บทปฏิบัติการที่ 5
การนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

หลักการ

ในการสร้างดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA) สำหรับการโคลนยีน (gene cloning) หรือดีเอ็นเอนั้น ต้องอาศัยดีเอ็นเอที่เป็นพาหะหรือเวกเตอร์ (vector) ในการนำชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ (DNA insert) เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (host cells) เวกเตอร์ที่ใช้อาจจะเป็นพลาสมิด เฟจ (phage) คอสมิด (cosmid) หรือ Yac vector ขึ้นอยู่กับขนาดของดีเอ็นเอที่จะโคลนและเซลล์เจ้าบ้าน สำหรับเวกเตอร์เพื่อให้มีการแสดงออกของยีน (gene expression) เป็นโปรตีนที่สนใจหรือต้องการนั้น จะต้องมีส่วนควบคุม (regulatory elements) เช่น ยีนส่งเสริม (promoter gene) หรือบริเวณจับสำหรับไรโบโซม (ribosome binding site หรือ RBS) เป็นต้น ดังนั้นเวกเตอร์ในแต่ระบบจึงแตกต่างกันและแยกออกไปในแต่ละชนิด เช่น เวกเตอร์สำหรับโคลนยีนทั่วๆ ไป เวกเตอร์สำหรับใช้ในการแสดงออกของยีน (expression vector) เพื่อเพิ่มการแสดงออกของยีน เป็นต้น ระบบเวกเตอร์ที่มีการพัฒนาและมีให้เลือกมากที่สุดคือเวกเตอร์สำหรับ *E. coli*

พลาสมิดสามารถจำลองตัวเองได้ในเซลล์ จึงนำพลาสมิดมาใช้เป็นดีเอ็นเอพาหะในการโคลนยีนในงานด้านพันธุวิศวกรรม ซึ่งพลาสมิดที่พบในธรรมชาติมีข้อเสียหลายอย่างไม่เหมาะที่จะนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอพาหะในการโคลนยีน จึงมีการสร้างพลาสมิดขึ้นมาใหม่ โดยการตัดต่อยีนจากพลาสมิดที่พบในธรรมชาติร่วมกับการสังเคราะห์ หรือดัดแปลงเบสเพิ่มเติมตามต้องการ พลาสมิดที่นำมาใช้ในการโคลนยีนนิยมใช้ที่มีการจำลองตัวแบบ relaxed และมีขนาดเล็ก ขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่สอดใส่ (insert) ควรมีขนาดไม่เกิน 10 กิโลเบส ถ้าชิ้นดีเอ็นเอมีขนาดใหญ่ ควรใช้เฟจหรือคอสมิด การโคลนโดยใช้ดีเอ็นเอของเฟจเป็นเวกเตอร์จะสามารถโคลนชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 6-20 กิโลเบส หรือไม่เกิน 25 กิโลเบส ส่วนคอสมิดสามารถสอดใส่ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดตั้งแต่ 2-45 กิโลเบส

ขั้นตอนหนึ่งที่สำคัญในกระบวนการโคลนยีนหลังจากสร้างดีเอ็นเอสายผสมแล้ว คือ การนำดีเอ็นเอสายผสมที่สร้างขึ้นเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านเพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ในที่นี้จะ

เน้นเฉพาะเซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรีย *E. coli* ในธรรมชาติจะมีการนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านหลายวิธีเช่น

1. Conjugation คือการย้ายดีเอ็นเอจากแบคทีเรียหนึ่ง (donor) ไปอีกเซลล์หนึ่ง (recipient) โดยสื่อที่เรียกว่า F-factor (fertility factor) เมื่อดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์แล้วจะรวมกับดีเอ็นเอในโครโมโซมของผู้รับ
2. Transduction คือการย้ายดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียโดยอาศัยสื่อพวกเฟจ
3. Transformation คือการย้ายดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียโดยไม่ต้องใช้สื่อหรือตัวกลางใดๆ ซึ่งการเกิด Transformation ในธรรมชาติจะเกิดได้กับแบคทีเรียบางชนิดเท่านั้น เช่น *Bacillus sp.*, *Streptococcus sp.* ส่วน *E. coli* ซึ่งนิยมใช้จะไม่สามารถรับดีเอ็นเอได้ในธรรมชาติ แต่จะสามารถรับดีเอ็นเอจากสิ่งแวดล้อมต่อเมื่ออยู่ในสภาพที่พร้อมจะรับดีเอ็นเอภายนอก (competent cells) คือสภาวะของเซลล์ที่ยอมให้ดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ (permeability) สิ่งสำคัญอีกประการหนึ่งหลังจากการเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์แล้ว ดีเอ็นเอจะต้องไม่ถูกทำลายโดยเอนไซม์นิวคลีเอส (nuclease) หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงโดย modifying enzymes ดังนั้นในการปฏิบัติในห้องปฏิบัติการ เซลล์เจ้าบ้านที่ใช้จะเป็นเซลล์เจ้าบ้านที่ไม่มีเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzymes) และเอนไซม์ดัดแปลง (modifying enzymes) (r^-m^-)

