บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันมีการนำเทคโนโลยีพันธุวิศวกรรมมาใช้ในการบำบัดหรือรักษาโรคที่เกี่ยวข้องพันธุกรรม เช่น โรคมะเร็ง (cancer therapy) และผลิตวัคซีนดีเอ็นเอ (DNA vaccine) จึงมีการศึกษาการใช้พลาสมิดดีเอ็นเอ (plasmid DNA) เพื่อใช้เป็นพาหะในการทำยีนบำบัดกันมากขึ้น พลาสมิดเป็นดีเอ็นเอสายคู่เป็นวงอยู่นอกโครโมโซม (double – stranded circular extrachromosomal DNA) ที่สามารถเพิ่มจำนวนได้สูงถึง 3,000 ชุด (copies) ในแบคทีเรียหนึ่งเซลล์ recombinant plasmid สามารถสร้างได้โดยการใช้เทคนิคทางพันธุกรรมเพื่อที่จะใส่ยีนที่ต้องการ ดังนั้นทำให้ได้จำนวนชุดของยีนหลายพันชุด ยีนที่ใส่เข้าไปนี้อาจเป็นยีนที่ใช้รักษาโรคพันธุกรรม เช่น ยีนฆ่าเซลล์มะเร็ง หรือยีนสร้างวัคซีน และเมื่อนำยีนที่มีคุณสมบัติในการรักษา (therapeutic gene) เข้าสู่สิ่งมีชีวิต (คน หรือสัตว์) จะทำให้สามารถรักษาความผิดปกติหรือโรคบางอย่างได้ วิธีการดังกล่าวซึ่งเป็นการบำบัดยีน (gene therapy) โดยตรง การใช้พลาสมิดทำได้ง่ายโดยการฉีด (injection) พลาสมิดดีเอ็นเอมีบทบาทสำคัญอย่างยิ่ง และการทำยีนบำบัดโดยการใช้พลาสมิดเป็นตัวพายีนเป็นเทคโนโลยีล่าสุดในการพายีนโดยไม่ใช้ไวรัสเป็นพาหะ (non-viral gene delivery system) เพราะใช้ง่ายผลิตได้ง่ายกว่าเมื่อเทียบกับการผลิตและใช้ไวรัส ซึ่งการใช้ไวรัสเป็นพาหะสามารถก่อให้เกิดการต่อต้านเมื่อใช้ในครั้งต่อ ๆ ไปเพราะร่างกายสร้างภูมิต้านทาน ขณะนี้พลาสมิดสำหรับการทำยีนบำบัด (pharmaceutacal grade pDNA) เป็นที่ต้องการอย่างมากทั่วโลก ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องผลิตให้ได้ปริมาณมากในระดับที่สามารถขยายส่วนได้ (scaleable) และกระบวนการผลิตเชื่อถือได้ซึ่งขณะนี้ยังไม่มีรายงานกระบวนการผลิตเป็นการค้า (Chamsart, 2001)

กระบวนการผลิตพลาสมิดง่ายกว่าการผลิตไวรัสเพื่อการรักษายีนโดยที่พลาสมิดดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 10 กิโลเบส สามารถโคลนใน *E. coli* และทำการเลี้ยงหัวเชื้อ (inoculum) เพื่อที่ให้เชื้อเพิ่มจำนวนต่อไปก็เข้าสู่กระบวนการเพาะเลี้ยง (cultivation) เพื่อให้ได้เซลล์จำนวนมาก ขั้นตอนต่อไปเป็นกระบวนการสลายเซลล์ด้วยด่าง (alkaline lysis) เพื่อทำให้เซลล์แตกและตกตะกอนสารที่เราไม่ต้องการเพื่อเป็นการลดการปนเปื้อนผลผลิต ขั้นตอนสุดท้ายเป็นขั้นตอนที่สำคัญคือการทำให้ผลผลิตมีความบริสุทธิ์ โดยวิธีการ anion exchange chromatography

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การสกัดพลาสมิดในระดับอุตสาหกรรมใหญ่ (large-scale) และการทำให้บริสุทธิ์จำเป็นต้องใช้กระบวนการผสมสาร (mixing process) ซึ่งประกอบด้วยการแขวนลอยเซลล์ การสลายเซลล์ด้วยด่างแก่ และการทำให้เป็นกลาง (neutralisation) เพื่อตกตะกอนโปรตีน และเศษเซลล์ (cell debris) เพื่อแยกพลาสมิดออกมา การขยายส่วน (scale-up) กระบวนการนี้มีข้อน่าสนใจอยู่ 6 ประการ คือ

(1) Initial cell suspension มีปริมาตร ½ ของ alkali-SDS lysis buffer

(2) การผสมสารแขวนลอยเซลล์และสารละลายด่างนี้ต้องทำอย่างรวดเร็ว เพื่อป้องกันพลาสมิดเสียหาย (irreversible denaturation) และการผสมของสารเหล่านี้ต้องไม่ก่อให้เกิด "hot spot" คือ การที่ lysis buffer สะสมอยู่เฉพาะจุด เพราะการกวนส่วนผสมไม่มีประสิทธิภาพ

