

บทที่ 5

วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย

1. การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ที่เหมาะสมต่อการทำเซลล์คอมพิเทนท์พบว่าเมื่อทำการเปรียบเทียบกราฟที่แสดงค่า O.D.₆₀₀ ในแต่ละช่วงเวลากับ growth curve ทำให้ทราบว่าช่วงเวลาที่เหมาะสมในการทำเซลล์คอมพิเทนท์ตามวิธีการทดลอง 3.1 และ 3.2 คือช่วง O.D.₆₀₀ = 0.5-1 มีจำนวนเซลล์ประมาณ 10^8 colony/ml ซึ่งใช้เวลาในการเลี้ยงประมาณ 2-3 1/2 ชั่วโมงในการเลี้ยงเซลล์ โดยทั่วไปการเลี้ยงเซลล์เพื่อเตรียมเซลล์คอมพิเทนท์ของวิธีอิเล็กโทรพอเรชันใช้ค่า O.D.₆₀₀ = 0.5-1 ในการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α และ LE392 (Dower *et al.*, 1988) หรือ O.D.₅₅₀ = 0.7-0.8 ในการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α (Sheng *et al.*, 1995) หรือ O.D.₆₀₀ = 0.4-0.5 ในการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ XL-1 Blue (Chuang *et al.*, 1995) หรือ O.D.₆₀₀ = 1 ในการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ JM101, JM109, MC1061 และ X1776 (Elvin and Bingham, 1991) มีรายงานว่า การเตรียมเซลล์คอมพิเทนท์ที่ดีในวิธีอิเล็กโทรพอเรชันนั้นจะต้องใช้เซลล์ที่อยู่ในช่วง mid log growth phase (Dower *et al.*, 1988) จากรายงานที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นว่าแม้แต่ในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์เดียวกัน ในการทำเซลล์คอมพิเทนท์นั้นแต่ละห้องปฏิบัติการยังมีการเลือกใช้ช่วงการดูดกลืนแสงและค่า O.D. ที่แตกต่างกันเพื่อให้ได้ค่า O.D. ที่เหมาะสมกับการทำเซลล์คอมพิเทนท์ เนื่องจากปัจจัยต่าง ๆ ที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ของแต่ละห้องปฏิบัติการนั้นมีความแตกต่างกันเช่น การใช้อาหาร SOB (ไม่มี Mg^{2+}) ในการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* และใช้ความเร็วในการเขย่าเลี้ยงเชื้อ 200-225 rpm (Sheng *et al.*, 1995) ส่วนในห้องปฏิบัติการนี้เลือกใช้อาหาร LB และการเขย่าเลี้ยงเชื้อ 150 rpm การศึกษารังนี้นี้ได้เลือกใช้ช่วงค่า O.D.₆₀₀ = 0.5-1 ในการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α (Dower *et al.*, 1988) ดังนั้นในการเลือกใช้ค่า O.D. ที่เหมาะสมจึงต้องทำการศึกษาถึงค่า O.D. ที่ตรงกับช่วงการเจริญเติบโตในช่วง mid log growth phase ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์ที่มีการเจริญเติบโตได้รวดเร็วและมีปริมาณสูง

ส่วนในวิธี heat shock มีรายงานการศึกษาว่าช่วงการเจริญเติบโตที่เหมาะสม คือ ช่วง early log growth phase (Chung *et al.*, 1989; Hengen, 1996) จากรายงานพบว่าเซลล์ *E. coli* ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C ช่วง O.D. ที่เหมาะสมในการเลือกมาใช้ในการทำเซลล์คอมพิเทนท์ของวิธี heat shock ได้แก่ O.D.₆₀₀ = 0.6 ในการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* (Inoue *et al.*, 1990) หรือ O.D.₆₀₀ = 0.94 ในการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* (Hengen, 1996) จากผลการทดลอง 1 ทำให้ทราบว่า O.D.₆₀₀ = 0.5-1 ซึ่งเป็นช่วง early log growth phase ถึง mid log growth phase เป็นช่วงที่เหมาะสมของการนำมาทำ