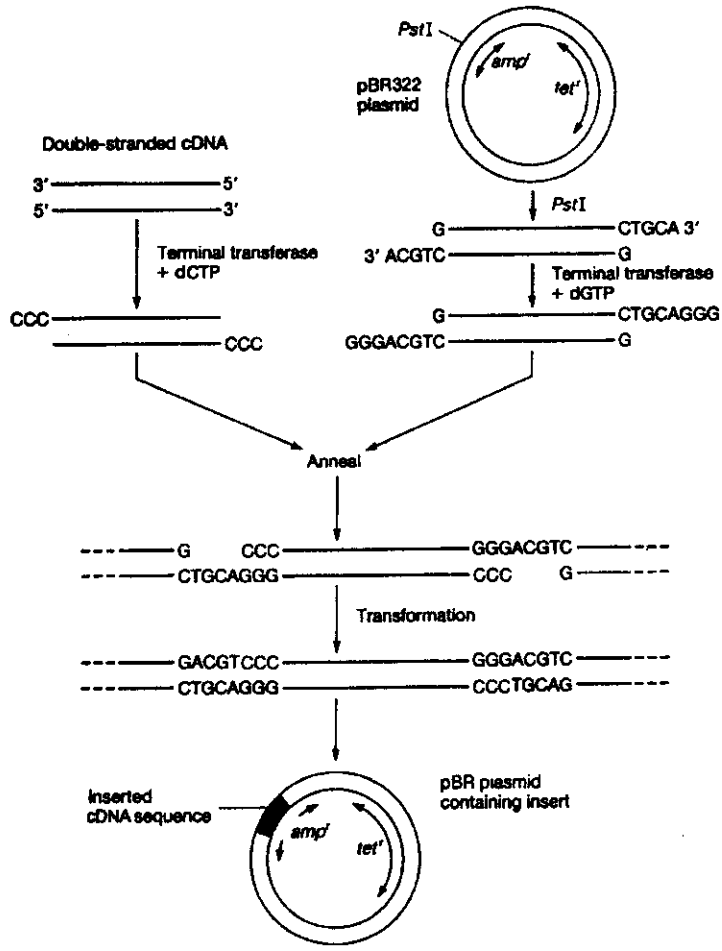
วิธีการเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการได้แก่

1. Heatshock โดยใช้ chemical treated cells โดยใช้สารเคมีเกลือโลหะต่างๆ หรือ DMSO (dimethyl sulfoxide) ในการทำให้เซลล์อยู่ในสถาพที่เป็น competent cell
2. Electroporation โดยอาศัยกระแสไฟฟ้าทำให้ผิวเซลด้านนอกแตกชั่วขณะเพื่อรับดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์
3. Transfection อาศัยเฟจพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์
4. Liposome โดยอาศัยสารสังเคราะห์ที่มีคุณสมบัติเป็นลิปิด (lipid) หรือฟอสโฟลิปิด (phospholipid)