(3) การตกลงสู่ก้นถังของ neutralised buffer ที่มีความหนาแน่นเนื่องจากการกวนไม่ดีพอ

(4) โครโมโซมอลดีเอ็นเอ (chromosomal DNA) และฟลอค (neutralised floc) นั้นไวต่อแรงเฉือนซึ่งจะทำให้มันแตกและทำให้เกิดความยุ่งยากในขั้นตอนการทำให้พลาสมิดบริสุทธิ์ ฉะนั้นต้องลดแรงเฉือนให้น้อยที่สุดขณะที่มีการกวน

(5) ปัญหาของ rheological complexcity ของของเหลวเนื่องจากมีคุณสมบัติเป็น viscoelastic ซึ่งทำให้ยากต่อการกวน

(6) การทำให้เซลล์ lysate เป็นกลางต้องทำให้ทั่วถึงมิฉะนั้น lysate จะเป็นอุปสรรคต่อกระบวนการกรองในขั้นต่อไป (Chamsart, 2001)

ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการออกแบบการสกัดพลาสมิดโดยใช้ (In-Line Mixer) โดยการไหลเซลล์แขวนลอยพร้อมกับสารละลายด่างให้เข้าไปพบกันในท่ออย่างต่อเนื่อง เซลล์จะถูกสลายได้อย่างรวดเร็วภายในเวลาเป็นวินาทีจากนั้นทำการไหลสารทำให้เป็นกลางเข้าไปพบกันในท่อเช่นกัน เพื่อตกตะกอนเศษเซลล์และโปรตีนอย่างต่อเนื่อง ซึ่งวิธีดังกล่าวนี้มีข้อดี คือ 1. สามารถแก้ปัญหาข้อ (2) ถึง (6) ที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นได้ ซึ่งเป็นการสลายเซลล์ในท่อแบบต่อเนื่องแทนการสลายในถังกวน (stirred tank) 2. สามารถทำได้แบบต่อเนื่อง (continuous operation) ซึ่งเป็นการนำไปสู่การพัฒนาเครื่องสกัดพลาสมิดอัตโนมัติ (automated pDNA extraction machine) 3. ต้นทุนและอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับวิธี In-Line Static Mixer ถูกกว่าการใช้ถังกวนอย่างมากคือประมาณ 20 เท่า (Chamsart, 2001)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อออกแบบกระบวนการและสร้างเครื่องมือสำหรับการสกัดพลาสมิดแบบต่อเนื่องภายในท่อ

2. เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของขั้นตอนต่าง ๆ สำหรับการสกัดพลาสมิดแบบต่อเนื่องตั้งแต่กระบวนการสลายเซลล์ การทำให้เป็นกลาง และการกรอง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ทำให้ได้กระบวนการต้นแบบ และทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมและเข้าใจถึงกระบวนการและเทคนิคในการสลายเซลล์แบบต่อเนื่องโดยการใช้ static mixer

2. ทราบถึงหลักการและวิธีทำงานของอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการสกัดพลาสมิดแบบต่อเนื่องใน 3 ขั้นตอน คือ การสลายเซลล์ และการทำให้เป็นกลาง ซึ่งวิธีการนี้ถือว่าเป็นเทคโนโลยีใหม่ (novel technology) ซึ่งมีข้อดีกว่าการสกัดแบบ batch โดยการใช้ถังกวน ซึ่งวิธีการสกัดพลาสมิดแบบต่อเนื่องนี้ต้นทุนของเครื่องมือต่ำกว่าการใช้ถังกวนมาก ประกอบกับทำได้รวดเร็วกว่าเพราะเป็นระบบแบบต่อเนื่อง

3. สามารถขยายส่วน (scale-up) แล้วนำไปประกอบกระบวนการผลิตพลาสมิดสำหรับยีนบำบัดในระดับอุตสาหกรรมได้ ซึ่งเป็นการลดต้นทุนสำหรับการสกัดพลาสมิดได้อย่างมาก และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานด้านวิศวกรรมชีวเคมี (biochemical engineering) สำหรับการผลิตสารชีวภาพอื่น ๆ โดยการใช้ In-Line Static Mixer ซึ่งสามารถนำไปดัดแปลงประยุกต์ใช้ได้ตามความเหมาะสม และจุดประสงค์ของแต่ละงาน

