บทที่ 1
บทนำ

พันธุวิศวกรรม (Genetic Engineering) หรือ รีคอมบิแนนท์ ดีเอ็นเอเทคโนโลยี (Recombinant DNA technology) คือ กระบวนการตัดต่อหรือเปลี่ยนแปลงยีน (Gene) หรือดีเอ็นเอ (DNA) ในหลอดทดลอง เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบส (Base) เป็นไปตามความต้องการ และนำดีเอ็นเอที่ต้องการเข้าไปสู่เซลล์เจ้าบ้าน (Host cell) ซึ่งอาจเป็นเซลล์พืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์ เพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะของสิ่งมีชีวิตตามต้องการ เช่น เพิ่มผลผลิตของโปรตีนที่หายากและมีราคาแพง เช่น อินซูลิน เป็นต้น

ขั้นตอนของการทำพันธุวิศวกรรม

โดยทั่วไปสามารถสรุปได้ดังนี้ (Sambrook , Fritsch and Maniatis , 1989)

1. การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอที่เราต้องการ ได้มาจากแหล่งต่าง ๆ เช่น สกัดจากเนื้อเยื่อ, สังเคราะห์จาก Messenger RNA (mRNA) หรือ สังเคราะห์ขึ้นโดยวิธีเคมี

2. การเชื่อมดีเอ็นเอ เข้ากับโมเลกุลดีเอ็นเอพาหะ (Vector DNA) เพื่อจะได้เพิ่มจำนวนได้ในเซลล์เจ้าบ้าน (Host cell) โดยใช้คุณสมบัติของดีเอ็นเอพาหะ ในการที่สามารถจำลองตัวเองได้ หรือกล่าวคือ มีจุดเริ่มต้นในการจำลองตัวเอง (Origin of replication)

ดีเอ็นเอพาหะ มี 4 ชนิด คือ

- พลาสมิด (Plasmid) ซึ่งใช้ในการนำ DNA ขนาด 1000-5000 เบส (base) เข้าเซลล์แบคทีเรีย เช่น pBR322 และ pUC18
- เฟจ (Phage) ซึ่งใช้ในการนำ DNA ขนาด 5-20 กิโลเบส (kilobase) เข้าเซลล์แบคทีเรีย
- ไวรัส (Virus) ซึ่งใช้กับเซลล์พืชและสัตว์
- คอสมิด (Cosmid) ซึ่งใช้ในการนำ DNA ขนาด 30-40 กิโลเบส (Kilobase) ซึ่งเป็น DNA ขนาดใหญ่มากเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

3. วิธีการนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (Introduction of recombinant DNA into host cell)

เซลล์เจ้าบ้าน ควรเป็นแบคทีเรียที่ปราศจากอันตรายต่อมนุษย์ ตัวอย่างของแบคทีเรียที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านที่สำคัญได้แก่ *E. coli* ซึ่งพันธุกรรมของแบคทีเรียตัวนี้ได้มีการศึกษาและมีรายงานชัดเจน การนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านมี 3 วิธี(Sambrook et al., 1989)ดังนี้

- การทรานสฟอร์เมชัน (Transformation) เป็นกระบวนการเคลื่อนย้าย ดีเอ็นเอสายผสมเข้าเซลล์แบคทีเรีย

- การทรานสเฟกชัน (Transfection) เป็นกระบวนการเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอสายผสมที่เป็นดีเอ็นเอจากฟาจหรือไวรัส เข้าเซลล์

- การทรานสดักชัน (Transduction) เป็นการเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอสายผสมที่เป็นดีเอ็นเอจากฟาจหรือไวรัสไปสร้างเป็นตัวไวรัสโดยรวมกับโปรตีนห่อหุ้มในหลอดทดลอง เรียกว่า In vitro packaging แล้วนำตัวฟาจหรือไวรัส ไปบุกรุกเซลล์เจ้าบ้าน

4. การคัดเลือกเซลล์ที่มีดีเอ็นเอสายผสม เนื่องจากไม่สามารถใส่ดีเอ็นเอสายผสม เข้าไปในเซลล์เจ้าบ้านทุกตัว เพราะฉะนั้น จึงต้องมีวิธีคัดเลือกเฉพาะเซลล์เจ้าบ้านที่รับดีเอ็นเอสายผสม

การคัดเลือก มี 3 วิธี

- ใช้เทคนิค Nucleic acid hybridization

- ใช้เทคนิค Antigen - Antibody Reaction

- ใช้เทคนิค Phenotype โดยดูความเปลี่ยนแปลงของเซลล์เจ้าบ้าน เช่น สี และการต้านยาปฏิชีวนะ

ในการพัฒนาพันธุวิศวกรรมหรือรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอเทคโนโลยี กระบวนการเคลื่อนย้ายยีนเพื่อเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านมีความสำคัญ เพราะยีนที่เราสร้างขึ้น (Recombinant DNA) จะแสดงออกให้เราเห็นเมื่อเข้าไปในเซลล์เจ้าบ้าน ปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคใหม่ ๆ ขึ้นมาเพื่อจะได้ มีความสะดวก รวดเร็ว และให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันสูงสุด

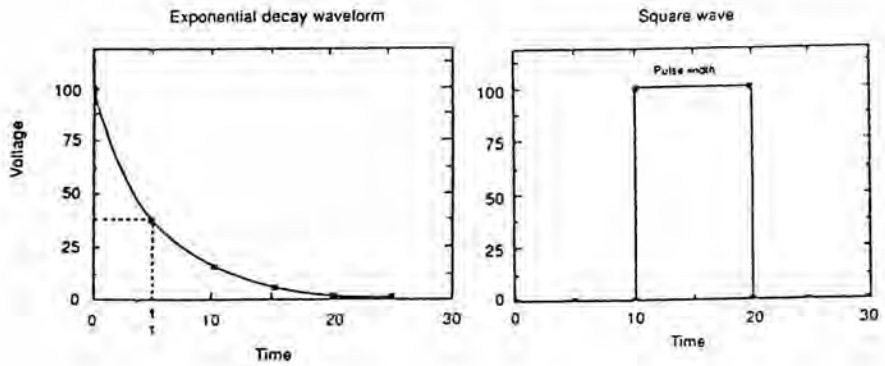
การนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

การเหนี่ยวนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่แบคทีเรียโดยวิธีการทรานสฟอร์เมชัน เป็นขั้นตอนที่จำเป็นสำหรับการสร้างสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีดีเอ็นเอสายผสมที่ต้องการ การทรานสฟอร์เมชันสามารถเกิดขึ้นได้โดยธรรมชาติ (natural) และการเหนี่ยวนำ (induction) การทรานสฟอร์เมชันใน