เซลล์คอมพิเทนท์ในวิธี heat shock และเพื่อเป็นมาตรฐานเดียวกันของการศึกษาและเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทรานสเฟอร์เมชันระหว่างวิธีอิเล็กโทรพอเรชันและวิธี heat shock

2. การศึกษาประสิทธิภาพการส่งถ่ายพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน

จากการศึกษาผลของขนาดพลาสมิดดีเอ็นเอทั้งสามชนิดคือ pUC19, p35S-GFP และ pBI221 ที่ส่งถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน พบว่าหลังจากทำการทรานสเฟอร์เมชันแล้วพลาสมิด pUC19 (2.7 kb) ที่มีขนาดเล็กที่สุด ให้ประสิทธิภาพในการทรานสเฟอร์เมชันสูงที่สุด คือ 5.33×10^6 transformants/ μ g รองลงมาคือ p35S-GFP (4.5 kb) และ pBI221 (5.7 kb) ตามลำดับ เช่นเดียวกับรายงานการทดลองในปี ค.ศ. 1995 ได้ทำการศึกษาผลการส่งถ่ายพลาสมิดดีเอ็นเอที่เรียกว่า bacterial artificial chromosome (BAC) เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* การทดลองได้ส่งถ่ายพลาสมิดที่มีขนาดแตกต่างกันเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH10B พบว่าประสิทธิภาพการทรานสเฟอร์เมชันจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อพลาสมิดที่เลือกใช้มีขนาดเล็กและประสิทธิภาพการทรานสเฟอร์เมชันจะลดลงเมื่อพลาสมิดที่เลือกใช้มีขนาดใหญ่ (Sheng *et al.*, 1995) และรายงานการทดลองในปี ค.ศ. 1998 ได้ทำการทดลองการส่งถ่ายพลาสมิด pUC19, pBR322 และ pPP4 เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ JM109 พบว่าประสิทธิภาพจะลดลงเมื่อขนาดพลาสมิดใหญ่ขึ้นและเพิ่มขึ้นเมื่อพลาสมิดมีขนาดเล็กลง (Szoskava and Horakova, 1998) จากผลการทดลองจึงสรุปได้ว่าการส่งถ่ายพลาสมิดขนาดเล็กจะมีประสิทธิภาพการทรานสเฟอร์เมชันสูงกว่าการส่งถ่ายพลาสมิดขนาดใหญ่ในปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอเท่ากัน

ในการทดลองนี้ได้ประสิทธิภาพการทรานสเฟอร์เมชันต่ำกว่าเท่าที่ควรคือ 10^8 transformants/ μ g โดยมีรายงานว่าการทำอิเล็กโทรพอเรชันจะทำให้เซลล์นั้นตายไปประมาณ 50-70% ซึ่งเซลล์ที่ได้รับดีเอ็นเอจะมีประมาณ 80% จากเซลล์ทั้งหมดที่มีชีวิตภายหลังจากการทำอิเล็กโทรพอเรชัน (Dower *et al.*, 1988) ดังนั้นการเตรียมเซลล์คอมพิเทนท์ในวิธีอิเล็กโทรพอเรชันนี้ควรเตรียมเซลล์ให้มีปริมาณมาก ๆ การทดลองนี้ได้เตรียมเซลล์จากอาหารเพียง 100 ml จากผลการทดลอง 1 จะเห็นว่าเซลล์ที่นำมาทำเซลล์คอมพิเทนท์มีจำนวน 10^8 cells/ml และถ้าเซลล์ไม่ตายเลยจะมีเซลล์คอมพิเทนท์ที่นำมาใช้ในการทรานสเฟอร์เมชันอยู่ประมาณ $10^9 - 10^{10}$ cells ในแต่ละหลอด (การทดลอง 5) และภายหลังจากการทำอิเล็กโทรพอเรชันพบว่าเซลล์ที่มีชีวิตมีเหลืออยู่ประมาณ $10^7 - 10^8$ cells/ml ดังนั้นจึงควรเพิ่มปริมาณอาหารที่ใช้ในการเตรียมเซลล์คอมพิเทนท์ให้มากขึ้นหรือพยายามเพิ่มจำนวนเซลล์ให้มีจำนวนมากขึ้น และหาวิธีการลดอัตราการตายของการเตรียมเซลล์คอมพิเทนท์เป็นต้น ส่วนการเพิ่มประสิทธิภาพการทรานสเฟอร์เมชันโดยวิธีอื่น ๆ

