

บทที่ 2

เอกสารที่เกี่ยวข้อง

1. การส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าในแบคทีเรียด้วยวิธีทรานสฟอร์เมชัน (bacterial transformation)

ในปี ค.ศ. 1982 ได้ค้นพบปรากฏการณ์ของการรับยีนหรือดีเอ็นเอในธรรมชาติของแบคทีเรีย ที่ต่อมาเรียกการรับดีเอ็นเอดังกล่าวว่า “ทรานสฟอร์เมชัน” จากการทดลองฉีดแบคทีเรีย *Streptococcus pneumoniae* สายพันธุ์ก่อโรคที่ตายด้วยความร้อนกับสายพันธุ์ไม่ก่อโรคให้แก่หนู พบว่าหนูที่ได้เชื้อที่ผสมกันดังกล่าวตาย และมีการศึกษาต่อในปี ค.ศ. 1944 โดยการผสมดีเอ็นเอที่สกัดได้จากสายพันธุ์ก่อโรคในอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *S. pneumoniae* สายพันธุ์ไม่ก่อโรค พบว่าสายพันธุ์ไม่ก่อโรคมีแคปซูลเกิดขึ้น ซึ่งแคปซูลนี้เป็นลักษณะประจำพันธุ์ของ *S. pneumoniae* สายพันธุ์ก่อโรคและลักษณะดังกล่าวไม่พบในสายพันธุ์ไม่ก่อโรคปกติ (ชวนพิศ และ วัฒนาลัย, 2536; นงลักษณ์ และ ปรีชา, 2539) จึงเป็นที่ยอมรับของนักวิทยาศาสตร์ว่าแบคทีเรียบางชนิดสามารถรับดีเอ็นเอเข้าสู่ตัวมันเองได้โดยกระบวนการทรานสฟอร์เมชัน เซลล์แบคทีเรียที่เป็นผู้รับดีเอ็นเอในกระบวนการนี้จะอยู่ในสภาพทางสัณฐานวิทยาที่เหมาะสมต่อการรับดีเอ็นเอ อยู่ในสภาพที่เรียกว่า “คอมพิเทนท์” (competent) (วิสุทธิ, 2536; ชวนพิศ และ วัฒนาลัย, 2536; นงลักษณ์ และ ปรีชา, 2539) กระบวนการส่งถ่ายยีนแบบนี้เกิดได้เองในแบคทีเรียนอกจาก *S. pneumoniae* ยังมีอีกทั้ง *Bacillus*, *Haemophilus*, *Neisseria* และ *Rhizobium* เป็นต้น (นงลักษณ์ และ ปรีชา, 2539) จากรายงานพบว่าประสิทธิภาพสูงสุดในการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ในธรรมชาติจะเกิดได้เพียงหนึ่งเซลล์ในจำนวนแบคทีเรียพันเซลล์ โดยกระบวนการทรานสฟอร์เมชันที่เกิดขึ้นนั้นจะต้องมีปริมาณดีเอ็นเอมากเกินไปและเซลล์แบคทีเรียดังกล่าวต้องอยู่ในสภาพคอมพิเทนท์ (ชวนพิศ และ วัฒนาลัย, 2536) ภายหลังกระบวนการทรานสฟอร์เมชันในแบคทีเรียโดยธรรมชาติจะเกิดการแลกเปลี่ยนดีเอ็นเอกันโดยกระบวนการรีคอมบิเนชันของยีนในตำแหน่งเดียวกัน ดังนั้นวิธีนี้จึงถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการหาคำแหน่งของยีนบนโครโมโซมของแบคทีเรียได้ (ชวนพิศ และ วัฒนาลัย, 2536) แต่ก็มีแบคทีเรียในดินที่เรียกว่า *Agrobacterium tumefaciens* นั้นสามารถเกิดการส่งถ่ายพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าสู่พืชใบเลี้ยงคู่ได้โดยกระบวนการทรานสฟอร์เมชัน (Walden and Wingender, 1995; Talaro and Talaro, 1996) พลาสมิดดีเอ็นเอดังกล่าวไม่ต้องผ่านกระบวนการรีคอมบิเนชันของยีนซึ่งแตกต่างจากที่กล่าวมาข้างต้นเพื่อดำรงอยู่ของดีเอ็นเอต่อไปในเซลล์แบคทีเรีย นักวิทยาศาสตร์จึงได้ใช้ความรู้ดังกล่าวมาปรับใช้ในเทคนิคพื้นฐานในการทำพันธุวิศวกรรมของเซลล์ในกลุ่มสิ่งมีชีวิตโปรคาริโอตและยูคาริโอต โดยอาศัย

พลาสมิดหรือไวรัสเป็นตัวพาหะนำยีนที่ต้องการเข้าสู่เซลล์ผู้รับ แต่การทรานสเฟอร์เมชันที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาตินั้นมีประสิทธิภาพต่ำและทำได้ยากเนื่องจากมีข้อจำกัดมากมายเช่น การเลี้ยงเซลล์ให้อยู่ในสภาพคอมพิเทนทั้นั้น ต้องเลี้ยงให้เซลล์อยู่ในช่วง late log phase (ชวนพิศ และ วัฒนาลัย, 2536) และลักษณะการรับดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียที่เลือกใช้มีความแตกต่างกันตามชนิดของแบคทีเรียและลักษณะทางพันธุกรรมเช่น แบคทีเรียแกรมลบมีเชื้อหุ้มเซลล์บางกว่าแบคทีเรียแกรมบวก (สุวณี, 2536; นงลักษณ์ และ ปรีชา, 2539) และขนาดดีเอ็นเอยังมีผลต่อกระบวนการทรานสเฟอร์เมชัน โดยขนาดดีเอ็นเอที่จะเกิดการทรานสเฟอร์เมชันได้ดีจะมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 3 แส่น ถึง 8 ล้านดาลตัน (นงลักษณ์ และ ปรีชา, 2539) เป็นต้น ด้วยความยุ่งยากดังกล่าวและข้อจำกัดมากมายทำให้นักวิทยาศาสตร์ต้องหาวิธีการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะแบคทีเรียอันเป็นที่นิยมใช้ในงานทางด้านชีวโมเลกุลได้แก่