แบคทีเรียได้ถูกพบครั้งแรกโดย Griffith ในปี ค.ศ. 1928 (Griffith, 1928 cited by Chassy, Merecenier, and Flickinger, 1988) ซึ่งได้บรรยายกลไกนี้ ก่อนการค้นพบดีเอ็นเอหรือสารพันธุกรรม (Genetic material)โดยค้นพบว่าการผสมเซลล์แบคทีเรีย *Streptococcus pneumoniae* ซึ่งมีลักษณะผิวหน้าโคโลนีเรียบและก่อให้เกิดโรคปอดบวม ที่ถูกฆ่าตายแล้วกับเซลล์แบคทีเรีย *Streptococcus pneumoniae* ซึ่งมีลักษณะผิวหน้าโคโลนีหยาบและไม่ทำให้เกิดโรคที่มีชีวิตพบว่าสามารถทำให้เซลล์แบคทีเรีย *Streptococcus pneumoniae* ซึ่งมีลักษณะผิวหน้าโคโลนีหยาบและไม่ทำให้เกิดโรคกลายเป็นชนิดผิวหน้าโคโลนีเรียบและก่อให้เกิดโรค นี่ก็คือปรากฏการณ์การทรานสฟอร์เมชัน การทรานสฟอร์เมชันสามารถเกิดได้ทั้งตามธรรมชาติ เช่น การคอนจูเกชัน (Conjugation) ในแบคทีเรียหรือโดยการเหนี่ยวนำโดยใช้สารเคมีที่นิยมใช้กันในปัจจุบัน คือ แคลเซียมคลอไรด์ (Hanahan, 1983) และ DMSO (Hanahan, 1983) ซึ่งช่วยทำให้มีการซึมของดีเอ็นเอผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้มากขึ้น เรียกภาวะเซลล์ที่มีการซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ดีว่า คอมพีเท็นเซลล์ (Competent cell) อันจะก่อให้เกิดการทรานสฟอร์เมชันสูงขึ้น ในปัจจุบันได้มีเทคนิคการทรานสฟอร์เมชันแบบใหม่ ที่ให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันสูง และทำให้เกิดการทรานสฟอร์เมชันในแบคทีเรียได้มากชนิดขึ้นพร้อมทั้งเซลล์พืชและเซลล์สัตว์ เทคนิคนี้ก็คืออิเล็กโทรพอเรชัน (Electroporation)

อิเล็กโทรพอเรชัน (Electroporation)

อิเล็กโทรพอเรชัน คือการให้สนามไฟฟ้า (มี 2 รูปแบบที่นิยมใช้คือ สนามไฟฟ้าที่เกิดจากคลื่นรูปพัลส์ที่ลดลงแบบเอกซ์โพเนนเชียล (Exeponential decaying pulse : EP) และสนามไฟฟ้าที่เกิดจากคลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยม (Square wave pulse : SP) ดังแสดงในรูปที่ 1.1)หรือความต่างศักย์ไฟฟ้าที่มีค่าสูงในช่วงเวลาสั้น ๆ ทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ก่อให้เกิดการซึมผ่านของสารต่าง ๆ เช่น ดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ การเกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์นี้จะเกิดขึ้นชั่วคราวสามารถใช้กระบวนการนี้กับการทรานสฟอร์เมชันในแบคทีเรีย กระบวนการอิเล็กโทรพอเรชันนี้มีความสะดวก ง่าย รวดเร็ว และให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันสูง (Chassy et al., 1988)



รูปที่ 1.1 คลื่นรูปพัลส์ที่ใช้ในกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชัน

ที่มา : Shigekawa and Dower, 1988

การทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน(Electroporation) , Electrotransformation หรือ Electropermeabilization ในแบคทีเรียได้มีการทดลองครั้งแรกในแบคทีเรียชนิด *Bacillus cereus* (Shivarova et al., 1983 cited by Chassy et al, 1988) โดยการนำ ดีเอ็นเอ เข้าสู่ *Bacillus cereus* ที่ไม่ได้ผ่านการทำให้เป็นโพรโทพลาสท์ (Protoplast) พบว่าได้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันดีกว่าการใช้โพรโทพลาสท์ถึง 10 เท่า หลังจากนั้นได้มีการนำเทคนิคนี้มาใช้กับแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ และภายใต้ภาวะต่าง ๆ กันมากมายดังตัวอย่างต่อไปนี้

Calvin และ Hanawalt (1988) ได้ทดลองนำพลาสมิด pUC18 เข้าสู่ *Escherichia coli* K12 โดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน สารละลายที่ใช้ คือ 10% กลีเซอรอลและ 0.2 mM K_2HPO_4 (pH = 7.5) และให้สนามไฟฟ้าที่เกิดจากคลื่นรูปพัลส์ที่ลดลงแบบเอกซ์โพเนนเชียล (EP) เท่ากับ 14.3 kV/cm ให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันเท่ากับ 1.8×10^7 t/µg DNA (transformant/µg DNA)

Miller, Dower และ Tompkins (1988) ได้ทดลองนำพลาสมิดเข้าสู่ *Campylobacter jejuni* สารละลายที่ใช้ คือ 272 mM sucrose, 15% glycerol, 2.43 mM K_2HPO_4 และ 0.57 mM KH_2PO_4 (pH 7.4) และให้สนามไฟฟ้า (EP) ความเข้ม 13 kV/cm เป็นเวลา 2 ms ให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันเท่ากับ 1×10^6 t/µg DNA ซึ่งเมื่อใช้สนามไฟฟ้า (EP) ความเข้ม 5.25 kV/cm และใช้เวลา 30 ms ก็ยังคงให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันเท่ากัน

Dower, Miller และ Ragsdale (1988) ทดลองโดยการนำพลาสมิด pUC18 และ pBR322 เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ LE392 และ DH5α ด้วยการให้สนามไฟฟ้า (EP) ความเข้ม

12.5 kV/cm ใช้เวลา 4.5-5 ms ได้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันเท่ากับ 1-8 x 10^9 t/µg DNA

Cymbalyuk และคณะ (1988) ได้ทดลองนำพลาสมิด pBR322 เข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ MH1, HB101 และ DH1 ที่แขวนลอยในสารละลาย B (10 mM Tris , pH 8.0 , 10 mM $MgSO_4$ และ 10% sucrose) แล้วให้สนามไฟฟ้า (EP) ความเข้ม 10 kV/cm ใช้เวลา 1.5 ms ได้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันเท่ากับ 4 x 10^6 t/µg DNA

