ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ประสิทธิภาพทรานสฟอร์เมชันใน *E. coli* โดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน
ชื่อผู้เขียน	นายวีระชัย ตีรอรุณศิริ
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	สาขาวิชาชีววิทยา
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	รศ. ดร. สมบูรณ์ อนันตลาโภชัย ประธานกรรมการ รศ. ดร. ทิพวรรณ สิงห์ไตรภพ กรรมการ ดร. ยิ่งมณี บุณยเกียรติ กรรมการ

บทคัดย่อ

ศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการส่งถ่ายดีเอ็นเอโดยวิธีทรานสฟอร์เมชัน (transformation efficiency) ของ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α โดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันในครั้งนี้ได้แก่ ขนาดของพลาสมิด, ความเข้มข้นของพลาสมิด, ความเข้มข้นของกลีเซรอล และระยะเวลาที่สามารถเก็บรักษาเซลล์คอมพิเทนท์ในอุณหภูมิ –20 °C พลาสมิด pUC19, p35S-GFP และ pBI221 ซึ่งมีขนาด 2.7, 4.5 และ 5.7 kb ใช้ในการส่งถ่ายเข้าแบคทีเรียที่ปริมาณเซลล์ 10^8 cells/ml พบว่ามีประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันดังนี้คือ 5.33 x 10^6, 2.93 x 10^6 และ 1.32 x 10^4 transformants/μg ตามลำดับ พลาสมิด p35S-GFP ถูกเลือกเพื่อใช้ศึกษาในการทดลองต่อมา เนื่องจากเป็นพลาสมิดที่มีขนาดและประสิทธิภาพเหมาะสม จากการศึกษาประสิทธิภาพการส่งถ่าย p35S-GFP ที่ปริมาณ 10, 100 และ 500 ng พบว่ามีจำนวนเซลล์ที่ได้รับพลาสมิด (transformants) ดังนี้คือ 2.60 x 10^4, 1.18 x 10^5 และ 6.44 x 10^5 transformants/ml ตามลำดับ ในการศึกษาความเข้มข้นกลีเซอรอลที่ใช้ในการเก็บรักษาเซลล์คอมพิเทนท์ที่ 10, 15 และ 20 % (v/v) ได้ประสิทธิภาพดังนี้คือ 1.51 x 10^6, 5.40 x 10^5 และ 3.1 x 10^5 transformants/μg เมื่อเก็บรักษาเซลล์คอมพิเทนท์ที่อุณหภูมิ –20 °C พบว่าภายในระยะเวลา 1 เดือน ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันของเซลล์คอมพิเทนท์ที่เก็บรักษาในสารละลายกลีเซอรอลทุกระดับความเข้มข้นจะลดลงอย่างรวดเร็วถึง 100 เท่า ส่วนเซลล์ที่เก็บรักษาในน้ำกลั่นประสิทธิภาพหมดลง เมื่อทำการเก็บรักษาเป็นระยะ

เวลา 2 เดือน ในการเก็บรักษาเซลล์คอมพิเทนท์ในสารละลายกลีเซรอลทุกความเข้มข้นสามารถเก็บรักษาได้ถึง 5 เดือน แต่ประสิทธิภาพจะลดลงประมาณ 10,000 เท่า ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการส่งถ่ายดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันกับวิธี heat shock โดยการส่งถ่ายพลาสมิด pUC19, p35S-GFP และ pBI221 พบว่าวิธีอิเล็กโทรพอเรชันให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันดีกว่าประมาณ 100 – 1,000 เท่า

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

Thesis Title	Transformation Efficiency in *E.coli* by Electroporation
Author	Mr. Werachai Tera-Arunsiri
M.S.	Biology
Examining Committee	Assoc. Prof. Dr. Somboon Anuntalabhochai Chairperson
	Assoc. Prof. Dr. Tippawan Singtripop Member
	Dr. Yingmanee Boonyakait Member

Abstract

To establish an optimal condition for transformation in *Escherichia coli* strain DH5α under several factors by electroporation were investigated. These factors were plasmid sizes, DNA concentrations, glycerol concentrations for storage competent cells and storage time of competent cell at –20 °C. Three different plasmids named pUC19 (2.7 kb), p35S-GFP(4.5 kb) and pBI221 (5.7 kb) were chosen to transform the cells with number of 10^8 cells/ml. Their transformation efficiency were 5.33 x 10^6, 2.93 x 10^6 and 1.32 x 10^5 transformants/μg respectively. The plasmid p35S-GFP was selected for further analysis because of its appropriate size and transformation efficiency. In order to vary plasmid concentration for transformation, three different concentrations, 10, 100 and 500 ng, were performed. The number of transformants were 2.60 x 10^4, 1.18 x 10^5 and 6.44 x 10^5 transformants/ml respectively. Concerning for investigation the competent cells storaging in different glycerol concentrations, three concentrations including 10, 15 and 20 % (v/v) were resuspended to the cells and kept at –20 °C from 1 – 5 month. At the first month, after electrotransformation, the efficiency were 1.51 x 10^6, 5.40 x 10^5 and 3.10 x 10^5 transformants/μg respectively. Consequently, the efficiency was decreased 100 fold in the second month of the storage in all glycerol dilutions.

Whereas the efficiency of the control (the cells resuspended in distilled water) wasn't detected at the second month. Although the competent cells could store in glycerol for 5 month, the efficiency was decreased 10,000 fold. The electroporation technique exhibited high efficiency in bacterial transformation than heat shock technique with a factor of 100 to 1,000 fold.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University