บทที่ 7
บทสรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ประดิษฐ์ระบบเครื่องอิเล็กโทรพอเรชัน (Electroporation systems) ซึ่งประกอบด้วยส่วนสำคัญ 3 ส่วน คือ ส่วนสร้างคลื่นไฟฟ้า ส่วนตรวจสอบคลื่นไฟฟ้าและห้องบรรจุเซลล์ โดยได้มีการใช้ส่วนสร้างคลื่นไฟฟ้า 2 แบบ คือ เครื่องอิเล็กโทรพอเรชันที่ให้กำเนิดคลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยม (Square wave pulse) และเครื่องอิเล็กโทรพอเรชันที่ให้กำเนิดคลื่นรูปพัลส์ที่ลดลงแบบเอกซ์โพเนนเชียล ในการศึกษาได้ใช้ห้องบรรจุเซลล์ประกอบด้วยสเตนเลส 2 แผ่นทำหน้าที่เป็นขั้วอิเล็กโทรดวางขนานกันบนแผ่นเทฟลอน ให้มีระยะห่างระหว่างขั้วเท่ากับ 0.1 cm และ 0.2 cm

งานวิจัยนี้ได้นำเครื่องอิเล็กโทรพอเรชันที่ประดิษฐ์ ไปใช้ในกระบวนการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน (Electroporation) ระหว่าง *E.coli* HB101 กับพลาสมิด pUC18 โดยศึกษาปัจจัยทางเคมีของสารละลายอิเล็กโทรพอเรชัน และปัจจัยทางไฟฟ้าพบว่าในภาวะการใช้เครื่องอิเล็กโทรพอเรชันที่ให้กำเนิดคลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยม (Square wave pulse) ในการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันระหว่าง *E. coli* HB101 กับพลาสมิด pUC18 ร่วมกับปัจจัยทางเคมีของสารละลายอิเล็กโทรพอเรชัน ที่เป็นสารละลาย PEG4000 ความเข้มข้น10% ที่มี $CaCl_2$ ความเข้มข้น 500 mM ปริมาตร 50 µl โดยปัจจัยทางไฟฟ้าที่เหมาะสมคือ การใช้สนามไฟฟ้าความเข้ม 6 kV/cm เป็นเวลา 3 ms กดกระตุ้น 1 ครั้ง แล้วเทียบกับภาวะที่ไม่มีสนามไฟฟ้าพบว่าทั้ง 2 ภาวะได้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันประมาณ 10^3 t/µg DNA ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันที่เกิดขึ้นนั้นเกิดจากสารละลาย PEG4000 ความเข้มข้น10% ที่มี $CaCl_2$ ความเข้มข้น 500 mM ส่วนในกรณีที่ใช้สารละลายกลีเซอรอลทำหน้าที่เป็นสารละลายอิเล็กโทรพอเรชัน จะไม่พบการเกิดการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันได้เลย ทั้งในภาวะที่มีและไม่มีสนามไฟฟ้า

ในภาวะการใช้เครื่องอิเล็กโทรพอเรชันที่ให้กำเนิดคลื่นรูปพัลส์ที่ลดลงแบบเอกซ์โพเนนเชียล (Exponential decaying pulse) สำหรับการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันระหว่าง *E. coli* HB101 กับพลาสมิด pUC18 และ pBR322 ได้ศึกษาปัจจัยทางเคมีของสารละลายอิเล็กโทรพอเรชันและปัจจัยทางไฟฟ้า พบว่าสารละลายอิเล็กโทรพอเรชันที่เหมาะสมคือ

สารละลายกลีเซอรอล (Glycerol) ความเข้มข้น 80% โดยนำเซลล์ผสมกับสารละลายกลีเซอรอล ความเข้มข้น 80% ในอัตราส่วน 1:6 แล้วนำมาใช้ในการทดลองครั้งละ 100 µl ผสมกับพลาสมิด pUC18 หรือ pBR322 ปริมาณ 90 ng แล้วนำไปผ่านสนามไฟฟ้าความเข้ม 4 kV/cm, กดกระตุ้น 1 pulse ได้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันเท่ากับ 5.93 x 10^4 t/µg pUC18 และ 5 x 10^3 t/µg pBR322 การที่ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันระหว่าง *E. coli* HB101 กับพลาสมิด pUC18 สูงกว่าพลาสมิด pBR322 เนื่องมาจากพลาสมิด pUC18 มีขนาดเล็กกว่าพลาสมิด pBR322 เมื่อเทียบกับภาวะที่ไม่ให้สนามไฟฟ้าให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันเท่ากับ 0 t/µg DNA ทั้งพลาสมิด pUC18 และ pBR322 เพราะฉะนั้นจึงสามารถยืนยันได้ว่าการทรานสฟอร์เมชันเกิดขึ้นได้โดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน อันเป็นผลของสนามไฟฟ้าที่เกิดจากคลื่นรูปพัลส์ที่ลดลงแบบเอกซ์โพเนนเชียลกับสารละลายกลีเซอรอล เนื่องมาจากกลีเซอรอลมีคุณสมบัติในการต้านทานไฟฟ้าได้ดจึงทำให้มีค่าสนามไฟฟ้าตกคร่อมผนังเซลล์สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานของ Fiedler และ Wirth(1988) ได้ทำการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันระหว่าง *E. coli* HB101 กับพลาสมิด pBR322 ที่ภาวะสนามไฟฟ้า(EP)ความเข้ม 6.25 kV/cmเป็นเวลา 6 ms ได้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เม-ชันเท่ากับ 1.6 x 10^5 t/µg DNA จะเห็นว่าใกล้เคียงกับประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันที่ใช้เครื่องอิเล็กโทรพอเรชันที่ให้กำเนิดคลื่นรูปพัลส์ที่ลดลงแบบเอกซ์โพเนนเชียลที่สร้างขึ้นซึ่งใช้ความเข้มสนามไฟฟ้าที่ต่ำกว่า นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีแคลเซียมคลอไรด์ดังแสดงในบทที่ 4 ซึ่งจะได้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันประมาณ 10^5 t/µg pUC18 จะเห็นว่าใกล้เคียงกับประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันที่ใช้เครื่องอิเล็กโทรพอเรชันที่ให้กำเนิดคลื่นรูปพัลส์ที่ลดลงแบบเอกซ์โพเนนเชียลที่สร้างขึ้นพร้อมกันนี้เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันกับเมื่อเครื่องอิเล็กโทรพอเรชันจากบริษัท Bio rad (ภาคผนวก ฉ) ซึ่งได้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชัน 1.8 x 10^5 t/µg pUC18 จะเห็นว่าใกล้เคียงกับประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันที่ใช้เครื่องอิเล็กโทรพอเรชันที่ให้กำเนิดคลื่นรูปพัลส์ที่ลดลงแบบเอกซ์โพเนนเชียลที่สร้างขึ้น

ประโยชน์ที่ได้จากงานวิจัยนี้ สามารถสรุปได้ดังนี้

1. ได้เครื่องอิเล็กโทรพอเรชันที่ให้กำเนิดคลื่นรูปพัลส์ที่ลดลงแบบเอกซ์โพเนนเชียล ซึ่งมีราคาถูกและสามารถใช้ในงานวิจัยได้
2. ได้สารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้นที่เหมาะสม 80 % ที่ช่วยให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันสูงขึ้น เนื่องจากสามารถป้องกันการเกิดประกายไฟฟ้า (arcing) เมื่อใช้เครื่องอิเล็กโทรพอเรชันจากบริษัท Bio rad