1.1 Heat shock หรือ Chemical transformation เกิดขึ้นในปี ค.ศ. 1970 จากการสาธิตการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* โดยการผสมเซลล์แบคทีเรียและ bacteriophage DNA ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) ความเข้มข้น 50 mM อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ($^{\circ}\text{C}$) จากนั้นนำไปกระตุ้นด้วยความร้อนประมาณ 37 ถึง 40 $^{\circ}\text{C}$ ในเวลาสั้น ๆ (Hanahan, 1983) กระบวนการดังกล่าวถูกเรียกว่า “heat shock” ต่อมาได้มีการปรับใช้ในการส่งถ่ายพลาสมิดดีเอ็นเอโดยอาศัยปัจจัยทางด้านเคมีของสารที่จะแตกตัวให้ประจุบวกนี้สามารถเปลี่ยนให้เซลล์แบคทีเรียกลายเป็นเซลล์คอมพิเทนท มีสมมุติฐานที่อธิบายว่าประจุบวกที่เกิดจากการแตกตัวของสารละลายที่ใช้ในการเตรียมเซลล์คอมพิเทนทดังกล่าวจะเข้าไปจับบริเวณผนังเซลล์ของแบคทีเรียและดีเอ็นเอเพื่อให้เซลล์พร้อมที่จะรับดีเอ็นเอที่เป็นประจุลบเข้าไปภายในเซลล์ (Mark *et al.*, 1995) โดยอาศัยปัจจัยของอุณหภูมิที่ได้กล่าวมาแล้ว เพื่อให้เกิดกระบวนการ heat shock ที่สมบูรณ์ ในระยะเวลาต่อมาได้มีการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียให้เพิ่มมากขึ้น โดยการเพิ่มชนิดของสารละลายที่แตกตัวให้ธาตุที่อยู่ในรูปของประจุบวกออกมา ซึ่งธาตุประจุบวกเหล่านั้นได้แก่ Mn^{2+} , Rb^+ และ K^+ เป็นต้น รวมถึงสารไฮโดรคาร์บอนบางชนิดได้แก่ glycerol, dimethyl sulfoxide (DMSO) และ dithiothreitol เป็นต้น (Hanahan, 1982) สารละลายดังกล่าวจะช่วยทำให้เซลล์แบคทีเรียเปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์คอมพิเทนท โดยการเลือกสารละลายเหล่านี้มาผสมรวมกันในอัตราส่วนที่เหมาะสมต่อการเตรียมเซลล์คอมพิเทนท การเตรียมเซลล์คอมพิเทนทด้วยวิธี heat shock ให้มีประสิทธิภาพการทรานสเฟอร์เมชันสูง ๆ นั้นยังจะต้องใช้สภาวะ (condition) ของอุณหภูมิที่เหมาะสม และการเตรียมเซลล์คอมพิเทนทให้มีปริมาณมาก ๆ (Dower *et al.*, 1988)

วิธีนี้สามารถใช้กับแบคทีเรียแกรมลบหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *E. coli* และแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิด ในปัจจุบันสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการส่งถ่ายพลาสมิด pBR322 เข้าสู่เซลล์ *E. coli* ที่ผ่านการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 18 °C ได้มีประสิทธิภาพสูงสุดประมาณ 10^9 cells/ μ g of DNA (Inoue *et al.*, 1990)

1.2 Protoplast transformation เริ่มต้นจากการแยกเอาผนังเซลล์ออก โดยอาศัยเอนไซม์ไลติก (lytic enzyme) ในการย่อยผนังเซลล์ จากนั้นก็ใช้ PEG: polyethylene glycol กระตุ้นให้เซลล์รับเอาดีเอ็นเอเข้าไปภายใน นำไปเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมเพื่อให้เซลล์คืนสภาพปกติ (regeneration) ในการส่งถ่ายดีเอ็นเอด้วยวิธีนี้สามารถใช้กับแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดได้ดีเช่น *Streptomyces* และ *Bacilli* (Chassy *et al.*, 1988) พบว่าประสิทธิภาพมากที่สุดที่เคยรายงานมาประมาณ 10^6 cells/ μ g of DNA ในเซลล์แบคทีเรียโดยใช้พลาสมิด pBR322 (Chung *et al.*, 1989)

1.3 Electroporation เป็นวิธีการกระตุ้นเซลล์ด้วยสนามไฟฟ้า (electric field) ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีความสามารถที่ยอมให้ดีเอ็นเอผ่านเข้าภายในเซลล์แบคทีเรีย ในปี ค.ศ. 1983 มีการทดลองครั้งแรกในการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่แบคทีเรีย *Bacillus cereus* แต่ยังไม่สามารถนำมาใช้ในการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียได้ เพราะการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ประสิทธิภาพต่ำเนื่องจากยังไม่สามารถหาเงื่อนไขที่เหมาะสม (Chassy *et al.*, 1988) จนกระทั่งนักวิทยาศาสตร์ของบริษัท BIO-RAD ได้ค้นพบกระบวนการทำอิเล็กโทรพอเรชันให้มีประสิทธิภาพสูงในการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ซึ่งมีประสิทธิภาพในการทรานสเฟอร์เมชันประมาณ 10^6 cells/ μ g of DNA ซึ่งแบคทีเรียที่นำมาใช้ไม่ได้ผ่านกระบวนการทางเคมีให้เป็นเซลล์คอมพิเทนท์ (Chassy *et al.*, 1988) ต่อมาในปี ค.ศ. 1988 ได้มีการศึกษาถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการทรานสเฟอร์เมชันได้แก่ สนามไฟฟ้า, ระยะเวลาที่เกิดกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชัน, ความเข้มข้นของพลาสมิดที่ใช้ และความเข้มข้นของเซลล์ในการทรานสเฟอร์เมชัน เป็นต้น ผลการทดลองพบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ที่ผ่านการล้างประจุต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อสนามไฟฟ้า ด้วยสารละลาย HEPES เพียงตัวเดียวหรือน้ำกลั่น โดยที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการส่งถ่ายพลาสมิด pBR329 เข้าสู่เซลล์ *E. coli* ได้ประมาณ 10^9 ถึง 10^{10} cells/ μ g of DNA (Dower *et al.*, 1988) และในการส่งถ่ายพลาสมิด pBR322 เข้าสู่เซลล์ *E. coli* มีประสิทธิภาพในการทรานสเฟอร์เมชันประมาณ 10^{10} cells/ μ g of DNA (Kimoto and Taketo, 1996) นอกจากนั้นวิธีนี้ยังเป็นวิธีการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่แบคทีเรียได้ทั้งแกรมลบและแกรมบวกได้ในปริมาณมากกว่าวิธีอื่น ๆ (Trevors, 1991) อีกทั้งยังสามารถส่งถ่ายดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ถึง 240 kb เข้าสู่เซลล์ *E. coli* ได้ (Sheng *et al.*, 1995)

