทนำ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้นำเครื่องหลอมเซลล์ด้วยไฟฟ้าที่ให้กำเนิดคลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยมจากโครงการการหลอมเซลล์มาใช้ในกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชัน โดยทำการต่อกับห้องบรรจุเซลล์ที่มีระยะห่างระหว่างขั้ว 0.1 cm แล้วทำการแบ่งการศึกษาปัจจัยออกเป็น 2 หัวข้อใหญ่ ๆ ตามชนิดของสารละลายอิเล็กโทรพอเรชัน (Electroporation solution) ได้แก่ สารละลาย PEG4000 ความเข้มข้น 10% ที่มี $CaCl_2$ ความเข้มข้น 500 mM และสารละลายกลีเซอรอล (glycerol) ความเข้มข้นต่างๆกัน จากการทดลองบทที่ 3 สารละลายอิเล็กโทรพอเรชันทั้ง 2 ชนิดนี้นำมาผสมกับ *E. coli* HB101 และพลาสมิด pUC18 แล้วให้สนามไฟฟ้าความเข้มต่าง ๆ หลังจากนั้นนำไปใส่ใน SOC medium ปริมาตร 500 µl ในขั้นตอนที่เรียกว่า Precultivation ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, เขย่า 300 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วกระจายเชื้อลงในจานอาหารคัดเลือกที่ผสมยาแอมพิซิลลิน (50 µg/ml) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน นับโคโลนีที่เกิดขึ้น แล้วคำนวณประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชัน จากนั้นวิเคราะห์ผลและสรุปผลการทดลอง

การศึกษาผลของสารละลายอิเล็กโทรพอเรชันที่ประกอบไปด้วย PEG4000 ความเข้มข้น 10% ที่มี $CaCl_2$ ความเข้มข้น 500 mM ต่อประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน

โดยการศึกษาครั้งนี้ได้เน้นการศึกษาผลของปัจจัยทางด้านไฟฟ้าต่อการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน ดังรายละเอียดตามหัวข้อต่อไปนี้

1. การศึกษาผลของความเข้มสนามไฟฟ้าและเวลาต่อการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน

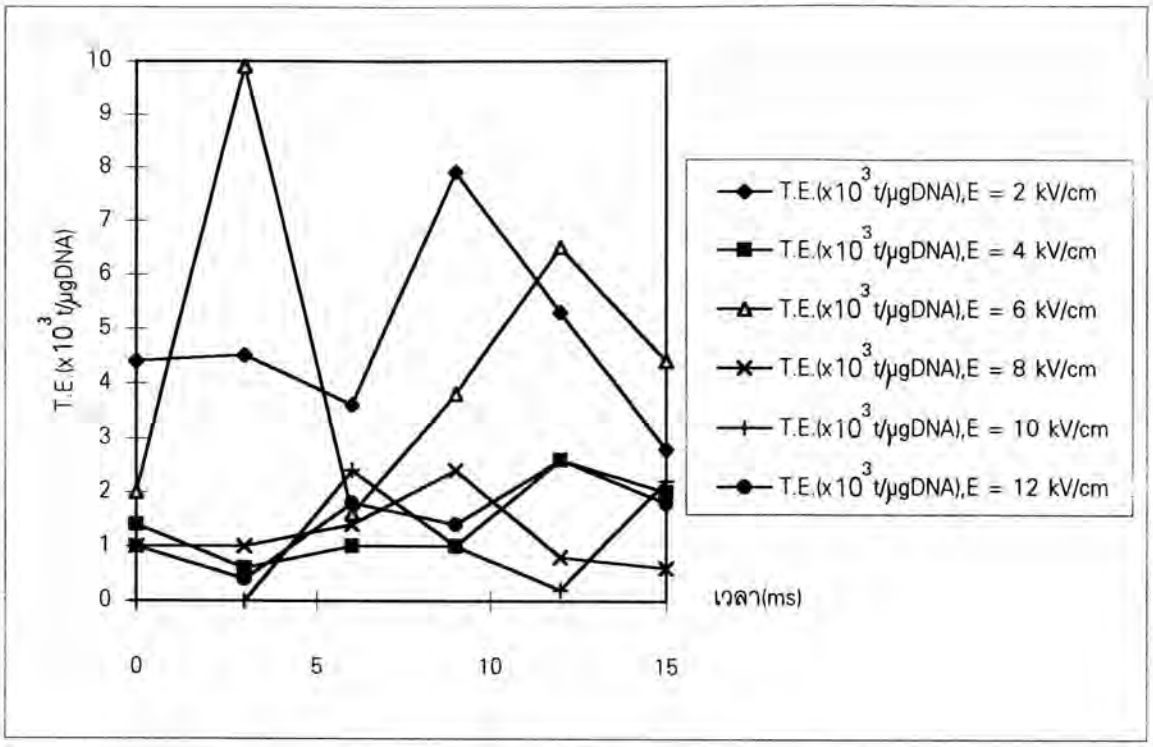
ในการศึกษาผลของสนามไฟฟ้าได้แปรความเข้มสนามไฟฟ้าในช่วง 2-12 kV/cm พร้อมทั้งแปรเวลาที่ให้ในช่วง 0-15 ms โดยใช้ภาวะ *E. coli* HB101 (50 µl) ผสมกับ pUC18 ปริมาณ 6.32 ng แล้วรวมกับ PEG4000 ความเข้มข้น 10% ที่มี $CaCl_2$ ความเข้มข้น 500 mM (50 µl) กดกระตุ้น 1 pulse ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 5.1 และรูปที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันระหว่าง *E. coli* HB101 กับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 6.32 ng ที่ภาวะสนามไฟฟ้าความเข้มและเวลาต่างๆ กัน กดกระตุ้น 1 ครั้ง ในสารละลาย PEG4000 ความเข้มข้น 10% ที่มี $CaCl_2$ ความเข้มข้น 500 mM (50 µl)

