บทที่ 4
การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการทรานสฟอร์เมชันระหว่าง *E. coli* สายพันธุ์ HB101 กับพลาสมิด pUC18 โดยวิธีแคลเซียมคลอไรด์

ในบทนี้จะกล่าวถึง การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการทรานสฟอร์เมชันระหว่าง *E. coli* สายพันธุ์ HB101 กับพลาสมิด pUC18 โดยวิธีแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้กันอยู่ทั่วไป เพื่อเป็นข้อมูลเปรียบเทียบกับการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันในบทต่อไปโดยจะทำการศึกษาในรายละเอียดดังต่อไปนี้

การทรานสฟอร์เมชันโดยใช้แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)

โดยทั่วไปการทรานสฟอร์เมชันโดยใช้แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) จะได้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันประมาณ 10^5 - 10^7 t/µg DNA (Hanahan, 1983) ในงานวิจัยนี้ได้ทำการทดลองหาประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ระหว่าง *E. coli* สายพันธุ์ HB101 และพลาสมิด pUC18 เพื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพที่ได้จากการทรานสฟอร์เมชัน โดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันในบทที่ 5 และ 6 ต่อไปพร้อมกันนี้ได้หาภาวะที่เหมาะสมในการทราน-สฟอร์เมชันโดยแคลเซียมคลอไรด์ โดยทำการแปรปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้

- ปริมาณพลาสมิด pUC18
- เวลาที่ใช้ในการบ่มที่อุณหภูมิ (Heat shock) 42 องศาเซลเซียส
- ชนิดอาหาร (medium) ที่ใช้ในขั้นตอน Pre cultivation
- ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้ ปริมาณพลาสมิด pUC18 , เวลาที่ใช้บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส และอาหารที่ใช้ในขั้นตอน Pre cultivation

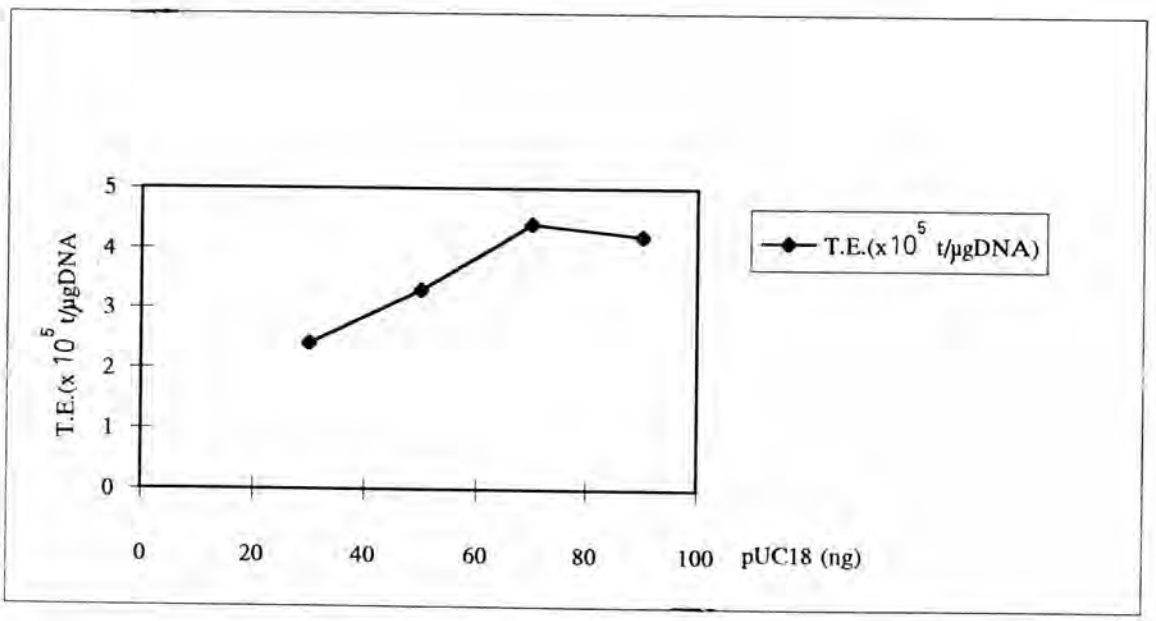
1. ปริมาณพลาสมิด pUC18 ที่มีผลต่อการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีแคลเซียมคลอไรด์

ในการทดลองนี้ได้ใช้พลาสมิด pUC18 ในช่วง 30 - 90 ng ที่ภาวะเวลาการบ่มที่อุณหภูมิเท่ากับ 42 องศาเซลเซียส (Heat shock) เป็นเวลา 90 วินาที และใช้ SOC medium ในขั้นตอน Precultivation ได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีแคลเซียมคลอไรด์ระหว่าง *E. coli* HB101 กับพลาสมิด pUC18 ที่ปริมาณต่าง ๆ กัน

ปริมาณพลาสมิด pUC18 (ng)	จำนวนโคโลนี (200 µl)	T.E. (x 10^5 t/µg DNA)
30	1424	2.4
50	3320	3.3
70	6120	4.4
90	7640	4.2

หมายเหตุ T.E. เท่ากับประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันเฉลี่ย



รูปที่ 4.1 ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีแคลเซียมคลอไรด์ ระหว่าง *E. coli* HB101 กับพลาสมิด pUC18 ที่ปริมาณต่าง ๆ กัน

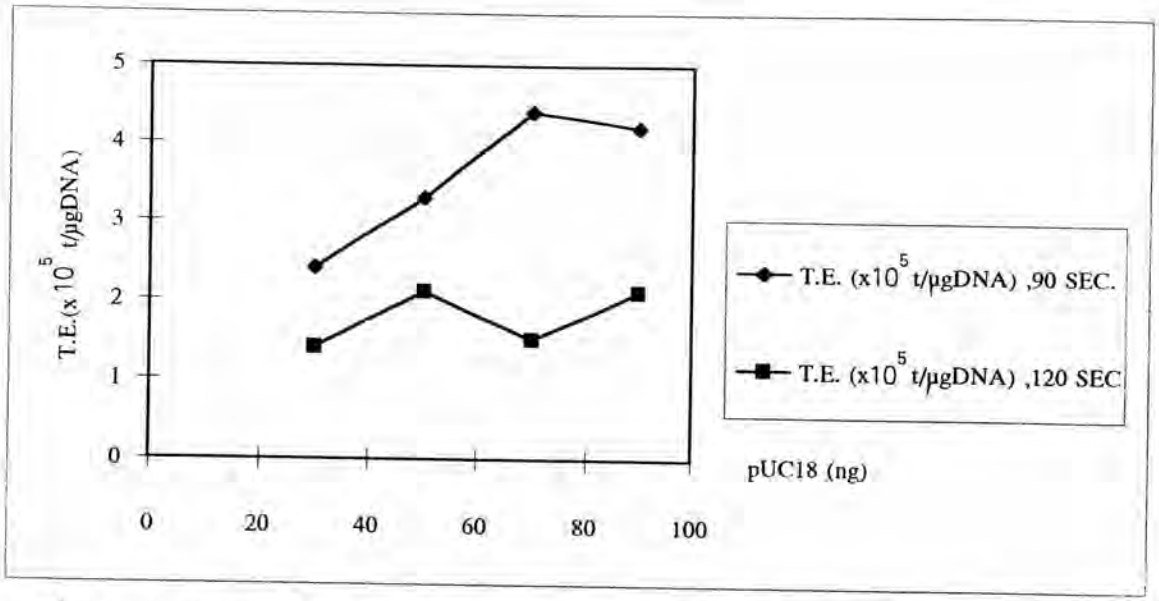
จากผลการทดลองตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.1 จะเห็นได้ว่าที่พลาสมิด pUC18 ปริมาณ 70 ng ให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันสูงสุด เท่ากับ 4.4 x 10^5 t/µg DNA เมื่อพิจารณาผลการทดลองในตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.1 จะพบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิด pUC18 มากกว่า 70 ng จะทำให้จำนวนโคโลนีเกิดเพิ่มไม่มากนักซึ่งคาดว่าเนื่องจากจำนวน competent cell เท่าเดิม จึงทำให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันลดลง

2. เวลาที่ใช้ในการบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส (Heat shock)