1.4 Biolistic transformation หรือ Particle gun bombardment คือ กระบวนการทรานสเฟอร์เมชันดีเอ็นเอ โดยการเคลือบดีเอ็นเอบนผงทองคำ (Walden and Wingender, 1995; Heiser, 2000) หรือทังสเตน (Heiser, 2000) แล้วยิงเข้าไปภายในเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยงบนอาหารแข็งโดยอาศัยแรงอัดของก๊าซฮีเลียมที่บรรจุในกระบอกทำให้ผงทองคำหรือทังสเตนที่มีดีเอ็นเอเคลือบอยู่ยิงเข้าสู่เซลล์เป้าหมายด้วยลักษณะการเคลื่อนที่ทางฟิสิกส์ที่เรียกว่า “microprojectiles” ซึ่งประสิทธิภาพในการทรานสเฟอร์เมชันที่รายงานมานั้นไม่สามารถเปรียบเทียบกับวิธีอื่นได้ เนื่องจากวิธีการที่ทำการทรานสเฟอร์เมชันนั้นได้ใช้เซลล์แบคทีเรียที่อยู่ในลักษณะของโคโลนีที่โตบนอาหารแข็ง (Heiser, 2000) ซึ่งคล้ายกับวิธีทรานสเฟอร์เมชันด้วยเครื่องเร่งอนุภาค แตกต่างกับวิธีทรานสเฟอร์เมชันอื่นๆที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

1.5 Ion beam bombardment คือการนำเอาเครื่องเร่งอนุภาคมารับใช้ในการทรานสเฟอร์เมชัน จากรายงานพบว่าสามารถส่งถ่ายพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* โดยการเร่งอนุภาคที่มีพลังงานต่ำของธาตุโลหะเช่น อาร์กอน (Ar) ให้เจาะผนังเซลล์แบคทีเรียเข้าไปด้วยพลังงานต่ำ (25 keV) จากนั้นจึงส่งพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียโดยการแช่ในสารละลายที่มีพลาสมิด จากผลการทดลองพบว่ายังไม่มีการรายงานถึงประสิทธิภาพการทรานสเฟอร์เมชันและกลไกการส่งถ่ายดีเอ็นเอ (Anuntalabhochai *et al.*, 2001)

2 สมมุติฐานของกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชัน (Hypothesis of electroporation)

สมมุติฐานที่รวบรวมได้พบว่า กระบวนการอิเล็กโทรพอเรชันสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ

สมมุติฐานที่ 1. “อิเล็กโทรพอเรชัน” คือ กระบวนการ หรือวิธีการ หรือเครื่องมือในการสร้างความต่างศักย์ไฟฟ้า (voltage) หรือสนามไฟฟ้าที่มีความเข้มสูง (electric field strength) เพื่อกระตุ้นให้เกิดรู (pore) หรือ โครงสร้างที่คล้ายรู (pore-like structure) บนเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้เกิดช่องทางผ่านของสารเคมีโดยเฉพาะอย่างยิ่งดีเอ็นเอผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์ (Calvin and Hanawalt, 1988; Antonov *et al.*, 1993; Sheng *et al.*, 1995)

สมมุติฐานที่ 2. “อิเล็กโทรพอเรชัน” คือ กระบวนการ หรือวิธีการ หรือเครื่องมือที่สร้างความต่างศักย์ไฟฟ้าสูงหรือการสร้างสนามไฟฟ้าที่มีความเข้มสูงเพื่อกระตุ้นให้เยื่อหุ้มเซลล์มีความสามารถในการผ่านเข้าออกของสารภายนอกและภายในเซลล์ได้มากกว่าปกติ ซึ่งความสามารถของเยื่อหุ้มเซลล์ดังกล่าวเรียกว่า “permeability” ทำให้สารเคมีโดยเฉพาะอย่างยิ่งดีเอ็นเอสามารถผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์ได้ (Dury, 1988; Miller, 1988 and Gang *et al.*, 1999)