สนามไฟฟ้า (kV/cm)	เวลา (ms)	โคโลนี (400 µl)	T.E. ($x10^3$ t/µg DNA)
2	0	22	4.4
	3	23	4.5
	6	18	3.6
	9	40	7.9
	12	27	5.3
	15	14	2.8
4	0	7	1.4
	3	3	0.6
	6	5	1.0
	9	5	1.0
	12	13	2.6
	15	10	2.0
6	0	10	2.0
	3	50	9.9
	6	8	1.6
	9	19	3.8
	12	33	6.5
	15	22	4.4
8	0	5	1.0
	3	4	1.0
	6	7	1.4
	9	12	2.4
	12	4	0.8
	15	3	0.6

ตารางที่ 5.1 (ต่อ) ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันระหว่าง *E. coli* HB101 กับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 6.32 ng ที่ภาวะสนามไฟฟ้าความเข้มและเวลาต่าง ๆ กัน กดกระตุ้น 1 ครั้ง ในสารละลาย PEG4000 ความเข้มข้น 10% ที่มี $CaCl_2$ ความเข้มข้น 500 mM (50 µl)

สนามไฟฟ้า (kV/cm)	เวลา (ms)	โคโลนี (400 µl)	T.E. ($x10^3$ t/µg DNA)
10	0	0	0
	3	0	0
	6	12	2.4
	9	5	1.0
	12	1	0.2
	15	11	2.2
12	0	5	1.0
	3	2	0.4
	6	9	1.8
	9	7	1.4
	12	13	2.6
	15	9	1.8



รูปที่ 5.1 ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันระหว่าง *E. coli* HB101 กับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 6.32 ng ที่ภาวะสนามไฟฟ้าความเข้มและเวลาต่าง ๆ กดกระตุ้น 1 ครั้ง ในสารละลาย PEG4000 ความเข้มข้น 10% ที่มี $CaCl_2$ ความเข้มข้น 500 mM (50 μl)

