บทที่ 6
การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน (Electroporation) ระหว่าง *E. coli* สายพันธุ์ HB101 กับพลาสมิด pUC18 และ pBR322 โดยใช้เครื่องอิเล็กโทรพอเรชันที่ให้กำเนิดคลื่นรูปพัลส์ที่ลดลงแบบเอกซ์โพเนนเชียล (Exponential decaying pulse)

ในบทที่ 5 ได้กล่าวถึงการใช้สนามไฟฟ้าคลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยมในกระบวนอิเล็กโทรพอเรชันแต่ผลที่ได้ไม่ดีนัก ในบทนี้จึงทำการทดลองใช้สนามไฟฟ้าคลื่นรูปพัลส์ที่ลดลงแบบเอกซ์โพเนนเชียล นำมาใช้ในกระบวนการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันระหว่าง *E. coli* HB101 กับพลาสมิด pUC18 และ pBR322 พร้อมกันนี้ได้ศึกษาปัจจัยทางไฟฟ้าและเคมีของสารละลายอิเล็กโทรพอเรชัน (Electroporation solution) ที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน โดยศึกษาในรายละเอียดดังหัวข้อต่อไปนี้

1. การศึกษาผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลต่อประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน (EP คือ คลื่นรูปพัลส์ที่ลดลงแบบเอกซ์โพเนนเชียล)

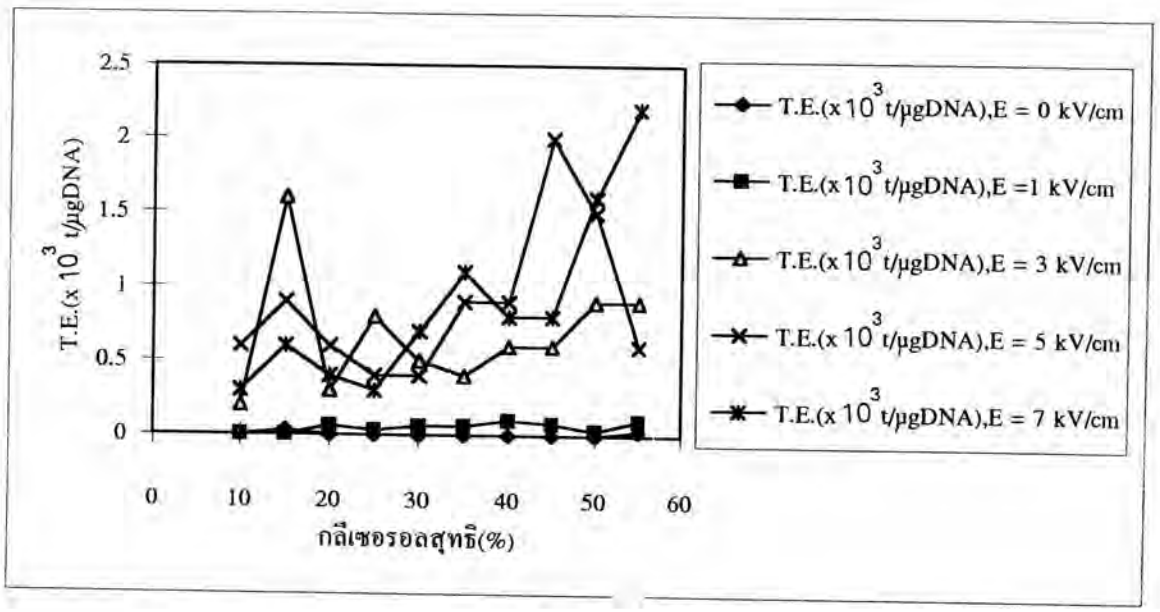
เนื่องจากในการทดลองจากบทที่ 3 พบว่าสารละลายกลีเซอรอลซึ่งมีมวลโมเลกุล 92.095 และมีสูตรโมเลกุล $CH_2OHCHOHCH_2OH$ มีความสามารถในการเกิดความต่างศักย์ไฟฟ้าตกคร่อมสารละลายที่ปรากฏมีค่าเท่ากับค่าต่างศักย์ไฟฟ้าที่ให้แก่ระบบ จึงนำมาใช้ในงานวิจัยนี้ โดยการทดลองนี้ได้ใช้ภาวะ *E. coli* HB101 (50 µl) ผสมกับสารละลายกลีเซอรอลแปรความเข้มข้นตั้งแต่ 10-100% ในอัตรส่วน 1 : 1 (v/v) แล้วนำไปใช้ในการทดลองครั้งละ 50 µl ผสมกับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 90 ng แล้วผ่านสนามไฟฟ้าความเข้ม 1 - 7 kV/cm , กดกระตุ้น 1 pulse ได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 6.1 และรูปที่ 6.1

ตารางที่ 6.1 ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันระหว่าง *E. coli* HB101 ที่ผสมสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้นต่างๆกัน ในอัตราส่วน 1:1(50 µl) กับพลาสมิด pUC18 เท่ากับ 90 ng ที่สนามไฟฟ้าความเข้มต่างๆกัน (EP) , 1 pulse

สารละลายกลีเซอรอล (% v/v)	กลีเซอรอลสุทธิ (% v/v)	E = 0 kV/cm		E = 1 kV/cm	
		โคโลนี (200 µl)	T.E. ($x10^3$ t/µg DNA)	โคโลนี (200 µl)	T.E. ($x10^3$ t/µg DNA)
10	10	0	0	0	0
20	15	1	0.03	0	0
30	20	0	0	2	0.06
40	25	0	0	1	0.03
50	30	0	0	2	0.06
60	35	0	0	2	0.06
70	40	0	0	4	0.1
80	45	0	0	3	0.08
90	50	0	0	1	0.03
100	55	1	0.03	4	0.1

ตารางที่ 6.1 (ต่อ) ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันระหว่าง *E. coli* HB101 ที่ผสมสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้นต่างๆกัน ในอัตราส่วน 1:1 (50 µl) กับพลาสมิด pUC18 เท่ากับ 90 ng ที่สนามไฟฟ้าความเข้มต่างๆกัน (EP) , 1 pulse