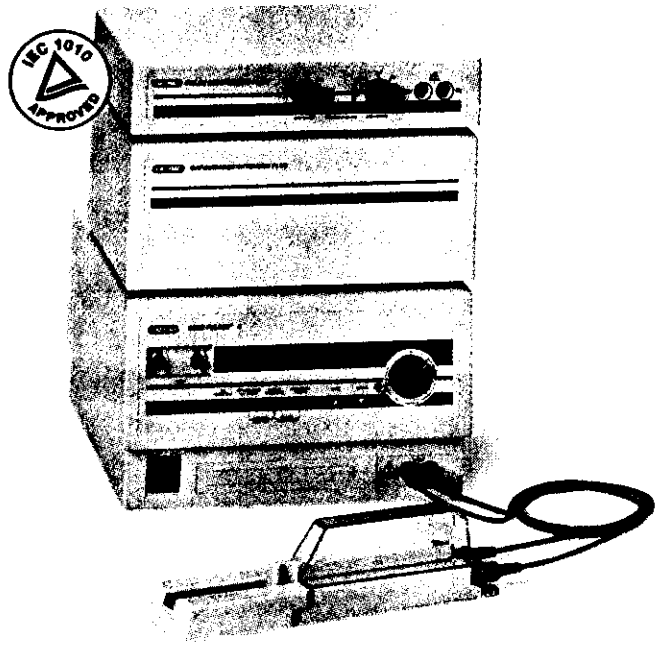
Heatshock transformation

โดยวิธีการนี้พลาสมิดดีเอ็นเอ (plasmid DNA) จะเคลื่อนสู่ *E. coli* โดยต้องเตรียมเซลล์ผู้รับให้อยู่ในสภาพ competent cells ก่อน เพื่อให้มีการยอมรับดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์

โดยแช่เซลล์ในสารละลายเกลือ Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, K^{+}, Co^{2+}, Rb^{+}, หรือ DMSO (dimethylsulfoxide) ที่ 0°C เมื่อเติมดีเอ็นเอลงไปก็จะเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของดีเอ็นเอกับเกลือโลหะเหล่านี้ที่ผนังเซลล์และจะเคลื่อนเข้าสู่เซลล์เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยความร้อนที่ 42°C (heatshock) เมื่อเซลล์รับดีเอ็นเอก็จะเจริญแบ่งตัวเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (replication) ได้ เนื่องจากมีจุด ORI บนพลาสมิดดีเอ็นเอ เซลล์ที่ได้รับพลาสมิดสายผสม (recombinant plasmid) จะมีฟีโนไทป์ (phenotye) ตามยีนที่ได้รับ ดังนั้นสามารถตรวจหาเซลล์ที่ได้รับพลาสมิด (transformant cell) นั้นได้จากฟีโนไทป์ที่เกิดขึ้น



รูปที่ 5-1 การโคลนยีนโดยการเชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้าไปใน pBR322
(จาก Zubay, 1987)



รูปที่ 5-2 เครื่องมือนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ด้วยกระแสไฟฟ้า
(Electroporator; Bio-Rad Laboratories)

ประสิทธิภาพของการเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง เช่น

1. ขนาดของดีเอ็นเอ โดยดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กจะสามารถเคลื่อนย้ายเข้าสู่เซลล์ได้ง่ายกว่าดีเอ็นเอขนาดใหญ่
2. โครงรูปของดีเอ็นเอ (conformation) ที่เป็นวงเกลียวแน่น (supercoiled form) จะให้ประสิทธิภาพสูงสุด และดีเอ็นเอปลายเปิดเป็นเส้นตรง (linear form) จะให้ประสิทธิภาพต่ำสุด ส่วนดีเอ็นเอที่คลายเป็นวง (relaxed form) จะให้ประสิทธิภาพปานกลาง
3. ชนิดของเซลล์เจ้าบ้าน
4. ระยะการเจริญของเซลล์เจ้าบ้าน โดยระยะ mid log phase จะให้ประสิทธิภาพสูงสุด เนื่องจากมีการสร้างสารชีวโมเลกุลมากและเซลล์มีความแข็งแรง ดังนั้นเมื่อเวลา

รับดีเอ็นเอเข้าไปแล้วจะปรับตัวพักฟื้นสู่สภาวะปกติได้ง่ายกว่า ถ้าเป็นระยะ lag phase เซลล์ยังอ่อนแอ มีการสร้างเอนไซม์และสารชีวโมเลกุลต่างๆ น้อย เมื่อถูกสารเคมีอาจทำให้เซลล์ตายง่าย ส่วนระยะ stationary phase เซลล์แก่เกินไปเมื่อถูกสารเคมีอาจทำให้เซลล์ตายง่ายเช่นเดียวกัน ประสิทธิภาพก็จะต่ำ

5. ปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้
6. วิธีเตรียม competent cells ที่นิยมใช้มี 2 วิธีใหญ่ๆ คือ
   1. การใช้แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$ method)

