

452

ระบบเครื่องหลอมเซลล์ด้วยไฟฟ้า

นางสาว อัญชญา จีนาอนุพันธ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ. ศ. 2538

ISBN 974-632-369-5

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 20514617

CELL ELECTROFUSION SYSTEM

Miss Anchana Jenanupun

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Program of Biotechnology

Graduate School

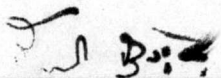
Chulalongkorn University

1995

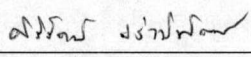
ISBN 974-632-369-5

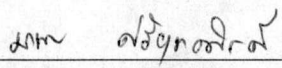
หัวข้อวิทยานิพนธ์ ระบบเครื่องหลอมเซลล์ด้วยไฟฟ้า
โดย นางสาว อัญชญา จินานุพันธ์
สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มานะ ศรียุทธศักดิ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล


บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

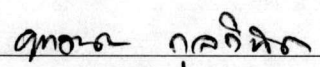

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. สันติ กงสุวรรณ)

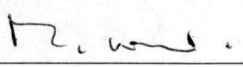
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)


อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มานะ ศรียุทธศักดิ์)


อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล)


กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ยุทธนา กุลวิทิต)


กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พญ. กิ่งกาญจน์ เล้าหทัย)

พิมพ์ต้นฉบับบทความวิจัยวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

อัญชญา จินานุพันธ์ : ระบบเครื่องหลอมเซลล์ด้วยไฟฟ้า (CELL ELECTROFUSION SYSTEM)

อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. มานะ ศรียุทธศักดิ์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร. นลิน นิลอุบล, 97 หน้า

ISBN 974-632-369-5

ได้มีการประดิษฐ์เครื่องหลอมเซลล์ด้วยไฟฟ้า ซึ่งประกอบด้วยส่วนสำคัญ 3 ส่วน คือ ห้องบรรจุเซลล์, ส่วนสร้างสัญญาณคลื่นไฟฟ้า, ส่วนขยายภาพ-แสดงและบันทึกผล ส่วนของห้องบรรจุเซลล์ทำมาจากกระจกสไลด์ที่ถูกกัดเจาะให้เป็นร่องด้วยกระบวนการทางเคมี ความกว้างของร่องมีขนาดเท่ากับ 2 มิลลิเมตร หลังจากทำการกัดเจาะร่องแล้วจะทำการระเหยขี้โลหะทิทาเนียมและแพลตินัมสำหรับป้องกันสัญญาณไฟฟ้าให้แก่เซลล์ที่แขวนลอยอยู่ในสารละลายของห้องบรรจุเซลล์ ส่วนสร้างสัญญาณคลื่นไฟฟ้าเป็นวงจรอิเล็กทรอนิกส์ที่ใช้ในการสร้างสัญญาณคลื่นรูปไซน์และสัญญาณคลื่นรูปพัลส์ สัญญาณคลื่นรูปไซน์ใช้ในการทำให้เซลล์เข้ามาเรียงกัน สัญญาณคลื่นรูปพัลส์ใช้ในการหลอมเซลล์ กระบวนการหลอมเซลล์จะถูกสังเกตโดยใช้กล้องถ่ายภาพแล้วส่งสัญญาณภาพออกทางจอโทรทัศน์และบันทึกภาพโดยเครื่องบันทึกวิดีโอ

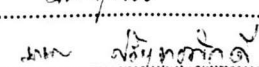
ในงานวิจัยครั้งนี้ได้ใช้เครื่องหลอมเซลล์ที่ประดิษฐ์ขึ้นทำการศึกษาโดยแปรปัจจัยทางชีวเคมีของสารละลายสำหรับหลอมเซลล์ได้แก่ ความเข้มข้นของสารละลายสำหรับหลอมเซลล์, อีออนในสารละลายสำหรับหลอมเซลล์ และปัจจัยทางไฟฟ้าของคลื่นไฟฟ้าได้แก่ ความถี่และขนาดแรงดันสัญญาณคลื่นรูปไซน์ จำนวน ความกว้าง และแรงดันของสัญญาณคลื่นรูปพัลส์ จากการศึกษาพบว่า ภาวะที่เหมาะสมของการหลอมเซลล์ NS-1 คือ สารละลายซอร์บิทอล 70 mM ที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมอีออน 0.25 mM และแมกนีเซียมอีออน 0.5 mM สัญญาณคลื่นรูปไซน์สำหรับการเรียงเซลล์มีความถี่ 1 MHz ขนาดของสัญญาณ 30 Vpp, สัญญาณคลื่นรูปพัลส์จำนวนเท่ากับ 4 พัลส์, ความกว้างของพัลส์เท่ากับ 10 μ sec ขนาดของสัญญาณพัลส์เท่ากับ 300 V ได้เปอร์เซ็นต์ของการหลอมเซลล์สูงสุด 37%