จากตารางที่ 5.1 และรูปที่ 5.1 จะเห็นได้ว่าที่ภาวะสนามไฟฟ้าความเข้ม 6 kV/cm เวลา 3 ms ให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันเท่ากับ 9.9 x 10^3 t/μg DNA ในขณะที่ภาวะที่ไม่ให้สนามไฟฟ้าให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันอยู่ในช่วง 0 - 4.4 x 10^3 t/μg DNA

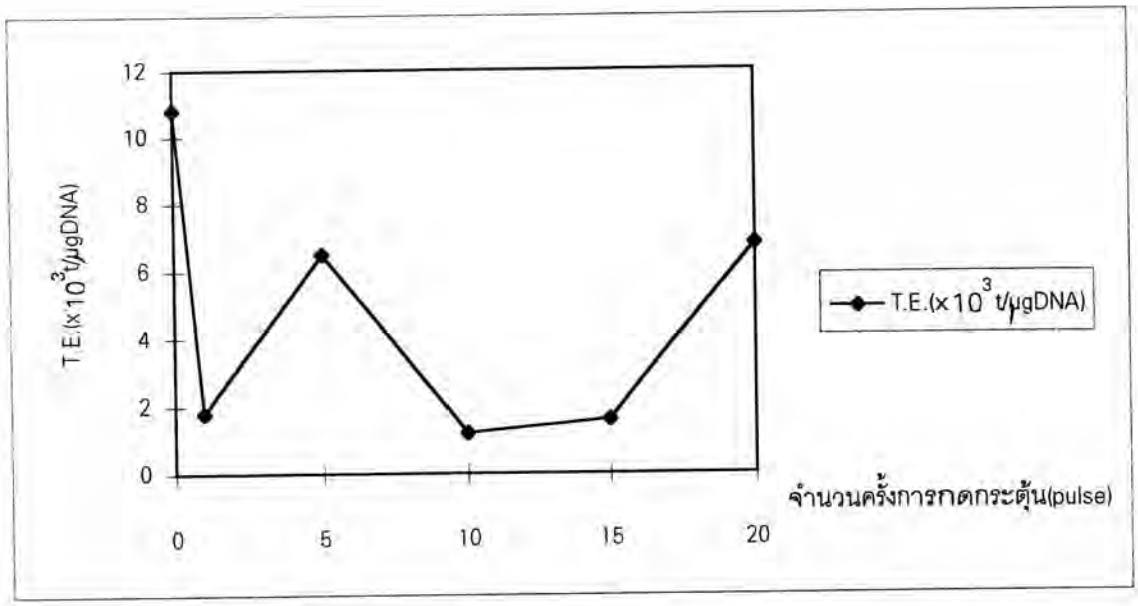
อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาผลการทดลองในตารางที่ 5.1 และรูปที่ 5.1 ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันเป็นผลจากสนามไฟฟ้าและเวลาที่ให้เท่านั้น แต่ยังมีปัจจัยอื่นที่อาจมีผลร่วมด้วยคือ สารละลาย PEG4000 ความเข้มข้น 10% ที่มี $CaCl_2$ ความเข้มข้น 500 mM (50 μl) ดังจะเห็นได้ว่าเมื่อใส่แต่สารละลาย PEG4000 ความเข้มข้น 10% ที่มี $CaCl_2$ ความเข้มข้น 500 mM (50 μl) ก็เกิดการทรานสฟอร์เมชันได้ แต่อย่างไรก็ตามการให้ สนามไฟฟ้าความเข้ม 6 kV/cm เป็นเวลา 3 ms มีแนวโน้มให้ผลที่ดีจึงนำไปใช้ในการทดลองหัวข้อต่อไป

2. การศึกษาผลของจำนวน pulse ต่อการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน

ในการทดลองนี้ ได้แปร จำนวน pulse ตั้งแต่ 0 - 20 pulses ที่ภาวะสนามไฟฟ้าความเข้ม 6 kV/cm เป็นเวลา 3 ms และใช้ *E. coli* HB101 ร่วมกับ pUC18 ปริมาณ 6.32 ng แล้วผสมกับสารละลาย PEG4000 ความเข้มข้น 10% ที่มี $CaCl_2$ ความเข้มข้น 500 mM (50 µl) ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 5.2 และรูปที่ 5.2