สารละลายกลีเซอรอล (% v/v)	กลีเซอรอลสุทธิ (% v/v)	E = 3 kV/cm		E = 5 kV/cm		E = 7 kV/cm	
		โคโลนี (200 µl)	T.E. ($x10^3$ t/µg DNA)	โคโลนี (200µl)	T.E. ($x10^3$ t/µg DNA)	โคโลนี (200 µl)	T.E. ($x10^3$ t/µg DNA)
10	10	7	0.2	20	0.6	13	0.3
20	15	57	1.6	34	0.9	23	0.6
30	20	10	0.3	23	0.6	15	0.4
40	25	30	0.8	16	0.4	9	0.3
50	30	19	0.5	13	0.4	25	0.7
60	35	13	0.4	31	0.9	38	1.1
70	40	23	0.6	31	0.9	30	0.8
80	45	21	0.6	71	2.0	28	0.8
90	50	34	0.9	53	1.5	56	1.6
100	55	34	0.9	23	0.6	80	2.2



รูปที่ 6.1 ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน ระหว่าง *E. coli* HB101 ที่ผสมสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้นต่าง ๆ ใน อัตราส่วน 1 : 1 กับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 90 ng ที่สนามไฟฟ้าความเข้มต่าง ๆ (EP) , 1 pulse

จากตารางที่ 6.1 และรูปที่ 6.1 จะเห็นได้ว่า ที่ภาวะการใช้สนามไฟฟ้าความเข้ม 5 kV/cm และสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 80% ให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันเท่ากับ 2×10^3 t/μg DNA ขณะที่ภาวะเดียวกันแต่ไม่ให้สนามไฟฟ้าได้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันเท่ากับ 0 t/μg DNA ดังนั้นสามารถบอกได้ว่า การทรานสฟอร์เมชันในครั้งนี้เกิดจากสนามไฟฟ้าที่เป็นคลื่นรูปพัลส์ที่ลดลงแบบเอกซ์โพเนนเชียล ร่วมกับสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 80% ถ้าขาดสนามไฟฟ้าหรือขาดสารละลายกลีเซอรอลอย่างใดอย่างหนึ่ง จะไม่ทำให้เกิดการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากสารละลายกลีเซอรอลที่เติมเข้าไปได้ช่วยปรับความต้านทานของสารละลายเซลล์ *E. coli* HB101 ที่รวมกับพลาสมิด pUC18 ให้มีค่าสูงขึ้นทำให้สนามไฟฟ้าผ่านเซลล์ได้มากขึ้นก่อให้เกิดกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชันขึ้นมา เมื่อพิจารณาผลการทดลองในตารางที่ 6.1 และรูปที่ 6.1 สนามไฟฟ้าความเข้มที่เหมาะสมคือ 3 - 5

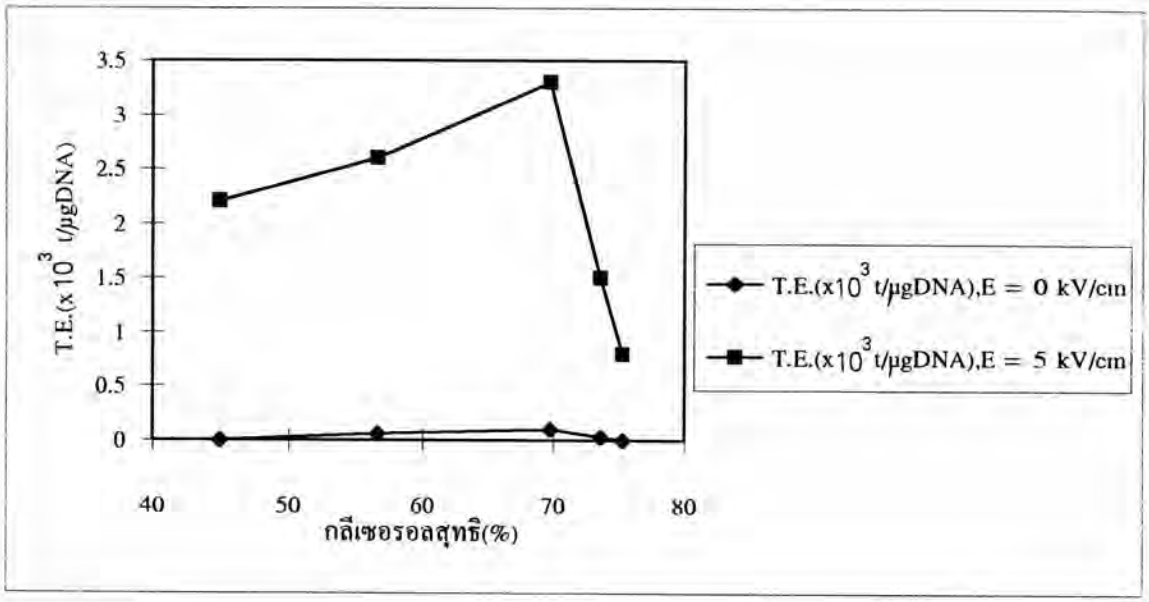
kV/cm จะทำให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันลดลงตามลำดับ ดังนั้น จึงเลือกใช้สนามไฟฟ้าที่เหมาะสมคือ 5 kV/cm ส่วนสารละลายกลีเซอรอลยิ่งความเข้มข้นสูงยิ่งให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันสูงขึ้น แต่ในการทดลองต่อไปได้เลือกใช้สารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 80% เนื่องจากว่าสามารถผสมกับเซลล์ *E. coli* HB101 ได้ดีกว่าการใช้สารละลายกลีเซอรอล ความเข้มข้น 90 และ 100% พร้อมกันนี้ยังให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันที่ค่อนข้างสูง เพราะฉะนั้นในการทดลองหัวข้อต่อไปใช้ภาวะสนามไฟฟ้าความเข้ม 5 kV/cm และใช้สารละลายอิเล็กโทรพอเรชัน คือ สารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 80% เพื่อศึกษาหาอัตราส่วนของปริมาตรเซลล์ต่อปริมาตรสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 80% ที่ก่อให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันที่ดีที่สุด

2. การศึกษาผลของอัตราส่วนโดยปริมาตรระหว่างเซลล์กับสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 80% ต่อประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน (EP)

ในการทดลองนี้ได้นำ *E. coli* HB101 (50 µl) ผสมกับสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 80% ที่แปรปริมาตรตั้งแต่ 50 - 700 µl แล้วนำมาใช้ในแต่ละการทดลองครั้งละ 50 µl ผสมกับพลาสมิด pUC18 เท่ากับ 90 ng แล้วให้สนามไฟฟ้าความเข้ม 5 kV/cm ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 6.2 และรูปที่ 6.2