Taketo (1988) ได้ทำการทดลอง อิเล็กโทรพอเรชัน ระหว่าง *E. coli* C กับพลาสมิด pBR322 โดยใช้สารละลาย 1 (10 mM Tris-HCl buffer , pH7.5 ที่มี 20% sucrose และ 1 mM $MgCl_2$) หรือสารละลาย 3 (Tris buffer ที่มี 1 mM $MgCl_2$) ให้สนามไฟฟ้า (EP) ความเข้ม 6.25 kV/cm ได้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันเท่ากันคือ ประมาณ 5.4 x 10^6 t/µg DNA ขณะที่การทรานสฟอร์เมชันโดยวิธี $CaCl_2$ ได้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันเท่ากับ 5.1 x 10^4 t/µg DNA

Fiedler และ Wirth (1988) ได้มีการนำพลาสมิด pBR322 เข้าสู่ *E. coli* HB101 โดยใช้สนามไฟฟ้า (EP) ความเข้ม 6.25 kV/cm ใช้เวลา 6 ms ได้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันเท่ากับ 1.6 x 10^5 t/µg DNA

Taketo (1989) ได้ทำการทดลองอิเล็กโทรพอเรชัน ระหว่าง *E. coli* CF กับ α3 RF ของ Bacteriophage โดยใช้สารละลายอิเล็กโทรไลท์ ประกอบด้วย 10 mM Tris HCl (pH 7.5), 5% ซูโครส และมี 1 mM โซเดียมซิเตรทหรือฟอสเฟต ที่สนามไฟฟ้า (EP) ความเข้ม 6.25 kV/cm ได้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชัน เท่ากับ 6.3 x 10^6 t/µg DNA

Wirth, Friesenegger และ Fiedler (1989) ได้ทำการทดลองนำพลาสมิด pKT231 ปริมาณ 200 ng เข้าสู่ *E. coli* HB101 โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์คือ 300 mM sucrose , 7 mM sodium phosphate, pH 7.4 และ 1 mM $MgCl_2$ โดยใช้สนามไฟฟ้า (EP) ความเข้ม 6.25 kV/cm ได้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันเท่ากับ 1.6 x 10^5 t/µg DNA

Dower (1990) เปรียบเทียบประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันระหว่างวิธีอิเล็กโทรพอเรชันกับวิธีทางเคมี ($CaCl_2$) โดยนำ *E. coli* DH5α มาทำการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันกับพลาสมิด pBR329 และ pUC18 ให้สนามไฟฟ้า (EP) ความเข้ม 16.7 kV/cm เป็นเวลา 2.3 ms ให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันเท่ากับ 10^9 t/µg DNA ในขณะที่วิธีทางเคมีให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันเท่ากับ 10^8 t/µg DNA

Xie, Sun และ Tsong (1990) ได้ทำการศึกษาการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันระหว่าง *E. coli* สายพันธุ์ JM105 และพลาสมิด pBR322 โดยใช้สารละลาย

0.1 mM Tris buffer pH7.4 ที่มี $CaCl_2$ ความเข้มข้น 5 mM โดยใช้สนามไฟฟ้าที่เกิดจากคลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยม (SP) ความเข้ม 8 kV/cm ใช้เวลา 1 ms กดกระตุ้น 1 ครั้งได้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันมากกว่าหรือเท่ากับ 5×10^8 t/µg DNA

Xie และ Tsong (1990) ได้ทำการทดลองนำพลาสมิด pUC18 เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ JM105 โดยใช้สนามไฟฟ้า (SP) ความเข้ม 200 V/cm 1Hz กระแสสลับ เป็นเวลา 30 วินาที ให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันเท่ากับ 1×15^5 t/µg DNA

Fujimoto, Hashimoto และ Ike (1991) ได้ทำการทดลองนำพลาสมิด pUC18 และ pBR322 เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH1, DH5α และ LE392 โดยใช้สนามไฟฟ้าความเข้ม 12 kV/cm ใช้เวลา 7 - 8 ms ได้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชัน ดังนี้

E. coli DH1 ให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันเท่ากับ 2×10^9 t/µg pUC18 และ 1.3×10^9 t/µg pBR322

E. coli DH5α ให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันเท่ากับ 1.5×10^9 t/µg pUC18 และ 0.5×10^9 t/µg pBR322

E. coli LE392 ให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันเท่ากับ 6.4×10^9 t/µg pUC18 และ 4.4×10^9 t/µg pBR322

Elvin และ Bingham (1991) ได้นำพลาสมิด pUC18 เข้าสู่ *E. coli* JM101 โดยใช้สนามไฟฟ้าชนิด square wave ความเข้ม 9 kV/cm ใช้เวลา 1000 µs ได้ประสิทธิภาพการทรานสฟอรเมชัน 2.7×10^7 t/µg DNA เปรียบเทียบกับสนามไฟฟ้าชนิด exponentially decaying pulse ความเข้ม 12.5 kV/cm ใช้เวลา 4.2 ms ได้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชัน เท่ากับ 4.7×10^6 t/µg DNA และวิธีทางเคมี ($CaCl_2$) ได้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันเท่ากับ 2×10^6 t/µg DNA

Sabelnikov และคณะ (1991) ได้นำพลาสมิด pUC18 และ pBR322 เข้าสู่ *E. coli* LE392 โดยใช้สนามไฟฟ้า (EP) ความเข้ม 13 kV/cm และ 5 ms ได้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันเท่ากับ 10^5 t/µg DNA

Eynard และคณะ (1992) ได้นำพลาสมิด pBR322 เข้าสู่ *E. coli* CBO129 โดยใช้สนามไฟฟ้า (SP) ความเข้ม 5 kV/cm เป็นเวลา 7 ms ได้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชัน เท่ากับ 150 t/µg DNA

Sawahel และคณะ (1993) ได้ทำการทดลองอิเล็กโทรพอเรชัน โดยใช้ *E. coli* DH10B กับพลาสมิด pBI221.23 กับสนามไฟฟ้า (EP) ความเข้ม 12 kV/cm ใช้เวลา 5 ms ได้ประสิทธิภาพ

การทรานสฟอร์เมชันเท่ากับ 10^9 t/µg DNA

Sheng, Mancino และ Birren (1995) ได้มีการนำโครโมโซมแบคทีเรียเทียม (Bacterial artificial chromosome , BACs) ขนาด 240 kb เข้าสู่ *E. coli* DH10B โดยใช้สนามไฟฟ้า (EP) ความเข้ม 17 kV/cm ใช้เวลา 5 ms ได้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันเท่ากับ 1.2 x 10^6 t/µg DNA