4. ในอนาคตพลาสมิดจะถูกนำมาใช้รักษายีนรวมทั้งรักษามะเร็งและวัคซีนดีเอ็นเอ ดังนั้นความต้องการในการใช้พลาสมิดที่บริสุทธิ์มีมากซึ่งจำเป็นต้องมีการผลิตในระดับอุตสาหกรรมเพื่อให้เพียงพอกับความต้องการใช้งาน แต่ในปัจจุบันยังไม่มีกระบวนการผลิตที่เป็นการค้าในระดับอุตสาหกรรม ฉะนั้นวิธีนี้จึงเป็นวิธีที่ดีที่สุดวิธีหนึ่ง เมื่อเปรียบเทียบกับการสกัดแบบ batch เนื่องจากกระบวนการผลิตไม่ซับซ้อนมากนัก จำนวนขั้นตอนกระบวนการมีไม่มากเกินไปเมื่อเทียบกับอุตสาหกรรมอื่น ๆ ซึ่งปัญหาการผลิตไม่ได้ขึ้นอยู่ที่เทคโนโลยีทางวิศวกรรมเคมี แต่อยู่ที่ความคิดรวบยอดของการออกแบบและพัฒนาระบบและกระบวนการผลิต ซึ่งสามารถสร้างเป็นโรงงานขนาดเล็กถึงกลางได้โดยใช้เงินทุนไม่สูงมากเมื่อเทียบกับอุตสาหกรรมยาอื่น ๆ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สมมติฐานของการวิจัย

1. อุปกรณ์ที่ใช้ทำปฏิกิริยาที่ดีสามารถใช้แทนปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวนได้

2. สภาวะที่เหมาะสมในการสลายเซลล์ภายใน In-Line Static Mixer มีผลต่อการผลิตเซลล์

3. โมเดลที่ใช้เป็นแบบจำลองสำหรับการศึกษาการแยกสกัดพลาสมิด โดยการทำให้เซลล์สลาย และปลดปล่อยพลาสมิดออกมาแบบต่อเนื่องภายในท่อ โดยการใช้ In-Line Static Mixer มีผลต่อประสิทธิภาพในการสลายเซลล์ ดังนั้นจำเป็นที่จะต้องมีการสร้างให้ได้แบบที่เหมาะสม โดยที่อุปกรณ์นี้จะใช้ทั้งสลายเซลล์ ตามด้วยการทำให้เซลล์เป็นกลาง เพื่อตกตะกอนเศษเซลล์ในเวลาเดียวกัน จากนั้นกรอง neutralised suspension ที่ได้เพื่อเอาเศษเซลล์ที่ตกตะกอนอยู่ในรูปเศษเซลล์ออก

4. นอกจากชุดเครื่องมือ In-Line Static Mixer แล้วประสิทธิภาพของการทำงานยังขึ้นอยู่กับสภาวะต่าง ๆ เช่น อัตราการไหล (flow rate) ของของเหลวที่ไหลภายในท่อ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ระบบการไหล (flow regimes) คุณสมบัติความหนืด (rheological properties) และอื่น ๆ ซึ่งปัจจัยหลัก ๆ ที่กล่าวมานี้ จะถูกศึกษารายละเอียดในงานวิจัยนี้ ส่วน อุณหภูมิ และ pH Chamsart (2001) ได้ศึกษาไว้แล้วและเมื่อได้พลาสมิดที่แขวนลอยอยู่ในสารละลายแล้วจำเป็นที่จะต้องมีการแยกและทำให้บริสุทธิ์

ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาการผลิตเซลล์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังหมัก (fermenter) ขนาด 5 และ 10 ลิตรโดยศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมที่สามารถผลิตเซลล์ได้จำนวนมากที่สุด โดยการเพาะเลี้ยงแบบกะ (batch cultivation) แบบครั้งคราว (fed-batch cultivation) และแบบต่อเนื่อง (continuous cultivation)

2. การออกแบบและสร้าง In-Line Mixer โดยการใช้ static mixer ที่มี static elements แบบ ribbon type (kenic static mixer) โดยแบ่งออกเป็นสองส่วนคือ ส่วนสำหรับการสลายเซลล์ด้วย alkali-SDS และส่วนการทำให้ lysate เป็นกลาง (neutralisation)

3. ศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสม ในขั้นตอนการสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer โดยที่อุปกรณ์นี้จะใช้ทั้งสลายเซลล์ ตามด้วยการทำให้ lysate เป็นกลางเพื่อตกตะกอนเศษเซลล์ในเวลาเดียวกัน ทั้งนี้ประสิทธิภาพการทำงานยังขึ้นอยู่กับสภาวะต่าง ๆ เช่น อัตราการไหลของของเหลวที่ไหลภายในท่อ อุณหภูมิ pH ระบบการไหล คุณสมบัติความหนืด และอื่น ๆ ซึ่งปัจจัย

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

หลัก ๆ ที่กล่าวมานี้สัมพันธ์โดยตรงกับประสิทธิภาพของเครื่องมือ ผลผลิตและคุณภาพของพลาสมิดจะถูกศึกษารายละเอียดในงานวิจัยนี้

สถานที่ทดลอง

ห้องปฏิบัติการ bioprocess engineering ซึ่งเป็นสถานที่ปฏิบัติงานวิจัยของกลุ่มวิจัย Bangsaen Biochem Engineering Group (BBERG) (http://bberg.buu.ac.th) โครงการบัณฑิตศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University