ตารางที่ 6.2 ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันระหว่าง *E. coli* HB101 (50 µl) ที่ผสมสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 80% ในอัตราส่วนต่างๆกัน กับพลาสมิด pUC18 เท่ากับ 90 ng ที่สนามไฟฟ้าความเข้ม 5 kV/cm (EP) , 1 pulse

อัตราส่วนระหว่างเซลล์กับสารละลายกลีเซอรอล	กลีเซอรอลสุทธิ (% v/v)	E = 0 kV/cm		E = 5 kV/cm	
		โคโลนี (400 µl)	T.E. ($x10^3$ t/µg DNA)	โคโลนี (400 µl)	T.E. ($x10^3$ t/µg DNA)
1:1	45	0	0	155	2.2
1:2	56.6	2	0.06	190	2.6
1:6	69.8	4	0.1	235	3.3
1:10	73.6	1	0.03	109	1.5
1:14	75.3	0	0	54	0.8



รูปที่ 6.2 ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน ระหว่าง *E.. coli* HB101 (50 μl) ที่ผสมสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 80% ในอัตราส่วนต่างๆกันกับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 90 ng ที่สนามไฟฟ้าความเข้ม 5 kV/cm (EP) , 1 pulse

จากตารางที่ 6.2 และรูปที่ 6.2 จะเห็นว่าอัตราส่วนในการผสมเซลล์ *E. coli* HB101 กับสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 80% โดยปริมาตรที่เหมาะสมก็คือ อัตราส่วน 1 : 6 ได้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชัน เท่ากับ 3.3 x 10^3 t/μg DNA

เมื่อพิจารณาผลการทดลองในตารางที่ 6.2 และรูปที่ 6.2 ถ้าอัตราส่วนผสมระหว่างเซลล์ต่อสารละลายกลีเซอรอลโดยปริมาตรน้อยกว่า 1 : 6 เช่น อัตราส่วนระหว่างเซลล์ต่อสารละลายกลีเซอรอลโดยปริมาตรเท่ากับ 1 : 1 หรือ 1 : 2 จะทำให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันน้อยลงเนื่องมาจากความต้านทานไฟฟ้าของสารละลายยังมีค่าต่ำอยู่ จึงทำให้ความต่างศักย์ไฟฟ้าตกคร่อมเซลล์หรือสารละลายได้น้อย ทำให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันยังไม่สูงเท่าที่ควร แต่ถ้า อัตราส่วนระหว่างเซลล์ต่อสารละลายกลีเซอรอลโดยปริมาตรมากกว่า 1 : 6 เช่น 1 : 10 หรือ

1 : 14 ก็จะทำให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันน้อยลงเช่นเดียวกันเนื่องมาจาก จำนวนเซลล์ในสารละลายน้อยลงนั่นเอง

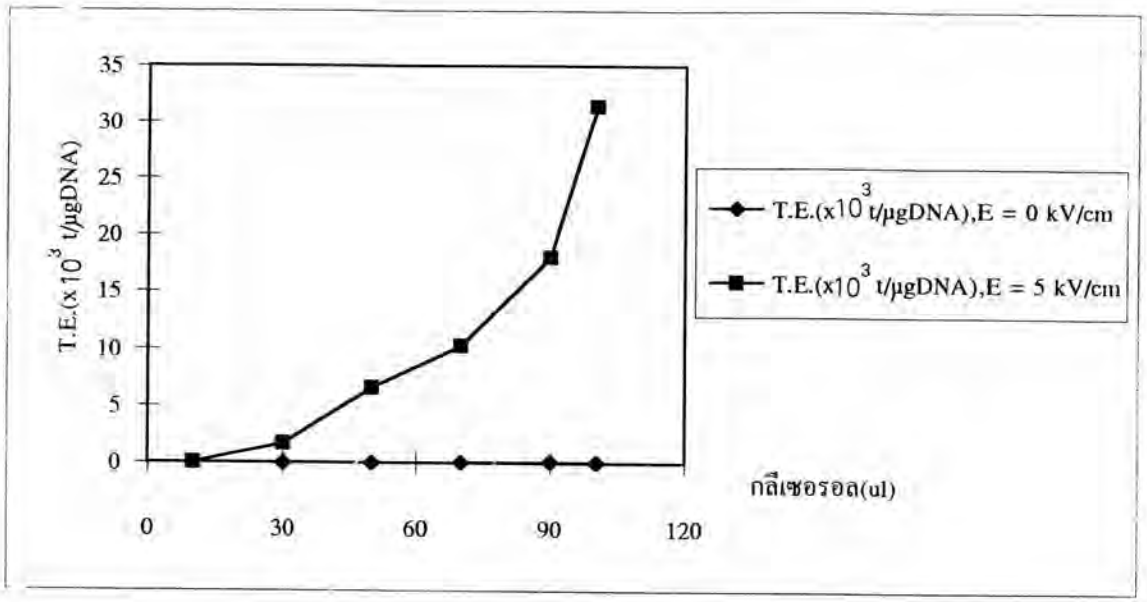
จากผลการทดลองดังตารางที่ 6.2 และรูปที่ 6.2 จึงเลือกอัตราส่วนผสมเซลล์ *E. coli* HB101 กับสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 80% โดยปริมาตรเท่ากับ 1 : 6 มาศึกษาต่อในหัวข้อเรื่องปริมาตรเซลล์ที่เหมาะสมในการทดลอง

3. การศึกษาผลของปริมาตรเซลล์ (1 : 6) ต่อประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน (EP)

ในการทดลองนี้ได้แปรปริมาตรเซลล์ที่ผสมกับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 90 ng ตั้งแต่ 10-100 µl (เนื่องจากห้องบรรจุเซลล์บรรจุได้มากที่สุด 100 µl) โดยใช้อัตราส่วนระหว่างปริมาตรเซลล์ต่อสารละลายกลีเซอรอล 80% (ความเข้มข้นกลีเซอรอลสุทธิ 69.8 %) เท่ากับ 1:6 ให้สนามไฟฟ้าความเข้ม 5 kV/cm กดกระตุ้น 1 ครั้ง ได้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 6.3 และรูปที่ 6.3

ตารางที่ 6.3 ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันระหว่าง *E. coli* HB101 ที่ผสมสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 80% ในอัตราส่วน 1:6 (ความเข้มข้นกลีเซอรอลสุทธิเท่ากับ 69.8 %) ปริมาตรต่างๆกัน ผสมกับพลาสมิด pUC18 เท่ากับ 90 ng ที่สนามไฟฟ้าความเข้ม 5 kV/cm (EP) , 1 pulse