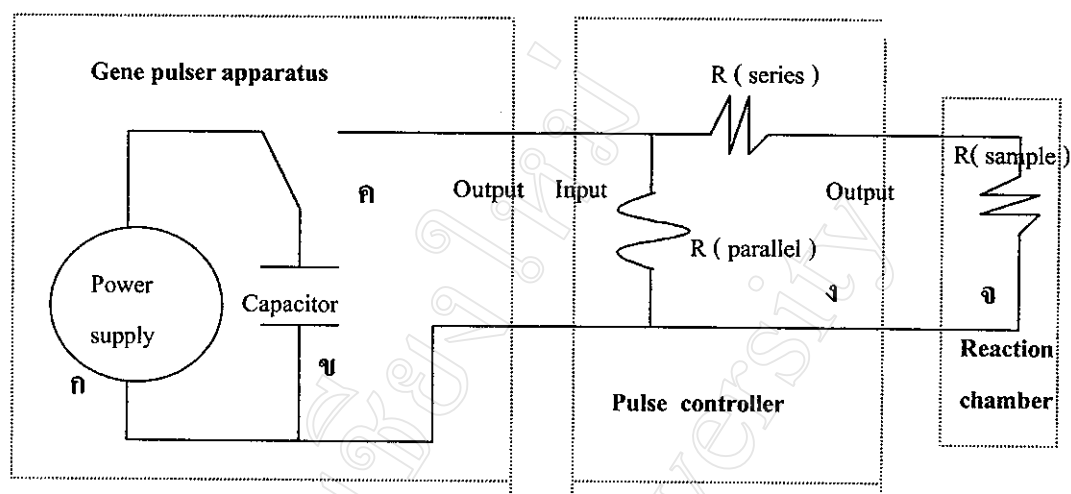
โดยสรุปอิเล็กโทรพอเรชันนั้นจะต้องอาศัยความต่างศักย์ไฟฟ้าสูงมากหรือสนามไฟฟ้าที่มีความเข้มสูง ในช่วงระยะเวลาเพียงเศษส่วนพันของวินาที (msec) เพื่อใช้ในการกระตุ้นเซลล์ให้รับดีเอ็นเอเข้าไปภายในเซลล์โดยกระบวนการทรานสเฟอร์เมชัน อย่างไรก็ตามกระบวนการนี้ยังไม่มีผู้ใดทราบถึงกลไกที่แท้จริง

3. การใช้ประโยชน์จากกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชัน (An application of electroporation)

“อิเล็กโทรพอเรชัน” เป็นเครื่องมือชนิดหนึ่งที่น่าสนใจในการส่งถ่ายยีนหรือดีเอ็นเอโดยกระบวนการทรานสเฟอร์เมชันเข้าสู่สิ่งมีชีวิต เพื่อนำมาใช้ในการทำ DNA library หรือ gene library โดยการสร้างความต่างศักย์ไฟฟ้าสูงในเซลล์แขวนลอยกับดีเอ็นเอในช่วงเวลาสั้น ส่งผลให้เซลล์มีความสามารถในการรับเอาดีเอ็นเอเข้าไปได้ ซึ่งสามารถปรับใช้กับเซลล์ของสิ่งมีชีวิตได้ทั้งกลุ่มยูคาริโอตและโพรคาริโอตได้แก่ สัตว์ เช่น แมลงหวี่ (Park *et al.*, 1999), พืช เช่น ยาสูบ (Pih *et al.*, 1995), ยีสต์ เช่น *Saccharomyces cerevisiae* (Van Dijken *et al.*, 2000), โปรโตซัว เช่น *Trypanosoma cruzi* (Martinez-Calvillo *et al.*, 1997), และแบคทีเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งนั้นสามารถส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ด้วยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันใช้ได้ทั้งแกรมลบและแกรมบวกได้แก่ *Acetobacter xylinum* (Hall *et al.*, 1992), *Lactobacillus plantarum* (Thompson *et al.*, 1997), *Enterococcus faecalis* (Dunny *et al.*, 1991), ruminal bacteria (Whitehead, 1992), *Streptococcus bovis* (Wyckoff and Whitehead, 1997), *Saccharopolyspora erythraea* (Fitzgerald *et al.*, 1998) และ *Escherichia coli* (Golub, 1987; Hara *et al.*, 1988; Jacobs *et al.*, 1990; Antonov *et al.*, 1993; Sheng *et al.*, 1995) เป็นต้น

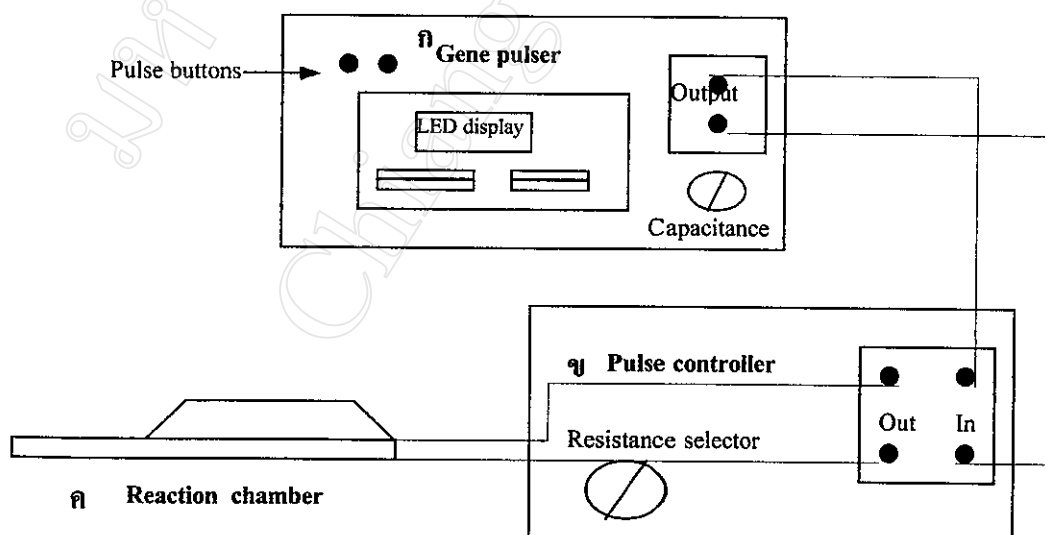
4. หลักการสำคัญในเครื่องอิเล็กโทรพอเรเตอร์ (Principle of electroporator)

