

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันเทคโนโลยีด้านพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) เป็นเทคนิคหนึ่งในการศึกษางานทางด้านชีวโมเลกุล (molecular biology) เพื่อประโยชน์ในงานทางการปรับปรุงพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต เพราะสามารถทำการถ่ายโอนสารพันธุกรรม, ตัดต่อ, ตัดแต่ง, หรือดัดแปลงยีน (gene) ของสิ่งมีชีวิตไม่ว่าจะเป็นพืช, สัตว์, หรือจุลินทรีย์ จากสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งไปสู่สิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่งได้ ทำให้เกิดสิ่งมีชีวิตพันธุ์ใหม่ ๆ สิ่งมีชีวิตที่เกิดจากเทคโนโลยีนี้ถูกเรียกว่า “ชีวภาพดัดแปลงพันธุ” (GMOs: genetically modified organisms) (สารโรจน์, 2543) เช่น ฝ้ายบีบีของบริษัทมอนซานโต (Monsanto) ที่ต้านทานต่อหนอนเจาะสมอฝ้ายและต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช ซึ่งสารกำจัดวัชพืชชนิดนี้มีชื่อทางเคมีว่า “ไกลโฟเสท” (glyphosat) (www.monsanto.com), มะเขือเทศพันธุ์ Flavr Saver ของบริษัท Calgene เป็นพันธุ์ที่เก็บรักษาได้ยาวนานขึ้นกว่าปกติเนื่องจากการดัดแปลงยีนที่ผลิตสารที่เกี่ยวข้องกับการนิ่มและนำไปสู่การผลิด (สารโรจน์, 2543), ข้าวโพดที่มีการเพิ่มปริมาณไลซีนให้สูงและข้าวที่มีปริมาณน้ำมันสูง ซึ่งลักษณะที่กล่าวมานี้เกิดจากการเพิ่มหรือขยายยีนเป้าหมาย (target genes) ที่ทำหน้าที่ในการควบคุมการสร้างไลซีนในข้าวโพดและการผลิตน้ำมันในข้าว (สารโรจน์, 2543), เชื้อรา *Aspergillus niger* ที่ได้รับยีนที่สร้างเอนไซม์ไคโมซิน (chymosin enzyme) จากลูกวัวหรือแพะเพื่อใช้ผลิตเนยแข็ง (สารโรจน์, 2543), เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่ได้รับกลุ่มยีนที่สร้างอินซูลิน (insulin) จากมนุษย์เพื่อผลิตอินซูลินมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ (www.acs.org/government/publications/eip_biotechnology.htm) และการใช้ *E. coli* ที่ได้รับกลุ่มยีนที่สร้างเอนไซม์ไคตินเนส (chitinase enzyme) ในการผลิตเอนไซม์ในเชิงอุตสาหกรรม (สารโรจน์, 2543) เป็นต้น ชีวภาพดัดแปลงพันธุ์เหล่านี้เกิดจากเทคโนโลยีดีเอ็นเอลูกผสม (recombinant DNA technology) ซึ่งเป็นเทคโนโลยีที่อาศัยเทคนิคด้านพันธุวิศวกรรม เริ่มจากการคัดเลือกยีนเป้าหมายต่อมาจึงทำการแยกเฉพาะยีนเป้าหมายออกจากสิ่งมีชีวิตที่มียีนเป้าหมายนั้นในรูปแบบที่เรียกว่า “cDNA” โดยอาศัยเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลเช่น การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) หรือการใช้เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR: polymerase chain reaction) เป็นต้น จากนั้นจึงนำยีนที่ได้มาเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ (DNA vector) เรียกรวมกันว่า “ดีเอ็นเอลูกผสม” (recombinant DNA) การทำเช่นนี้เพื่อให้ดีเอ็นเอพาหะเป็นตัวนำยีนใหม่นี้เข้าสู่เซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่เราต้องการปรับปรุงพันธุกรรมเพื่อเพิ่มปริมาณ และแสดงลักษณะทางพันธุกรรมของยีนเป้าหมายนั้นโดยอาศัยความสามารถทางพันธุกรรมของดีเอ็นเอพาหะที่เลือกใช้

