การหาภาวะที่เหมาะสมในการนำพลาสมิดเข้าสู่ *Escherichia coli* สายพันธุ์ HB101 ด้วยอุปกรณ์อิเล็กโทรพอเรชัน

นายวรพันธ์ บุญชัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2540

ISBN 974-638-898-3

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

OPTIMIZATION FOR PLASMID TRANSFORMATION IN *Escherichia coli* HB101 BY USING ELECTROPORATION SYSTEM

Mr. Warrapan Boonchai

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biotechnology
Program of Biotechology
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 1997

ISBN 974-638-898-3

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การหาภาวะที่เหมาะสมในการนำพลาสมิดเข้าสู่ *Escherichia coli* สายพันธุ์ HB101 ด้วยอุปกรณ์อิเล็กโทรพอเรชัน
โดย	นายวรพันธ์ บุญชัย
ภาควิชา	หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. มานะ ศรียุทธศักดิ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ศุภวัฒน์ ชุติวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์)

อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. มานะ ศรียุทธศักดิ์)

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล)

กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์)

วรพันธ์ บุญชัย : การหาภาวะที่เหมาะสมในการนำพลาสมิดเข้าสู่ *Escherihia coli* สายพันธุ์ HB101 ด้วยอุปกรณ์อิเล็กโทรพอเรชัน (OPTIMIZATION FOR PLASMID TRANSFORMATION IN *Escherichia coli* HB101 BY USING ELECTROPORATION SYSTEM) อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ.ดร. มานะ ศรียุทธศักดิ์, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ, 123 หน้า. ISBN 974-638-898-3

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน ระหว่าง *E. coli* สายพันธุ์ HB101 กับ พลาสมิด pUC18 และ pBR 322 โดยใช้เครื่องอิเล็กโทรพอเรชันที่ให้กำเนิดคลื่นรูปพัลส์ที่ลดลงแบบเอกซ์โพเนนเชียลที่ประดิษฐ์ขึ้น ทำการศึกษาโดยแปรปัจจัยทางเคมีของสารละลายที่ใช้ในกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชันได้แก่ ความเข้มข้นของสารละลาย อิออนในสารละลายและ ปัจจัยทางไฟฟ้า ได้แก่ ความเข้มสนามไฟฟ้า จำนวนครั้งการกดกระตุ้น จากการศึกษาพบว่า ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันระหว่าง *E. coli* สายพันธุ์ HB101 กับ พลาสมิด pUC18 และ pBR 322 คือ ผสมสารแขวนลอยเซลล์ กับสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 80 % ในอัตราส่วน 1 : 6 (กลีเซอรอลความเข้มข้นสุทธิเท่ากับ 69.8 %) ปริมาตร 100 μl และสนามไฟฟ้าความเข้ม 4 kV /cm จำนวนครั้งการกดกระตุ้น 1 ครั้ง ได้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันเท่ากับ 5.93×10^{4} t/μg pUC18 และ 5×10^{3} t / μg pBR 322

ภาควิชา .....
สาขาวิชา สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ .....
ปีการศึกษา 2540 .....

ลายมือชื่อนิสิต วรพันธ์ บุญชัย .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

C727111 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: ELECTROPORATION / *E. coli* HB101 / pUC18 / pBR322
WARRAPAN BOONCHAI : OPTIMIZATION FOR PLASMID TRANSFORMATION IN *Escherichia coli* HB101 BY USING ELECTROPORATION SYSTEM. THESIS ADVISOR ; ASSO. PROF. MANA SRIYUDTHSAK , Ph.D THESIS CO- ADVISOR ; ASSO.PROF. PAIROH PINPHANICHAKARN, Ph.D.
123 pp. ISBN 974-638-898-3

Transformation of *E. coli* HB101 with plasmid pUC18 and pBR322 was performed by using a fabricated electroporation set generating exponential decay pulse. Conditions for transformation were optimized by varying chemical parameters such as concentration of electroporation solution , ion concentration in electroporation solution and the electrical parameters , such as field strength and the number of pulse. Optimal conditions for electroporation of *E. coli* HB101 with both plasmid were as follows : using 100 μl of cell suspension which was prepared by mixing stock cell suspension with 80% glycerol at a ratio of 1 : 6 (to give 69.8 % final concentration of glycerol) , field strength at 4 kV/cm and 1 pulse Under these conditions maximum transformation efficiencies of 5.93 x 10^4 t/μg of pUC 18 and 5 x 10^3 t/μg pBR322 were obtained.