นอกจากนี้ยังมีรายงานอีกมากมายที่กล่าวถึงการใช้กระบวนการอิเล็กโทรพอเรชันกับเซลล์ชนิดต่าง ๆ เช่น จุลินทรีย์หรือแบคทีเรียชนิดอื่น ดังแสดงในตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 การทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันในจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

ชนิดเซลล์	พลาสมิด	E (EP) (kV/cm)	เวลา (ms)	T.E. (t/μg DNA)	อ้างอิง
เซลล์แบคทีเรีย (Bacteria)					
Acetobacter xylinum	pUCD2,	12.5	6-8	10^6-10^7	Hall et al. (1992)
	pRK248	12.5	6-8	10^5	Hall et al. (1992)
Actinomyces pyogenes					
สายพันธุ์ BBR1	pEP2	15	10	10^5	Jost et, Al. (1997)
Bacillus amyloliquefaciens					
สายพันธุ์ SB-1	pUB110	7.5	8-10	10^5	Vehmaanpera (1989)
B. sphaericus สายพันธุ์ 1953	pUB110	12.5	4	10^5-10^6	Taylor and Burke, JR. (1990)
B. subtilis สายพันธุ์ PB 1424	pVE18	6.25	5	10^4	Brigidi et al. (1990)
B. subtilis สายพันธุ์ 1A 42	pBM82	12.5	8	10^5	Stephenson and Jarrett (1991)
B. thuringiensis สายพันธุ์ HD-73	pC194	8.75	4.7	10^6	Masson, Pretontaine and Brousseau (1989)
Bacteroides fragilis สายพันธุ์ 638	pBI191	12.5	10	10^6	Smith, Parker and Rogers (1990)
Bradyrhizobium Japonicum					
สายพันธุ์ USDA 110	pZB32	12.5	4.7-6.6	10^7	Hattermann and Stacey (1990)
Campylobacter jejuni สายพันธุ์ C31	pILL512	13	2	10^6	Miller et al. (1988)

ตารางที่ 1.1 (ต่อ) การทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันในจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

ชนิดเซลล์	พลาสมิด	E (EP) (kV/cm)	เวลา (ms)	T.E. (t/μg DNA)	อ้างอิง
Cellulomonas flavigena สายพันธุ์ ATCC482	pJA85	10	5	10^4	Alemohammad and Pembroke (1990)
Clostridium perfringens สายพันธุ์ 3624A	pAMB1	6.25	6	10^2	Allen and Blaschek (1988)
Corynebacterium glutamicum สายพันธุ์ ASO19	pWST4B	12.5	5	10^7	Liebl et al. (1989)
Enterococcus faecalis สายพันธุ์ OG1X	pAM401	17.5	9-16	10^6	Friesenegger et al. (1991)
E. faecalis สายพันธุ์ JH 2-2	pGB354	12.5	4.7	10^6	Cruz-Rodz and
	pAM409	12.5	4.7	10^5	Gilmore (1990)
Lactobacillus curvatus สายพันธุ์ CTC435	pNZ12	7	7.8	10^5	Aymerich et al. (1993)
L. sake สายพันธุ์ CTC335	pNZ12	7	6	10^3	Aymerich et al. (1993)
L. sake สายพันธุ์ CTC284	pNZ12	6	6.7	10^3	Aymerich et al. (1993)
L. plantarum สายพันธุ์ CTC305	pNZ12	6	5.5	10^1	Aymerich et al. (1993)

ตารางที่ 1.1 (ต่อ) การทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันในจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

ชนิดเซลล์	พลาสมิด	E (EP) (kV/cm)	เวลา (ms)	T.E. (t/µg DNA)	อ้างอิง
L. bavaricus สายพันธุ์ CTC232	pNZ12	6	7.6	10^2	Aymerich et al. (1993)
L. casei สายพันธุ์ ATCC393	pNZ12	5	5	10^4	Chassy and Flickinger (1987)
Mycobacterium aurum สายพันธุ์ L1	pAL8	12.5	3.4-4.5	10^3	Hermans, Boschloo and Bont (1990)
M. bovis สายพันธุ์ WAg200	pYUB18	12.5	250	10^5	Wards and Collins (1996)
Proteus mirabilis สายพันธุ์ LVI	pMLS10	6.5	1.2	10^4	Katenkamp et al. (1992)
Pseudomonas putida					
สายพันธุ์ PpY101	pSUP104	12.5	4.5	10^5	Iwasaki et al. (1994)
	pSR134	12.5	4.5	10^5	Iwasaki et al. (1994)
Staphylococcus aureus					
สายพันธุ์ RN4220	pSK265	23	2.5	10^8	Schenk and Laddaga (1992)
S. aureus สายพันธุ์ ATCC29213	pSK265	23	2.5	10^5	Schenk and Laddaga (1992)
S. epidermidis สายพันธุ์ ATCC12228	pSK265	23	2.5	10^3	Schenk and Laddaga (1992)
Streptococci Lactic สายพันธุ์ LMO230	pMU1328	6.25	4.9	10^4	Powell et al. (1988)
S. thermophilus สายพันธุ์ ST11	pNZ12	10.25	10	10^4	Marciset and Mollet (1993)
Yersinia enterocolitica สายพันธุ์ W22703	pK19	12.5	4.8	10^5	Conchas and Carniel (1990)

ตารางที่ 1.1 (ต่อ) การทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันในจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

ชนิดเซลล์	พลาสมิด	E (EP) (kV/cm)	เวลา (ms)	T.E. (t/μg DNA)	อ้างอิง
Zymomonas mobilis สายพันธุ์ CP4	pSUP304	12	10	10^4	Lam, Mullan and Eveleigh (1993)
สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Cyanobacterium)					
Anabaena sp. สายพันธุ์ M131	pRL6	8	2.5	10^4	Thiel and Poo (1989)
รา (Fungi)					
Aspergillus niger van tieghem สายพันธุ์ ATCC20739	pXba192	6	8	1.4	Ozeki et al. (1994)
ยีสต์ (Yeast)					
Saccharomyces cerevisiae สายพันธุ์ D13-1A	Yrp7	10	0.01	945	Karube, Tamiya and Matsuoka (1985)

EP = สนามไฟฟ้าที่เกิดจากคลื่นรูปพัลส์ที่ลดลงแบบ เอกซ์โพเนนเชียล (Exponential decaying pulse)

T.E. = Transformation efficiency

กลไกของกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชัน (Mechanism of electroporation)

