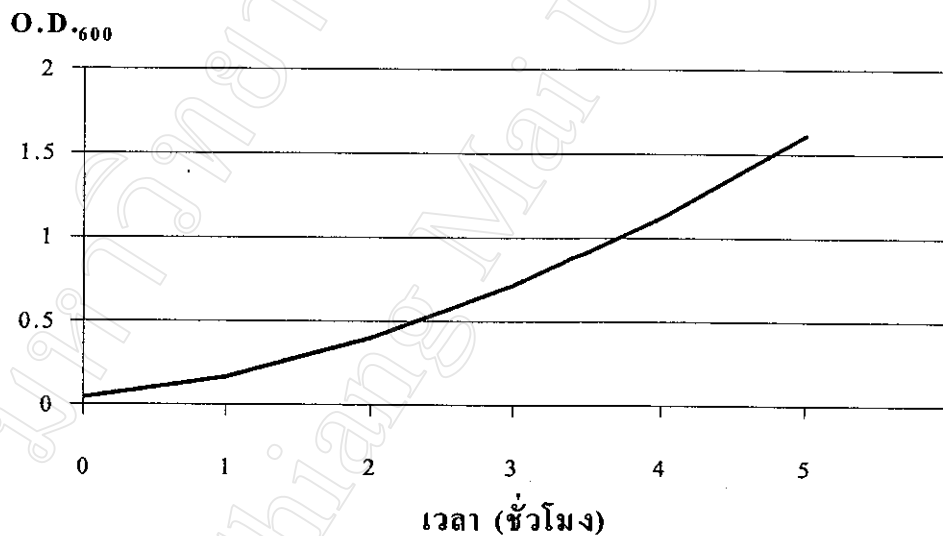


บทที่ 4

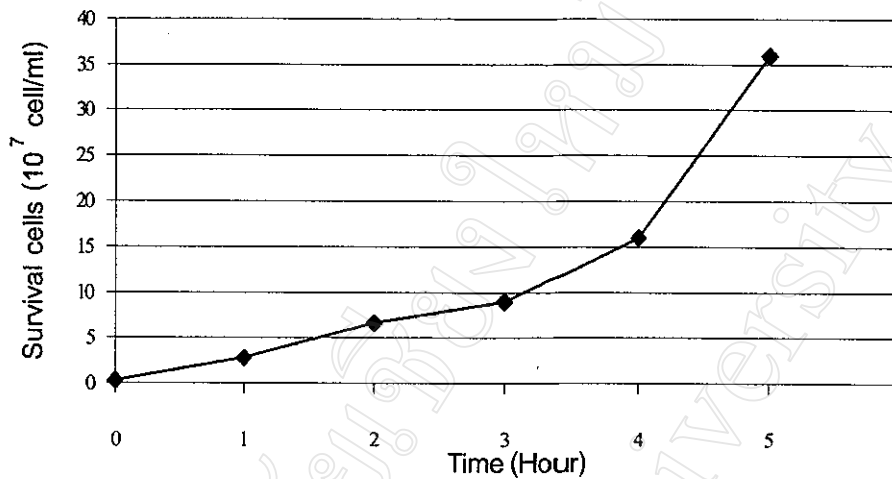
ผลการวิจัย

1. การศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อ *E. coli* (growth curve)

การศึกษาการเจริญของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α พบว่าหลังจากบันทึกค่า O.D.₆₀₀ ตั้งแต่การลงเชื้อ *E. coli* ที่เป็นหัวเชื้อปริมาณ 2 ml ถ่ายลงเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB 100 ml จากผลการทดลองสามารถนำมาสร้างกราฟได้ดังรูป 9 ส่วนจำนวนเซลล์ที่นับได้สามารถนำมาสร้าง growth curve ได้ดังรูป 10 จากผลการทดลองทำให้ทราบว่าช่วง O.D.₆₀₀ = 0.5 – 1 คือช่วง early log phase – mid log phase ซึ่งมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตประมาณ 10^8 cells/ml (รูป 10)



รูป 9 กราฟแสดงค่า O.D.₆₀₀ ในการเลี้ยงเชื้อ *E. coli* ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาณ 100 ml ระยะเวลา 5 ชั่วโมง