ภาควิชา..... ลายมือชื่อนิสิต วรพันธ์ บุญชัย

สาขาวิชา สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2540 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้สำเร็จสมบูรณ์ ด้วยความช่วยเหลืออย่างดีของรองศาสตราจารย์ ดร. มานะ ศรียุทธศักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณอย่างสูงสุดไว้ ณ ที่นี้

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ทำวิจัยที่สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และที่ห้องปฏิบัติการวิจัยสิ่งประดิษฐ์สารกึ่งตัวนำ ภาควิชาวิศวกรรมไฟฟ้า คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จึงขอขอบพระคุณคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือให้คำแนะนำและอำนวยความสะดวกในระหว่างการทำวิจัยนี้เป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำแนะนำ ความคิดเห็น และคำวิจารณ์อันมีค่ายิ่ง

ขอขอบพระคุณ หัวหน้าภาควิชาชีวเคมีและผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อัญชลี ทัศนาขจร ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการขอใช้เครื่องอิเล็กโทรพอเรชันของภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณ คุณณรงค์ หอมจันทร์ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในเรื่องของอุปกรณ์ และคำแนะนำเกี่ยวกับระบบไฟฟ้า จนงานวิจัยนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ คุณกมลชัย มังกรฤทธิ์ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำที่มีประโยชน์เกี่ยวกับวงจรไฟฟ้า

ขอขอบคุณ คุณทรงศักดิ์ พันธุ์วัฒนะสิงห์ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือเกี่ยวกับงานเอกสารและขอขอบคุณ น้องๆ และเพื่อนๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจด้วยดีมาตลอด

เนื่องจากงานวิจัยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยของบัณฑิตวิทยาลัย จึงขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ คุณย่า คุณลุง คุณอา และน้องที่ได้ให้ความช่วยเหลือสนับสนุนทั้งกำลังกาย กำลังใจ และกำลังทรัพย์ ที่ดียิ่งแก่ผู้วิจัยจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญตาราง ..... ฌ
สารบัญรูป ..... ฎ

บทที่

1. บทนำ 1
2. วิธีการทดลอง 22
3. ระบบเครื่องอิเล็กโทรพอเรชัน (Electroporation apparatus) และการศึกษาความต่างศักย์ไฟฟ้าตกคร่อมที่เกิดในภาวะที่มีสารละลายอิเล็กโทรไลท์ชนิดต่างๆ 34
4. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการทรานสฟอร์เมชันระหว่าง *E. coli* สายพันธุ์ HB101 กับพลาสมิด pUC18 โดยวิธีแคลเซียมคลอไรด์ 51
5. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน (Electroporation) ระหว่าง *E. coli* สายพันธุ์ HB101 กับพลาสมิด pUC18 โดยใช้เครื่องอิเล็กโทรพอเรชันที่ให้กำเนิดคลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยม (Square wave pulse) 61
6. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน (Electroporation) ระหว่าง *E. coli* สายพันธุ์ HB101 กับพลาสมิด pUC18 และ pBR322 โดยใช้เครื่องอิเล็กโทรพอเรชันที่ให้กำเนิดคลื่นรูปพัลส์ที่ลดลงแบบเอกซ์โพเนนเชียล (Exponential decaying pulse) 74
7. บทสรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 100

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

เอกสารอ้างอิง..... 102
ภาคผนวก ก..... 109
ภาคผนวก ข..... 111
ภาคผนวก ค..... 113
ภาคผนวก ง..... 116
ภาคผนวก จ..... 119
ภาคผนวก ฉ..... 121
ประวัติของผู้เขียน..... 123

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1.1 การทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันในจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ..... 8-11

1.2 ส่วนประกอบของสารละลายอิเล็กโทรพอเรชัน (Electroporation solution) ที่ใช้กับแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ..... 17

3.1 ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าตกคร่อมที่ปรากฏของสารละลายชนิดต่าง ๆ 44

3.2 ผลของกลีเซอรอลความเข้มข้นต่าง ๆ กับความต่างศักย์ ไฟฟ้าตกคร่อมสารละลายที่ปรากฏที่ห้องบรรจุเซลล์ที่มีระยะห่างระหว่างขั้ว 0.1 cm เมื่อบรรจุปริมาตร 50 µl. 46

3.3 ผลของปริมาตร S1 และ S2 ต่อความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ปรากฏเมื่อใช้ห้องบรรจุเซลล์ที่มีระยะระหว่างขั้วเท่ากับ 0.1 cm และความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ให้ระบบเท่ากับ 1200 v..... 48

4.1 ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยแคลเซียมคลอไรด์ระหว่าง *E. coli* HB101 กับพลาสมิด pUC18 ที่ปริมาณต่าง ๆ กัน..... 52