กระบวนการ Electroporation เป็นวิธีทางฟิสิกส์เกิดขึ้นเมื่อสนามไฟฟ้าวิ่งผ่านเซลล์ในช่วงระยะเวลาสั้น ๆ มีผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดรู รูนี้จะเกิดขึ้นชั่วคราวและเกิดในบริเวณที่จำเพาะเจาะจงบนเยื่อหุ้มเซลล์ การกระตุ้นด้วยสนามไฟฟ้าความเข้มสูงในช่วงเวลาสั้น ๆ ทำให้ชั้นไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงและเกิดรูขึ้นมา

กลไกการเกิดรู (Pore formation) นั้นเกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยสนามไฟฟ้า ซึ่งทำให้เกิดความต่างศักย์ไฟฟ้าตกคร่อมเซลล์ที่แตกต่างกันระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ด้านในและด้านนอกให้มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 1 (Tsong , 1991) ถ้าให้ความต่างศักย์ไฟฟ้าตกคร่อมเซลล์ระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ด้านในกับด้านนอก เป็น ΔY_{membr} (V) สามารถคำนวณหาค่าได้จากสมการ (1)

$$\Delta Y_{membr}\ max = 1.5\ r_{cell}\ E_{appl} \qquad (1)$$

เมื่อ

r_{cell} = รัศมีของเซลล์ (cm)

E_{appl} = สนามไฟฟ้าที่ให้เซลล์ (V/cm)

สำหรับ *E. coli* มีรูปร่างเป็นแท่ง (~2 μm x 0.7 μm) มากกว่าจะเป็นวงรี (Spherical) เพราะฉะนั้นเมื่อเราใช้ r_{cell} เท่ากับ 1 μm แทนใน (1) เมื่อเราให้สนามไฟฟ้าความเข้ม 8 kV/cm จะได้ ΔY_{membr} max เท่ากับ 1.2 V ก่อให้เกิดกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชัน

Zimmermann (1983) ได้รายงานเกี่ยวกับกลไกการเกิดรูว่า มีขั้นตอนดังนี้

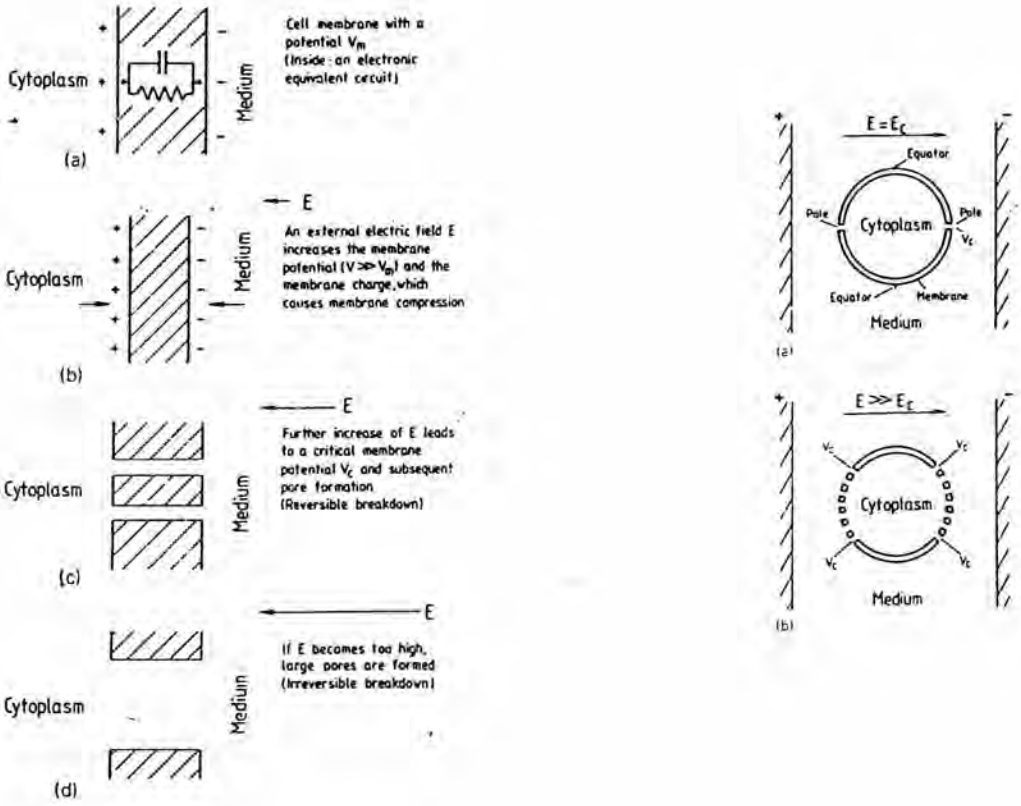
1. เยื่อหุ้มเซลล์ปกติมี ความต่างศักย์ไฟฟ้าค่าหนึ่ง เรียกว่า V_m ปกติมีค่าประมาณ 100 mV โดยมีการความจุไฟฟ้าและมีความสมดุลย์ทางไฟฟ้า

2. เมื่อเซลล์หรือเยื่อหุ้มเซลล์อยู่ในสนามไฟฟ้าจะทำให้ความต่างศักย์ไฟฟ้าของเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนแปลงไปความต่างศักย์นี้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มสนามไฟฟ้า โดยความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เยื่อหุ้มเซลล์ยิ่งเพิ่มมากขึ้นเท่าไหร่ จะทำให้ความหนาของเยื่อหุ้มเซลล์ลดลง

3. เมื่อความต่างศักย์ไฟฟ้าตกคร่อมเยื่อหุ้มเซลล์ เพิ่มถึงค่าประมาณ 1V เรียกค่านี้ว่าความต่างศักย์ไฟฟ้าตกคร่อมเยื่อหุ้มเซลล์วิกฤต (V_c) ก่อให้เกิดการเป็นรูหรือช่องของเยื่อหุ้มเซลล์ พร้อมทั้งมีการปล่อยประจุไฟฟ้าของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์สามารถกลับคืนสภาพเดิมได้

4. ถ้าให้สนามไฟฟ้าความเข้มสูงกว่าขั้นวิกฤต (หรือให้สนามไฟฟ้าเป็นเวลานาน) จะทำให้รูขนาดใหญ่ขึ้นและกลับคืนสู่สภาพเดิมไม่ได้ ก่อให้เกิดการตายของเซลล์