กระบวนการอิเล็กโทรพอเรชันเป็นวิธีการที่ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของสิ่งมีชีวิตมีความสามารถในการรับสารที่มีโมเลกุลใหญ่ได้แก่ ดีเอ็นเอ, โปรตีน และโมเลกุลอื่น ๆ เข้าไปในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เมื่อเซลล์นั้นถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้ากระแสตรงในช่วงเวลาสั้น ๆ ซึ่งกระบวนการส่งกระแสไฟฟ้าเข้าไปที่เซลล์นั้นถูกควบคุมด้วยเครื่องอิเล็กโทรพอเรเตอร์ (electroporator) ภายในเครื่องบรรจุส่วนประกอบต่าง ๆ ที่สำคัญวางอยู่ในตำแหน่งต่าง ๆ ของวงจรไฟฟ้า ส่วนประกอบเหล่านั้นได้แก่ power supply (รูป 1 ก), capacitors (รูป 1 ข), discharge circuit (รูป 1 ค) และ reaction chamber (รูป 1 ง) ซึ่งมีหน้าที่หลักในเครื่องอิเล็กโทรพอเรเตอร์ (รูป 2) ดังนี้ (Promega, 1987)



รูป 1 วงจรไฟฟ้าในเครื่องอิเล็กโทรพอเรเตอร์

- ก. Power supply
- ข. Capacitor
- ค. Discharge circuit
- ง. Resistance circuit
- จ. Reaction chamber



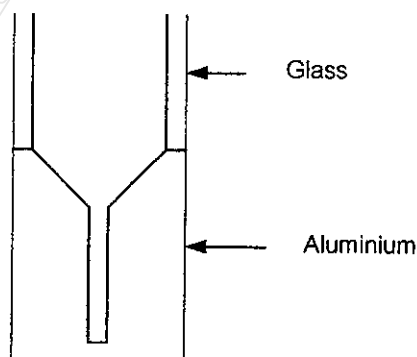
รูป 2 ส่วนประกอบหลักของเครื่องอิเล็กโทรพอเรเตอร์

- ก. Gene pulser
- ข. Pulse controller
- ค. Reaction chamber

- 1 Power supply มีหน้าที่ในการเปลี่ยนกระแสไฟฟ้าให้เป็นไฟฟ้ากระแสตรง
- 2 Capacitors มีหน้าที่ในการเก็บกระแสไฟฟ้ากระแสตรงที่เกิดจาก power supply จนได้ปริมาณที่ต้องการ
- 3 Discharge circuit เป็นวงจรไฟฟ้าที่ทำหน้าที่ในการปล่อยกระแสไฟฟ้าที่เก็บใน capacitor ไปที่ตัวอย่าง หรือส่งไปที่ reaction chamber

4 Reaction chamber หรือ shocking chamber เป็นส่วนที่กระแสไฟฟ้าที่ผ่านมาจาก discharge circuit ส่งไปที่ตัวอย่างที่บรรจุในภาชนะที่เรียกว่า “cuvette” (รูป 3)

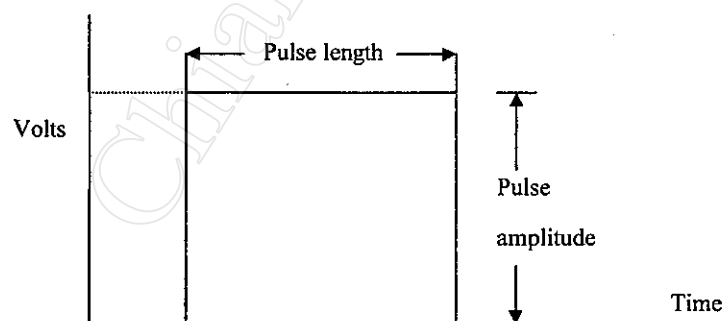
ต่อมาพบว่าวงจรไฟฟ้าที่เสนอไว้นี้ยังคงมีปัญหาในการใช้งาน เนื่องจากตัวอย่างมีความต้านทานการไหลของกระแสไฟฟ้ามาก เป็นสาเหตุให้เกิดการช็อต (arcing) หรือลัดวงจรของไฟฟ้า ส่งผลให้เกิดความล้มเหลวในการทรานส์ฟอร์มเมชันและอาจสร้างความเสียหายแก่เครื่องอิเล็กทรอนิกส์รวมถึงอาจเป็นอันตรายต่อผู้ใช้ ซึ่งเป็นเหตุผลที่สำคัญที่ทำให้ทางบริษัท BIO-RAD ได้เพิ่มวงจรอีกตัวหนึ่งซึ่งบรรจุอยู่ในเครื่อง pulse controller (รูป 2ข) เรียกว่า “resistance circuit” (รูป 1ง) ทำหน้าที่ในการควบคุมความต้านทานในวงจรทั้งหมดโดยตัวต้านทานที่เป็นคู่ขนานกับความต้านทานในตัวอย่าง เพื่อป้องกันการลัดวงจรที่จะเกิดขึ้นจากการตีกลับของกระแสไฟฟ้าที่เกิดจากตัวอย่างมีความต้านทานมากกว่าที่กระแสไฟฟ้าภายในเครื่องจะไหลผ่านไปได้ ซึ่งจะทำงานร่วมกับเครื่องอิเล็กทรอนิกส์ดังรูป 2 และยังเหมาะกับการทำอิเล็กทรอนิกส์ในเซลล์แขวนลอยแบบที่เรียกว่าเนื่องจากการทรานส์ฟอร์มเมชันในแบบที่เรียนนี้ต้องใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าสูงมากในแต่ละครั้ง จากรายงานพบว่าใน *E. coli* ต้องใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าสูงถึง 2,500 V จึงจะให้ประสิทธิภาพในการทรานส์ฟอร์มเมชันสูงสุด (Dower *et al.*, 1988)



รูป 3 แสดงภาพของ “cuvette”