รูป 10 กราฟแสดงการเจริญของเชื้อ *E. coli* ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาณ 100 ml ระยะเวลา 5 ชั่วโมง

2. การศึกษาประสิทธิภาพการส่งถ่ายพลาสมิดที่มีขนาดแตกต่างกัน

จากการใช้พลาสมิด 3 ชนิดได้แก่ pUC19, p35S-GFP และ pBI221 ที่มีขนาดต่างกัน คือ 2.7, 4.5 และ 5.7 kb ตามลำดับ ในปริมาณความเข้มข้น 100 ng ส่งถ่ายเข้าไปในเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ปริมาตร 100 μ l ด้วยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน จากนั้นนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ C ที่ความเร็ว 150 rpm นาน 1 ชั่วโมง พบว่าประสิทธิภาพการทรานสเฟอร์เมชันมีจำนวนเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดต่อปริมาณพลาสมิดคือเอ็นเอ 1 μ g คือ 5.33×10^6 , 2.93×10^6 และ 1.32×10^4 transformants/ μ g ตามลำดับ แสดงในตาราง 1

ตาราง 1 ประสิทธิภาพการทรานสเฟอร์เมชันด้วยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน ในการส่งถ่ายพลาสมิด ดีเอ็นเอที่มีจำนวนโมเลกุลต่างกัน 3 ชนิด คือ pUC19, p35S-GFP และ pBI221 ตามลำดับ เข้าสู่เซลล์ *E. coli* แขนวลอย

พลาสมิดดีเอ็นเอ	pUC19	p35S-GFP	pBI221
ประสิทธิภาพการ ทรานสเฟอร์เมชัน* (transformants/ μ g)	$(5.33 \pm 1.97) \times 10^6$	$(2.93 \pm 1.61) \times 10^6$	$(1.32 \pm 2.30) \times 10^4$

*Mean $\pm$ SD of triplicate plates.

3. การศึกษาการส่งถ่ายพลาสมิดที่มีความเข้มข้นต่างกัน

ได้เลือกพลาสมิดดีเอ็นเอ p35S-GFP เป็นตัวแทนในการศึกษาถึงผลของความเข้มข้นพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีต่อประสิทธิภาพการทรานสเฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน โดยใช้ความเข้มข้น 10, 100 และ 500 ng ส่งถ่ายในเซลล์ *E. coli* แขนวลอยปริมาตร 100 μ l แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C ที่ความเร็ว 150 rpm 1 ชั่วโมง มีจำนวนเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดในอาหารทั้งหมดหนึ่งมิลลิลิตรดังนี้ คือ 0, 2.6×10^4 , 1.18×10^5 และ 6.44×10^5 transformants/ml ตามลำดับ (ตาราง 2) และจำนวนเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอหลังการทรานสเฟอร์เมชันและจะลดลงเมื่อลดปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอตามลำดับดังตาราง 2

ตาราง 2 จำนวนเซลล์ที่ได้รับพลาสมิด (transformants) หลังจากทำอิเล็กโทรพอเรชันด้วยพลาสมิดดีเอ็นเอ p35S-GFP ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันทั้ง 3 ระดับ

ความเข้มข้นของพลาสมิด (ng)	H ₂ O	10	100	500
จำนวนเซลล์ที่ได้รับพลาสมิด* (transformants /ml)	0	$(2.6 \pm 4.2) \times 10^4$	$(1.18 \pm 1.5) \times 10^5$	$(6.44 \pm 6.0) \times 10^5$

* = Mean $\pm$ SD of triplicate plates

4. การศึกษาประสิทธิภาพการส่งถ่ายพลาสมิดของเซลล์ที่ละลายในสารละลายกลีเซอรอลที่มีความเข้มข้นต่างกัน

การศึกษาระดับความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหมาะสมของการเก็บรักษาเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ที่ความเข้มข้น 10, 15 และ 20% ตามลำดับ โดยเลือกพลาสมิดดีเอ็นเอ p35S-GFP ปริมาณความเข้มข้น 100 ng พบว่าเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ที่เก็บรักษาในสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% มีประสิทธิภาพการทรานสเฟอร์เมชันสูงที่สุด รองลงมาคือ 15, 20% กลีเซอรอล และน้ำกลั่น ตามลำดับ โดยมีประสิทธิภาพการทรานสเฟอร์เมชัน 1.51×10^6 , 5.4×10^5 , 3.1×10^5 และ 1.8×10^5 transformants/ μ g ตามลำดับ ดังตาราง 3