ที่มีรายงานไว้ได้แก่ การเลี้ยงเซลล์ในสภาพที่เหมาะสม ซึ่งมีรายงานการทดลอง ในปี ค.ศ. 1995 ได้ทำการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* ที่อุณหภูมิแตกต่างกันคือ ที่ 18 °C และ 37 °C พบว่าเซลล์ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 18 °C มีประสิทธิภาพการทรานสเฟอร์เมชันสูงกว่าเซลล์ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C ประมาณ 3 เท่า เมื่อนำไปส่งถ่ายพลาสมิดด้วยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน (Chuang *et al.*, 1995) หรือการใช้ความร้อนกระตุ้นเซลล์ภายหลังการทำอิเล็กโทรพอเรชันและความเข้มข้นของสารละลายที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเซลล์ พบว่าภายหลังจากการทำอิเล็กโทรพอเรชันแล้วนำไปทำ heat shock ด้วยอุณหภูมิ 20-40 °C กับเซลล์ที่เก็บอยู่ในน้ำกลั่น พบว่าประสิทธิภาพจะเพิ่มขึ้นจากปกติถึง 3 เท่า ส่วนเซลล์ที่เก็บในสารละลาย sucrose ความเข้มข้น 290 mosmol/l จะมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นอีก 10 เท่า (Antonov *et al.*, 1993) การทดลองนี้ไม่ได้กระตุ้นด้วยความร้อนภายหลังการทำอิเล็กโทรพอเรชัน ดังนั้นการทำ heat shock ภายหลังการทำอิเล็กโทรพอเรชันและการเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิต่ำจึงเป็นอีกหนทางหนึ่งที่น่าสนใจในการเพิ่มประสิทธิภาพการทรานสเฟอร์เมชัน

3. การศึกษาการส่งถ่ายพลาสมิดที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน

การศึกษานี้ได้เลือกพลาสมิด p35S-GFP มาใช้ เนื่องจากผลจากการทดลอง 2 ซึ่งเห็นว่าพลาสมิด p35S-GFP ยากต่อการนับจำนวนโคโลนีภายหลังการทรานสเฟอร์เมชันและมีประสิทธิภาพแตกต่างไปจากพลาสมิด pUC19 เพียงเล็กน้อย พลาสมิด p35S-GFP ปริมาณ 10 , 100 และ 500 ng ถูกเลือกใช้ศึกษาการส่งถ่ายพลาสมิดที่มีความเข้มข้นต่างกันเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย เพื่อเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่รับพลาสมิดในการส่งถ่ายพลาสมิดที่มีความปริมาณต่างกัน ผลคือการส่งถ่ายพลาสมิดที่มีความเข้มข้นมากจะได้จำนวนเซลล์ที่รับพลาสมิดมากกว่าการส่งถ่ายพลาสมิดที่มีความเข้มข้นน้อยกว่า สอดคล้องกับรายงานการทดลองในปี ค.ศ.1991 ได้ทำการทรานสเฟอร์เมชันส่งถ่ายพลาสมิด pDL414 ปริมาณ 25 -500 ng เข้าสู่แบคทีเรีย *Enterococcus faecalis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก พบว่าเมื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย จะทำให้ประสิทธิภาพในการทรานสเฟอร์เมชันเพิ่มขึ้นตามเสมอ (Dunny *et al.*, 1991)