ปริมาตรเซลล์ที่ผสมกับ pUC18 แล้วใส่ chamber (µl)	E = 0 kV/cm		E = 5 kV/cm	
	โคโลนี (200 µl)	T.E. ($x10^3$ t/µg DNA)	โคโลนี (200 µl)	T.E. ($x10^3$ t/µg DNA)
10	0	0	0	0
30	0	0	61	1.7
50	0	0	237	6.6
70	1	0.03	369	10.3
90	5	0.10	648	18.0
100	3	0.08	1129	31.4



รูปที่ 6.3 ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน ระหว่าง *E. coli* HB101 ที่ผสมสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 80% ในอัตราส่วน 1 : 6(ความเข้มข้นกลีเซอรอลสุทธิ 69.8 %) ปริมาตรต่าง ๆ กัน กับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 90 ng ที่สนามไฟฟ้าความเข้ม 5 kV/cm , (EP) 1 pulse

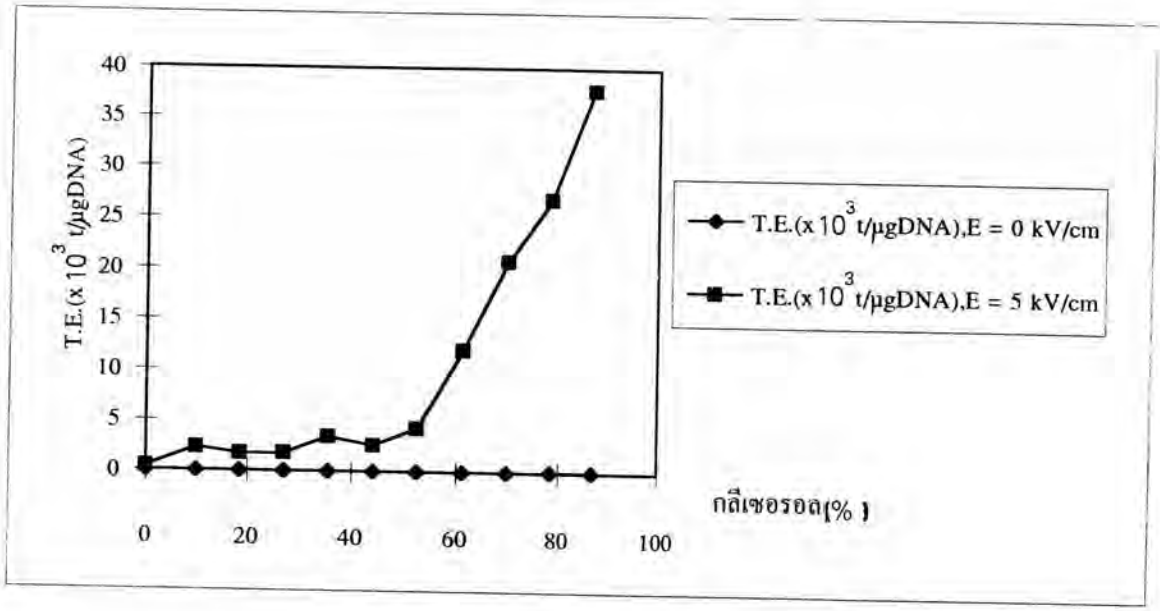
จากตารางที่ 6.3 และ รูปที่ 6.3 จะเห็นได้ว่า ปริมาตรที่ใส่ห้องบรรจุเซลล์ (chamber) ปริมาตร 100 μl ให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันเท่ากับ 3.14 x 10^4 t/μg DNA แต่ถ้าปริมาตรเซลล์ที่ใส่ chamber น้อยกว่านี้ จะทำให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันต่ำลง เนื่องจากปริมาตรเซลล์น้อยทำให้จำนวนเซลล์น้อยลงไปด้วยทำให้ได้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันลดลง จากผลการทดลองในตารางที่ 6.3 และรูปที่ 6.3 จึงใช้ภาวะ *E. coli* HB101 กับสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 80% ผสมกันในอัตราส่วน 1 : 6 (v/v) (ความเข้มข้นกลีเซอรอลสุทธิเท่ากับ 69.8%) แล้วนำไปทดลองครั้งละ 100 μl ผสมกับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 90 ng ไปศึกษาในเรื่องความเข้มข้นของสารละลายกลีเซอรอล

4. การศึกษาผลของความเข้มข้นกลีเซอรอลที่ผสมกับเซลล์ต่อประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน (EP)

ในการทดลองนี้ได้แปรความเข้มข้นของกลีเซอรอลตั้งแต่ 0 - 100% แล้วนำไปผสมกับ *E. coli* HB101 ในอัตราส่วน เซลล์ : สารละลายกลีเซอรอล (v/v) เท่ากับ 1 : 6 แล้วนำไปทดลองครั้งละ 100 µl ผสมกับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 90 ng ให้สนามไฟฟ้าความเข้ม 5 kV/cm, กดกระตุ้น 1 pulse ได้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 6.4 และรูปที่ 6.4

ตารางที่ 6.4 ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันระหว่าง *E. coli* HB101 ผสมกับสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้นต่างๆกันในอัตราส่วน 1:6 (100 µl) กับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 90 ng ที่สนามไฟฟ้าความเข้ม 5 kV/cm (EP) , 1 pulse

สารละลายกลีเซอรอล (% v/v)	กลีเซอรอลสุทธิ (% v/v)	E = 0 kV/cm		E = 5 kV/cm	
		โคโลนี (200 µl)	T.E. ($x10^3$ t/µg DNA)	โคโลนี (200 µl)	T.E. ($x10^3$ t/µg DNA)
0	-	0	0	14	0.4
10	10	0	0	83	2.3
20	18.5	0	0	61	1.7
30	27	0	0	65	1.8
40	35.6	0	0	121	3.4
50	44.1	0	0	94	2.6
60	52.7	1	0.03	153	4.3
70	61.2	1	0.03	430	12.0
80	69.8	0	0	748	20.8
90	78.3	2	0.06	967	26.9
100	86.9	2	0.06	1363	37.8



รูปที่ 6.4 ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน ระหว่าง *E. coli* HB101 ผสมกับสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้นต่าง ๆ กันในอัตราส่วน 1 : 6 (100 μl) กับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 90 ng ที่สนามไฟฟ้าความเข้ม 5 kV/cm