ตาราง 3 ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มเมชันของเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ที่เก็บรักษาในสารละลายกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 10 , 15 และ 20% ตามลำดับ

	ความเข้มข้นของสารละลายกลีเซอรอล (%)			
	H ₂ O	10	15	20
ประสิทธิภาพการ ทรานสฟอร์มเมชัน* (transformants/ μ g)	$(1.8 \pm 1.1) \times 10^5$	$(1.51 \pm 2.0) \times 10^6$	$(5.4 \pm 1.7) \times 10^5$	$(3.1 \pm 1.5) \times 10^5$

* = Mean $\pm$ SD of triplicate plates

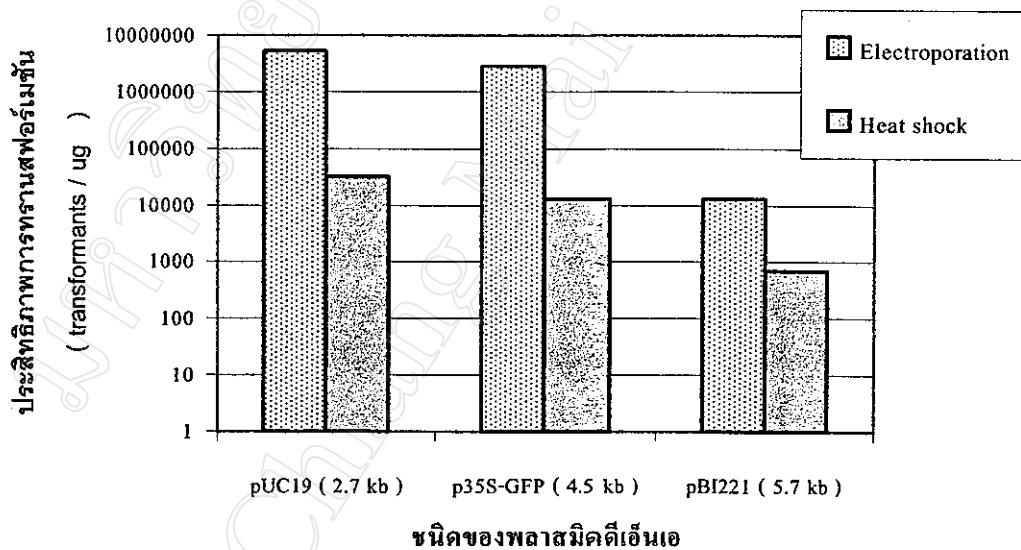
5. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการส่งถ่ายพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรพอเรชันกับ heat shock

ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มเมชันของเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ที่ใช้พลาสมิดดีเอ็นเอ pUC19, p35S-GFP และ pBI221 พบว่าในการส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์โดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันสูงกว่าวิธี heat shock ถึง 100 – 1,000 เท่า (ตาราง 4 และ รูป11) และพบว่าประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มเมชันของเซลล์ที่ส่งถ่ายพลาสมิด pUC19 สูงที่สุด รองลงมาคือ p35S-GFP และ pBI221 ตามลำดับ โดยประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มเมชันของวิธีอิเล็กโทรพอเรชันคือ 5.33×10^6 , 2.93×10^6 และ 1.32×10^4 transformants/ μ g ตามลำดับ และประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มเมชันของวิธี heat shock คือ 3.2×10^3 , 1.3×10^3 และ 7.0×10^2 transformants/ μ g ดังตาราง 4

ตาราง 4 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทรานสเฟอร์เมชันของวิธีอิเล็กโทรพอเรชันกับวิธี heat shock