การศึกษานี้พบว่า สามารถใช้พลาสมิดที่มีปริมาณเพียง 10 ng ในการทรานสเฟอร์เมชัน ซึ่งการเลือกใช้พลาสมิดปริมาณ 10 ng มีจุดประสงค์เพื่อนำมาปรับใช้ในงานที่ต้องการส่งถ่ายพลาสมิดถูกผสมที่เกิดจากกระบวนการ ligation ได้เนื่องจากในการทำ ligation ในแต่ละครั้งปริมาณพลาสมิดถูกผสมที่ได้จากกระบวนการ ligation นั้นจะมีปริมาณความเข้มข้นประมาณ 10 ng

4. การศึกษาประสิทธิภาพการส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ที่ละลายในสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้นต่างกัน ในแต่ละช่วงเวลาของการเก็บรักษาเซลล์คอมพิเทนท์ที่อุณหภูมิ -20°C

พบว่าสารละลายกลีเซอรอลที่ใช้ในการเก็บรักษาเซลล์คอมพิเทนท์ที่ระดับความเข้มข้น 10% สามารถให้ประสิทธิภาพในการทรานสเฟอร์เมชันสูงที่สุด รองลงมาคือ 15%, 20% และ น้ำกลั่น ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าที่ระดับความเข้มข้น 10% ของสารละลายกลีเซอรอลที่นิยมใช้กันมาก (Dower *et al.*, 1988; Elvin and Bingham, 1991; Chuang *et al.*, 1995) มีความเหมาะสมต่อการเกิดแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) อันเป็นปัจจัยที่สำคัญของการทรานสเฟอร์เมชัน และสามารถนำมาใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพการทรานสเฟอร์เมชันได้อีกหลายเท่าด้วยการกระตุ้นด้วยความร้อน (heat shock) อุณหภูมิ $20 - 40^{\circ}\text{C}$ ภายหลังจากการทำอิเล็กโทรพอเรชัน มีรายงานว่าในเซลล์ที่เก็บในสารละลาย sucrose ความเข้มข้น 290 mosmol/l ภายหลังจากการทำ heat shock ด้วยอุณหภูมิ $20 - 40^{\circ}\text{C}$ จะมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นอีก 10 เท่า ส่วนเซลล์ที่เก็บในน้ำกลั่นมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นเพียง 3 เท่า (Antonov *et al.*, 1993)

จากการทดลองเมื่อทำการเก็บรักษาเซลล์คอมพิเทนท์ในน้ำกลั่นและสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 10, 15 และ 20 % เป็นระยะเวลา 5 เดือน พบว่าการเก็บรักษาเซลล์คอมพิเทนท์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ในสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 10 % สามารถคงประสิทธิภาพการทรานสเฟอร์เมชันได้สูงที่สุด รองลงมาคือเซลล์คอมพิเทนท์ที่เก็บรักษาในสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 15 และ 20% ตามลำดับ ที่คงประสิทธิภาพได้น้อยที่สุดคือเซลล์คอมพิเทนท์ที่เก็บรักษาในน้ำกลั่น ในการศึกษาพบว่าเซลล์ที่เก็บรักษาในน้ำกลั่นสามารถเก็บที่อุณหภูมิ -20°C ได้เพียง 2 เดือน โดยประสิทธิภาพลดลงอย่างรวดเร็วภายหลังจากเก็บรักษาไปเพียง 1 เดือน โดยมีประสิทธิภาพลดลงถึง 1,000 เท่า ที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจากน้ำรอบเซลล์เป็นน้ำแข็งส่งผลทำให้เซลล์แตกได้ง่าย ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญให้เซลล์ตายลงเป็นจำนวนมากในเซลล์ *E. coli* ที่เก็บรักษาในน้ำกลั่น ส่วนเซลล์คอมพิเทนท์ที่เก็บรักษาในสารละลายกลีเซอรอล 10, 15 และ 20% หลังจากผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C พบว่าประสิทธิภาพลดลงประมาณ 100 เท่า เมื่อทำการเก็บผลในเดือนที่ 1 ของทุก ๆ ความเข้มข้น ในเดือนที่ 2 ประสิทธิภาพการทรานสเฟอร์เมชันของเซลล์คอมพิเทนท์ในสารละลายกลีเซอรอลทุกความเข้มข้นมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย ในเดือนที่ 3 เซลล์คอมพิเทนท์ที่เก็บสารละลายกลีเซอรอลทุก ๆ ความเข้มข้นพบว่าจะลดลงประมาณ 10 เท่า ในเดือนที่ 4 ประสิทธิภาพของเซลล์ที่เก็บในสารละลายกลีเซอรอลทุก ๆ ความเข้มข้นจะเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย เดือนสุดท้ายที่ทำการวัดผลการทดลองเซลล์คอมพิเทนท์ที่เก็บรักษา