4.2 ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีแคลเซียมคลอไรด์ระหว่าง *E. coli* HB101 กับพลาสมิด pUC18 ปริมาณต่าง ๆ กัน เวลาในการบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที และ 120 วินาที..... 54

4.3 ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยแคลเซียมคลอไรด์ระหว่าง *E. coli* HB101 กับพลาสมิด pUC18 ปริมาณต่าง ๆ กัน เมื่อใช้ชนิดอาหาร LB และ SOC medium ในขั้นตอน Pre cultivation..... 56

4.4 ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีแคลเซียมคลอไรด์ระหว่าง *E. coli* HB101 กับพลาสมิด pUC18 ที่ปริมาณต่าง ๆ กัน ใช้เวลาในการบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เท่ากับ 90 และ 120 วินาทีในอาหาร L และ SOC medium..... 58-59

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

5.1 ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันระหว่าง *E. coli* HB101 กับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 6.32 ng ที่ภาวะสนามไฟฟ้าความเข้มและเวลาต่าง ๆ กัน กดกระตุ้น 1 ครั้งในสารละลาย PEG4000 ความเข้มข้น10% ที่มี $CaCl_2$ ความเข้มข้น 500 mM (50μl)..... 63-64

5.2 ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันระหว่าง *E. coli* HB101กับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 6.32 ng และสารละลาย PEG4000 ความเข้มข้น10% ที่มี $CaCl_2$ ความเข้มข้น 500 mM (50 μl)ที่ภาวะสนามไฟฟ้าความเข้ม 6 kV/cm เป็นเวลา 3 ms จำนวน pulse ต่าง ๆ กัน..... 66

5.3 ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันของ ปริมาตร *E. coli* HB101 : ปริมาตรของกลีเซอรอลความเข้มข้นต่างๆ (S1 = 1 : 1, S2 = 1 : 5) ปริมาตร 50 μl กับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 6.32 ng ที่สนามไฟฟ้าความเข้ม 6 kV/cm เป็นเวลา 3 ms , 1pulse..... 69

5.4 ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันของปริมาตรเซลล์ *E. coli* HB101 ในสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 80% ของ S1 และ S2 ปริมาตร 50 μl กับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 6.32 ng ที่สนามไฟฟ้าและเวลาต่าง ๆ กัน , 1 pulse..... 71-72

6.1 ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันระหว่าง *E. coli* HB101 ที่ผสมสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้นต่าง ๆ กันในอัตราส่วน 1 : 1(50 μl) กับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 90 ng ที่สนามไฟฟ้าความเข้มต่าง ๆ กัน(EP) , 1 pulse 75-76

6.2 ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันระหว่าง *E. coli* HB101 (50 μl) ที่ผสมสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 80% ในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน กับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 90 ng ที่สนามไฟฟ้าความเข้ม 5 kV/cm (EP) , 1 pulse..... 79

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

6.3 ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันระหว่าง *E. coli* HB101 ที่ผสมสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 80% ในอัตราส่วน 1 : 6 (ความเข้มข้นกลีเซอรอลสุทธิเท่ากับ 69.8%) ปริมาตรต่าง ๆ กัน ผสมกับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 90 ng ที่สนามไฟฟ้าความเข้ม 5 kV/cm (EP) , 1 pulse 82

6.4 ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันระหว่าง *E. coli* HB101 ที่ผสมสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ในอัตราส่วน 1 : 6(100 µl) กับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 90 ng ที่สนามไฟฟ้าความเข้ม 5 kV/cm (EP) , 1 pulse 85

6.5 ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันระหว่าง *E. coli* HB101 ผสมกับสารละลายอิเล็กโทรพอเรชันที่ประกอบด้วยสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 80% ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ในอัตราส่วน 1 : 6 (100 µl) กับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 9 ng ที่สนามไฟฟ้าความเข้ม 5 kV/cm (EP) , 1 pulse 88

6.6 อัตราการรอดชีวิตของ *E. coli* HB101 (1 : 6) ที่สนามไฟฟ้าความเข้ม 0 - 7 kV/cm และจำนวน pulse ต่าง ๆ กัน 90

6.7 ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันระหว่าง *E. coli* HB101 (1 : 6) กับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 90 ng ที่ภาวะสนามไฟฟ้าความเข้มต่างๆ กัน(EP) และจำนวน pulse ต่างๆกัน 92

6.8 ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันระหว่าง *E. coli* HB101 (1 : 6) กับพลาสมิด pBR322 ปริมาณ 90 ng ที่ภาวะสนามไฟฟ้าความเข้มต่างๆ กัน(EP) และจำนวน pulse ต่าง ๆ กัน 94