พลาสมิดดีเอ็นเอ	pUC19	p35S-GFP	pBI221
Electroporation* (transformants/ μ g)	$(5.33 \pm 1.97) \times 10^6$	$(2.93 \pm 1.61) \times 10^6$	$(1.32 \pm 2.30) \times 10^4$
Heat shock* (transformants/ μ g)	$(3.2 \pm 5.0) \times 10^3$	$(1.3 \pm 2.3) \times 10^3$	$(7.0 \pm 4.6) \times 10^2$

* = Mean + SD of triplicate of plates



รูป 11 กราฟแสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทรานสเฟอร์เมชันของวิธีอิเล็กโทรพอเรชันกับวิธี heat shock

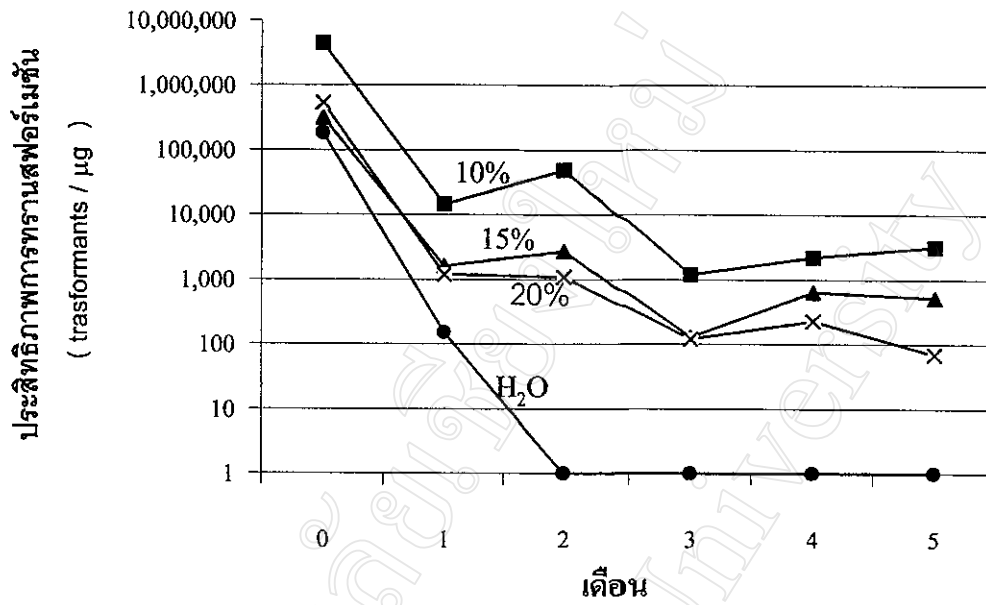
6. การศึกษาประสิทธิภาพการส่งถ่ายพลาสมิดในช่วงเวลาที่เก็บรักษาเซลล์คอมพิเทนท์ในสารละลายกลีเซอรอล

เมื่อทำการศึกษาถึงผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาเซลล์คอมพิเทนท์ในน้ำกลั่นและสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 10, 15 และ 20 % ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ -20°C ในช่วงเวลาทั้งหมด 5 เดือน โดยทำการวัดประสิทธิภาพการทรานสเฟอร์เมชันในทุกๆเดือน หลังการส่งถ่ายพลาสมิด p35S-GFP ความเข้มข้น 100 ng เข้าสู่เซลล์คอมพิเทนท์ในสารละลายกลีเซอรอลพบว่าประสิทธิภาพการทรานสเฟอร์เมชันของเซลล์ที่เก็บรักษาในน้ำกลั่นเมื่อเริ่มต้นทดลองมีประสิทธิภาพเท่ากับ 1.8×10^5 transformants/ μg หลังจากนั้นในเดือนที่ 1 ประสิทธิภาพลดลงเหลือ 1.5×10^2 transformants/ μg และหมดประสิทธิภาพไปในเดือนที่ 2 ส่วนเซลล์คอมพิเทนท์ที่เก็บรักษาในสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% พบว่าเมื่อเริ่มต้นการทดลองมีประสิทธิภาพเท่ากับ 1.5×10^6 transformants/ μg ต่อมาประสิทธิภาพลดลงเหลือ 1.4×10^4 transformants/ μg ในเดือนที่ 1 ในเดือนที่ 2 พบว่ามีประสิทธิภาพเท่ากับ 4.9×10^4 transformants/ μg หลังจากผ่านการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 3 เดือน เซลล์คอมพิเทนท์มีประสิทธิภาพลดลงเหลือ 1.2×10^3 transformants/ μg และประสิทธิภาพในการทรานสเฟอร์เมชันเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยในเดือนที่ 4 และ 5 โดยมีประสิทธิภาพเท่ากับ 2.2×10^3 และ 3.2×10^3 transformants/ μg ตามลำดับ ส่วนเซลล์คอมพิเทนท์ที่เก็บรักษาในสารละลายกลีเซอรอล 15% เมื่อเริ่มต้นทำการทดลองพบว่าประสิทธิภาพเท่ากับ 5.4×10^5 transformants/ μg ต่อมาประสิทธิภาพลดลงเหลือ 1.6×10^3 transformants/ μg ในเดือนที่ 1 และเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยในเดือนที่ 2 มีประสิทธิภาพเท่ากับ 2.7×10^3 transformants/ μg ในเดือนที่ 3 ประสิทธิภาพของเซลล์คอมพิเทนท์ที่เก็บรักษาในสารละลายชนิดนี้มีประสิทธิภาพลดลงเหลือ 1.3×10^2 transformants/ μg และเมื่อเก็บไว้ถึงเดือนที่ 4 และ 5 พบว่าประสิทธิภาพเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย โดยมีประสิทธิภาพเท่ากับ 6.4×10^2 และ 5.2×10^2 transformants/ μg ตามลำดับ ในส่วนของเซลล์คอมพิเทนท์ที่เก็บรักษาในสารละลายกลีเซอรอล 20 % เมื่อเริ่มต้นทดลองพบว่าประสิทธิภาพเท่ากับ 3.1×10^5 transformants/ μg ต่อมาในเดือนที่ 1 ประสิทธิภาพลดลงเหลือ 1.2×10^3 transformants/ μg และประสิทธิภาพการทรานสเฟอร์เมชันยังคงใกล้เคียงกับเดือนที่ 2 คือ 1.1×10^3 transformants/ μg หลังจากวัดผลการทดลองในเดือนที่ 3 พบว่าประสิทธิภาพลดลงเหลือ 1.2×10^2 transformants/ μg เดือนที่ 4 ประสิทธิภาพการทรานสเฟอร์เมชันที่บันทึกได้เท่ากับ 2.3×10^2 transformants/ μg และในเดือนที่ 5 ซึ่งเป็นเดือนสุดท้ายประสิทธิภาพลดลงเหลือ 7.8×10^1 transformants/ μg จากการทดลองจะเห็นได้ว่าการเก็บรักษาเซลล์คอมพิเทนท์ในสารละลายกลีเซอรอล 10% มีประสิทธิภาพ

สูงที่สุดในทุก ๆ เดือนเมื่อเทียบกับการเก็บรักษาเซลล์คอมพิเทนท์ในน้ำกลั่น และสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 15 และ 20 % ที่ได้ทำการทดลองดังตาราง 5 (รูป12)

ตาราง 5 ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มเมชันของเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ที่เก็บรักษาในสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 10, 15 และ 20% ช่วงเวลา 5 เดือน โดยทำการทดสอบประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มเมชันทุกเดือน

	ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มเมชัน (transformants/ μ g)			
ความเข้มข้นของ สารละลาย กลีเซอรอล (%)	H ₂ O	10	15	20
เริ่มต้นทำการ ทดลอง	1.8×10^5	1.5×10^6	5.4×10^5	3.1×10^5
เดือนที่ 1	1.5×10^2	1.4×10^4	1.6×10^3	1.2×10^3
เดือนที่ 2	0	4.9×10^4	2.7×10^3	1.1×10^3
เดือนที่ 3	0	1.2×10^3	1.3×10^2	1.2×10^2
เดือนที่ 4	0	2.2×10^3	6.4×10^2	2.3×10^2
เดือนที่ 5	0	3.2×10^3	5.2×10^2	7.8×10^1



รูปที่ 12 กราฟแสดงประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มเมชันของเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ที่เก็บรักษาในสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 10, 15 และ 20 % ในระยะเวลา 5 เดือน