การใช้แคลเซียมคลอไรด์ในการทำให้ผนังเซลล์เจ้าบ้านเกิด permeability ทำได้โดยให้เซลล์เจ้าบ้านอยู่ในสภาวะของแคลเซียมคลอไรด์นานๆ ประมาณ 24 ชั่วโมง ที่ $4^{\circ}C$ จะทำให้ประสิทธิภาพในการ transfer ดีขึ้น โดยวิธีแคลเซียมคลอไรด์นี้มีโอกาสที่พลาสมิดดีเอ็นเอจะเข้าไปในเซลล์เจ้าบ้านได้ 1 ใน 1000 เท่านั้น ดังนั้นประสิทธิภาพของการ transformation จะได้ประมาณ 10^5-10^6 เท่านั้น เช่น การ transform พลาสมิด pBR322 เข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน HB101 ประสิทธิภาพของการ transform = 10^5 transformants/μg DNA

   2. การใช้ DMSO (DMSO method)

การเพิ่มไอออน (ion) จะช่วยในการทำให้เกิด permeability ที่ผนังเซลล์มากขึ้น ได้แก่ Ca^{2+}, Mg^{2+}, K^{+}, Mn^{2+}, Co^{3+}, Rb^{+} และ DMSO เนื่องจาก DMSO เป็นสารที่มีอันตรายต่อเซลล์ ดังนั้นวิธีนี้จะทำในเวลาสั้นๆ ซึ่งจะทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์น้อยมาก นอกจากนี้แล้ว DMSO ยังมีบทบาทในการทำให้ประสิทธิภาพในการ transform สูงขึ้น แต่ถ้าหาก DMSO ที่ใช้ถูกออกซิไดซ์ (oxidized) โดยออกซิเจนในอากาศแล้ว จะได้ $DMSO_4$ (dimethylsulfate) ซึ่งจะทำให้ประสิทธิภาพของการ transform ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ข้อควรระวังในการ transformation นี้ต้องใช้ fresh DMSO ที่ผ่าน N_2 free O_2 แล้วเท่านั้น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้รู้วิธีการนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย (transformation)
2. เพื่อให้รู้วิธีการเตรียมเซลล์แบคทีเรียในสภาพที่พร้อมจะรับดีเอ็นเอจากภายนอก

สารเคมีที่ใช้

1. LB broth; LB broth ที่มีแอมพิซิลิน 100 μg/ml
2. LB agar ที่มีแอมพิซิลิน 100 μg/ml
3. 0.1 M $CaCl_2$
4. 0.1 M $MgCl_2$
5. กลีเซอรอล
6. พลาสมิดดีเอ็นเอ
7. *E. coli* DH5α (เป็นสายพันธุ์ใช้ในการเตรียมพลาสมิดและคอสมิด สามารถคัดเลือกโดยใช้ compementation ได้ เพราะมี ϕ80 *lacZ* ΔM15 อยู่บนโครโมโซม)

อุปกรณ์

1. ตู้อบ 37°C พร้อมเครื่องเขย่า (shaker incubator)
2. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (42°C water bath)
3. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge)
4. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) และคิวเวต (cuvette)
5. Microtube

หมายเหตุ : สารละลายและภาชนะบรรจุเซลล์จะต้องนึ่งฆ่าเชื้อ ก่อนใช้

วิธีการทดลอง

การเตรียม competent *E. coli* โดยวิธี $CaCl_2$

1. เขี่ยเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวของเซลล์ *E.coli* DH5α ลงใน LB broth 5 ml เลี้ยงเชื้อโดยเขย่าที่ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง
2. เติมเชื้อที่เลี้ยง 0.4 ml ลงใน LB broth 40 ml (1:1 00) เลี้ยงเชื้อโดยเขย่าที่ 37°C จนถึง log phase (A_{600} ~ 0.4-0.5) ประมาณ 3 ชั่วโมง (1 $A_{600} \cong 10^8$ cells/ml)
3. เก็บเชื้อโดยปั่นที่ 500-1โโดยปั่นที่ 500-1,000. 4°C เป็นเวลา 10 นาที
4. แยกส่วนใส (supernate) ออก แล้วละลายตะกอนเชื้อโดยใช้ 8 ml $MgCl_2$ (1:5 ปริมาตรเริ่มต้น) แช่น้ำแข็ง 15 นาที
5. ปั่นแยกเซลล์ที่ 500-1,000 x g ที่ 4°C เป็นเวลา 10 นาที