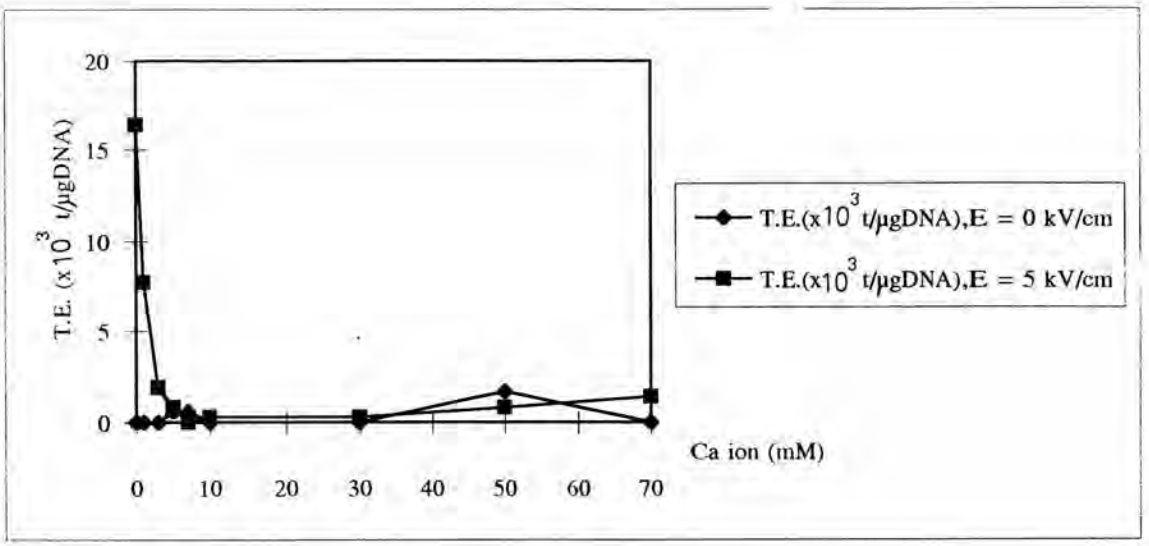
จากตารางที่ 6.4 และรูปที่ 6.4 จะเห็นได้ว่าการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายกลีเซอรอลมีผลทำให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันสูงขึ้น แม้ว่าการใช้สารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 100 % จะให้ผลการทดลองที่สูง แต่ก็มีปัญหาในเรื่องของการผสมกับเซลล์ให้เป็นเนื้อเดียวกันยาก เนื่องจากสารละลายมีความหนืดสูง จึงเลือกสารละลายกลีเซอรอล ความเข้มข้น 80% ไปใช้ในการศึกษาอิทธิพลแคลเซียมอิออนในการทดลองหัวข้อต่อไป

5. การศึกษาผลของแคลเซียมอิออนในสารละลายอิเล็กโทรพอเรชัน (สารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 80%) ต่อประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน (EP)

ในการศึกษาผลของแคลเซียมอิออนได้แปรความเข้มของอิออน ตั้งแต่ 0 - 70 mM ในสารละลายอิเล็กโทรพอเรชัน (สารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 80%) แล้วทดลองที่ภาวะ *E. coli* HB101 ผสมกับสารละลายอิเล็กโทรพอเรชันที่ประกอบด้วย สารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 80% ที่ผสมกับแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-70 mM (อัตราส่วน 1 : 6) ปริมาตร 100 µl ผสมกับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 9 ng ให้สนามไฟฟ้าความเข้มข้น 5 kV/cm กดกระตุ้น 1 ครั้ง ได้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 6.5 และรูปที่ 6.5

ตารางที่ 6.5 ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันระหว่าง *E. coli* HB101 (50 µl) ผสมกับสารละลายอิเล็กโทรพอเรชันที่ประกอบด้วยกลีเซอรอลความเข้มข้น 80% ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆกัน ในอัตราส่วน 1:6 (100 µl) กับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 9 ng ที่สนามไฟฟ้าความเข้ม 5 kV/cm (EP) , 1 pulse

ความเข้มข้นของแคลเซียมอิออน (mM)	E = 0 kV/cm		E = 5 kV/cm	
	โคโลนี (200 µl)	T.E. ($x10^3$ t/µg DNA)	โคโลนี (200 µl)	T.E. ($x10^3$ t/µg DNA)
0	0	0	59	16.4
1	0	0	28	7.7
3	0	0	7	1.9
5	2	0.6	3	0.8
7	2	0.6	0	0
10	0	0	1	0.3
30	0	0	1	0.3
50	6	1.7	3	0.8
70	0	0	5	1.4



รูปที่ 6.5 ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน ระหว่าง*E. coli* HB101 ผสมกับสารละลายอิเล็กโทรพอเรชันที่ประกอบด้วยสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 80% ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มต่าง ๆ กันในอัตราส่วน 1 : 6 (100 μl) กับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 9 ng ที่สนามไฟฟ้าความเข้ม 5 kV/cm (EP), 1 pulse

จากตารางที่ 6.5 และรูปที่ 6.5 จะเห็นได้ว่าการเติมแคลเซียมอิออนลงไปในสารละลายอิเล็กโทรพอเรชันเมื่อผ่านกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชันแล้วประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันจะลดลง แม้จะปริมาณเล็กน้อยเพียง 1 mM ดังจะเห็นได้ว่าจากภาวะที่ไม่มีแคลเซียมอิออนในสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 80% ได้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันเท่ากับ 1.64×10^4 t/μg DNA แต่ถ้ามีแคลเซียมอิออนเพียง 1 mM ในสารละลายกลีเซอรอล 80% จะได้ประสิทธิภาพเพียง 7.7×10^3 t/μg DNA ยิ่งความเข้มข้นแคลเซียมอิออนสูงขึ้นจะทำให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันลดต่ำลงตามลำดับ

6. การศึกษาอัตราการรอดชีวิตของ *E. coli* HB101 (1 : 6) ในกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชัน (EP)

โดยใช้ภาวะ *E. coli* HB101 ผสมกับสารละลายกลีเซอรอล ความเข้มข้น 80% อัตราส่วน 1 : 6 ปริมาตร 100 µl ผ่านสนามไฟฟ้าความเข้มต่าง ๆ กัน และจำนวนครั้งการกดกระตุ้น 1, 2 และ 3 pulse หลังจากนั้นก็ใช้ภาวะการ Precultivation เช่นเดียวกับกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชัน แล้วนำมาเจือจางเซลล์ในอัตราการเจือจางเซลล์ต่าง ๆ กัน แล้วกระจายเชื้อในจานอาหาร LB ได้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 6.6