6.9 ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันระหว่าง *E. coli* HB101 (1 : 6) กับพลาสมิด pUC18 และ pBR322 ปริมาณ 90 ng ที่ภาวะสนามไฟฟ้าความเข้ม 3 และ 4 kV/cm (EP) , 1 pulse 96

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	คลื่นรูปพัลส์ที่ใช้ในกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชัน	4
1.2	เยื่อหุ้มเซลล์ที่อยู่ในสนามไฟฟ้า	13
1.3	กลไกการถ่ายยีนโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน ก	14
1.4	กลไกการถ่ายยีนโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน ข	15
2.1	ขั้นตอนการสกัดพลาสมิดโดยวิธี Rapid alkaline lysis	25
2.2	ขั้นตอนการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)	29
2.3	ขั้นตอนการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน	32
3.1	ผังวงจรไฟฟ้าที่ใช้ในกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชัน ก	35
3.2	ผังวงจรไฟฟ้าที่ใช้ในกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชัน ข	35
3.3	ผังวงจรไฟฟ้าที่ใช้ในกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชัน ค	36
3.4	ผังวงจรไฟฟ้าที่ใช้ในกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชัน ง	36
3.5	ผังวงจรไฟฟ้าที่ใช้ในกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชัน จ	37
3.6	ผังวงจรไฟฟ้าที่ใช้ในกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชัน ฉ	37
3.7	ผังวงจรไฟฟ้าที่ใช้ในกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชัน ช	38
3.8	เครื่องอิเล็กโทรพอเรชัน (Electroporation apparatus) ที่ให้กำเนิดคลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยม	40
3.9	ระบบเครื่องอิเล็กโทรพอเรชัน (Electroporation system) ที่ให้กำเนิดคลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยม	40
3.10	ผังวงจรไฟฟ้าคลื่นรูปพัลส์ที่ลดลงแบบเอกซ์โพเนนเชียล	41
3.11	เครื่องอิเล็กโทรพอเรชันที่ให้กำเนิดคลื่นรูปพัลส์ที่ลดลงแบบเอกซ์โพเนนเชียล	42
3.12	ระบบเครื่องอิเล็กโทรพอเรชัน (Eletroporation system) ที่ให้กำเนิดรูปพัลส์ที่ลดลงแบบเอกซ์โพเนนเชียล	42

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.13	ห้องบรรจุเซลล์ (Chamber) ที่มีระยะห่างระหว่างขั้วอิเล็กโทรด 0.1 cm (A) และ 0.2 cm (B)	43
3.14	ความสัมพันธ์ระหว่างความต่างศักย์ไฟฟ้าตกคร่อมที่ปรากฏของสารละลายชนิดต่าง ๆ(ระยะห่างระหว่างขั้วอิเล็กโทรด เท่ากับ 0.1 cm)	45
3.15	ความสัมพันธ์ระหว่างของกลีเซอรอลความเข้มข้นต่าง ๆ กับความต่างศักย์ไฟฟ้าตกคร่อมสารละลายที่ปรากฏที่ห้องบรรจุเซลล์ที่มีระยะห่างระหว่างขั้ว 0.1 cm	47
3.16	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาตร S1 และ S2 ต่อความต่างศักย์ไฟฟ้าตกคร่อมสารละลายที่ปรากฏเมื่อใช้ห้องบรรจุเซลล์ที่มีระยะห่างระหว่างขั้วเท่ากับ 0.1 cm และความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ให้ระบบเท่ากับ 1200 V	49
4.1	ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีแคลเซียมคลอไรด์ระหว่าง *E. coli* HB101กับพลาสมิด pUC18 ที่ปริมาณต่าง ๆ กัน	52
4.2	ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีแคลเซียมคลอไรด์ระหว่าง *E. coli* HB101 กับพลาสมิด pUC18 ปริมาณต่าง ๆ กัน ใช้เวลาในการบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 และ 120 วินาที	55
4.3	ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีแคลเซียมคลอไรด์ระหว่าง *E. coli* HB101 กับพลาสมิด pUC18 ปริมาณต่าง ๆ กัน เมื่อใช้ชนิดอาหาร LB และ SOC medium ในขั้นตอน Pre cultivation	57
4.4	ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีแคลเซียมคลอไรด์ระหว่าง *E. coli* HB101 กับพลาสมิด pUC18 ที่ปริมาณต่าง ๆ กัน ใช้เวลาในการบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเท่ากับ 90 และ 120 วินาทีในอาหาร LB และ SOC medium	60
5.1	ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันระหว่าง *E. coli* HB101 กับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 6.32 ng ที่ภาวะสนามไฟฟ้าความเข้มและเวลาต่าง ๆ กัน กดกระตุ้น 1 ครั้ง ในสารละลาย PEG4000 ความเข้มข้น 10% ที่มี $CaCl_2$ ความเข้มข้น 500 mM (50 µl)	65