6. แยกส่วนใสออก แล้วละลายตะกอนเชื้อโดยเติม 0.8 ml $CaCl_2$ (1:50 ปริมาตรเริ่มต้น) แช่น้ำแข็ง 30-60 นาที เซลล์ที่ได้จะเรียกว่า competent cells ซึ่งพร้อมที่จะรับดีเอ็นเอ อื่นเข้าสู่เซลล์ (ถ้าเก็บส่วนนี้ไว้ที่น้ำแข็งหรือ 4°C เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง จะทำให้ประสิทธิภาพในการ transform สูงขึ้น 4-6 เท่า)
7. ในกรณีที่จะเก็บ competent cells ไว้ใช้งาน ให้เติมกลีเซอรอลลงใน competent cells โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของกลีเซอรอลเป็น 15%

หมายเหตุ : เซลล์และสารละลายของบัฟเฟอร์ที่นำมาใช้ในข้อ 3-7 ต้องแช่เย็นในระหว่างที่ทำการทดลอง

การนำพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าสู่ *E.coli* DH5α โดย heat shock method

1. เติมดีเอ็นเอ 0, 5, 20, 100, และ 500 ng ลงใน microtube ขนาด 1.5 mL (ปริมาตรไม่เกิน 10 μl)
2. เติม competent cells ที่เตรียมไว้ข้างต้น 100 μl แช่น้ำแข็ง 15-20 นาที
3. แช่เซลล์ที่ 42°C เป็นเวลา 45-60 วินาที
4. เติม LB broth 900 μl เขย่าเซลล์ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง.
5. แบ่งเชื้อ 100 μl (ไม่ควรเกิน 200 μl ต่อ เพลท (plate) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 90 mm) มากระจายบน LB agar ที่มีแอมพิซิลิน 100 μg/ml
6. บ่มเชื้อที่ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง.

ผลการทดลอง

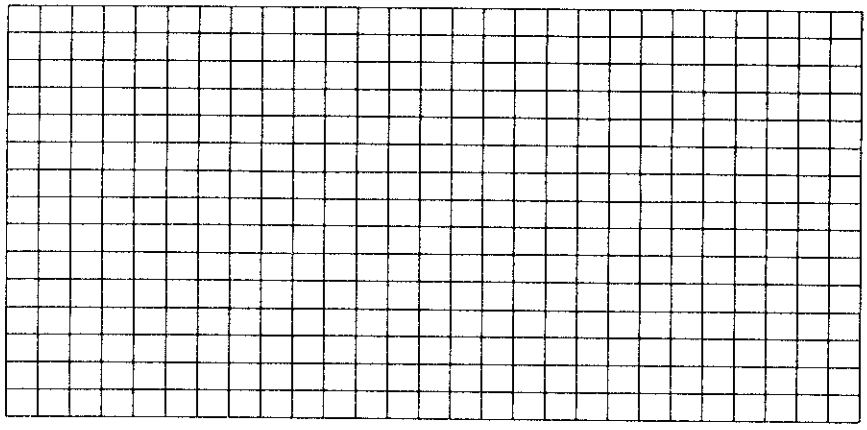
1. ประสิทธิภาพ (efficiency) ในการเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์

ปริมาณดีเอ็นเอ (ng)	จำนวนโคโลนีต่อเซลล์100 μl	จำนวนโคโลนีต่อ 1 หลอดที่ transform	ประสิทธิภาพของการ transform (colonies/μg DNA)
0 (control)			
5			
20			
100			
500			

โดยวิธีนี้ ประสิทธิภาพของการ transform จะอยู่ในช่วง 10^7 transformed colonies/μg DNA

2. สร้างกราฟการ transform โดยให้จำนวน transformants เป็นแกน Y ส่วนปริมาณพลาสมิดเป็นแกน X

Transformants (colonies)



ปริมาณพลาสมิด (ng)

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

แบบฝึกหัดบทปฏิบัติการที่ 5

1. สารละลาย Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, K^{+}, Co^{2+} หรือ Rb^{+} มีประโยชน์อย่างไรในการนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย
2. ในการนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย ถ้ามีประสิทธิภาพต่ำควรจะแก้ไขโดยวิธีใด
3. ข้อดีและข้อเสียของ heat shock transformation มีอะไรบ้าง