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

สนามไฟฟ้า (kV/cm)	จำนวนโคโลนีที่รอดเฉลี่ย (10^x colony/100 µl)		
	1 pulse	2 pulse	3 pulse
0	5.2×10^{16}	5.2×10^{16}	5.2×10^{16}
1	3.3×10^{16}	2.8×10^{16}	1.6×10^{16}
3	0.0003×10^{16}	0.0002×10^{16}	0.0001×10^{16}
5	4.1×10^{10}	0.6×10^{10}	0.6×10^{10}
7	0.5×10^{10}	0.7×10^{10}	0.2×10^{10}

จากตารางที่ 6.6 ถ้าพิจารณาแล้วจะเห็นว่าความเข้มสนามไฟฟ้า มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ โดยยิ่งสนามไฟฟ้ามีความเข้มสูงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์จะต่ำลง

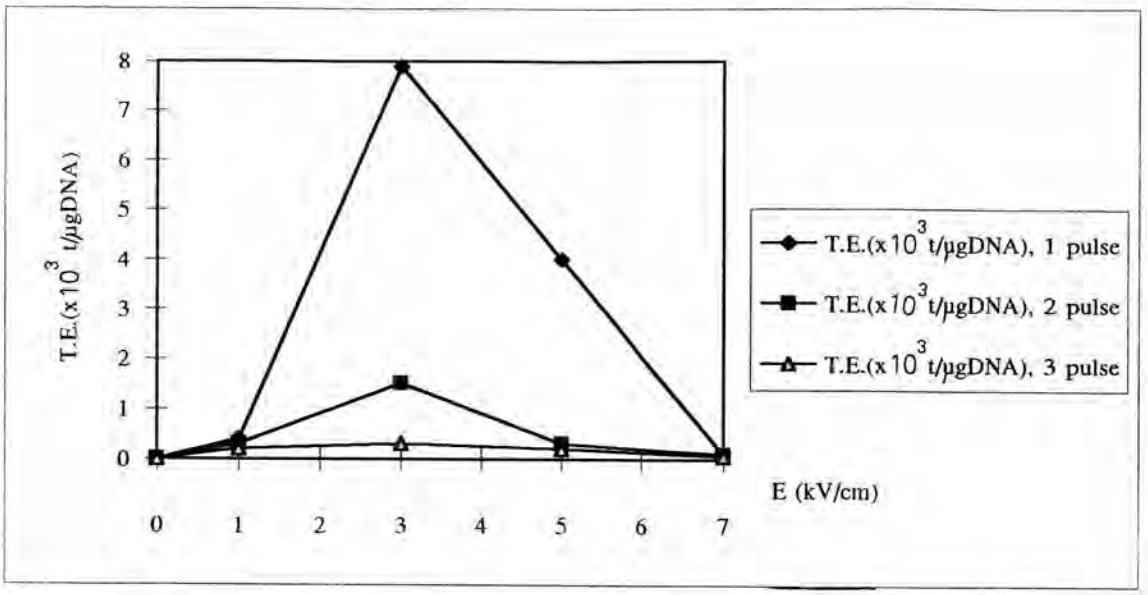
จากตารางที่ 6.6 จะเห็นว่า เมื่อสนามไฟฟ้าเพิ่มขึ้นจาก 1 kV/cm เป็น 5 kV/cm มีอัตราการรอดชีวิตลดลงจาก 10^{17} Colony/100 µl เหลือเพียง 10^{11} Colony/100 µl แสดงว่าสนามไฟฟ้าในช่วงนี้ก่อให้เกิดกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชัน แต่ถ้าสนามไฟฟ้าความเข้มสูงตั้งแต่ 5 kV/cm ขึ้นไป ทำให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันลดลง เนื่องจากอัตราการรอดชีวิตลดลงนั่นเอง

7. การศึกษาผลของจำนวนครั้งการกดกระตุ้นและความเข้มสนามไฟฟ้า(EP)ต่าง ๆ ต่อประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันระหว่าง *E. coli* HB101 กับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 90 ng

ได้ทำการแปรสนามไฟฟ้าความเข้มตั้งแต่ 0 - 7 kV/cm โดยใช้จำนวนครั้งการกดกระตุ้นเท่ากับ 1, 2 และ 3 pulse และใช้ภาวะ *E. coli* HB101 ผสมกับกลีเซอรอลความเข้มข้น 80% (อัตราส่วน 1 : 6) ปริมาตร 100 µl ผสมกับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 90 ng ได้ผลทางทดลองแสดงดังตารางที่ 6.7 และรูปที่ 6.6

ตารางที่ 6.7 ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันระหว่าง *E. coli* HB101 (1:6) กับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 90 ng ที่ภาวะสนามไฟฟ้า ความเข้มต่างๆกัน (EP) และจำนวน pulse ต่างๆกัน

สนามไฟฟ้า kV/cm	1 pulse		2 pulse		3 pulse	
	โคโลนี (400 µl)	T.E. ($x10^3$ t/µg DNA)	โคโลนี (400µl)	T.E. ($x10^3$ t/µg DNA)	โคโลนี (400 µl)	T.E. ($x10^3$ t/µg DNA)
0	0	0	0	0	0	0
1	34	0.4	23	0.3	15	0.2
3	570	7.9	107	1.5	23	0.3
5	282	4.0	23	0.3	12	0.2
7	10	0.1	7	0.1	5	0.07



รูปที่ 6.6 ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันระหว่าง *E. coli* HB101(1 : 6) กับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 90 ng ที่ภาวะสนามไฟฟ้าความเข้มต่างๆกัน (EP)และจำนวน pulse ต่าง ๆ กัน