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
5.2	ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน ระหว่าง *E. coli* HB101 กับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 6.32 ng และสารละลาย PEG4000ความเข้มข้น 10 %ที่มี $CaCl_2$ ความเข้มข้น 500 mM(50 µl) ภาวะสนามไฟฟ้า ความเข้ม 6 kV/cm เป็นเวลาเวลา 3 ms จำนวน pulse ต่างๆกัน	67
6.1	ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน ระหว่าง *E. coli* HB101 ที่ผสมสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้นต่าง ๆ กันใน อัตราส่วน 1 : 1 กับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 90 ng ที่สนามไฟฟ้าความเข้ม ต่าง ๆ กัน (EP) , 1 pulse	77
6.2	ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน ระหว่าง *E. coli* HB101 (50 µl) ที่ผสมสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 80% ในอัตราส่วนต่าง ๆ กันกับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 90 ng ที่สนามไฟฟ้าความเข้ม 5 kV/cm (EP) , 1 pulse	80
6.3	ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน ระหว่าง *E. coli* HB101 ที่ผสมสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 80% ในอัตราส่วน 1 : 6 (ความเข้มข้นกลีเซอรอลสุทธิเท่ากับ 69.8%) ปริมาตรต่าง ๆ กัน ผสมกับ พลาสมิด pUC18 ปริมาณ 90 ng ที่สนามไฟฟ้าความเข้ม 5 kV/cm(EP) , 1 pulse	83
6.4	ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน ระหว่าง *E. coli* HB101 ที่ผสมกับสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ในอัตราส่วน 1 : 6 (100 µl) กับพลาสมิด pUC18 = 90 ng ที่สนามไฟฟ้าความ เข้ม 5 kV/cm (EP). 1 pulse	86
6.5	ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเลกโทรพอเรชัน ระหว่าง *E. coli* HB101 ที่ผสมกับสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 80% ที่มีแคลเซี่ยม คลอไรด์ ความเข้มข้นต่างๆกัน ในอัตราส่วน 1 : 6 (100 µl) กับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 9 ng ที่สนามไฟฟ้าความเข้ม 5 kV/cm (EP), 1 pulse	89

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
6.6	ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน ระหว่าง *E. coli* HB101 (1 : 6) กับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 90 ng ที่ภาวะสนามไฟฟ้าความเข้มต่างๆกัน(EP)และจำนวน pulse ต่าง ๆ กัน.....	93
6.7	ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน ระหว่าง *E. coli* HB101 (1 : 6) กับพลาสมิด pBR322 ปริมาณ 90 ng ที่ภาวะสนามไฟฟ้าความเข้มต่างๆกัน(EP)และจำนวน pulse ต่าง ๆ กัน.....	95
6.8	โคโลนีในจานอาหารคัดเลือกที่เกิดจากการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน ระหว่าง *E. coli* HB101 (1 : 6) กับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 90 ng ที่ภาวะสนามไฟฟ้าความเข้ม 4 kV/cm, กดกระตุ้น 1 ครั้ง (pulse) (EP).....	97
6.9	โคโลนีในจานอาหารคัดเลือกที่เกิดจากการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน ระหว่าง *E. coli* HB101 (1 : 6) กับพลาสมิด pBR322 ปริมาณ 90 ng ที่ภาวะสนามไฟฟ้าความเข้ม 4 kV/cm, กดกระตุ้น 1 ครั้ง (pulse) (EP).....	98

คำย่อ

°C	-	องศาเซลเซียส
EP	-	คลื่นรูปพัลส์ที่ลดลงแบบเอกซ์โพเนนเชียล (Exponential decaying pulse)
g	-	กรัม
kV/cm	-	กิโลโวลต์ / เซนติเมตร (Kilovolt/centimeter)
ml	-	มิลลิลิตร
mM	-	มิลลิโมลาร์
ms	-	มิลลิวินาที (mellisecond)
ng	-	นาโนกรัม
rpm	-	รอบ/นาที (round per minute)
SP	-	คลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยม (Square wave pulse)
t/μg DNA	-	ทรานสฟอร์แมนท์ / ไมโครกรัมดีเอ็นเอ (transformant / microgam DNA)
V	-	โวลท์ (Volt)
μF	-	ไมโครฟารัด (microfared)
μl	-	ไมโครลิตร (microliter)
μS	-	ไมโครวินาที (microsecond)