รายละเอียดแสดงดังรูปที่ 1.2



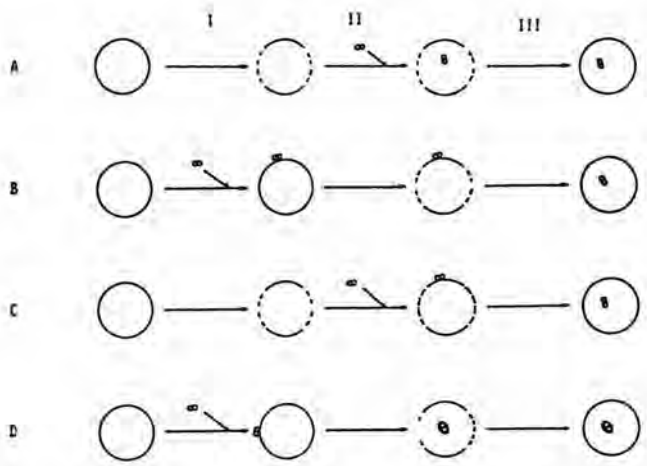
รูปที่ 1.2 เยื่อหุ้มเซลล์ที่อยู่ในสนามไฟฟ้า

ที่มา : Zimmermann (1983)

กลไกของกระบวนการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน

จากกลไกการเกิดรูนี้เองก็ได้นำไปสู่การซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของสารต่าง ๆ ทั้งเข้าและออกจากเซลล์ กระบวนการนี้เองนำไปประยุกต์ใช้กับการถ่ายยีน (gene transfer) เข้าสู่เซลล์ พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ชนิดต่าง ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ได้มีการตั้งสมมติฐานเกี่ยวกับการถ่ายยีนโดยนักวิทยาศาสตร์ต่าง ๆ ดังนี้

Xie และคณะ (1990) ได้เสนอกลไกการเกิดการถ่ายยีนโดยวิธี อิเล็กโทรพอเรชัน มี 4 รูปแบบ ดังแสดงในรูปที่ 1.3



รูปที่ 1.3 กลไกการถ่ายยีนโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน ก
ที่มา : Xie และคณะ (1990)

จากรูปที่ 1.3 อธิบายกลไกการเกิดการถ่ายยีนโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันว่ามี 4 รูปแบบ ดังนี้

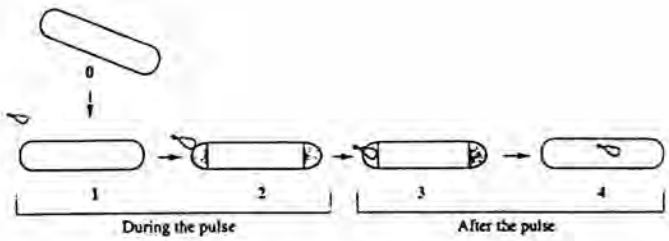
รูปแบบที่ A หลังจากเกิดอิเล็กโทรพอเรชัน (step1) พลาสมิด pBR322 ก็จะแพร่เข้าไป (step2) หลังจากนั้นเยื่อหุ้มเซลล์ ก็จะปิด (step3)

รูปแบบที่ B พลาสมิดจะจับกับผิวนอกและเข้าสู่เซลล์โดยใช้การแพร่ผ่าน (Surface diffusion)

รูปแบบที่ C เกิดอิเล็กโทรพอเรชันก่อนแล้วเติมพลาสมิด พลาสมิดจะจับที่ผิวของเยื่อหุ้มเซลล์ แล้วผ่านเข้าสู่เซลล์

รูปแบบที่ D พลาสมิดเข้าเซลล์โดยแรงอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoretic force) ของสนามไฟฟ้า พลาสมิดจะเข้าไปพร้อมกับชิ้นส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์และจะห่อหุ้มพลาสมิดไว้ด้วยเมื่ออยู่ในเซลล์

Eynard และคณะ (1992) ได้เสนอกลไกการถ่ายยีน โดยใช้ *E. coli* ดังแสดงในรูปที่ 1.4



รูปที่ 1.4 กลไกการถ่ายยีนโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน ข
ที่มา : Eynard และคณะ (1992)

Eynard และคณะ (1992) ได้เสนอกลไกการถ่ายยีน โดยใช้ *E. coli* ดังขั้นตอนต่อไปนี้

1. เมื่อให้สนามไฟฟ้าจะทำให้ เซลล์ *E. coli* มีการจัดทิศทาง
2. ยังให้สนามไฟฟ้าอยู่ ทำให้พลาสมิดในสารละลายจับกับบริเวณที่เกิดการซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์
3. หลังจากให้สนามไฟฟ้าก่อให้เกิดการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์หรือผนังเซลล์อย่างช้า ๆ ขั้นตอนนี้ขึ้นกับอุณหภูมิ
4. พลาสมิดเข้าสู่เซลล์อย่างสมบูรณ์

Chernomordik (1992) ได้เสนอกลไกการถ่ายยีน โดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันว่าประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ดังนี้

1. Induction เป็นการให้สนามไฟฟ้าในระยะเวลาสั้น ๆ เพื่อเหนี่ยวนำให้พลาสมิดหรือดีเอ็นเอเชื่อมติดกับเยื่อหุ้มเซลล์
2. Resealing of pore เป็นขั้นตอนที่พลาสมิดหรือดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์โดยผ่านเยื่อหุ้มเซลล์พร้อมทั้งปิดรูที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของสนามไฟฟ้า

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชัน

1. ความเข้มสนามไฟฟ้าและระยะเวลาการให้สนามไฟฟ้า

1.1 ผลของความเข้มสนามไฟฟ้า

ความเข้มสนามไฟฟ้าที่เหมาะสมในแบคทีเรียแต่ละชนิดมีค่าแตกต่างกัน เช่น Dower (1990) พบว่า การทรานสฟอร์เมชันของ *E. coli* LE392 กับพลาสมิด pBR329 โดยใช้สนามไฟฟ้า (EP) ความเข้ม 7 kV/cm เป็นเวลา 20 ms หรือ 11 kV/cm เป็นเวลา 5 ms จะให้ประสิทธิภาพเท่ากัน คือ ประมาณ 1.5 - 1.6 x 10^9 t/µg DNA

Chassay และคณะ (1988) พบว่า ความเข้มสนามไฟฟ้า (EP) ที่ให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันสูงสุดของ *Lactobacillus bulgaricus* เท่ากับ 2 kV/cm แต่ถ้าเป็น *Streptococcus thermophilus* ต้องใช้เท่ากับ 10 kV/cm และยังมีจุลินทรีย์ และเซลล์อื่น ๆ ที่ใช้สนามไฟฟ้า ความเข้มที่เหมาะสมแตกต่างกันไป ดังตารางที่ 1.1