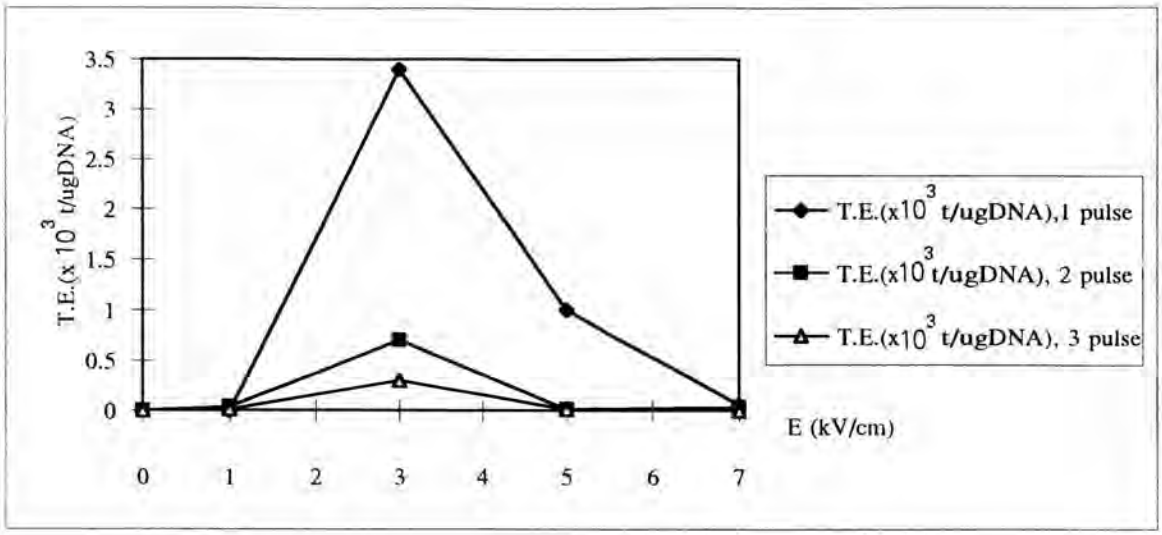
จากตารางที่ 6.7 และรูปที่ 6.6 จะเห็นได้ว่า ที่ภาวะสนามไฟฟ้าความเข้ม 3 kV/cm จำนวนครั้งการกดกระตุ้น 1 pulse ให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันสูงสุดเท่ากับ 7.9 x 10^3 t/μg DNA เมื่อใช้พลาสมิด pUC18 ปริมาณ 90 ng

8. การศึกษาจำนวนครั้งการกดกระตุ้น (pulse) และความเข้มสนามไฟฟ้าต่าง ๆ ต่อประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันระหว่าง *E. coli* HB101 กับพลาสมิด pBR322 ปริมาณ 90 ng

ในการทดลองนี้ได้ใช้พลาสมิด pBR322 และใช้ภาวะการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 7 เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมที่ให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันสูงสุดและเปรียบเทียบกับพลาสมิด pUC18 ได้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 6.8 และรูปที่ 6.7

ตารางที่ 6.8 ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันระหว่าง *E. coli* HB101 (1:6) กับพลาสมิด pBR322 ปริมาณ 90 ng ที่ภาวะสนามไฟฟ้าความเข้มต่างๆกัน (EP) และจำนวน pulse ต่างๆกัน

สนามไฟฟ้า (kV/cm)	1 pulse		2 pulse		3 pulse	
	โคโลนี (400 µl)	T.E. ($x10^3$ t/µg DNA)	โคโลนี (400 µl)	T.E. ($x10^3$ t/µg DNA)	โคโลนี (400 µl)	T.E. ($x10^3$ t/µg DNA)
0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	3	0.04	1	0.01
3	242	3.4	50	0.7	22	0.3
5	70	1.0	1	0.01	1	0.01
7	4	0.06	3	0.04	0	0



รูปที่ 6.7 ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน ระหว่าง *E. coli* HB101(1 : 6) กับพลาสมิด pBR322 ปริมาณ 90 ng ที่ภาวะสนามไฟฟ้าความเข้มต่างๆกัน (EP) และ จำนวน pulse ต่าง ๆ กัน

จากตารางที่ 6.8 และรูปที่ 6.7 จะเห็นว่าที่ภาวะสนามไฟฟ้าความเข้ม 3 kV/cm, 1 pulse ให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันเท่ากับ 3.4 x 10^3 t/µg DNA สำหรับพลาสมิด pBR322 ปริมาณ 90 ng

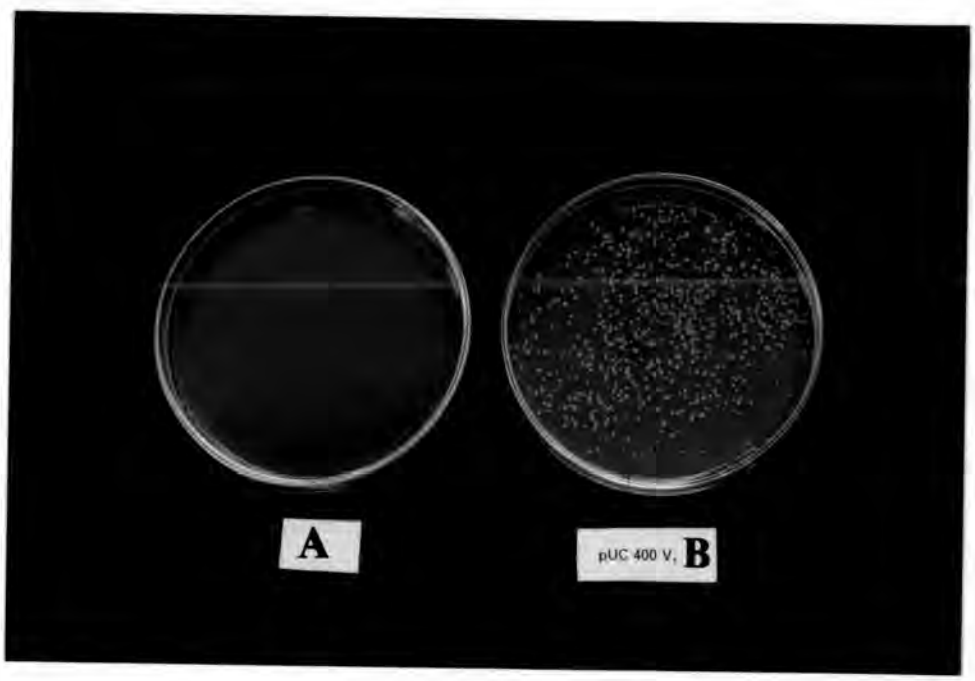
9. การศึกษาภาวะสนามไฟฟ้าที่เหมาะสมที่สุดในการทรานสฟอร์เมชัน โดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันระหว่าง *E. coli* HB101 (1 : 6) กับพลาสมิด pUC18 และ pBR322