ในสารละลายกลีเซอรอล 20 % จะลดลงอีกประมาณ 10 เท่า ส่วนเซลล์ที่ละลายในสารละลายกลีเซอรอล 10 และ 15 % พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย จะเห็นได้ว่าการเก็บรักษาเซลล์คอมพิเทนท์ที่นำไปใช้ในการส่งถ่ายดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันนั้น ไม่เหมาะสมเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C มีรายงานว่าเซลล์ *Enterococcus faecalis* ที่เป็นเซลล์คอมพิเทนท์ในการทำอิเล็กโทรพอเรชันที่เก็บรักษาในสารละลาย 0.625 M sucrose และ 1 mM MgCl_2 ที่ -75 ถึง -80°C สามารถเก็บรักษาได้ระยะเวลาอย่างน้อย 1 ปี โดยประสิทธิภาพไม่ลดลง และในบางครั้งประสิทธิภาพการทรานสเฟอร์เมชันเพิ่มขึ้น (Dunny *et al.*, 1991) ส่วนใน *E. coli* มีรายงานว่านิยมเก็บรักษาเซลล์ที่ -80°C (www.bio-hem.arizona.edu) หรือในไนโตรเจนเหลว (Elvin and Bingham, 1991) ดังนั้นในงานที่ต้องการประสิทธิภาพการทรานสเฟอร์เมชันสูง ควรเตรียมเซลล์คอมพิเทนท์ขึ้นมาใหม่เสมอหรืออาจต้องทำการเก็บรักษาเซลล์คอมพิเทนท์ในอุณหภูมิที่ต่ำกว่านี้

5. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทรานสเฟอร์เมชันการส่งถ่ายพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันกับวิธี heat shock

การทดลองนี้พบว่าวิธีอิเล็กโทรพอเรชันมีประสิทธิภาพสูงกว่าวิธี heat shock ถึงประมาณ 10 ถึง 100 เท่า จากผลการส่งถ่ายพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลที่แตกต่างกัน 3 ขนาด ได้แก่ pUC19 (2.7 kb), p35S-GFP (4.5 kb) และ pBI221 (5.7 kb) เช่นเดียวกับที่ได้รายงานไว้ว่าการทรานสเฟอร์เมชันด้วยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันดีกว่าวิธี heat shock (Taketo, 1988) (www.nwfsc.noaa.gov and www.biochem.arizona.edu) ประมาณ 10 เท่า (Dower *et al.*, 1988) ในการเปรียบเทียบการส่งถ่ายพลาสมิด 3 ชนิด และรายงานการทดลอง ในปี ค.ศ. 1991 พบว่าในเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ JM101, JM109, MC1061 และ X1776 ในการส่งถ่ายพลาสมิด pUC18 เมื่อทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างวิธีอิเล็กโทรพอเรชันที่สร้างความต่างศักย์ไฟฟ้าในรูป square waveform กับวิธี heat shock ที่ใช้สารละลาย CaCl_2 เป็นสารหลักในการเตรียมเซลล์คอมพิเทนท์ พบว่ามีประสิทธิภาพดีกว่า 10 – 100 เท่า (Elvin and Bingham, 1991) ดังนั้นในการทรานสเฟอร์เมชันที่ต้องการประสิทธิภาพสูง ๆ อย่างเช่น การทำ gene library, DNA library และการส่งถ่ายพลาสมิดที่มีขนาดใหญ่มาก เป็นต้น จึงควรเลือกใช้วิธีอิเล็กโทรพอเรชัน