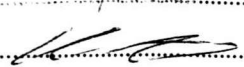
ภาควิชา

สาขาวิชา ...เทคโนโลยีทางชีวภาพ.....

ปีการศึกษา 2537

ลายมือชื่อนิสิต 

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา 

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม 

C526401 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD : ELECTROFUSION / CELL FUSION / HYBRIDOMA

ANCHANA JENANUPUN : CELL ELECTROFUSION SYSTEM. THESIS ADVISOR :

ASST. PROF. MANA SRIYUDTHSAK, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR : ASSO. PROF.

NALINE NILUBOL, Ph.D. 97 pp. ISBN 974-632-369-5

A cell electrofusion system was developed. This system composed of 3 main parts which were fusion chamber, electrical signal generator and display-video recorder. Glass slide was used as an initial material for fabricating the fusion chamber. Grooves with 2 mm width were fabricated on glass slide as a fusion chamber by using photolithography technique and chemical etching process. After etching process, Ti/Pt electrodes were deposited by electron beam evaporator for supplying electrical signal to the fusion chamber. The electrical signal generator was an electronic circuit capable to generate both sine wave and square wave pulse signal. High frequency sine wave signal was used for inducing cell alignment by dielectrophoretic force. Square wave pulses were used for cell fusion. The cell fusion process could be observed via microscope linking to a video camera and video recorder.

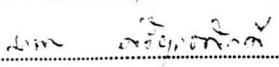
Electrofusion of myeloma cell (NS-1) was performed by using this developed system. Conditions for fusion were optimized by varying biochemical parameters such as concentration of fusion medium, ion concentration in fusion medium and electrical parameters, such as frequency and voltage of sine wave signal, number of pulses, pulse width and voltage of pulse. Optimal conditions obtained were as follows: fusion medium consisted of 0.25 mM calcium ion and 0.5 mM magnesium ion in 70 mM sorbitol solution, dielectrophoresis for cell alignment was at 1 MHz, 30 Vpp of sine wave, four square wave pulses (10 μ sec delay time) of 300 V were applied to the electrodes for cell fusion. Under the above conditions, 37% of myeloma cell fusion was achieved.

ภาควิชา..... -

สาขาวิชา..... เทคโนโลยีทางชีวภาพ

ปีการศึกษา..... 2537

ลายมือชื่อนิสิต..... 

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... 

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... 

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดีของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มานะ ศรียุทธศักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณอย่างสูงสุดไว้ ณ ที่นี้

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ทำที่สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และที่ห้องปฏิบัติการวิจัยสิ่งประดิษฐ์สารกึ่งตัวนำ ภาควิชาวิศวกรรมไฟฟ้า คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จึงขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และอำนวยความสะดวกในระหว่างการทำวิจัยนี้เป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พญ. กิ่งกาญจน์ เลาทัย ที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อเซลล์เพื่อใช้ในงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ยุทธนา กุลวิทิต, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พญ. กิ่งกาญจน์ เลาทัย กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ได้ให้คำแนะนำ ความคิดเห็น และคำวิจารณ์ อันมีคุณค่ายิ่ง

ขอขอบคุณ คุณสุวัฒน์ โสภิตพันธ์, คุณวิโรจน์ บุญโกสมภ, คุณอาภรณ์ ชีรภรณ์รัศมี นิสิตปริญญาเอก ภาควิชาวิศวกรรมไฟฟ้า คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้คำแนะนำในด้านวงจรไฟฟ้า และเทคนิคในการใช้เครื่องยิงอิเล็กตรอน