จากการทดลองในหัวข้อ 7 และ 8 ได้นำมาหาสนามไฟฟ้าความเข้มที่เหมาะสมที่อยู่ระหว่าง 3 - 5 kV/cm ว่ามีประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันเป็นอย่างไร โดยใช้ภาวะการทดลองเช่นเดียวกับในหัวข้อ 7 และ 8 ได้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 6.9

ตารางที่ 6.9 ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันระหว่าง *E. coli* HB101 (1:6) กับพลาสมิด pUC18 และ pBR 322 ปริมาณ 90 ng ที่ภาวะสนามไฟฟ้าความเข้ม 3 และ 4 kV/cm (EP) , 1 pulse

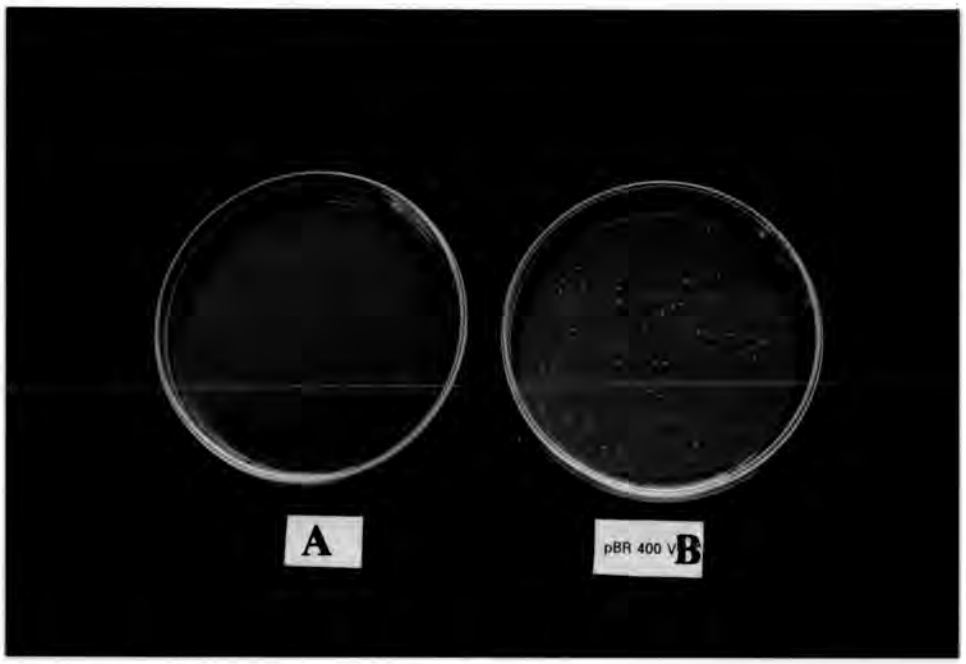
พลาสมิด (90 ng)	E = 3 kV/cm		E = 4 kV/cm	
	โคโลนี (400 µl)	T.E. ($x10^3$ t/µg DNA)	โคโลนี (400 µl)	T.E. ($x10^3$ t/µg DNA)
pUC18	1142	31.7	2136	59.3
pBR322	142	3.9	176	5.0

จากตารางที่ 6.9 จะเห็นได้ว่า ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันสูงสุด ระหว่าง *E. coli* HB101 (1 : 6) กับพลาสมิด pUC18 และ pBR322 ปริมาณ 90 ng ที่สนามไฟฟ้าความเข้ม 4 kV/cm เท่ากับ 5.93 x 10^4 t/µg pUC18 และ 5.0 x 10^3 t/µg pBR322 ตามลำดับ ในขณะที่ภาวะไม่มีสนามไฟฟ้าได้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันเท่ากับ 0 แสดงดังรูปที่ 6.8 และ รูปที่ 6.9



รูปที่ 6.8 โคโลนีในจานอาหารคัดเลือกที่เกิดจากการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันระหว่าง*E. coli* HB101(1:6) กับพลาสมิด pUC18ปริมาณ 90 ng ที่ภาวะสนามไฟฟ้าความเข้ม 4 kV/cm กดกระตุ้น 1 ครั้ง (pulse) (EP)

A : ภาวะที่ไม่ให้สนามไฟฟ้า B : ให้สนามไฟฟ้าความเข้ม 4 kV/cm กดกระตุ้น 1 ครั้ง



รูปที่ 6.9 โคโลนีในจานอาหารคัดเลือกที่เกิดจากการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน ระหว่าง *E. coli* HB101 (1 - 6) กับพลาสมิด pBR322 ปริมาณ 90 ng ที่ภาวะสนามไฟฟ้าความเข้ม 4 kV/cm, กดกระตุ้น 1 ครั้ง (pulse) (EP)
A : ภาวะที่ไม่ให้สนามไฟฟ้า B : ให้สนามไฟฟ้าความเข้ม 4 kV/cm กดกระตุ้น 1 ครั้ง

เมื่อพิจารณาผลการทดลองในตารางที่ 6.9 จะเห็นว่าที่สนามไฟฟ้าความเข้ม 4 kV/cm ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันระหว่าง *E. coli* HB101 กับพลาสมิด pUC18 มีประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันสูงกว่าประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชัน ระหว่าง *E. coli* HB101 กับพลาสมิด pBR322 เนื่องมาจากพลาสมิด pUC18 มีขนาดเล็กกว่า พลาสมิด pBR322 โดยที่พลาสมิด pUC18 มีขนาด 2.69 kb และพลาสมิด pBR322 มีขนาด 4.36 kb ดังแสดงในภาคผนวก จ

สรุป

การทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันโดยใช้เครื่องอิเล็กโทรพอเรชันที่ให้คลื่นรูปพัลส์ที่ลดลงแบบเอกซ์โพเนนเชียล ที่ประดิษฐ์ขึ้นพบว่า ภาวะที่เกิดการทรานสฟอร์เมชันได้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันสูงสุดสำหรับ *E. coli* HB101 กับพลาสมิด pUC18 และ pBR322 คือ *E. coli* HB101 (50 µl) ผสมกับสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 80% ในอัตราส่วน 1 : 6 ปริมาตร 100 µl รวมกับพลาสมิด pUC18 และ pBR322 ปริมาณ 90 ng ที่ภาวะสนามไฟฟ้าความเข้ม 4 kV/cm กดกระตุ้น 1 pulse ได้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชัน เท่ากับ 5.93×10^4 t/µg pUC18 และ 5.0×10^3 t/µg pBR322 ตามลำดับ