1.2 ผลของระยะเวลาการให้สนามไฟฟ้า

ระยะเวลาการให้สนามไฟฟ้าจะสัมพันธ์กับความเข้มสนามไฟฟ้า ดังมีรายงานต่อไปนี้

Dower (1990) ได้ทดลอง การทรานสฟอร์เมชัน *E. coli* LE392 กับพลาสมิด pBR329 โดยใช้สนามไฟฟ้า 16.7 kV/cm พบว่าที่เวลา 2.3 ms ให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันสูงสุด ประมาณ 2 - 3 x 10^9 t/µg DNA และถ้าให้สนามไฟฟ้าความเข้ม 2 kV/cm พบว่าต้องใช้ เวลาถึง 900 ms จะให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชัน ประมาณ 10^6 t/µg DNA

2. ชนิดของสารละลายอิเล็กโทรพอเรชัน (Electroporation solution)

องค์ประกอบของสารละลายอิเล็กโทรพอเรชันก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชัน ซึ่งพบว่ามีผู้ทดลองใช้สารละลายอิเล็กโทรพอเรชันที่มีองค์ประกอบแตกต่างกันมากมาย อย่างไรก็ตามพบว่าสารละลายที่ใช้ควรมีไอออนต่ำ ๆ (Eynard et al., 1992) ดังตารางที่ 1.2

ตารางที่ 1.2 ส่วนประกอบของสารละลายอิเล็กโทรพอเรชัน (Electroporation solution) ที่ใช้กับแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ

ส่วนประกอบของสารละลาย Electroporation solution	เชื้อจุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
1. กลีเซอรอลความเข้มข้น 10% (Glycerol 10%)	*E. coli* LE392 และ DH5α	Dower และคณะ (1988)
กลีเซอรอลความเข้มข้น 10% (Glycerol 10%)	*E. coli* LE392	Sabelnikov และคณะ (1991)
กลีเซอรอลความเข้มข้น 10% (Glycerol 10%)	*E. coli* JM101	Elvin และ Bingham (1991)
กลีเซอรอลความเข้มข้น 10% (Glycerol 10%)	*E. coli* DH1และ *E.faecalis*	Fujimoto และคณะ (1991)
กลีเซอรอลความเข้มข้น 10% (Glycerol 10%)	*E. coli* DH10B	Sawahel และคณะ (1993)
2. 300mM Sucrosoe, 7mM Sodium phosphate, pH7.4, 1 mM $MgCl_2$, Glycerol 20%	*E. coli* HB101 และ *P. putida*	Fiedler และ Wirth (1988)
3. 10mM Tris (pH8.0), 10mM $MgCl_2$ และ 10% Sucrose	*E. coli* MH1	Cymbalyuk และคณะ (1988)
4. 10% Glycerol-0.2 mM K_2HPO_4 (pH7.5)	*E. coli* K12	Calvin และ Hanawalt (1988)
5. 10 mM Tris-HCl buffer (pH7.5) ที่มี 1 mM $MgCl_2$	*E. coli* BB	Taketo (1988)
6. 0.1 mM Tris buffer pH7.4, 2.5 mM $CaCl_2$	*E. coli* JM105	Xie และคณะ (1990)
7. 1mM Tris buffer pH7.4, 30 mM Sucrose และ 1 mM $MgCl_2$	*E. coli* JM105	Xie และ Tsong (1990)
8. 1mM Tris, pH7.4 และ 270 mM Sucrose	*E. coli* CBO129	Eynard (1992)

จากตารางที่ 1.2 ไม่ได้กล่าวถึงชนิดของพลาสมิดและประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชัน โดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน เนื่องจากได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น จะเห็นได้ว่าสารละลายกลีเซอรอล (Glycerol) และซูโครส (Sucrose) เป็นสารรักษาแรงดันออสโมติก เรียกว่า Osmotic agent ของเซลล์ ส่วนสารพวก แคทอิออน (Cations) เช่น Ca^{2+} และ Mg^{2+} มีผลให้เยื่อหุ้มเซลล์มีความเสถียร และช่วยในการซ่อมแซมเยื่อหุ้มเซลล์ (Shigekawa and Dower, 1988) แต่ถ้าเพิ่มความเข้มข้นของ Ca^{2+} และ Mg^{2+} มากเกินไปจะลดประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน (Shigekawa and Dower, 1988)

สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบสำคัญในสารละลายอิเล็กโทรพอเรชันอีกตัวหนึ่ง คือ โพลีเอธิลลีนไกลคอล (Polyethylene glycol : PEG) สูตรโมเลกุลCH_2OH-$(CH_2$-O-$CH_2)_n$-CH_2OH เป็นสารที่นำมาใช้ในการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันและวิธีเคมี เพื่อช่วยในการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย โดยมีรายงานดังต่อไปนี้

Klebe และคณะ (1983) ทำการศึกษาการทรานสฟอร์เมชันโดยใช้ *E. coli* HB101 กับพลาสมิด pBR322 ร่วมกับสารละลาย PEG1000 ความเข้มข้น25% รวมกับ Succinate ความเข้มข้น100 mM ได้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันเท่ากับ 10^6 - 10^7 t/µg DNA

Chung และคณะ (1989) ทำการศึกษาการทรานสฟอร์เมชันโดยใช้ *E. coli* JM109 กับพลาสมิด pUC19 ร่วมกับสารละลาย TSS (LB broth, 10% (w/v) ของ PEG มวลโมเลกุล 3350 หรือ 8000, 5%V/V ของ DMSO และ 20-50 mM ของ Mg^{2+} (($MgSO_4$ หรือ $MgCl_2$) ที่ pH 6.5) ได้ประสิทธิภาพประมาณ 10^7 t/µg DNA

Stephenson และ Jarrett (1991) ทำการศึกษาการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันระหว่าง *Bacillus subtilis* 168 กับพลาสมิด pBC16 ร่วมกับสารละลาย PEG6000 ความเข้มข้น 30% ที่สนามไฟฟ้า (EP) ความเข้ม 12.5 kV/cm ใช้เวลา 6.6 ms ได้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันเท่ากับ 1.1 x 10^4 t/µg DNA

3. เซลล์และดีเอ็นเอ

3.1 เซลล์ (Cell)

ความเข้มข้นของเซลล์ส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 10^9 - 10^{11} cell/ml (OD_{600} = 0.5 - 1) ระยะการเจริญของเซลล์อยู่ในช่วง Early-mid log phase (Miller and Nickoloff, 1995) หรือ log phase (Chang, 1992) การเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์ จาก 0.8 x 10^9 ไปเป็น 8 x 10^9 cell/ml ช่วยเพิ่ม

ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชัน 10-20 เท่า เนื่องจากการที่พลาสมิดดีเอ็นเอสามารถจับเซลล์ได้ดีขึ้น ทำให้เกิดกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชันได้ดีขึ้น(Shigekawa and Dower, 1988)