ในการทดลองนี้ได้ทำการแปรเวลาที่ใช้ในการบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส (Heat shock) โดยใช้เวลาเท่ากับ 90 วินาที (Hanahan, 1983) และ 120 วินาที (Maniatis, Fritsch and Sambrook, 1982) ซึ่งเป็นเวลาที่ใช้กันมากในกระบวนการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีแคลเซียมคลอไรด์ ในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการทดลองการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีแคลเซียมคลอไรด์ระหว่าง *E. coli* HB101 กับพลาสมิด pUC18 ปริมาณต่าง ๆ กัน แล้วเปรียบเทียบการใช้เวลาในการบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 และ 120 วินาที และใช้ SOC medium ในขั้นตอน Precultivation ซึ่งได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีแคลเซียมคลอไรด์ระหว่าง *E. coli* HB101 กับพลาสมิด pUC18 ปริมาณต่าง ๆ กัน เวลาในการบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 และ 120 วินาที

ปริมาณพลาสมิด pUC18 (ng)	จำนวนโคโลนี (200 µl) ที่เวลา 90 วินาที	T.E. (x 10^5 t/µgDNA) ที่เวลา 90 วินาที	จำนวนโคโลนี (200 µl) ที่เวลา 120 วินาที	T.E. (x 10^5 t/µgDNA) ที่เวลา 120 วินาที
30	1424	2.4	843	1.4
50	3320	3.3	2070	2.1
70	6120	4.4	2110	1.5
90	7640	4.2	3840	2.1



รูปที่ 4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีแคลเซียมคลอไรด์ ระหว่าง *coli* HB101 กับพลาสมิด pUC18 ปริมาณต่าง ๆ กัน ใช้เวลาการบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 และ 120 วินาที

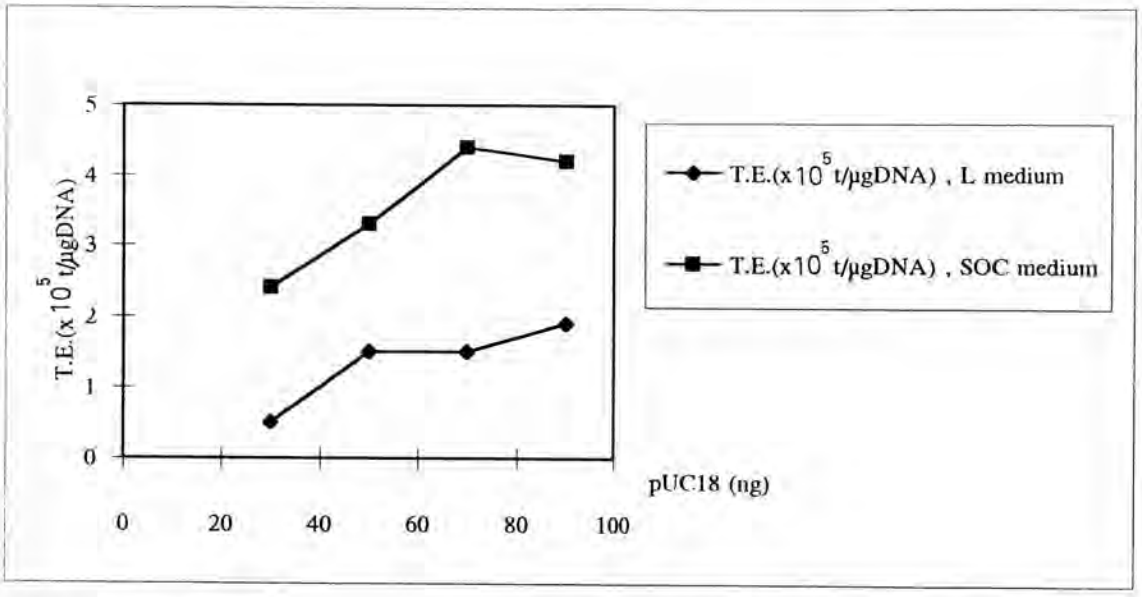
เมื่อพิจารณาผลการทดลองในตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.2 พบว่าการใช้เวลาในการบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที ให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันที่สูงกว่าที่เวลา 120 วินาที ทั้งนี้สาเหตุอาจเนื่องมาจากถ้าใช้เวลาในการบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นานเกินไปอาจทำให้ Competent cell ถูกทำลายโดยความร้อนเป็นผลให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันลดลง

3. ชนิดของอาหาร (medium) ที่ใช้ในขั้นตอน Precultivation

ในการทดลองนี้ ได้ทำการแปรชนิดของอาหาร (medium) ที่ใช้ในขั้นตอน Precultivations หลังจากที่ผ่านขั้นตอนการบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส โดยทดลองแปรชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ (medium) 2 ชนิด คือ LB medium (Maniatis, et al., 1982) และ SOC medium (Hanahan, 1983) ทั้งนี้เพราะรายงานส่วนใหญ่นิยมใช้ SOC medium(Dower, 1988 ; Sabelnikov, et al., 1991) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการทดลองการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีแคลเซียมคลอไรด์ ระหว่าง *E. coli* HB101 กับพลาสมิด pUC18 ปริมาณต่าง ๆ กัน แล้วใช้เวลาในการบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที และใช้ LB และ SOC medium ในขั้นตอนPrecultivation ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีแคลเซียมคลอไรด์ระหว่าง *E. coli* HB101 กับพลาสมิด pUC18 ปริมาณต่างๆ กัน เมื่อใช้ชนิดอาหาร LB และSOC medium ในขั้นตอน Precultivation

ปริมาณพลาสมิด pUC18 (ng)	LB medium		SOC medium	
	จำนวนโคโลนี (200 µl)	T.E. (x 10^5 t/µgDNA)	จำนวนโคโลนี (200 µl)	T.E. (x 10^5 t/µgDNA)
30	316	0.5	1424	2.4
50	1530	1.5	3320	1.3
70	2100	1.5	6120	4.4
90	3500	1.9	7640	4.2



รูปที่ 4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีแคลเซียมคลอไร์ระหว่าง *E. coli* HB101 กับพลาสมิด pUC18 ปริมาณต่าง ๆ กัน เมื่อใช้ชนิดอาหาร LB และ SOC medium ในขั้นตอน Precultivation

จากผลการทดลอง ในตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.3 จะเห็นได้ว่า SOC medium ให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีแคลเซียมคลอไรด์สูงกว่า LB medium ตั้งแต่ pUC18 ปริมาณในช่วง 30 - 90 ng

เมื่อพิจารณาผลการทดลองในตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.3 พบว่า อาหาร SOC medium ให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันสูงกว่าการใช้อาหาร LB medium สาเหตุเนื่องมาจาก SOC medium มีองค์ประกอบอาหารที่อุดมกว่า(ภาคผนวก ข) นอกจากนี้ยังประกอบด้วย KCl และ $MgCl_2$ ซึ่งมีผู้รายงานว่าแคทอิออนมีผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสถียรและยังช่วยซ่อมแซมเยื่อหุ้มเซลล์ (Shigekawa and Dower, 1988)

จากการทดลองที่1 - 3 สามารถสรุปปัจจัยที่มีผลต่อการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีแคลเซียมคลอไรด์ ระหว่าง *E. coli* HB101 กับพลาสมิด pUC18 ที่ปริมาณในช่วง 30 - 90 ng เวลาในการบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เท่ากับ 90 และ 120 วินาที และ ชนิดอาหาร LB และ SOC medium ในขั้นตอน Precultivation ดังแสดงในตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีแคลเซียมคลอไรด์ระหว่าง *E. coli* HB101 กับพลาสมิด pUC18 ที่ปริมาณต่าง ๆ กัน ใช้เวลาในการบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเท่ากับ 90 และ 120 วินาที ในอาหาร LB และ SOC medium