ขอขอบคุณ คุณดวงแข นนท์ศรี, คุณทรงจันทร์ ภูทอง ที่กรุณาช่วยสอนเทคนิคต่าง ๆ ในการเลี้ยงเซลล์ และคุณสายทอง จรรยา, คุณนุชรินทร์ เกชิต ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในด้านอุปกรณ์การเลี้ยงเซลล์

ขอขอบคุณ คุณณรงค์ หอมจันทร์ และ คุณสมศรี เกียรติวณิชพันธ์ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ และคำแนะนำด้านเทคนิคและเอกสาร

เนื่องจากทุนการวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนมาจากห้องปฏิบัติการวิจัยสิ่งประดิษฐ์สารกึ่งตัวนำ และทุนอุดหนุนการวิจัยของบัณฑิตวิทยาลัย จึงขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

ท้ายนี้ ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ และ คุณแม่ ที่ได้สนับสนุนทุนทรัพย์และเป็นกำลังใจที่ดียิ่งแก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญรูป	ญ
บทที่	
1. บทนำ	1
2. ทฤษฎีและหลักการหลอมเซลล์ด้วยไฟฟ้า	13
ขั้นตอนการหลอมเซลล์ด้วยไฟฟ้า	15
ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการหลอมเซลล์ด้วยไฟฟ้า	19
3. ระบบเครื่องหลอมเซลล์ด้วยไฟฟ้า	21
4. การประดิษฐ์เครื่องหลอมเซลล์ด้วยไฟฟ้า	27
ห้องบรรจุเซลล์	27
ส่วนสร้างคลื่นไฟฟ้า	33
ส่วนขยายภาพ-แสดงและบันทึกผล	48
5. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการหลอมเซลล์ด้วยไฟฟ้า	49
ปัจจัยทางชีวเคมีของสารละลายสำหรับหลอมเซลล์	51
ปัจจัยทางไฟฟ้า	62
6. สรุปผลการทดลอง	78
เอกสารอ้างอิง	81
ภาคผนวก ก	88
ภาคผนวก ข	93
ภาคผนวก ค	95
ประวัติของผู้เขียน	97

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	ตัวอย่างระบบเครื่องหลอมเซลล์ด้วยไฟฟ้า	5
3.1	ชนิดของวัสดุที่ใช้ทำอิเล็กโทรดและห้องบรรจุเซลล์ที่ใช้หลอมเซลล์	24
4.1	ภาวะที่ใช้ในการระเหยโลหะแบบลำอิเล็กตรอน	32
4.2	แรงดันขาเข้าและขาออกจากส่วนขยายสัญญาณคลื่นรูปไซน์	35
ก. 1	ความเข้มข้นของแคลเซียมอออนในสารละลายสำหรับหลอมเซลล์	90
ก. 2	ความเข้มข้นของแมกนีเซียมอออนในสารละลายสำหรับหลอมเซลล์	90
ก. 3	ความเข้มข้นของอออนผสมในสารละลายสำหรับหลอมเซลล์ ที่แปรความเข้มข้นของแคลเซียมอออน	91
ก. 4	ความเข้มข้นของอออนผสมในสารละลายสำหรับหลอมเซลล์ ที่แปรความเข้มข้นแมกนีเซียมอออน	91
ง. 1	อัตราการกัดกร่อนของสารละลาย ไฮโดรเจนฟลูออไรด์ 10 %	96