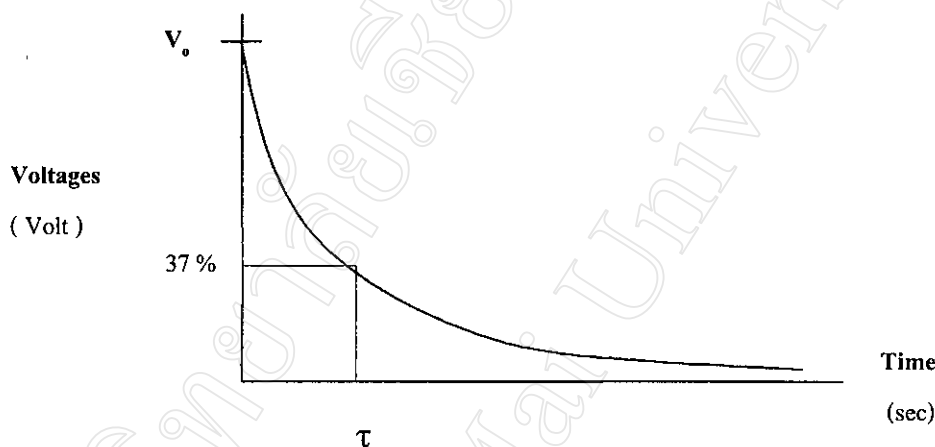
ในการส่งกระแสไฟฟ้าเข้าสู่ shocking chamber (รูป 1จ และรูป 2ค) จะสร้างรูปแบบของความต่างศักย์ไฟฟ้าตามที่ต้องการใน “cuvette” เพียงระยะเวลาสั้นๆ (msec) ซึ่งเกิดจากการปล่อยกระแสไฟฟ้าจากวงจรเข้าสู่ shocking chamber สามารถแบ่งได้ 2 แบบ คือการเกิดความต่างศักย์ไฟฟ้าแบบต่อเนื่องในระดับคงที่ซึ่งจะทำให้เกิดรูปของกราฟที่เรียกว่า “square waveform” และการเกิดความต่างศักย์แบบไม่ต่อเนื่องทำให้เกิดรูปของกราฟที่เรียกว่า “exponential decay waveform”

1. “Square waveform” คือการสร้างความต่างศักย์ไฟฟ้าในปริมาณที่ต้องการระหว่างอิเล็กโทรด (electrodes) หรือตัวนำไฟฟ้าที่มีหน้าที่เป็นขั้วไฟฟ้า อันเป็นส่วนประกอบสำคัญอยู่ใน shocking chamber (รูป 1จ และรูป 2 ค) ซึ่งเป็นที่วางภาชนะที่บรรจุเซลล์แขวนลอยในการทรานสเฟอร์เมชันด้วยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันที่เรียกว่า “cuvette” (รูป 3) หลังจากถูกนำไปประกอบเข้าใน shocking chamber เมื่อเริ่มกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชัน พบว่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เกิดขึ้นนั้นจะมีระดับคงที่ตลอดช่วงเวลาที่เกิดอิเล็กโทรพอเรชันที่เรียกว่า “time constant” จนเสร็จกระบวนการ ความต่างศักย์ไฟฟ้างกล่าวเกิดจากการปล่อยไฟฟ้ากระแสตรงที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจากวงจรเข้าสู่ “cuvette” จนเกิดปริมาณความต่างศักย์ไฟฟ้าตามต้องการ ดังรูป 4 เมื่อสิ้นสุดช่วงเวลาในการปล่อยกระแสไฟฟ้าแล้วความต่างศักย์ไฟฟ้าก็จะลดลงอย่างรวดเร็วจนเป็นศูนย์ การสร้าง “square waveform” จะต้องอาศัยตัว capacitor (รูป 1ข) ที่มีขนาดใหญ่มากกว่าปกติเพื่อคงระดับความต่างศักย์ไฟฟ้าให้คงที่ในระยะเวลาที่ต้องการ และเครื่องมือดังกล่าวมีราคาแพงมาก



รูป 4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความต่างศักย์ไฟฟ้าในช่วงเวลาที่เกิดกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชัน ในลักษณะที่เรียกว่า “square waveform”

2. “Exponential decay waveform” คือการสร้างปริมาณความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ตรงกันข้ามกับ “square waveform” คือ “exponential decay waveform” จะสร้างความต่างศักย์ไฟฟ้าขึ้นระหว่างอิเล็กโทรดส์ โดยการเก็บกระแสไฟฟ้าไว้ที่ capacitor ในปริมาณที่ต้องการแล้วปล่อยออกมาโดยไม่ต้องคงระดับความต่างศักย์ไฟฟ้าให้คงที่เหมือนการทำ “square waveform” หลังจากเริ่มต้นการเกิดขบวนการอิเล็กโทรพอเรชัน จากนั้นความต่างศักย์ไฟฟ้าจะลดลงไปจนกระทั่งเหลือเพียง 37 % จากความต่างศักย์เริ่มต้น (V_0) จึงจะถือว่าสิ้นสุดกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชันดังรูป 5 ซึ่งเกิดจากเครื่องอิเล็กโทรพอเรเตอร์ (รูป 2)



รูป 5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความต่างศักย์ไฟฟ้าในช่วงเวลาที่เกิดกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชันในลักษณะที่เรียกว่า “exponential decay waveform”

ซึ่งลักษณะในการเกิดความต่างศักย์ไฟฟ้าแบบนี้มีค่าทางไฟฟ้าที่เป็นปัจจัยสำคัญ (parameter) 2 ค่า คือ V_0 (ปริมาณความต่างศักย์สูงสุดที่จุดเริ่มต้น) และ τ (ระยะเวลาที่ความต่างศักย์สูงสุดที่จุดเริ่มต้นลดลงเหลือประมาณ 37%) ถูกเรียกว่า “time constant” ($\tau = RC$) ค่านี้ถูกกำหนดจากความต้านทานในวงจร (R : ohms) และปริมาณไฟฟ้าที่เก็บไว้ใน capacitor ที่เรียกว่า “capacitance” (C : farad) ดังนั้น τ ควรจะถูกใช้ในการควบคุมความต้านทานที่เกิดจากวงจรไฟฟ้าในเครื่อง capacitor หรือจากตัวอย่างที่นำมาทำอิเล็กโทรพอเรชัน