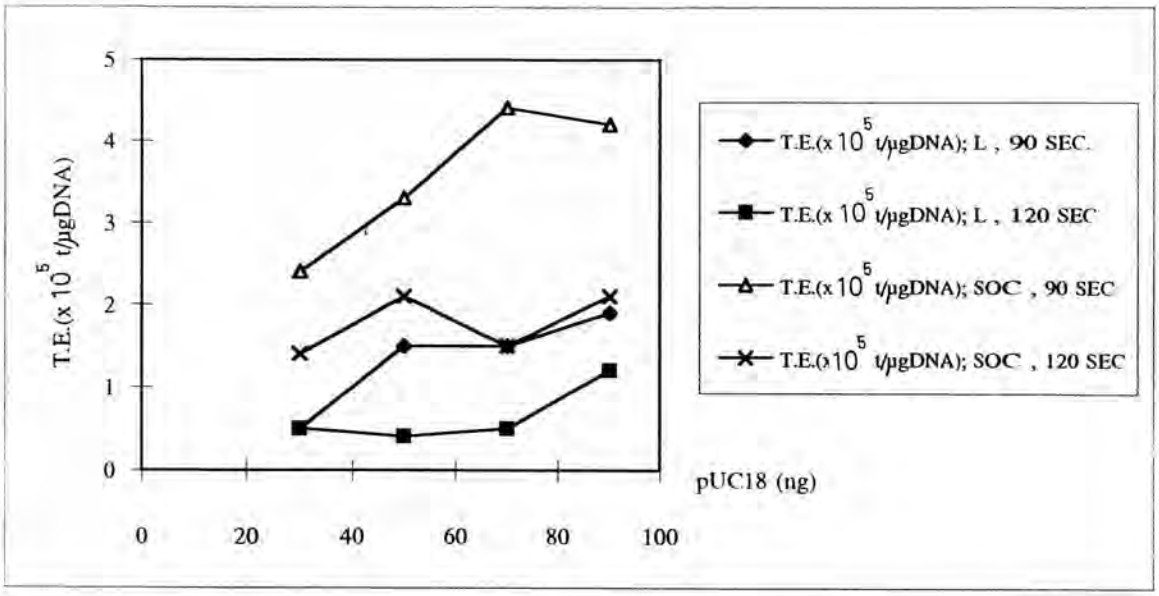
ปริมาณพลาสมิด pUC18 (ng)	เวลาที่ใช้บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส		สารละลายอาหาร		จำนวนโคโลนี (200 µl)	T.E. (x 10^5 t/µgDNA)
	90 วินาที	120 วินาที	LB medium	SOC medium		
30	+	-	+	-	316	0.5
30	-	+	+	-	315	0.5
30	+	-	-	+	1424	2.4
30	-	+	-	+	843	1.4
50	+	-	+	-	1530	1.5
50	-	+	+	-	390	0.4
50	+	-	-	+	3320	3.3
50	-	+	-	+	2070	2.1

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีแคลเซียมคลอไรด์ระหว่าง *E. coli* HB101 กับพลาสมิด pUC18 ที่ปริมาณต่าง ๆ กัน ใช้เวลาในการบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซียล เท่ากับ 90 และ 120 วินาทีในอาหาร LB และ SOC medium

ปริมาณพลาสมิด pUC18 (ng)	เวลาที่ใ ช้บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส		สารละลายอาหาร		จำนวนโคโลนี (200 µl)	T.E. (x 10^5 t/µg DNA)
	90 วินาที	120 วินาที	LB medium	SOC medium		
70	+	-	+	-	2100	1.5
70	-	+	+	-	640	0.5
70	+	-	-	+	6120	4.4
70	-	+	-	+	2110	1.5
90	+	-	+	-	3500	1.9
90	-	+	+	-	2210	1.2
90	+	-	-	+	7640	4.2
90	-	+	-	+	3840	2.1

+ ทำการทดลอง

- ไม่ได้ทำการทดลอง



รูปที่ 4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีแคลเซียมคลอไรด์ ระหว่าง*E. coli* HB101กับพลาสมิดpUC18 ที่ปริมาณต่าง ๆ กัน ใช้เวลาในการบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเท่ากับ 90 และ 120 วินาทีในอาหาร LB และ SOC medium

สรุป

เมื่อพิจารณาผลการทดลองในตาราง 4.1 - 4.4 และรูปที่ 4.1 - 4.4 ภาวะที่เหมาะสมในการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีแคลเซียมคลอไรด์ระหว่าง *E. coli* HB101 กับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 70 ng ใช้เวลาในการบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเท่ากับ 90 วินาที และใช้ SOC medium ในขั้นตอน Precultivation ได้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันสูงสุดเท่ากับ 4.4×10^5 t/μg DNA