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	ตัวอย่างระบบเครื่องหลอมเซลล์ด้วยไฟฟ้า	11
2.1	คลื่นรูปพัลส์ที่ใช้ในการหลอมเซลล์	15
2.2	เซลล์ถูกเหนี่ยวนำด้วยสนามไฟฟ้าสัญญาณคลื่นรูปไซน์	16
2.3	เซลล์เรียงติดกันเมื่อเหนี่ยวนำด้วยสนามไฟฟ้าสัญญาณคลื่นรูปไซน์	16
2.4	ขั้นตอนการหลอมเซลล์	18
3.1	ส่วนประกอบของระบบเครื่องหลอมเซลล์ด้วยไฟฟ้า	21
3.2	ห้องบรรจุเซลล์แบบต่าง ๆ	22
3.3	บล็อกไดอะแกรมของการสร้างสัญญาณคลื่นรูปไซน์และคลื่นรูปพัลส์	26
4.1	โครงสร้างของห้องบรรจุเซลล์	27
4.2	ขั้นตอนการประดิษฐ์ห้องบรรจุเซลล์	28
4.3	ขั้นตอนการทำขั้วโลหะ	30
4.4	เครื่องระเหยโลหะแบบลำอิเล็กตรอน	31
4.5	หลักการทำงานของเครื่องระเหยโลหะแบบลำอิเล็กตรอน	31
4.6	กระจกสไลด์ที่ผ่านขั้นตอนต่าง ๆ จนได้ห้องบรรจุเซลล์ที่สมบูรณ์	33
4.7	สัญญาณคลื่นรูปไซน์ที่ผ่านการขยายด้วยวงจขยายสัญญาณ	35
4.8	บล็อกไดอะแกรมของวงจรกำเนิดสัญญาณคลื่นรูปพัลส์	37
4.9	ผังวงจรไฟฟ้าสัญญาณคลื่นรูปพัลส์	38
4.10	ผังวงจรไฟฟ้าสัญญาณพัลส์ต่อเนื่องของ LM 555	39
4.11	ความสัมพันธ์ของเวลากับค่าความจุไฟฟ้าที่ใช้ในวงจรสัญญาณพัลส์ต่อเนื่อง ..	40
4.12	ผังวงจรกำเนิดสัญญาณพัลส์เดี่ยว	41
4.13	สัญญาณคลื่นรูปพัลส์ก่อนและหลังวงจรเกต	42
4.14	ผังวงจรสวิตชิง	43
4.15	ผังวงจรแหล่งจ่ายไฟฟ้ากระแสตรง	44
4.16	สัญญาณคลื่นรูปพัลส์จากวงจรกำเนิดพัลส์	45
4.17	ลักษณะภายในของเครื่องหลอมเซลล์ด้วยไฟฟ้า	47
4.18	ระบบเครื่องหลอมเซลล์ด้วยไฟฟ้า	47
5.1	ขั้นตอนการเตรียมเซลล์มะเร็งหนู	50

รูปที่	หน้า
5.2 ผลของความเข้มข้นของสารละลายสำหรับหลอมเซลล์	52
5.3 ผลของแคลเซียมไอออนในสารละลายสำหรับหลอมเซลล์	55
5.4 ผลของแมกนีเซียมไอออนในสารละลายสำหรับหลอมเซลล์	56
5.5 ผลของความเข้มข้นของไอออนผสมในสารละลายสำหรับหลอมเซลล์ที่ แปรความเข้มข้นของแคลเซียมไอออน	58
5.6 ผลของความเข้มข้นของไอออนผสมในสารละลายสำหรับหลอมเซลล์ที่ แปรความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออน	60
5.7 ผลของความถี่ที่ใช้ในการเรียงเซลล์ต่อการหลอมเซลล์	63
5.8 ผลของแรงดันที่ใช้ในการเรียงเซลล์ต่อการหลอมเซลล์	64
5.9 ผลของจำนวนพัลส์ที่ใช้ในการหลอมเซลล์	66
5.10 ผลของความกว้างพัลส์ที่ใช้ในการหลอมเซลล์	67
5.11 ผลของแรงดันคลื่นรูปพัลส์ที่ใช้ในการหลอมเซลล์	69
5.12ก เซลล์ NS-1 แขนงลอยอยู่ในสารละลายสำหรับหลอมเซลล์	73
5.12ข เซลล์ NS-1 ถูกกระตุ้นด้วยสัญญาณคลื่นรูปไซน์	73
5.12ค เซลล์ NS-1 หลังจากกระตุ้นด้วยสัญญาณคลื่นรูปไซน์เป็นเวลา 40 วินาที ..	74
5.12ง เซลล์ NS-1 ถูกกระตุ้นด้วยสัญญาณคลื่นรูปพัลส์	74
5.12จ ภาพของเซลล์ NS-1 เมื่อเริ่มกระตุ้นด้วยสัญญาณคลื่นรูปพัลส์ เป็นเวลา 50 วินาที	75
5.13ก ภาพของเซลล์ NS-1 ถูกกระตุ้นให้เรียงกันด้วยสัญญาณคลื่นรูปไซน์	75
5.13ข ภาพของเซลล์ NS-1 ถูกกระตุ้นด้วยสัญญาณคลื่นรูปพัลส์ หลังจากกระตุ้นเป็นเวลา 10 วินาที	76
5.13ค ภาพของเซลล์ NS-1 ถูกกระตุ้นด้วยสัญญาณคลื่นรูปพัลส์ หลังจากกระตุ้นเป็นเวลา 20 วินาที	76
5.13ง ภาพของเซลล์ NS-1 ถูกกระตุ้นด้วยสัญญาณคลื่นรูปพัลส์ หลังจากกระตุ้นเป็นเวลา 40 วินาที	77
5.13จ ภาพของเซลล์ NS-1 ถูกกระตุ้นด้วยสัญญาณคลื่นรูปพัลส์ หลังจากกระตุ้นเป็นเวลา 60 วินาที	77
ข.1 แบบลอกลายกระจกเพื่อใช้เป็นหน้ากากสำหรับร่องของห้องบรรจุเซลล์	94
ข.2 แบบลายวงจรสำหรับวงจรกำเนิดพัลส์	94
ค.1 อัตราการกัดกระจกสไลด์ของสารละลาย 10 % ไฮโดรเจนฟลูออไรด์	96