ขนาดของเซลล์ก็เป็นปัจจัยหนึ่ง โดยเซลล์ขนาดเล็กต้องการสนามไฟฟ้าความเข้มสูงกว่าเซลล์ขนาดใหญ่ จากการทดลองพบว่าเซลล์โปรคารีโอต (Prokaryotic cell) ได้แก่ เซลล์แบคทีเรีย เป็นต้น ซึ่งมีขนาดเล็กต้องการสนามไฟฟ้าความเข้มในช่วง 4 - 12.5 kV/cm ส่วนเซลล์ยูคารีโอต (Eukaryotic cell) ได้แก่ เซลล์ยีสต์, เซลล์พืช และเซลล์สัตว์ เป็นต้น ซึ่งมีขนาดใหญ่ ต้องการสนามไฟฟ้าความเข้มในช่วง 0.5 - 1.1 kV/cm (Dower, 1990)

นอกจากความเข้มข้นเซลล์และขนาดเซลล์แล้วยังมีส่วนที่สำคัญอื่นอีก เช่น องค์ประกอบเซลล์ เช่น ในแบคทีเรียแกรมบวกมีผนังเซลล์และ peptidoglycan หนาอยู่รอบเยื่อหุ้มเซลล์ ในขณะที่แบคทีเรียแกรมลบมีผนังเซลล์และ peptidoglycan บาง ๆ อยู่รอบเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน ในแบคทีเรียแกรมลบมีประสิทธิภาพสูงกว่าแบคทีเรียแกรมบวก

3.2 ดีเอ็นเอ (DNA)

ได้มีรายงานเกี่ยวกับพลาสมิดที่ใช้ในการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันดังต่อไปนี้

Sawahel และคณะ (1993) ได้ทดลองนำพลาสมิด pBI221.23 ปริมาณ 2 pg - 100 ng เข้าสู่ *E. coli* DH10B ที่สนามไฟฟ้า(EP) ความเข้ม 10-12 kV/cm, 5 ms พบว่า พลาสมิด pBI221.23 (4.3 kb) ปริมาณ 2 pg ให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันสูงสุด เท่ากับ 10^9 t/µg DNA

Sheng และคณะ (1995) ได้นำโครโมโซมแบคทีเรียเทียม (Bacterial Artificial Chromosome : BACs), หลายขนาด เข้าสู่ *E. coli* DH10B โดยใช้สนามไฟฟ้า (EP) ความเข้ม 17 kV/cm ใช้เวลา 5 ms พบว่า BACs ขนาด 7.3, 80, 150 และ 240 kb ให้ประสิทธิภาพการ ทรานสฟอร์เมชันเท่ากับ 2.3×10^9 , 1.9×10^8 , 3.2×10^7 และ 1.2×10^6 t/µg DNA ตามลำดับ จะเห็นได้ว่ายิ่งโครโมโซมแบคทีเรียยิ่งมีขนาดใหญ่ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันจะลดลงตามลำดับ

รูปร่างพลาสมิดหรือดีเอ็นเอก็มีผลต่อการทำอิเล็กโทรพอเรชันโดยพลาสมิดที่มีรูปร่าง Supercoil และ Relax ให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันสูง (Trevous et al, 1992) ถ้าพลาสมิดสะอาดและรูปร่างแบบ Supercoil จะให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันสูง มากกว่า 10^9 t/µg DNA (Miller and Nickoloff, 1995)

4. อุณหภูมิ

เนื่องจากผลของสนามไฟฟ้าที่ให้แก่เซลล์ในกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชันก่อให้เกิดความร้อนที่เรียกว่า Joule heating ทำให้อุณหภูมิเพิ่มขึ้น 15-25 องศาเซลเซียส ดังนั้นในการทดลองส่วนใหญ่จึงมีการแช่เซลล์และดีเอ็นเอในน้ำแข็งเป็นเวลา 1-5 นาที ก่อนให้สนามไฟฟ้า

ขั้นตอนการทำอิเล็กโทรพอเรชัน

สามารถสรุปโดยย่อได้ดังนี้ (ดัดแปลงมาจาก Solioz และ Bienz ค.ศ. 1990)

1. เลี้ยงเซลล์ให้เจริญในอาหารสมบูรณ์จนถึง mid-log phase แช่เย็นและเก็บเซลล์
2. ล้างเซลล์ 10^9 - 10^{10} cells/ml ในสารละลายกลีเซอรอล ความเข้มข้น 10% 2 ครั้ง และเก็บเซลล์ในสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% ที่ -70 องศาเซลเซียส
3. ผสมเซลล์ 50 µl กับ พลาสมิด แล้วบ่มไว้ 1 นาทีในน้ำแข็ง
4. ให้สนามไฟฟ้าแล้วเติมอาหารเหลว (medium) ปริมาตร 500 µl แล้วเลี้ยงที่ภาวะ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 300 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
5. กระจายเชื้อปริมาตร 100 µl ลงในจานอาหารคัดเลือก (Selective plate) บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อสร้างเครื่องอิเล็กโทรพอเรชันแล้วนำมาใช้ในการทรานสฟอร์มพลาสมิดpUC18 และ pBR322 เข้าสู่ *E. coli* HB101 โดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน (Electroporation)
2. ศึกษาหาชนิดของสารละลายอิเล็กโทรพอเรชันที่เหมาะสม
3. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันกับประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธี $CaCl_2$

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

1. ศึกษาเอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
2. สร้างเครื่องอิเล็กโทรพอเรชัน (Electroporation apparatus) ที่ให้กำเนิดคลื่นรูปพัลส์ที่ลดลงแบบเอกซ์โพเนนเชียลที่ดัดแปลงมาจากเครื่องกำเนิดความต่างศักย์ไฟฟ้าสูง และนำเครื่องอิเล็กโทรพอเรชันที่ให้กำเนิดคลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยม มาใช้ในงานวิจัย
3. สร้างและออกแบบห้องบรรจุเซลล์ (Chamber)
4. ศึกษาปัจจัยทางเคมีของสารละลายอิเล็กโทรพอเรชัน (Electroporation solution)
5. ศึกษาปัจจัยทางไฟฟ้า เช่น ความเข้มสนามไฟฟ้า, ระยะเวลาการให้สนามไฟฟ้า และจำนวนครั้งการกดกระตุ้น
6. สรุปและวิเคราะห์ผลการทดลอง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้เครื่องอิเล็กโทรพอเรชันที่ดัดแปลงขึ้นนำมาใช้ในงานวิจัยซึ่งมีราคาถูกกว่าเครื่องทางการค้า
2. ได้สารละลายที่ช่วยให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันสูงขึ้น