ตารางที่ 5.2 ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันระหว่าง *E. coli* HB101 กับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 6.32 ng และสารละลาย PEG4000 ความเข้มข้น 10% ที่มี $CaCl_2$ ความเข้มข้น 500 mM (50 µl) ที่ภาวะสนามไฟฟ้าความเข้ม 6 kV/cm เป็นเวลา 3 ms จำนวน pulse ต่าง ๆ กัน

จำนวนครั้งการกดกระตุ้น (pulses)	โคโลนี (400 µl)	T.E. ($x10^3$ t/µg DNA)
0	55	10.8
1	9	1.8
5	33	6.5
10	6	1.2
15	8	1.6
20	32	6.3



รูปที่ 5.2 ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน ระหว่าง *E. coli* HB101 กับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 6.32 ng และสารละลาย PEG4000 ความเข้มข้น 10% ที่มี $CaCl_2$ ความเข้มข้น 500 mM (50 μl) ที่ภาวะสนามไฟฟ้าความเข้ม 6 kV/cm เป็นเวลา 3 ms จำนวน pulse ต่าง ๆ กัน

จากตารางที่ 5.2 และรูปที่ 5.2 จะเห็นได้ว่า ที่ภาวะไม่ให้สนามไฟฟ้ายังสามารถให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันสูงถึง 10.8 x 10^3 t/μg DNA ซึ่งเป็นค่าที่สูงสุดในตารางที่ 5.2 แต่ที่ภาวะการให้สนามไฟฟ้ากลับทำให้ค่าประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันลดลง

จากการทดลองในหัวข้อที่ 1 และ 2 สามารถสรุปได้ว่า ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันที่เกิดขึ้นนั้นเกิดจากสารละลายอิเล็กโทรพอเรชัน (PEG4000 ความเข้มข้น 10% ที่มี $CaCl_2$ ความเข้มข้น 500 mM) มากกว่าที่เป็นผลมาจากสนามไฟฟ้าที่ให้เข้าไป พร้อมกันนี้ได้มีการตรวจสอบโดยดูความต่างศักย์ไฟฟ้าตกคร่อมที่ผ่านสารละลาย PEG4000 ความเข้มข้น 10% ที่มี $CaCl_2$ ความเข้มข้น 500 mM จากออสซิลโลสโคปดังรายละเอียดในบทที่ 3 พบว่ามีค่าต่ำกว่าค่าที่ตั้งไว้มาก นี่ก็เป็นเหตุผลที่ทำให้ทราบว่า การทรานสฟอร์เมชันที่เกิดขึ้นระหว่าง *E. coli* HB101 กับ

พลาสมิด pUC18 เป็นผลจากสารละลายอิเล็กโทรพอเรชัน (Electroporation solution)เป็นหลัก แต่จากการทดลองนี้เองทำให้ได้วิธีการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีการใช้สารละลาย PEG4000 ความเข้มข้น 10% ที่มี $CaCl_2$ ความเข้มข้น 500 mM ซึ่งจัดเป็นการทรานสฟอร์เมชันโดยใช้สารเคมี และได้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันระหว่าง *E. coli* HB101 กับพลาสมิด pUC18 ประมาณ 10^3 t/µg DNA ซึ่งมีค่ายังไม่มากนักแต่ถ้าพัฒนาต่อไปก็จะมีประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันที่สูงขึ้นแต่ในการงานวิจัยนี้ต้องการศึกษาผลของสนามไฟฟ้าต่อประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน จึงได้ทำการวิจัยต่อในหัวข้อต่อไป

การศึกษาผลของสารละลายอิเล็กโทรพอเรชันที่ประกอบไปด้วย กลีเซอรอล (Glycerol) ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ต่อประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน

จากการทดลองในบทที่ 3 พบว่า กลีเซอรอลเป็นสารละลายที่ทำให้เกิดความต่างศักย์ไฟฟ้าตกคร่อมสารละลายได้สูง ยิ่งความเข้มข้นของกลีเซอรอลสูงยิ่งทำให้ได้สนามไฟฟ้าสูงขึ้น นั่นคือ ความต้านทานไฟฟ้าของสารละลายกลีเซอรอลมีค่าสูงนั่นเอง และได้มีรายงานของ Cavin และ Hanawalt ในปี ค.ศ. 1988 ได้มีการใช้ สารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 10 และ 15% ผสมกับสารละลาย 0.2 mM K_2HPO_4 (pH7.5) ในกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชัน และยังไม่มีรายงานใด ๆ ที่ศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการแปรความเข้มข้นสารละลายกลีเซอรอลในกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชัน ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงทำการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายกลีเซอรอลที่มีผลต่อประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน พร้อมทั้งศึกษาปัจจัยอื่น ดังรายละเอียดตามหัวข้อดังนี้

1. การศึกษาผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลตั้งแต่ 10-100% ต่อประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน กับคลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยม(Square wave pulse: SP)

ได้ทำการแปรความเข้นข้นของกลีเซอรอลตั้งแต่ 10-100% แล้วผ่านสนามไฟฟ้าความเข้ม 6 kV/cm เป็นเวลา 3 ms, กดกระตุ้น 1 pulse ทำการทดลอง 5 ซ้ำ โดยใส่สารละลาย S1 (ปริมาตรเซลล์ *E. coli* HB101 (V) : ปริมาตรกลีเซอรอล (V) เท่ากับ 1 : 1) และ S2 (ปริมาตรเซลล์ *E. coli* HB101 (V) : ปริมาตรกลีเซอรอล (V) เท่ากับ 1 : 5) ทำการทดลองโดยทำ 5 ซ้ำ โดยใส่สารละลาย S1, S2 ที่ผสมกับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 6.32 ng ครั้งละ 10 µl (ปริมาตร 10 µl นี้ ให้สนามไฟฟ้าสูงและเหมาะสมกับช่องใส่เซลล์ (Chamber)) แล้วรวมกันเลี้ยงใน SOC medium ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 5.3

ตารางที่ 5.3 ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันของ ปริมาตร *E. coli* HB101 : ปริมาตรกลีเซอรอลความเข้มข้นต่างๆ (S1 = 1:1, S2 = 1:5) ปริมาตร 50 µl กับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 6.32 ng ที่สนามไฟฟ้าความเข้ม 6 kV/cm เป็นเวลา 3 ms, 1 pulse

ความเข้มข้นกลีเซอรอล (%)	S1		S2	
	โคโลนี (200 µl)	T.E. ($x10^3$ t/µg DNA)	โคโลนี (200 µl)	T.E. ($x10^3$ t/µg DNA)
10	0	0	0	0
20	0	0	0	0
30	0	0	0	0
40	0	0	0	0
50	0	0	0	0
60	0	0	0	0
70	0	0	0	0
80	0	0	0	0
90	0	0	0	0
100	0	0	0	0

จากตารางที่ 5.3 จะเห็นว่าไม่เกิดการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน (SP) ที่ภาวะใดๆ แสดงให้เห็นว่าสารละลายกลีเซอรอล โดยตัวมันเองไม่ทำให้เกิดการทรานสฟอร์เมชัน ถึงแม้จะให้สนามไฟฟ้าเข้าไปก็ยังไม่ทำให้เกิดการทรานสฟอร์เมชันใน *E. coli* HB101กับพลาสมิด pUC18 ในการทดลองขั้นต่อไปได้เลือกกลีเซอรอลความเข้มข้น 80% เนื่องจากมีความเข้มข้นที่สูงและเหมาะสมในการผสมกับ *E. coli* HB101 ไปศึกษาอิทธิพลของสนามไฟฟ้าและเวลา ต่อการทรานสฟอร์เมชัน

2. การศึกษาผลของความเข้มสนามไฟฟ้าและเวลาในสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 80% ต่อการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน (SP)