บทที่ 1

บทนำ

การพัฒนาสมบัติของสิ่งมีชีวิตหรือการปรับปรุงพันธุ์ จะเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสมบัติขั้นพื้นฐานของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจะเป็นการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมของเซลล์ในระดับยีนและโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตนั้นๆหรือเรียกว่าการกลายพันธุ์(Mutation) การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นนี้อาจเกี่ยวข้องกับการสูญหายไปของส่วนของยีน การสูญหายไปหรือการเข้ามาของส่วนของโครโมโซมที่ครอบคลุมมากกว่าหนึ่งยีน การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นนี้จะแสดงลักษณะที่ดีและไม่ดีออกมา การกลายพันธุ์นี้อาจเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ ซึ่งโดยทั่วไปจะมีโอกาสเกิดได้น้อยมาก(10^{-5} - 10^{-6} ต่อเซลล์ต่อรุ่น) นอกจากนี้ยังสามารถกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการชักนำจากภายนอก เช่น การใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ต, รังสีนิวตรอนหรือรังสีแกมมา เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้โดยการใช้สารเคมีในกลุ่มของแอลคิลเลทติงเอเจนต์(Alkylating agent) ได้แก่ กรดไนตริก(HNO_2), เอทิลีนอิมิน(Ethyleneimine), เอทิลมีเทน ซัลโฟเนต(Ethyl methane sulfonate) เป็นต้น ซึ่งการเหนี่ยวนำเพื่อทำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยวิธีนี้จะสามารถทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้มากกว่าการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติถึง 10-1000 เท่า

นอกจากวิธีที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว วิธีที่นิยมในการปรับปรุงพันธุ์ในปัจจุบัน คือวิธีการทางพันธุวิศวกรรม(Genetic engineering) สำหรับการนำเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมนั้นเป็นวิธีที่สามารถกำหนดเจาะจงยีนที่ต้องการ แล้วนำยีนที่ต้องการจากเซลล์หนึ่งถ่ายถอดสู่อีกเซลล์หนึ่งเพื่อให้เกิดผลผลิตตามที่ต้องการ แต่อย่างไรก็ตามการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีนี้เป็นกระบวนการที่ยุ่งยากและซับซ้อน จะต้องทราบรายละเอียดทางพันธุกรรมของเซลล์นั้นๆ รวมถึงการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการเป็นอย่างดี นอกจากนี้วิธีที่กล่าวมาข้างต้นแล้วยังมีอีกวิธีที่ใช้กันมากในปัจจุบันเช่นกันคือการหลอมเซลล์(Cell fusion) การหลอมเซลล์นั้นเป็นวิธีที่สามารถหลอมรวมเซลล์ระหว่าง 2 สายพันธุ์ที่แตกต่างกัน และทำให้เกิดลูกผสมที่มีลักษณะที่ดีของทั้ง