จากนั้นส่งถ่ายดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์ที่ต้องการด้วยกระบวนการที่เรียกว่า “ทรานสฟอร์เมชัน” (transformation) ซึ่งมีหลายวิธีได้แก่ การประยุกต์วิธีการทางธรรมชาติมาใช้ คือการอาศัยจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการบุกรุก (infect) เซลล์ ทำหน้าที่ในการส่งถ่ายดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่สิ่งมีชีวิตที่เป็นเจ้าบ้าน (host cell) ตัวอย่างที่ชัดเจนได้แก่ การใช้เชื้อแบคทีเรียในดินที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Agrobacterium tumefaciens* มีความสามารถเข้าตามบาดแผลของต้นพืชบางชนิดเช่น มะเขือเทศ, มันฝรั่ง, ยาสูบ และถั่ว เป็นต้น จากนั้นมันจะส่งถ่ายพลาสมิด Ti หรือ T-DNA ซึ่งบรรจุยีนที่สร้างฮอร์โมนพืชบางชนิดเข้าไปในบริเวณที่มันอาศัย ทำให้พุ่มพุ่มเรียกอาการดังกล่าวว่า crown gall disease (Walden and Wingender, 1995; Talaro and Talaro, 1996) ซึ่งพบได้ในตำแหน่งที่มีเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวเข้าไป จากความรู้นี้จึงอาศัยแบคทีเรียในดินที่ได้กล่าวมานี้ในการส่งถ่ายดีเอ็นเอลูกผสมที่บรรจุยีนเข้าสู่พืชเพื่อสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรม (transgenic plants) (Walden and Wingender, 1995; Alcamo, 1996), การส่งถ่ายดีเอ็นเอลูกผสมด้วยปืนดีเอ็นเอ (particle gun bombardment) ด้วยการยิงดีเอ็นเอลูกผสมเข้าไปในเซลล์โดยเคลือบ (coat) ดีเอ็นเอลูกผสมดังกล่าวกับผงทองคำ (Walden and Wingender, 1995; Heiser, 2000) หรือทังสเตน (Heiser, 2000), การใช้สารเคมีได้แก่ polyethylene glycol ในการส่งถ่ายดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียที่แยกเอาผนังเซลล์ออกเรียกเซลล์นั้นว่า “โปรโตพลาสต์” (protoplast) (Chassy *et al.*, 1988; Chung *et al.*, 1988), การใช้ความร้อน (heat shock) ในระยะเวลาสั้น ๆ ซึ่งจะใช้กับเซลล์แบคทีเรียที่ผ่านกระบวนการทางเคมี (Hanahan, 1983) ทำให้แบคทีเรียอยู่ในสภาพที่พร้อมรับดีเอ็นเอจากภายนอก เรียกเซลล์ที่มีสภาพนี้ว่า “เซลล์คอมพิเทนท์” (competent cell), การใช้สนามไฟฟ้าชักนำเซลล์ให้เพิ่มความสามารถของเยื่อหุ้มเซลล์ในการผ่านเข้าของดีเอ็นเอลูกผสมผ่านมากขึ้นกว่าปกติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์แบคทีเรียสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการส่งถ่ายดีเอ็นเอลูกผสมได้สูงซึ่งวิธีดังกล่าวมานี้เรียกว่า “อิเล็กโทรพอเรชัน” (electroporation) (Dower *et al.*, 1988) และล่าสุดการใช้เครื่องเร่งอนุภาค (ion beam) มาปรับใช้ในการทรานสฟอร์เมชันในจุลินทรีย์แต่ก็ยังไม่รายงานถึงประสิทธิภาพของการทรานสฟอร์เมชัน (Anuntalabhochi *et al.*, 2001)

เทคนิคอิเล็กโทรพอเรชันเป็นเทคนิคที่ใช้ในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่สิ่งมีชีวิตได้หลายชนิดได้แก่ เซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม, โปรโตพลาสต์พืช (Pih *et al.*, 1996), โปรโตซัว (Martinez-Calvillo *et al.*, 1997) และแบคทีเรียหลายชนิด เป็นต้น โดยมากนิยมใช้วิธีการทรานสฟอร์เมชันในแบคทีเรีย ซึ่งเทคนิคนี้จะให้ประสิทธิภาพที่สูงกว่าวิธี heat shock (Dower *et al.*, 1988) แต่ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันในแบคทีเรียจะขึ้นกับวิธีการเตรียมเซลล์คอมพิเทนท์ที่มีความแตกต่างกันในแต่ละห้องปฏิบัติการ การทดลองครั้งนี้จึงได้ศึกษาถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อ

ประสิทธิภาพการส่งถ่ายพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยวิธีอิเล็กโทร-
พอเรชันของห้องปฏิบัติการนี้ให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุด เพื่อความสะดวกและรวดเร็วในการนำมา
ประยุกต์ใช้ในงานด้านการโคลนยีน (gene cloning) และ DNA library

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบถึงปัจจัยต่างๆ เช่น ขนาดของพลาสติก, ความเข้มข้นของพลาสติก, วิธีการเก็บรักษาเซลล์คอมพิเทนท์ และระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาเซลล์คอมพิเทนท์ ให้ประสิทธิภาพการทรานสเฟอร์เมชันที่ได้อยู่ในระดับที่เหมาะสม
2. เพื่อนำข้อมูลจากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทรานสเฟอร์เมชันแบคทีเรีย *E.coli* โดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันมาใช้ในการโคลนนิ่งเอ็นเอลูกผสม ภายในห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์ และชีวโมเลกุลต่อไปในอนาคต