โดยการทดลองปริมาตรเซลล์ *E. coli* HB101 ต่อปริมาตรกลีเซอรอล ความเข้มข้น 80% ตามหัวข้อ 1 ปริมาตร 50 µl ผสมกับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 6.32 ng แล้วผ่านสนามไฟฟ้าความเข้ม 6 และ 12 kV/cm เวลาตั้งแต่ 0.5 - 15 ms, 1 pulse (ผ่านสนามไฟฟ้าครั้งละ 10 µl, 5 ครั้ง) ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 5.4

ตารางที่ 5.4 ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันของปริมาตรเซลล์ *E. coli* HB101 ในสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 80% ของ S1 และ S2 ปริมาตร 50 µl กับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 6.32 ng ที่สนามไฟฟ้าและเวลาต่างๆกัน , 1 pulse

สารละลาย (50 µl)	เวลา (ms)	E = 6 kV/cm		E = 12 kV/cm	
		โคโลนี (200 µl)	T.E. ($x10^3$ t/µg DNA)	โคโลนี (200 µl)	T.E. ($x10^3$ t/µg DNA)
S1	0	0	0	0	0
	0.5	0	0	0	0
	1	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
	5	0	0	0	0
	7	0	0	0	0
	9	0	0	0	0
	11	0	0	0	0
	13	0	0	0	0
	15	0	0	0	0

ตารางที่ 5.4 (ต่อ) ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันของปริมาตรเซลล์ *E. coli* HB101 ในสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 80% ของ S1 และ S2 ปริมาตร 50 µl กับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 6.32 ng ที่สนามไฟฟ้าและเวลาต่างๆกัน , 1 pulse

สารละลาย (50 µl)	เวลา	E = 6 kV/cm		E = 12 kV/cm	
	(ms)	โคโลนี (200 µl)	T.E. ($x10^3$ t/µg DNA)	โคโลนี (200 µl)	T.E. ($x10^3$ t/µg DNA)
S2	0	0	0	0	0
	0.5	0	0	0	0
	1	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
	5	0	0	0	0
	7	0	0	0	0
	9	0	0	0	0
	11	0	0	0	0
	13	0	0	0	0
	15	0	0	0	0

จากตารางที่ 5.4 จะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันเท่ากับ 0 t/μg DNA จากการทดลองในหัวข้อ 1 และ 2 นี้ ทำให้ทราบว่า การใช้เครื่องอิเล็กโทรพอเรชันที่ให้กำเนิดคลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยม (Square wave pulse) กับสารละลายกลีเซอรอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ไม่ก่อให้เกิดกระบวนการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน

สรุป

การทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันระหว่าง *E. coli* HB101 กับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 6.32 ng และใช้เครื่องอิเล็กโทรพอเรชันที่ให้กำเนิดคลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยมที่นำเครื่องหลอมเซลล์ที่ให้กำเนิดคลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยมมาใช้ในกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชัน พบว่า ถ้าใช้สารละลายอิเล็กโทรพอเรชัน ที่ประกอบด้วย PEG4000 ความเข้มข้น 10% ที่มี $CaCl_2$ ความเข้มข้น 500 mM แล้วแปรค่าสนามไฟฟ้าและเวลา เห็นได้ว่าภาวะที่ไม่ให้สนามไฟฟ้าให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันใกล้เคียงหรือสูงกว่าภาวะที่ให้สนามไฟฟ้า คือเท่ากับ 10^3 t/μg DNA ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันที่เกิดขึ้นเป็นผลจากสารละลาย PEG4000 ความเข้มข้น 10% ที่มี $CaCl_2$ ความเข้มข้น 500 mM

แต่ถ้าใช้สารละลายอิเล็กโทรพอเรชัน ที่ประกอบไปด้วยสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้นต่าง ๆ กัน แล้วแปรค่าสนามไฟฟ้าและเวลา จะเห็นได้ว่า ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันเท่ากับ 0 ทั้งภาวะที่มีและไม่มีสนามไฟฟ้า ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองในบทต่อไปโดยการใช้เครื่องอิเล็กโทรพอเรชันที่ให้กำเนิดคลื่นรูปพัลส์ที่ลดลงแบบเอกซ์โพเนนเชียล