ยังมีค่าทางไฟฟ้าที่สำคัญอีกค่าหนึ่งคือ ความเข้มของสนามไฟฟ้า [electric field strength, E_0 (V/cm) = V/d (cm)] เกิดจากปริมาณความต่างศักย์ไฟฟ้าสูงสุดที่จุดเริ่มต้น (V_0) ที่อิเล็กโทรดส์หารด้วยระยะทางระหว่างอิเล็กโทรดส์ (d ; cm) การลดลงของความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผ่านเซลล์ถูกควบคุมโดยความเข้มของสนามไฟฟ้าและเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ ดังนั้นเมื่อ

เปลี่ยนชนิดของเซลล์สิ่งมีชีวิตที่ใช้ให้มีขนาดแตกต่างกันมาก ๆ จะต้องทำการปรับความเข้มสนามไฟฟ้าที่ใช้เพื่อให้เกิดขบวนการอิเล็กโทรพอเรชันที่เหมาะสมเช่น ใน *E. coli* จะใช้ความเข้มสนามไฟฟ้า 12.5 kV/cm (Dower *et al.*, 1988; Elvin and Bingham, 1991), ใน *Streptococcus bovis* จะใช้ความเข้มสนามไฟฟ้า 12.5 kV/cm (Wyckoff and Whitehead, 1997) และในเซลล์ยีสที่มีขนาดใหญ่กว่าพบว่าการใช้ความเข้มสนามไฟฟ้าเพียง 800 V/cm (Pih *et al.*, 1995) เป็นต้น

การศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพในการทรานสเฟอร์เมชันด้วยการสร้างลักษณะความต่างศักย์ไฟฟ้าทั้งสองรูปแบบที่เสนอมาข้างต้นนี้ มีรายงานว่าเซลล์ที่ผ่านขบวนการอิเล็กโทรพอเรชันที่เกิดจากการสร้างความต่างศักย์ไฟฟ้าทั้งสองรูปแบบมีประสิทธิภาพในการทรานสเฟอร์เมชันเท่ากัน ได้เลือกทดลองกับแบคทีเรีย *E. coli* พบว่ามีประสิทธิภาพในการส่งถ่ายพลาสมิดดีเอ็นเอในปริมาณเท่ากัน เมื่อทำการเปรียบเทียบกันระหว่างการสร้างความต่างศักย์ไฟฟ้าในรูปแบบ “exponential decay waveform” กับ “square waveform” พบว่ามีประสิทธิภาพเท่ากัน (Elvin and Bingham, 1991) แต่เครื่องอิเล็กโทรพอเรเตอร์ที่ใช้สร้างความต่างศักย์ไฟฟ้าในรูปแบบ “square waveform” นั้นมีราคาแพง เนื่องจากต้องเพิ่มความสามารถในการเก็บกระแสไฟฟ้าของ capacitor ดังนั้นจึงมีความนิยมใช้เครื่องอิเล็กโทรพอเรเตอร์ที่สร้างความต่างศักย์ไฟฟ้าแบบ “exponential decay waveform” นี้มากกว่า

3. ประสิทธิภาพการทรานสเฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันในแบคทีเรีย (Efficiency of bacterial transformation by electroporation)

จากการศึกษาทางด้านการทรานสเฟอร์เมชันโดยใช้วิธีอิเล็กโทรพอเรชันพอที่จะสรุปถึงปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการทรานสเฟอร์เมชัน โดยวิธีนี้ได้แก่

1. การเตรียมเซลล์ (cell preparation) ในแบคทีเรียบางชนิด (species) พบว่าช่วงเวลาในการเจริญของเซลล์ที่ได้ทำการเก็บเซลล์เพื่อมาทำเซลล์คอมพิเทนท์มีความสัมพันธ์ต่อความสามารถของการกลายเป็นเซลล์คอมพิเทนท์ที่ใช้ในการทรานสเฟอร์เมชันด้วยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน ซึ่งแบคทีเรียบางชนิดที่มีรายงานและโดยเฉพาะอย่างยิ่ง *E. coli* พบว่าช่วงการเจริญเติบโตที่นำมาทำเซลล์คอมพิเทนท์ได้ดีที่สุดคือ ช่วงต้นของ Mid log phase (Miller, 1988; Dower *et al.*, 1988) ซึ่งมีรายงานว่าประสิทธิภาพในการทรานสเฟอร์เมชันนั้นจะลดลงอย่างชัดเจนทางสถิติเมื่อเก็บเซลล์ที่เจริญอยู่ในช่วงปลาย log phase ส่วนผลกระทบต่างๆ ที่ส่งผลให้เกิดความแปรปรวนไปในการเลี้ยงเซลล์เช่น สภาพแวดล้อมที่ใช้ในการเลี้ยงได้แก่ การเลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 18 °C ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการทรานสเฟอร์เมชันใน *E. coli* (Chuang *et al.*, 1995) โดยทั่วไปมัก

นิยมเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C (Dower et al., 1988; Calvin and Hanawalt, 1988; Sheng et al., 1995 and Kimoto and Taketo, 1996) ซึ่งระยะในการเก็บเซลล์เหล่านี้จะมีความจำเพาะต่อชนิดของแบคทีเรียที่แตกต่างกัน และบางครั้งจะจำเพาะต่อสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน

การเตรียมเซลล์ให้เป็นเซลล์คอมพิเทนท์นั้น องค์ประกอบของสารละลายที่ใช้ในกระบวนการทางเคมีจะมีความสำคัญต่อการเตรียมเซลล์คอมพิเทนท์ เพราะจะส่งผลถึงประสิทธิภาพการทรานสเฟอร์เมชัน องค์ประกอบของสารละลายเหล่านี้ได้แก่ ปริมาณประจุ, ความเข้มข้นของสารต่าง ๆ, pH และค่าทางวิทยาศาสตร์ต่าง ๆ เป็นต้น ซึ่งจำเป็นอย่างมากที่ต้องปรับเพื่อให้เหมาะสมต่อการอยู่รอดของเซลล์คอมพิเทนท์และประสิทธิภาพในการทรานสเฟอร์เมชันสูงสุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งปริมาณประจุไฟฟ้าของสารที่ใช้ในการเตรียมเซลล์คอมพิเทนท์นั้นจะเป็นตัวกำหนดอัตราการไหลของไฟฟ้าที่ผ่านตัวอย่างที่นำไปทำอิเล็กโทรพอเรชันหรือก่อให้เกิดความต้านทานไฟฟ้าขึ้นและปริมาณความร้อนที่จะเกิดขึ้นภายหลังจากการทำอิเล็กโทรพอเรชัน ประจุไฟฟ้าที่มีปริมาณมากในเซลล์คอมพิเทนท์นั้นจะส่งผลต่อความต้านทานรวมในวงจรไฟฟ้า อาจจะทำให้เกิดจากข้อต่อหรือเกิดไฟฟ้าลัดวงจรขึ้นได้ มีรายงานว่า การเตรียมเซลล์คอมพิเทนท์ด้วยน้ำกลั่นหรือสารละลาย HEPES และ/หรือ glycerol และ/หรือ DMSO จะทำให้เซลล์คอมพิเทนท์มีประจุไฟฟ้าน้อยที่สุด (Dower et al., 1988; Willson and Gough, 1988; Hall et al., 1992; Chuang et al., 1995; Sheng et al., 1995) แต่ถ้ามีสารชนิดอื่น ๆ ที่จำเป็นต้องเพิ่มเติมในปริมาณที่สูงขึ้นและสารต่าง ๆ นี้ส่งผลต่อความต้านทานของตัวอย่างที่นำไปทำอิเล็กโทรพอเรชัน อาจป้องกันได้จากการตั้งค่า “time constant” ให้ต่ำหรือตั้งค่าความต้านทานสูงขึ้น เป็นต้น ส่วนการเก็บรักษาเซลล์คอมพิเทนท์ด้วยกลีเซอรอลหรือซูโครส นั้นนิยมเก็บที่อุณหภูมิ -70 °C (Golub, 1988; Dower et al., 1988; Bio-rad Laboratories Richmond, CA; Sheng et al., 1995) หรือที่อุณหภูมิ -80 °C (Wyckoff and Whitehead, 1997; Buckley et al., 1999)

2. ผลของความเข้มสนามไฟฟ้า (E_e) และ time constant (τ) ต่อการทำอิเล็กโทรพอเรชันในแบคทีเรีย (Effect of electric strength and time constant for bacteria electroporation) จากข้อมูลการทดลองในการทรานสเฟอร์เมชันของแบคทีเรียหลายชนิดพอจะสรุปถึงค่าคงที่ทางไฟฟ้าที่สำคัญในการทำอิเล็กโทรพอเรชันได้ ซึ่งโดยปกติแล้วเมื่อปล่อยกระแสไฟฟ้าในช่วงเวลาสั้น ๆ พบว่าการเพิ่มความเข้มสนามไฟฟ้าจะทำให้ประสิทธิภาพในการทรานสเฟอร์เมชันเพิ่มขึ้นเพียงช่วงหนึ่งของการเพิ่มความเข้มสนามไฟฟ้าเท่านั้น ในการทดลองหาประสิทธิภาพการทรานสเฟอร์เมชันใน *E. coli* ลดลงเมื่อความเข้มของสนามไฟฟ้าเกินกว่าที่เซลล์คอมพิเทนท์จะทนต่อสภาวะดังกล่าวได้ แต่ลักษณะดังกล่าวนี้จะขึ้นกับค่า “time constant” ซึ่งค่าดังกล่าวนี้จะช่วยเก็ทหนุ่กันเพราะถ้าต้องการให้มีความเข้มของสนามไฟฟ้าสูงๆ ก็ต้องลดค่า “time constant” ลง

ตามหรือต้องการเพิ่ม “time constant” ในการทำอิเล็กโทรพอเรชันยาวออกไปจะต้องลดค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ลง จากการทดลองศึกษาถึงค่าทางไฟฟ้าที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มเมชันในวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน พบว่าค่าทางไฟฟ้าที่เป็นปัจจัยหลักในการทรานสฟอร์มเมชันที่ให้ประสิทธิภาพดีที่สุดคือ ความเข้มสนามไฟฟ้า 12.5 kV/cm, ความจุไฟฟ้า 25 μ F และความต้านทาน 200 Ω เมื่อทำอิเล็กโทรพอเรชันแล้วควรจะมีค่า “time constant” อยู่ในช่วง 4.5 – 5 msec เป็นค่าที่ได้ทำการทดสอบมาแล้วในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ LE392 ของการส่งถ่ายพลาสมิดดีเอ็นเอ pBR329 (Dower *et al.*, 1988)

3. ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ และ เซลล์ (DNA and cell concentration) จากการทดลองทรานสฟอร์มเมชันใน *E. coli* ด้วยวิธี heat shock พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอ็นเอที่ใช้ในการทรานสฟอร์มเมชันมากขึ้น ผลก็คือประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มเมชันจะเพิ่มขึ้นตามเสมอ (Hanahan, 1983) เช่นเดียวกับวิธีอิเล็กโทรพอเรชันซึ่งหน่วยในการวัดประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มเมชันนั้นขึ้นกับความถี่ในการปรากฏของเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดอย่างสมบูรณ์ (transformant) ต่อปริมาณดีเอ็นเอ ดังนั้นในการทำอิเล็กโทรพอเรชันเราจึงต้องใช้เซลล์คอมพิเทนท์ที่มีความเข้มข้นสูงมาก และลดอัตราการตายของเซลล์ โดยการเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอให้สะอาดเพื่อลดสารพิษเช่น phenol, chloroform และ alcohol เป็นต้น ที่ส่งผลต่อเซลล์ที่เราเตรียม (Miller, 1988) เพื่อเพิ่มโอกาสในการเกิด transformant ให้มาก